



Łukasiewicz

Instytut Chemii Przemysłowej

**Synteza, charakterystyka oraz badanie oddziaływań
substancji farmaceutycznych z dwuwymiarową
i trójwymiarową powierzchnią złota do zastosowań
biomedycznych**

Dr n. farm. Elżbieta Urszula Stolarczyk

Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej

Zakład Analityczny

ul. Rydygiera 8

01-793 Warszawa



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Część badań finansowana z NCN

Autoreferat przedstawia omówienie dorobku i osiągnięć naukowych do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Warszawa, 2021



Spis treści

1. Prezentacja informacji ogólnych.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm).	5
4.A. Tytuł osiągnięcia naukowego:.....	5
4.B. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.	5
4.C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	46
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	48
7. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze.	50
7.A. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora. Wykaz publikacji w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.....	50
7.B. Omówienie działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia naukowego doktora bez pozycji wymienionych w punkcie 4. Wykaz publikacji w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.	52
7.C. Udział w projektach badawczych.....	56
7.D. Uzyskane i zgłoszone patenty.	59
7.E. Nagrody za działalność naukową.	60
Piśmiennictwo	60

1. Prezentacja informacji ogólnych.

Imię i nazwisko: Elżbieta Urszula Stolarczyk (nazwisko panięskie Sałamaj).

Podsumowanie przebiegu pracy naukowo-badawczej:

W 2000 r. uzyskałam tytuł magistra, w 2009 r. tytuł doktora nauk farmaceutycznych.

Od 09.2000 r. do 06.2020 r. zatrudniona byłam w Instytucie Farmaceutycznym, specjalność: chemia analityczna, spektrometria mas, chromatografia gazowa, nanotechnologia. Od 2009 r. zatrudniona byłam na stanowisku adiunkta w Pracowni Chromatografii Gazowej. Brałam udział w projektach badawczych syntez substancji czynnych, których celem było opracowanie technologii. Jako referent analityczny nadzorowałam oraz opracowywałam metody z zastosowaniem technik chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz chromatografii gazowej (GC-FID, GC-HS, GC-MS). Prowadziłam również badania podstawowe w zakresie zaprojektowania selektywnych nośników leków substancji przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych i syntezy materiałów kompozytowych złożonych z nanocząstek złota i substancji czynnych. Celem mojej pracy była charakterystyka fizykochemiczna nowych koniugatów oraz określenie mechanizmów oddziaływań poprzez opracowaniu odpowiedniej metodologii analitycznej.

Od 06.2020 r. do obecnie, pracuję na stanowisku głównego specjalisty w Zespole Analityki Badawczej, w Zakładzie Analitycznym, w Departamencie Badawczym w Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej. Do głównych moich obowiązków należy opracowywanie metod i wykonywanie analiz identyfikacji zanieczyszczeń organicznych w substancjach czynnych, w tym również zanieczyszczeń genotoksycznych w projektach realizowanych w Instytucie i na zlecenia zewnętrzne, przygotowywanie sprawozdań dotyczących badania pozostałości rozpuszczalników i lotnych substancji organicznych, przygotowywanie planów i raportów z walidacji metod analitycznych. Jestem specjalistą w zakresie analiz technikami GC-FID, GC-FID (HS), GC-MS, LC-MS/MS, ICP-MS. Kontynuuję również prace związane z syntezą i charakterystyką selektywnych nośników substancji czynnych. Mój dorobek obejmuje:

- **34** publikacje, w tym **17** z ostatnich 5 lat, w **23** publikacjach jestem pierwszym autorem i/lub autorem korespondencyjnym
- **3** zgłoszenia patentowe/patenty
- **39** streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych
- Udział w grantach i kontraktach przemysłowych:
lider, referent analityczny lub wykonawca prac analitycznych w projektach/grantach: Projekty UE (2), POIG (15), INNOTECH (3), INNOMED (2), NCN (2), Inicjatywa Technologiczna (6), projekty przemysłowe (12)
- sumaryczny *impact factor*, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **59,605**, łączna punktacja MEiN: **1476**

- indeks Hirscha (h) według bazy Scopus: 6

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

07.2000 r. Stopień magistra chemii.

Pracę magisterską pt.: „Zastosowanie kolumn porfiryńowych do chromatografii anionów” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Pyrzyńskiej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w Pracowni Analizy Przepływowej i Chromatografii kierowanej przez prof. dr hab. Marka Trojanowicza.

12.2009 r. Stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Rozprawę doktorską pt.: „Opracowanie metod oznaczania profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych latanoprost i kwetiapina z zastosowaniem chromatografii i spektrometrii mas” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Kutnera w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie i obroniłam na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 07.1998 r. – zatrudniona na umowę zlecenie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego – opracowanie metody specyficznego oznaczania żelaza w wodach naturalnych.
- 09.2000 r. – 01.2001 r. – zatrudniona w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie na stanowisku specjalisty inżynierji – technicznego, miejsce pracy: Zakład Kontroli Jakości i Analityki Badawczej.
- 01.2001 r. - 02.2007 r. – zatrudniona w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie na stanowisku asystenta, miejsce pracy: Zakład Kontroli Jakości i Analityki Badawczej.
- 02.2007 r. – 12.2009 r. - zatrudniona w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie na stanowisku asystenta, miejsce pracy: Pracownia Chromatografii Gazowej, Zakład Analityki Badawczej, Laboratorium Badań Strukturalnych Wydziału Chemii UW (LBS-UW).
- 01.2010 r. – 05.2020 r. - zatrudniona w Instytucie Farmaceutycznym na stanowisku adiunkta, miejsce pracy: Pracownia Chromatografii Gazowej, Zakład Analityki Badawczej.

- 05.2020 r. – do obecnie - zatrudniona w Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Chemii Przemysłowej, w Zakładzie Analitycznym, w Zespole Analityki Badawczej na stanowisku głównego specjalisty, miejsce pracy: Laboratorium Chromatografii Gazowej, Laboratorium Spektrometrii Mas.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm).

4.A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

Synteza, charakterystyka oraz badanie oddziaływań substancji farmaceutycznych z dwuwymiarową i trójwymiarową powierzchnią złota do zastosowań biomedycznych.

4.B. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Monotematyczny cykl osiągnięcia naukowego obejmuje sześć oryginalnych publikacji z lat 2017-2021, w których jestem pierwszym i głównym autorem publikacji, a w pięciu jestem również autorem korespondencyjnym. Łączna wartość współczynnika oddziaływania publikacji (IF) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **26,799**, a łączna liczba punktów MEiN wynosi **380**. Średni IF na publikację wynosi **4,466**. Współczynnik IF i liczba punktów MEiN są wpisane z roku ukazania się publikacji.

* autor korespondencyjny

^ publikacje bez udziału pracownika z tytułem profesora lub dr hab. z roku ukazania się publikacji.

Lp.	Publikacja	IF	MEiN
H1.	E. U. Stolarczyk ^{*^} , K. Stolarczyk, M. Łaszcz, M. Kubiszewski, W. Maruszak, W. Olejarz, D. Bryk, <i>Synthesis and characterization of genistein conjugated with gold nanoparticles and the study of their cytotoxic properties</i> , European Journal of Pharmaceutical Sciences , 96 (2017) 176 : https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.019	3,466	35
H2.	E. U. Stolarczyk [*] , K. Stolarczyk, M. Łaszcz, M. Kubiszewski, A. Leś, O. Michalak, <i>Pemetrexed conjugated with gold nanoparticles – Synthesis, characterization and a study of noncovalent interactions</i> ,	3,466	35

	European Journal of Pharmaceutical Sciences 109 (2017) 13: 10.1016/j.ejps.2017.07.011		
H3.	E.U. Stolarczyk* , M. Łaszcz, A. Leś, M. Kubiszewski, K. Kuziak, K. Sidoryk, K. Stolarczyk, <i>Design and Molecular Modeling of Abiraterone-Functionalized Gold Nanoparticles</i> , Nanomaterials, 8(9) (2018) 641: https://doi.org/10.3390/nano8090641	4,034	35
H4.	E.U. Stolarczyk^ , K. Sidoryk, M. Cybulski, M. Kubiszewski, K. Stolarczyk*, <i>Design of Therapeutic Self-assembled Monolayers of Thiolated Abiraterone</i> , Nanomaterials 8(12) (2018) 1018: https://doi.org/10.3390/nano8121018	4,034	35
H5.	E.U. Stolarczyk* , A. Leś, M. Łaszcz, M. Kubiszewski, W. Strzempek, E. Menaszek, M. Fussaro, K. Sidoryk, K. Stolarczyk, <i>The ligand exchange of citrates to thioabiraterone on gold nanoparticles for prostate cancer therapy</i> , International Journal of Pharmaceutics 583 (2020) 119319: DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119319	5,875	100
H6.	E.U. Stolarczyk* , W. Strzempek, M. Łaszcz, A. Leś, E. Menaszek, K. Sidoryk, K. Stolarczyk, <i>Anti-Cancer and Electrochemical Properties of Thiogenistein—New Biologically Active Compound</i> , International Journal of Molecular Sciences 22 (2021) 8783: https://doi.org/10.3390/ijms22168783	5,924	140
		SUMA 26,799	380

Średni Impact Factor na publikację wynosi: **4,466**

4.C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Nowotwory należą do głównych chorób, które są przyczyną zgonów na całym świecie. W 2018 r. odnotowano 18,1 mln nowych przypadków i 9,5 mln zgonów z powodu raka. Według raportu National Cancer Institute (NCI) [1], szacuje się, że do 2040 r. liczba nowych przypadków odnotowanych w ciągu roku wzrośnie do 29,5 mln, a liczba zgonów z powodu raka do 16,4 mln. Przewiduje się więc, że liczba pacjentów onkologicznych będzie rosła, ponieważ coraz więcej społeczeństw świata starzeje się, wzrasta także ekspozycja na czynniki

mutagenne i rakotwórcze, zmieniające nawyki żywieniowe, zachowania społeczno-kulturowe (np. brak aktywności fizycznej, palenie tytoniu i inne używki) oraz szybka industrializacja.

Leczenie chorób nowotworowych jest procesem długotrwałym, dlatego tak istotnym czynnikiem jest odpowiedni dobór terapii. Oprócz zabiegów chirurgicznych i radioterapii, główną pozycję w leczeniu nowotworów zajmuje chemioterapia z zastosowaniem niskocząsteczkowych cytostatyków. Ich działanie jest jednak ograniczone poprzez krótki okres półtrwania, małą selektywność i liczne działania uboczne (m. in. uszkodzenie zdrowych komórek, wypadanie włosów, osłabienie odporności organizmu). Dlatego terapia przeciwnowotworowa poddawana jest ciągłym modyfikacjom, a poszukiwanie nowych terapii stało się odpowiedzią na konieczność różnicowania leczenia, kontroli objawów ubocznych, kontroli czasu do wystąpienia progresji choroby, a przede wszystkim zwiększenia czasu przeżycia [2]. Wyniki tych badań wskazują, że uzasadnione jest poszukiwanie leków o mniejszej toksyczności oraz przede wszystkim leków ograniczających swoje działanie do ogniska nowotworowego (tzw. leki celowane). Z jednej strony czytamy o poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych, o syntezie nowych analogów o zwiększonej cytotoksyczności, a z drugiej strony słyszymy o niewielkiej efektywności tych prac, które weryfikują badania kliniczne. Konsekwencją tego jest brak nowych, wysoce wydajnych leków przeciwnowotworowych, czego efektem jest oporność wielolekowa i oporność komórek nowotworowych na dobrze znane leki.

Już w 1891 r. Paul Ehrlich podał wstępną definicję dostarczania leków, wg której „leki mają być transportowane w odpowiednim stężeniu do odpowiedniego miejsca i w odpowiednim czasie”. Od tego czasu dużo się zmieniło, ale nadal ważne i naglące jest opracowanie efektywnych strategii leczenia opartych na wielofunkcyjnych nośnikach umożliwiających ukierunkowane dostarczania chemioterapeutyków. Główne zalety stosowania nośników leków związane są więc z większą precyzją w leczeniu i dostarczaniu leków (zwiększenie dostaw do komórek docelowych), z mniejszą toksycznością, a jednocześnie większą efektywnością leczenia (zmniejszenie toksycznego oddziaływania uwalnianego leku na organy i tkanki nie biorące udział w leczeniu). Aktualne badania potwierdzają, że obiecującym podejściem w tym kierunku jest zastosowanie nanocząstek złota jako nośników leków, które mogą zwiększać selektywność oraz skuteczność leków. Ich ogromny potencjał wiąże się z szeroką możliwością modyfikacji powierzchni, rozmiaru i kształtu. Dodatkowo, zdolność pochłaniania i rozpraszania promieniowania elektromagnetycznego takiego układu może zostać wykorzystana również w terapii fototermicznej, co może być podstawą innowacyjnych terapii [3, 4].

Metaliczne złoto ma całkowicie zapełnioną podpowłokę 5d w strukturze elektronowej oraz względnie wysoką energią jonizacji (9,22 eV) i jako metal szlachetny ma niewielkie zastosowanie katalityczne. W odróżnieniu od metalicznego złota, nanocząstki złota wykazują dużą aktywność katalityczną. Właściwości ich zależą od procesów zachodzących na powierzchni, gdzie stosunek powierzchni do objętości jest znaczny, a więc odwrotnie niż w przypadku materiału objętościowego (metaliczne złoto), dla którego

parametry fizyczne są zawsze zdominowane przez właściwości makroskopowe materiału. Skutkiem zmniejszania rozmiarów do skali nano jest znaczne zwiększenie powierzchni właściwej granic ziaren w jednostce objętości. Bardziej rozwinięta powierzchnia ma znaczący wpływ m.in. na reaktywność materiałów, właściwości adsorpcyjne, aktywność biologiczną, co może być wykorzystane w leczeniu chorób nowotworowych i chorób wywołanych przez drobnoustroje chorobotwórcze. Duże znaczenie ma również rozkład wielkości nanokrystalitów, dlatego cząstki te, w porównaniu do większych struktur, mają nie tylko odmienne ale i często korzystniejsze właściwości fizyczne, chemiczne, elektryczne, mechaniczne i optyczne. Czynniki te wpływają również na unikalne właściwości biologiczne nieorganicznych nanocząstek i kombinacje nieorganicznych nanocząstek z organicznymi substancjami w formie hybryd.

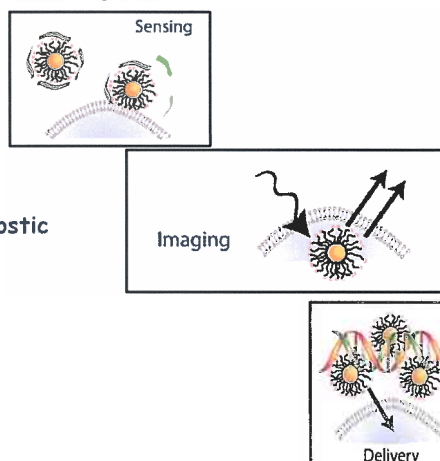
Od kształtu i rozmiaru zależą również właściwości optyczne i elektryczne nanocząstek złota. Nanocząstki złota pochłaniają promieniowanie z szerokiego zakresu, zaś emitują promieniowanie, które jest ściśle zależne od średnicy nanocząstki. Widma absorpcji nanokryształów metali występują w zakresie widzialnym i są zdominowane przez pasma plasmonu (SPR - zjawisko rezonansu plazmonu powierzchniowego). Absorpcja ta występuje z powodu współwzbudzenia gazu elektronowego powierzchniowych atomów i jest charakterystyczna dla nanokryształów metali o odpowiednich rozmiarach. Obserwowane pasmo odpowiada przerwie energetycznej pomiędzy pasmem walencyjnym, a pasmem przewodnictwa. Roztwory monodispersyjnych nanocząstek złota mają zatem barwę zależną od ich średnicy. Badania spektroskopowe pokazały, że w widmie nanocząstek złota o średnicy od 5 do 50 nm obserwuje się pasmo absorpcji przy około 520 nm, które nie jest obserwowane ani dla objętościowej fazy złota, ani dla nanocząstek złota o średnicy poniżej 5 nm [5, 6]. Pasma SPB dostarcza informacji na temat struktury elektronowej nanocząstek. Opisywane zjawisko zostało wyjaśnione w 1908 roku przez Mie [7]. Na położenie tego pasma, jego szerokość i intensywność w widmie absorpcyjnym mają wpływ średnica, kształt nanocząstki, właściwości związków zaadsorbowanych na nanocząstce, stężenie nanocząstek, stała dielektryczna rozpuszczalnika i temperatura [6, 8, 9]. Pasma SPB często wykorzystywane jest do optymalizacji syntezy nanocząstek złota z ligandami.

Nanocząstki złota wykazują tunelowanie pojedynczego elektronu, zwane często blokadą kulombowską lub schodkami Coulomba. Zjawisko to może być wykorzystywane do konstrukcji tranzystorów, przetwórczyków, biosensorów i katalizatorów. Ponadto nanocząstki złota zachowują się jak molekuly redoks. Wysokość pików prądowych jest określona przez przeniesienie elektronu lub dyfuzję nanocząstek złota do elektrody, natomiast pojemność warstwy podwójnej nanocząstek złota zależy od ich rozmiarów. Zaobserwowano ponadto, że liczba występujących stanów redoks jest zależna od zakresu potencjałów, a dodatkowe piky mogą się tworzyć w wyniku zmiany np. temperatury. Do zalet nanocząstek złota należy również występowanie efektu wzmocnionej przepuszczalności i retencji (EPR).

Nanocząstki złota wykazują więc wyraźny efekt powierzchniowy, makroskopowy efekt tunelowania kwantowego i pasmo SPR. Cechy te sprawiają, że są one ciekawym materiałem do zastosowań w różnych dziedzinach, również biomedycznych, obejmujących biodetekcję, obrazowanie molekularne, farmację. W obszarze biomedycznym mogą służyć jako testy biodiagnostyczne np. raka, HIV-AIDS i innych chorób, również jako testy ciążowe, sztuczne przeciwciała, do wzmacniania radioterapii raka w obrazowaniu tomografii komputerowej. Mogą być zastosowane również w celu ułatwienia skutecznego dostarczenia słabo rozpuszczalnych leków, jako sondy do obrazowania fluorescencyjnego, czy jako środki kontrastowe (rycina 1) [10-12].

Application of AuNPs in the biomedical fields

- **biodiagnostic assays of cancer, HIV-AIDS, and other diseases**
- **pregnancy tests**
- **artificial antibodies**
- **enhanced cancer radiation therapy**
- **improved imaging contrast in diagnostic CT scans**
- **facilitating the efficient delivery of poorly soluble drugs**
- **fluorescence imaging probes**
- **contrast agents (multivalency)**
- **therapeutic approaches including: drug and gene delivery vehicles, diagnostic tools, imaging agents in therapy, and biomarkers in the field of pharmacy**



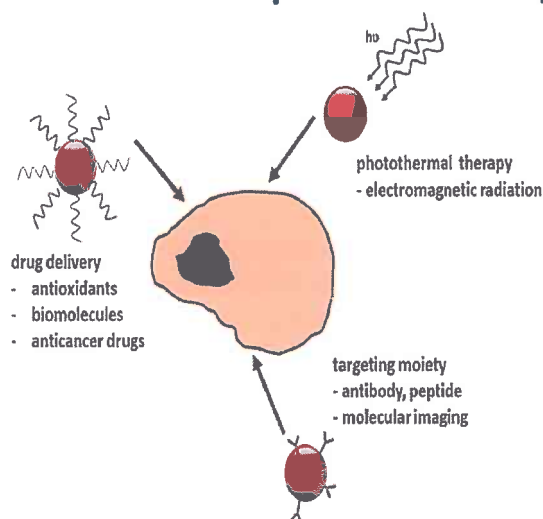
R. Arvizo, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Expert Opin Drug Deliv.* 7 (2010) 753-763, A. Kumar, X. Zhang, X.-J. Liang, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 593-606, Y.-Ch. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, *Nanoscale* 4 (2012) 1871-1880, E.C Dreaden, L.A Austin, M.A Mackey, M.A El-Sayed, *Ther Deliv.* 3 (2012) 457-478.

Rycina 1. Biomedyczne zastosowania nanocząstek złota [13].

Nanocząstki złota jako nośniki leków łatwo mogą być funkcjonalizowane (dekorowane) przez różnego rodzaju biomolekuły tj. leki, geny czy też celowane ligandy. Mogą być również stosowane w fototerapii z zastosowaniem promieniowania elektromagnetycznego w terapii przeciwnowotworowej (rycina 2). Nanocząstki złota są biokompatybilne, więc mogą mieć bardzo szerokie zastosowanie w medycynie. Jednakże czynnikiem, który znacząco wpływa na wykorzystanie nanocząstek w medycynie jest stabilność cząsteczki i odporność na czynniki środowiskowe. Dlatego tak istotną rolę odgrywa stabilizacja powierzchni nanocząstek. Wiąże się z nią dobór odpowiednich ligandów, nietoksycznych dla komórek organizmu, które jednocześnie zabezpiecząby

metaliczne rdzenie cząstek przed utlenianiem i umożliwiały dołączanie określonych molekuł funkcyjnych.

Functionalized AuNPs in cancer therapies and diagnosis

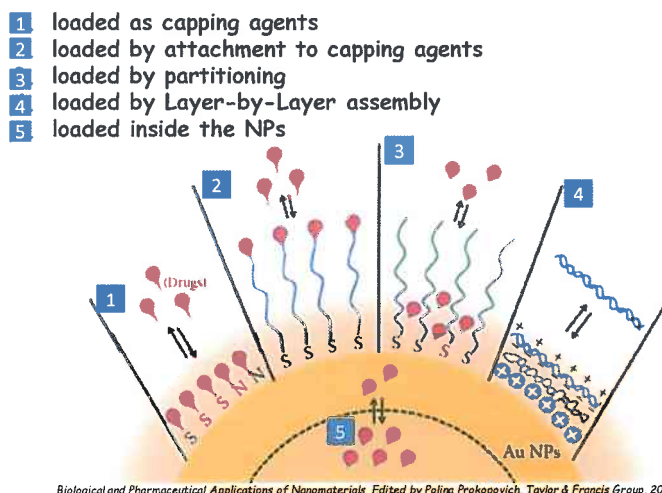


S.C. Coelho, M. Rangel, M. C. Pereira, M. A. N. Coelho, G. Ivanova, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2015, 17, 18971

Rycina 2. Funkcjonalizowanie nanocząstek złota w diagnostyce i terapii [14].

Nanocząstki złota w połączeniu z substancjami czynnymi (API, ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) są stosowane w celach diagnostycznych i terapeutycznych. W szczególności przedmiotem zainteresowania są obecnie terapie przeciwnowotworowe i przeciwzapalne, które bazują na ukierunkowanym dostarczaniu połączeń nanocząstka złota - substancja czynna, do komórek rakowych. Specyficzność działania tych połączeń zwiększa się, stosując oprócz substancji czynnej, przeciwciała lub inne czynniki wektorowe, zapewniające dostarczenie leku w pożądanym miejscu. Oprócz połączeń nanocząstka złota - API realizowane poprzez różne rodzaje ligandów, znane są również połączenia bezpośrednio (np. za pomocą grup tiolowych lub disiarczków), co obrazowo przedstawiono na rycinie 3. Przyłączenie ligandu do nanocząstek złota odbywa się na dwa sposoby: poprzez oddziaływania kowalencyjne i niekowalencyjne (adsorpcję, oddziaływania elektrostatyczne, van der Waalsa, hydrofobowe, pułapkowanie). Najbardziej efektywne są połączenia kowalencyjne ze względu na wysoką stabilność i odtwarzalność połączeń. Można wtedy precyzyjnie kontrolować gęstość upakowania i ułożenie cząsteczek związanych z powierzchnią nośnika. Efektywność wiązania kowalencyjnego leku do ligandu uzależniona jest od umiejscowienia i rodzaju grup funkcyjnych na powierzchni ligandu oraz od ilości dostępnych miejsc na nośniku. Najczęściej stosowane są wiązania amidowe oraz estrowe.

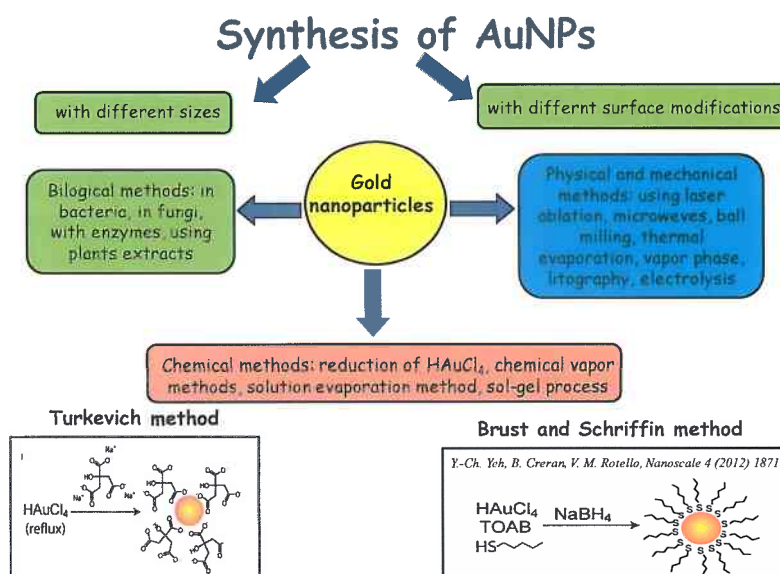
AuNPs in drug delivery



Rycina 3. Nanocząstki złota w dostarczaniu substancji farmaceutycznych [15].

Synteza nanocząstek złota może być ukierunkowana na różny rozmiar, albo na różną modyfikację powierzchni (rycina 4). W literaturze opisano wiele sposobów wytwarzania nanocząstek złota [16, 17] wykorzystujące metody biologiczne, fizyczne, mechaniczne i metody chemiczne np. syntezę w roztworze przy zastosowaniu odpowiednich związków o właściwościach redukujących i stabilizujących. Synteza nanocząstek złota polega najczęściej na redukcji jonów złota w obecności stabilizatora. Prekursorem do tworzenia nanocząstek złota jest głównie kwas tetrachlorozłotowy (HAuCl_4), ale często stosuje się również chlorek trifenylfosfiny złota. Najczęściej stosowane stabilizatory to karboksylany, aminy, tiole, polimery, fosfiny, DNA, przeciwciała, peptydy, surowica bydłęca, fosfolipidy, apolipoproteiny itp. Często stosowane reduktory to cytryniany, kwas askorbinowy, borowodorki, diborany, czy też ostatnio opisany przez Perraulta i współpracowników, hydrochinon [18]. Nanocząstki złota mogą być stabilizowane związkami fizycznie lub chemicznie zaadsorbowanymi na powierzchni. W takim układzie wyróżnia się rdzeń nanocząstki i warstwę substancji stabilizującej, która zapobiega agregacji. W przypadku fizycznej adsorpcji cząsteczki adsorbentu, np. cytryniany ujemnie naładowane, oddziałują elektrostatycznie z powierzchnią rdzenia nanocząstki, zubożniając jej dodatni ładunek. W przypadku chemicznej modyfikacji, cząsteczki adsorbentu, np. związki organotiolowe, są połączone wiązaniem kowalencyjnym z rdzeniem nanocząstki „Au-S”. Nanocząstki złota modyfikowane związkami organotiolowymi wykazują większą stabilność i trwałość w roztworze niż nanocząstki z fizycznie zaadsorbowaną monowarstwą. Podczas tworzenia nanocząstek, cząsteczki stabilizatora adsorbują się na powierzchni rdzenia hamując dalszy wzrost nanocząstek, a także modyfikują ich powierzchnię nadając im odpowiednie właściwości. Możliwe jest wizualne zaobserwowanie zachodzących reakcji wskazujących na tworzenie nanocząstek złota poprzez obserwację zmian koloru. W trakcie syntezy można kontrolować powstawanie cząstek o różnym kształcie np. kulistym, w kształcie pręta i w wielu innych. Natomiast wielkość

powstających nanocząstek można kontrolować nie tylko podczas syntezy ale również podczas funkcjonalizacji powierzchni różnymi grupami. W wyniku syntezy możliwe jest otrzymanie próbek monodispersyjnych lub polidispersyjnych nanocząstek złota. Przy czym do badań biomedycznych najbardziej pożądane są nanocząstki monodispersyjne, o jak najbardziej zbliżonych rozmiarach. Monodispersyjne nanocząstki złota można otrzymać na kilka sposobów: m.in. stosując podczas syntezy odpowiedni stosunek molowy modyfikatora, reduktora, soli złota, jak również sterując odpowiednią szybkością dodawania reduktora, czy temperaturą prowadzenia syntezy. Im większa jest szybkość reakcji lub stężenie środka stabilizującego, tym mniejsze powstają nanocząstki.



Rycina 4. Metody syntezy nanocząstek złota.

Bardzo popularną metodą syntezy nanocząstek złota, opisaną w literaturze, jest metoda, w której wodną mieszaninę soli złota i cytrynianów ogrzewa się do temperatury około 100°C . Została ona po raz pierwszy zastosowana przez Turkevicha w 1951 roku [19, 20]. W wyniku tej syntezy otrzymuje się nanocząstki złota modyfikowane cytrynianami, które stabilizują rdzeń nanocząstki złota oddziałując elektrostatycznie z dodatnio naładowanym rdzeniem. Modyfikację tej metody wprowadził Navarro [21], poprzez dodatek acetyloacetonianu sodu, który umożliwia kompleksowanie i redukcję jonów Au^{3+} do Au^+ . Następnie przeprowadzana jest redukcja cytrynianem sodu do obojętnych atomów złota. Metoda ta umożliwia maksymalną kontrolę struktury nanocząstek. Powszechnie znaną metodą jest również jednofazowa i dwufazowa synteza, opisane jako metoda Brusta i Schiffrina [22, 23]. Natomiast publikacja z 2010 roku opisuje metodę bez czynnika stabilizującego, z redukcją borowodorkiem sodu, znaną jako metoda Martina [24].

Oprócz prac prowadzonych na nanocząstkach złota – obiektach trójwymiarowych 3D, naukowcy dla porównania prowadzą badania na płaskich elektrodach złotych – obiektach dwuwymiarowych 2D. Pokrycie elektrody monomolekularną warstwą API otrzymaną na drodze samoorganizacji (ang. *Self - Assembled Monolayers (SAMs)*) umożliwia badanie

procesów zachodzących pomiędzy cząsteczkami API, oraz otrzymanie terapeutycznej monowarstwy (TSAMs). Monowarstwy tego typu powstają przez spontaniczną adsorpcję cząsteczek z roztworu. Cienkie warstwy cząsteczek tworzą się na drodze samoorganizacji i wykazują określone funkcje chemiczne np. wiążą się specyficznie z powierzchnią lub innymi związkami zakotwiczonymi już na podłożu. Szczególnie istotne są badania nad związkami tiolowymi, gdyż wykazują one wysokie powinowactwo do powierzchni metali. Cząsteczki tiozwiązków wiążą się z powierzchnią złota dzięki specyficznemu oddziaływaniu siarki z atomami złota, co potwierdzone zostało za pomocą widm uzyskanych techniką spektroskopii fotoelektronów (XPS) [25]. Oprócz chemisorpcji, na trwałość zaadsorbowanych warstw, mają wpływ oddziaływania van der Waalsa występujące pomiędzy łańcuchami tiozwiązków. Energia tych oddziaływań rośnie ze wzrostem liczby grup metylenowych w łańcuchu alkilowym, dlatego wzrost uporządkowania monowarstwy wiąże się ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Na uporządkowanie monowarstwy ma również wpływ obecność dodatkowych grup funkcyjnych występujących w cząsteczce tiozwiązku. W zależności od charakteru grupy, może ona wpływać porządkująco lub destabilizująco na uporządkowanie monowarstwy, dlatego dobór odpowiednich parametrów adsorpcji pozwala na przygotowanie monowarstw dobrze zorganizowanych. Stosowane w badaniach tiozwiązki posiadają zdolność do tworzenia trwałych, ściśle upakowanych monowarstw o określonym składzie, grubości i strukturze. Dobrze zdefiniowane monowarstwy na podłożach stałych pozwalają więc na modelowanie i badanie procesów zachodzących na granicy faz, jak również na badanie oddziaływań pomiędzy różnymi cząsteczkami w monowarstwie. Tiozwiązki mogą być stosowane również do badania transportu elektronów, charakteryzują się dużą trwałością, a elektroda pozostaje zablokowana w szerokim zakresie potencjałów. Przy odpowiednio ujemnym potencjale następuje desorpcja monowarstwy, a utlenienie złota przesunięte jest do bardziej dodatnich potencjałów w porównaniu z elektrodą, która nie została pokryta monowarstwą. Badania właściwości powierzchni pokrytych substancjami czynnymi zmierzają do zastosowania odpowiednio zaprojektowanych warstw molekularnych do zastosowań biomedycznych. Dodatkowo przyłączenie nanocząstek złota, które łatwo adsorbują się (fizycznie lub chemicznie) na modyfikowanych tiozwiązkami powierzchniach metali np. platyny, srebra czy też właśnie złota, tworząc agregaty, monowarstwy i wielowarstwy nanocząstek, pozwala poszerzyć zakres zastosowań biomedycznych. Specyficzną własnością nanocząstek złota modyfikowanych monowarstwą organiczną jest ich zdolność do gromadzenia ładunku, przez co są również materiałem użytecznym w katalizie procesów elektrodowych, a monowarstwy SAMs na złocie i tytanie są wykorzystywane w ukierunkowanym dostarczaniu leków [26]. Badania wykazują, że monowarstwy mogą być stosowane jako alternatywny system dostarczania leków ze stentów wieńcowych i innych implantów metalowych.

Cel pracy

Badania w mojej pracy naukowej skoncentrowałam na rozwijającym się w farmacji kierunku celowanego transportu leków przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych z wykorzystaniem nośników jakimi są nanocząstki złota. Celem mojej pracy było zaprojektowanie i synteza selektywnych nośników substancji farmaceutycznych z wykorzystaniem nanocząstek złota (AuNPs) oraz powierzchni płaskich złota modyfikowanych wybranymi substancjami czynnymi (API), które mają właściwości przeciwnowotworowe i/lub przeciwutleniające: z genisteiną (GE) [H1], pemetreksedem (PE) [H2], abirateronem (AB) [H3], tioabirateronem (TAB) – nowym analogiem AB [H4, H5], tiogenisteiną (TGE) – nowym analogiem GE [H6].

Wybór substancji farmaceutycznych był uzasadniony ich zdolnością do ulegania reakcjom redoks. Bardzo pomocne w tym celu były badania na dwuwymiarowych (2D) powierzchniach złotych, opisane w pracach [H4], [H6]. W swoich badaniach zaplanowałam i wykonałam wielokierunkowe syntezy opierające się na bezpośrednim przyłączeniu API, reakcji wymiany lub sprzęgania chemicznego przez łącznik. Obszar prac obejmował również optymalizację syntezy i oczyszczania nanokoniugatów.

Oprócz optymalizacji syntezy nanocząstek złota z wybranymi substancjami API, sposobu ich oczyszczania, koncepcja badań obejmowała charakterystykę fizykochemiczną nowych analogów substancji czynnych i koniugatów nanocząstek złota z substancjami czynnymi oraz określenie mechanizmów oddziaływań pomiędzy cząsteczkami API oraz API i nanocząstką w tych koniugatach poprzez skorelowanie modelu kwantowego z wynikami analiz.

Moja koncepcja zakłada badania fizykochemiczne nowych koniugatów poprzez określenie ich rozmiarów, stopnia dyspersji, czystości chemicznej i potwierdzenie tożsamości. Do charakterystyki w pierwszej kolejności zaproponowałam zastosowanie spektroskopii UV-Vis, zarówno do kontroli mieszanin reakcyjnych, badania stabilności i optymalizacji oczyszczania. Do oceny zawartości substancji czynnej w odciekach zaproponowałam techniki UV-Vis oraz separacyjne. Do oceny rozmiaru i rozkładu wielkości nanocząstek wybrałam technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), technikę dynamicznego rozpraszania światła (DSL), rentgenowską dyfrakcję proszkową (XRPD) oraz spektrometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS). W celu określenia stopnia naładowania otrzymanych koniugatów zaproponowałam wyznaczenie potencjału zeta techniką elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS). Badania elektrochemiczne wybrałam do potwierdzenia obecności substancji czynnej, określenia mechanizmów utleniania i redukcji, oraz weryfikacji możliwości tworzenia się nanocząstek. Spektroskopię w podczerwieni (IR), ramanowską (RS) i magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zaproponowałam zarówno do potwierdzenia tożsamości jak i badania oddziaływań w koniugatach w odniesieniu do teoretycznie wyliczonego modelu kwantowego z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości (DFT). Do oceny pokrycia nanocząstek substancją czynną zaproponowałam termogravimetrię (TGA), której rezultaty były konieczne

do obliczeń w badaniach biologicznych oraz do oceny wydajności procesu. Dodatkowym założeniem mojej pracy było modelowanie molekularne, które stanowiło pomoc, wzmocnienie i uzupełnienie badań eksperymentalnych.

Pełna charakterystyka fizykochemiczna była niezbędna do otrzymania produktu wysokiej jakości, co przekłada się również na otrzymanie wiarygodnych wyników badań biologicznych i jednoznaczne określenie mechanizmów oddziaływań pomiędzy AuNPs a substancjami czynnymi, procesów utleniania i redukcji, które są ważne m.in. z powodu określania uwalniania substancji czynnych czy też jej oddziaływań w komórkach. Rozwijany przeze mnie kierunek prac jest odpowiedzią na problemy obecnej terapii nowotworowej. Nowoczesne systemy dostarczania leków do leczonego organu na bazie nanocząstek umożliwiają zwiększenie skuteczności i specyficzności leczenia w porównaniu z zaaplikowaniem samej substancji czynnej leczonemu pacjentowi. Tego typu badania są niezwykle ważne z punktu widzenia rozwoju farmacji i mogą przynieść znaczny postęp w leczeniu chorób.

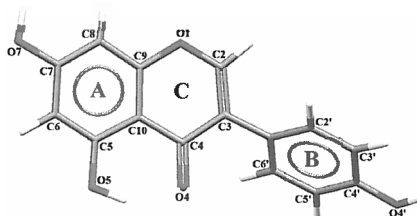
W celu oceny praktycznego zastosowanie nowych koniugatów i analogów zaplanowane zostały wstępne badania biologiczne, opisane w artykułach [H1, H5, H6].

Prowadzone przeze mnie prace były wielokierunkowe i miały charakter multidyscyplinarny.

Omówienie wyników badań

H1 (GE, 3D)

Przykładem bezpośredniego wiązania substancji czynnej z nanocząstkami złota, jest połączenie genisteiny (GE) opisane przeze mnie w omawianej publikacji [H1]. Genisteina (5,7,4'-trihydroksyizoflawon) zawiera trzy grupy hydroksylowe: jedną w pozycji C4' w pierścieniu B i dwie w pierścieniu A w pozycjach C5 i C7 tworząc strukturę typu rezorcynolu [27] (rycina 5). Związek ten jest naturalnie występującym izoflawonidem, wykazuje właściwości przeciwutleniające, antynowotworowe, antymetastatyczne i antyangiogenne, jego słaba rozpuszczalność ogranicza jednak zastosowania kliniczne [28]. Izoflawonoidy to związki polifenolowe działające jako czynniki redukujące, które mogą również redukować i stabilizować nanocząstki złota (AuNPs).



Rycina 5. Wzór modelowy cząsteczki genisteiny.

W literaturze nie opisano bezpośredniej syntezy genisteiny z nanocząstkami złota, ale pojawiły się wzmianki o wytwarzaniu nanocząstek złota w połączeniu z ekstraktami

roślinnymi bogatymi w genisteinę, np. z ekstraktem soi [29]. Tak otrzymane koniugaty nie zostały w pełni scharakteryzowane i nie potwierdzono tożsamości substancji czynnej przyłączonej do takich nanocząstek złota ani jej ilości. Patent US 8586096 (zgłoszenie nr US2009 / 0117045A1) [30] przedstawia sposób otrzymywania biokompatybilnych nanocząstek złota poprzez zmieszanie materiału roślinnego z soi lub soczewicy lub ich ekstraktów z wodnym roztworem soli złota umożliwiając reakcję tworzenia nanocząstek złota, które są stabilizowane przez silną powłokę pochodzącą z materiału roślinnego soi lub soczewicy lub ich reaktywnych ekstraktów. Zarówno soja, jak i soczewica są bogate w izoflawony, takie jak genisteina i daidzeina. W patencie opisano próbę uzyskania nanocząstek złota w połączeniu z genisteiną i daidzeiną, analogicznie do eksperymentów z soją lub soczewicą. Analiza spektrofotometryczna UV wykazała, że nanocząstki złota nie zostały utworzone, co sugerowało, że izoflawony nie odgrywają istotnej roli w redukcji Au (III) do nanocząstek złota lub że ich rola jest bardzo ograniczona. Syntezę nanocząstek złota przy użyciu fermentowanych wodnych ekstraktów soi i czosnku bogatych w polifenole i związki białkowe opisali El-Batal i współpracownicy [29]. Autorzy zaobserwowali, że genisteina jest jednym z flawonoidów występujących w ekstraktach soi i sugerowali, że jej grupy karbonylowe i hydroksylowe mogą stabilizować nanocząstki AuNPs, a genisteina może działać jako środek redukujący. Badali również aktywność przeciwbakteryjną tych nanocząsteczek. W publikacji Singh i współpracowników [31] opisana jest szybka, powtarzalna synteza sklasyfikowana jako "zielona chemia", która wykorzystuje ekstrakty z liści *sissoo Dalbergia* w celu otrzymania nanocząsteczek złota. Bezpośrednią syntezę nanocząstek złota z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych opisano również w publikacji [32]. W pracy magisterskiej [33] szczegółowo opisano sposób otrzymywania nanocząsteczek złota w połączeniu z ekstraktami soi (Soy-AuNP) poprzez bezpośrednie wiązanie oczyszczonego ekstraktu sojowego z HAuCl_4 w wysokiej temperaturze. Patent US833994 B2 [34] dotyczy, podobnie jak poprzedni patent, sposobu wytwarzania biokompatybilnych nanocząstek złota z udziałem materiału roślinnego bogatego w roślinne związki polifenolowe lub flawonoidowe lub reaktywne składniki fitochemiczne roślin. Sole złota są także redukowane w celu uzyskania nanocząstek złota stabilizowanych przez powlekanie ich materiałem roślinnym bogatym w polifenole lub flawonoidy, np. czarna herbata, cynamon, kurkuma i kurkumina. Podsumowując, w literaturze znane są nanocząstki złota w połączeniu z ekstraktami roślinnymi, np. soi, bogatymi w genisteinę, natomiast nie znaleziono połączenia nanocząstek złota z genisteiną wyodrębnioną spośród innych fitoestrogenów z materiału roślinnego. Przedstawione badania analityczne dla ekstraktów i mieszaniny wielu związków są bardzo ubogie i nie są w stanie sprostać wymaganiom ICH (ang. *International Council of Harmonisation*) i EMEA (ang. *European Medicines Agency*) co do potwierdzenia tożsamości i jakości substancji czynnych przyłączonych do nanocząstek złota.

W artykule [H1] opisano nową metodę syntezy nanocząstek złota z genisteiną (AuNPs-GE). Opracowano metodę przyłączenia genisteiny do nanocząstek złota oddzielną

od innych fitoestrogenów występujących w materiale roślinnym. Koniugat AuNPs-GE otrzymano w syntezie jednofazowej z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Turkevicza. Prace w zakresie optymalizacji syntezy obejmowały dobór rozpuszczalnika, temperatury, szybkości mieszania oraz sposobu oczyszczania osadu. Opracowano metodę UV-Vis do kontroli wydajności tworzenia nanocząstek w mieszaninach reakcyjnych. Wykazano, że genisteina redukuje jony Au^{3+} do sferycznych nanokrystalitów złota i działa również, jako środek stabilizujący. Synteza AuNPs-GE jest prosta i ekonomiczna. W tworzeniu koniugatu AuNPs-GE genisteina działała jako reduktor oraz stabilizator. W publikacji opisany został bezpośredni mechanizm formowania koniugatu genisteina – nanocząstki złota, który tworzy się dzięki wiązaniu dwóch grup hydroksylowych genisteiny z powierzchnią nanocząstek złota.

Skuteczność oczyszczania koniugatu z wolnej genisteiny była kontrolowana za pomocą elektroforezy kapilarnej (CE). Rdzenie nanocząstek złota mają wąski zakres wielkości od 14 do 33 nm, co potwierdzono za pomocą techniki TEM. Potencjał zeta nanocząstek złota modyfikowanych genisteiną wynosi -19,32 i sugeruje stabilność nanocząstek oraz niższą toksyczność dla zdrowych komórek. Tożsamość genisteiny na nanocząstkach złota potwierdzono za pomocą badań elektrochemicznych, spektroskopii NMR i ramanowskiej.

Analiza widma 1H NMR próbki AuNPs-GE wykazała obecność wszystkich oczekiwanych sygnałów genisteiny: pięciu sygnałów (siedmiu protonów) pochodzących od siedmiu grup CH oraz trzy sygnały pochodzące od trzech grup OH. W porównaniu do widma referencyjnego genisteiny wyraźnie widać znaczne przesunięcie (o ok. 2 ppm) dwóch sygnałów pochodzących od grup OH w kierunku większej indukcji pola przy niezmiennych wartościach pozostałych sygnałów. Zmiana wartości przesunięć chemicznych dla dwóch grup OH wskazuje, że grupy w pozycjach 5 i 7 mogą uczestniczyć w wiązaniu Au-GE. Świadczy to o zwiększeniu ekranowania tych protonów w koniugacie AuNPs-GE.

Aby potwierdzić tworzenie nanocząstek złota modyfikowanych genisteiną, przeprowadzono eksperymenty woltamperometryczne dla substancji rozpuszczonej w buforze PBS o pH 7,4 przy użyciu elektrody z węgla szklanego (GCE). Na krzywych zarejestrowanych za pomocą woltamperometrii cyklicznej obserwowano dwa piki. Pierwszy pik anodowy przy potencjale około 0,4 V odpowiada nieodwracalnemu utlenianiu grupy hydroksylowej w pierścieniu przy atomie węgla C4' genisteiny, drugi pik przy potencjale około 0,8 V odpowiada utlenianiu grup hydroksylowych przy atomie węgla C5 i/lub C7 w pierścieniu genisteiny. Lepsze rozdzielenie pików woltamperometrycznych uzyskano stosując woltamperometrię pulsową różnicową (DPV) i obserwowano również dwa piki utlenienia genisteiny. Następnie rejestrowano cykliczne krzywe woltamperometryczne (CV) i krzywe za pomocą woltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) dla nanocząsteczek złota pokrytych genisteiną w roztworze zawierającym wyłącznie elektrolit podstawowy. Zarówno na woltamperogramach CV, jak i DPV, piki pojawiają się przy podobnych potencjałach, jak w przypadku genisteiny rozpuszczonej w roztworze. Potwierdza to skuteczną modyfikację nanocząstek złota genisteiną. Wyniki woltamperometryczne są zgodne z wynikami

opublikowanymi dla genisteiny rozpuszczonej w roztworze przez Diculescu i współpracowników [35].

Charakter oddziaływań pomiędzy genisteiną a nanocząstkami złota badano również za pomocą spektroskopii ramanowskiej poprzez analizę różnic pomiędzy widmami genisteiny i koniugatu AuNPs-GE. Analizę widm przeprowadzono w oparciu o wyniki badań strukturalnych genisteiny za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji monokryształu przeprowadzone przez Yearleya i współpracowników [36] i Bretona i współpracowników [37] oraz badań genisteiny uzyskanych za pomocą powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (ang. *SERS: Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) przeprowadzonych przez Sekine i współpracowników [38]. Badania strukturalne genisteiny potwierdziły obecność silnego wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego O4-H5A-O5 (energia dysocjacji wynosi 13,40 kcal/mol) oraz sześciu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Otrzymane w naszej pracy widmo ramanowskie genisteiny jest zgodne z opisanym przez Sekine i współpracowników [38].

Analiza porównawcza widm genisteiny oraz koniugatu AuNPs-GE wykazała różnice w zakresie drgań rozciągających grupy karbonylowej i pierścieni aromatycznych ($1647 - 1470 \text{ cm}^{-1}$). Dwa główne pasma 1647 i 1615 cm^{-1} na widmie genisteiny są przesunięte w kierunku niższych liczb falowych 1589 i 1556 cm^{-1} na widmie AuNPs-GE. Takie przesunięcie może sugerować zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej związanej z osłabieniem międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Przesunięcia pasm w kierunku niższych liczb falowych zaobserwowano również w zakresie drgań rozciągających C-O, deformacyjnych -OH i C-H (w płaszczyźnie i poza płaszczyzną). Analiza widm potwierdziła adsorpcję molekuł genisteiny na powierzchni nanocząstek złota poprzez grupy hydroksylowe.

Ilość genisteiny na powierzchni nanocząstek złota badano za pomocą termogravimetrii. Krzywa TGA genisteiny wykazała, że jej całkowity rozkład następuje w zakresie temperaturowym $300 - 400^\circ\text{C}$. Dlatego w tym zakresie badano ilość genisteiny w koniugacie, która wynosiła $5,09\%$ (m/m).

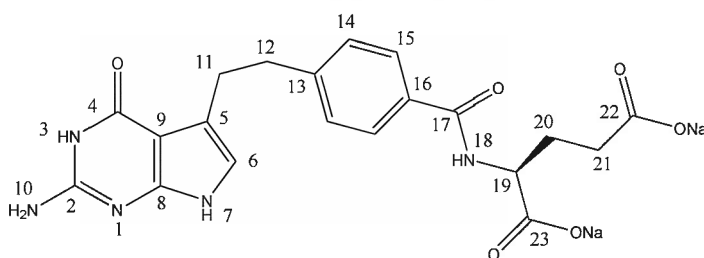
Badania toksyczności genisteiny oraz genisteiny połączonej z nanocząstkami złota (AuNPs-GE) przeprowadzono na liniach komórkowych czerniaka skóry (HTB-140) oraz raka płuc (A549). Żywotność komórek przedstawiono jako procent redukcji MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego) w komórkach traktowanych badanymi substancjami w porównaniu do grupy kontrolnej. Koniugat AuNPs-GE wykazał większą toksyczność w stosunku do komórek rakowych niż wolna genisteina. Zarówno genisteina jak i koniugat wykazały większą toksyczność w stosunku do linii komórkowych HTB140. Wynika to z następstw mutacji linii A549, która wykazuje większą oporność na działanie czynników proapoptotycznych.

Wytworzony i scharakteryzowany unikatowy koniugat AuNPs-GE był bardziej toksyczny w stosunku do komórek rakowych niż wolna genisteina. Produkt charakteryzował się odpowiednią jakością, która była kontrolowana opracowanymi metodami analitycznymi.

Opracowane zostały metody analityczne w zakresie kontroli mieszanin reakcyjnych (UV-Vis), potwierdzenia tożsamości produktu (NMR, Raman, techniki elektrochemiczne), badanie pozostałości wolnej genisteiny w odciekach reakcyjnych (UV-Vis, CE), charakterystyki produktu technikami (UV-Vis, TEM, ELS, DLS).

H2 (PE, 3D)

Celem kolejnych badań, opisanych w artykule [H2], było opracowanie syntezy i pełna charakterystyka nanocząstek złota (AuNPs) połączonych z pemetreksedem (PE) (rycina 6).



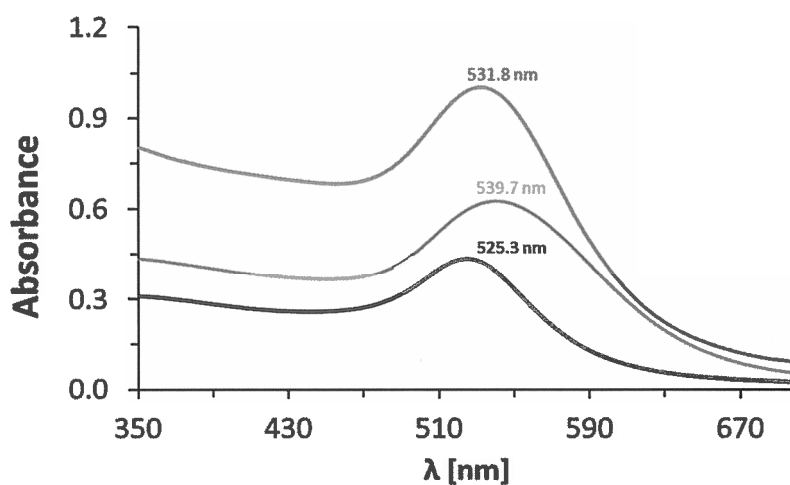
Rycina 6. Wzór strukturalny pemetreksedu.

Pemetreksed jest lekiem przeciwnowotworowym o wielokierunkowym działaniu. Jest antagonistą kwasu foliowego zaburzający podstawowe procesy metaboliczne wykorzystujące foliany niezbędne dla podziału komórek [39-41]. Zastosowanie pemetreksedu wymaga właściwego przygotowania chorego poprzez suplementację witaminową, stosowanie deksametazonu, w celu ograniczenia częstości występowania oraz nasilenia działań niepożądanych. Przy stosowaniu kwasu foliowego i witaminy B12 stwierdzono mniejszą toksyczność oraz zmniejszenie częstości występowania działań niepożądanych. Leczenie pemetreksedem wymaga regularnej kontroli w zakresie jego bezpieczeństwa z koniecznością modyfikacji dawkowania w przypadku wystąpienia zarówno hematologicznych, jak i niehematologicznych działań niepożądanych [42].

W publikacji opisano opracowanie trzech różnych metod syntezy nanocząstek złota z pemetreksedem. Syntezy opierały się na bezpośrednim połączeniu pemetreksedu z nanocząstkami złota (AuNPs-PE), połączeniu pemetreksedu z cytrynianowymi nanocząstkami (AuNPs-citr-PE), zmiany pH w syntezie przez zastosowanie buforu PBS (AuNPs-PBS-PE). Zastosowano spektroskopię UV-Vis do kontroli tworzenia nanokoniugatów poprzez pomiar wartości absorbancji i położenia pików powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR). W zależności od rodzaju syntezy i wielkości nanocząstek złota, charakterystyczne pasma SPR dla trzech nanokompozytów mieściły się w zakresie długości fali od 525 do 540 nm (rycina 7). Trudności w opracowaniu metody bezpośredniej syntezy koniugatu AuNPs-PE wynikały z powstawania kompleksu Au^{3+} -PE przed utworzeniem nanocząstek, obserwowanego przy 425 nm. Wydajność tworzenia nanocząstek złota została zwiększona w stosunku do tworzenia kompleksu przy zastosowaniu wyższego pH (pH 7,4). Syntezę bezpośrednią prowadzono przy pH około 5,0, w którym dysocjują tylko grupy

karboksylowe ($pK_{a1}=3,5$, $pK_{a2}=4,8$) pemetreksedu. Natomiast zwiększoną wydajność tworzenia nanocząstek złota zaobserwowano przy wyższym pH w roztworze PBS (pH 7,4), co można tłumaczyć dysocjacją protonów przy N-1 ($pK_{a3}= 5,3$, guanidynowy N-1 na pierścieniu pterynowym) lub ogólnie większym ładunkiem ujemnym. Podobny mechanizm oddziaływania azotu (tu N-1) z powierzchnią złota podczas tworzenia nanocząstek złota zaobserwowano dla szeroko opisywanej w literaturze deazaguaniny [43, 44]. Dla PE, który ma bardziej skomplikowaną budowę i ma dwie dodatkowe grupy karboksylowe ulegające dysocjacji, w widmach NMR nie zaobserwowano zmian w obszarze atomów azotu z pierścienia. Również metody obliczeniowe nie wykazały tych korzystnych energetycznie oddziaływań. Założono więc, że zwiększona efektywność syntezy AuNPs-PE wynika z większego ładunku ujemnego powstającego w wyższym pH.

W trakcie badań wykazano również, że PE może być połączony z cytrynianowymi nanocząstkami złota. Cytryniany spełniają wtedy rolę reduktora, dzięki czemu PE nie ulega utlenianiu. Na widmach NMR widoczne są sygnały od cytrynianów i PE. Ponadto w widmie Ramana widoczne jest pasmo pochodzące od drgań deformacyjnych N-H. To pasmo ujawnia również największą zmianę w kierunku wyższych liczb falowych w porównaniu z nanokompozytami AuNPs-PE i AuNPs-PBS-PE.



Rycina 7. Widma UV-Vis osadów: AuNPs-citr-PE (czarna linia), AuNPs-PBS-PE (niebieska linia) and AuNPs-PE (czerwona linia) w fizjologicznych warunkach (bufor PBS pH 7,4).

Podczas oczyszczania i wirowania nie zaobserwowano agregacji, na co wskazywał brak zmian w maksymalnym paśmie absorpcji UV-Vis osadu koniugatów w porównaniu z mieszaniną reakcyjną. Oczyszczaniu nanocząstek złota z nadmiaru wolnego PE towarzyszyło jednoczesne oczyszczanie z konkurencyjnego kompleksu Au^{3+} -PE.

Wielkość nanocząstek AuNPs-PE, AuNPs-PBS-PE, AuNPs-citr-PE, ich rozkład wielkości i stabilizację cząstek określono metodami DLS, ELS oraz TEM. Wyniki pomiarów dla nanocząstek złota sprzężonych z PE podano w tabeli 1.

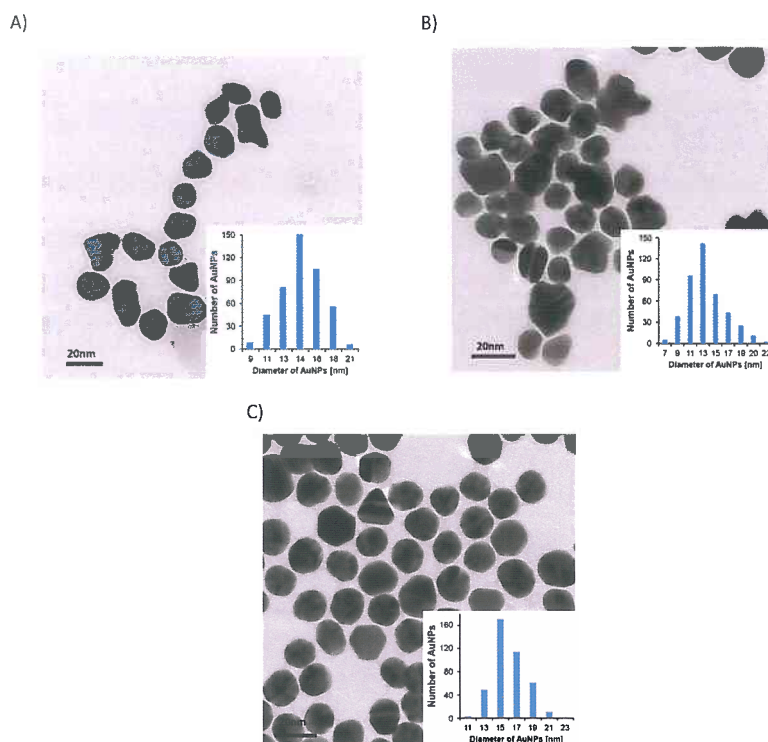
Tabela 1. Podsumowanie badań fizykochemicznych

Nanokoniugat	SPR, nm	Rozmiar (TEM), nm	Potencjał Zeta, mV
AuNPs-PE	532	14	-33,20
AuNPs-PBS-PE	540	13	-47,63
AuNPs-citr-PE	525	15	-48,30

Technika ELS mierzy ruchliwość elektroforetyczną nanocząstek (naładowane cząstki zawieszane w cieczy poddawane są działaniu pola elektrycznego – cząstki zaczynają poruszać się z charakterystyczną prędkością). Następnie ruchliwość elektroforetyczna jest zamieniana na potencjał zeta. Potencjał zeta służy do określania stabilności układów koloidalnych. Potencjał zeta otrzymanych koniugatów w wodzie wynosił od -33,2 do -48,3 mV, co odpowiada ujemnie naładowanym nanocząstkom złota. Wysoki, ujemny potencjał zeta odpowiada odpychającemu oddziaływaniu między nanocząstkami mającym na celu zapobieganie aglomeracji nanocząstek złota, dzięki czemu wykazują doskonałą stabilność bez znaczącego wzrostu rozmiaru w okresie inkubacji w wodzie. Ujemny ładunek powierzchniowy zawiesin nanocząstek Au nie tylko wskazuje na wysoką stabilność, ale także sugeruje mniejszą toksyczność dla normalnych komórek.

Morfologię rdzenia AuNPs badano za pomocą mikroskopii TEM (rycina 8). Nanocząstki są w przybliżeniu kuliste i monodispersyjne. Z histogramu wynika, że średnice cząstek mieszczą się w dość wąskim zakresie od 11 nm do 18 nm dla AuNPs-PE, od 9 nm do 19 nm dla AuNPs-PBS-PE oraz od 13 nm do 19 nm dla AuNPs-citr-PE. Maksymalna średnica nanokoniugatów występuje przy 14 nm. Kształt nanocząstek AuNPs-citr-PE jest prawie idealnie kulisty, a kształty koniugatów AuNPs-PE i AuNPs-PBS-PE nie wykazują tak idealnie kulistego kształtu.

Ilość PE (lub sumę PE i kwasu cytrynowego w przypadku AuNPs-citr-PE) na powierzchni AuNPs oraz właściwości termiczne nanokoniugatów zmierzono za pomocą analizy termogravimetrycznej. Ilość PE obliczona z krzywej TGA wynosiła 34,1% i 24,6% (m/m) odpowiednio dla AuNPs-PE i AuNPs-PBS-PE. Suma ilości PE i kwasu cytrynowego obliczona z krzywej TGA wynosiła 18,3% dla AuNPs-citr-PE.

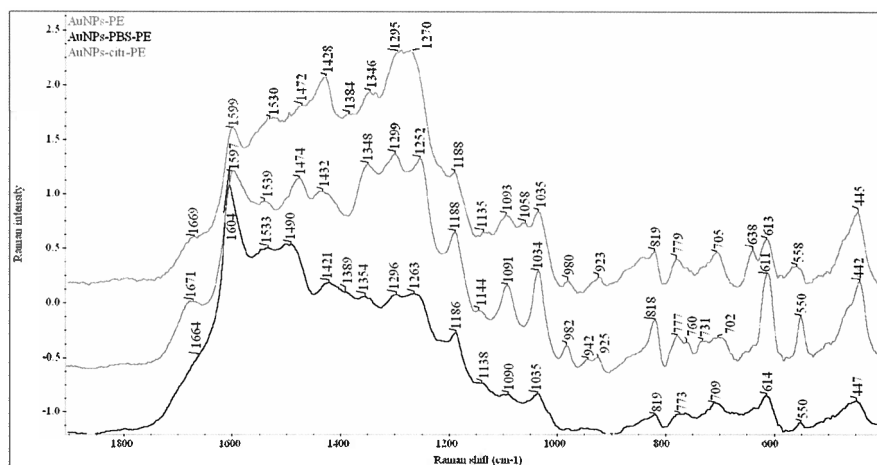


Rycina 8. Obrazy TEM wraz z histogramem: (A) AuNPs-PE, (B) AuNPs-PBS-PE, (C) AuNPs-citr-PE.

Aby potwierdzić tworzenie nanocząsteczek złota modyfikowanych PE, zarejestrowano krzywe za pomocą voltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) dla trzech różnych próbek nanocząsteczek złota modyfikowanych PE oraz dla wolnego PE w buforze PBS, pH 7,4. Dla wszystkich tych układów na voltamperogramach DPV obserwowano jeden nieodwracalny pik utlenienia przy potencjale +0,43 V. Ten pojedynczy nieodwracalny pik utlenienia odpowiada utlenianiu pierścienia indolowego w PE, jak opisano w literaturze [45-49]. Badania elektrochemiczne potwierdziły skuteczną modyfikację nanocząsteczek PE.

Przeprowadzono również prace metodami chemii teoretycznej i obliczeniowej w celu uzyskania przybliżonej (lokalnej) struktury kompleksów pemetreksedu oraz cytrynianu z nanocząstką złota oraz oceny ich parametrów spektralnych. Geometrię badanych układów uzyskano na drodze optymalizacji struktury z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości B3LYP/6-31G(d,p) dla atomów H, C, N, O oraz pseudopotencjału LANL2DZ z 60-elektronowym rdzeniem dla atomów Au. W toku obliczeń uzyskano częstości harmoniczne i aktywności Ramana, które przeliczono na intensywności Ramana i porównano z widmami eksperymentalnymi uzyskując zgodność jakościową, co z kolei umożliwiło interpretację głównych pasm pemetreksedu oraz kompleksu nanocząstki złota z pemetreksedem. Rozpatrzono dwa sposoby kontaktu cząsteczki pemetreksedu z atomami złota w małym klastrze Au₅, tj. poprzez grupę karboksylową oraz poprzez fragment deazaguaninowy, a także analizując różne stany jonowe układów. Wyniki wskazują na oddziaływanie PE z nanocząstkami złota od strony grup karboksylowych.

Porównano eksperymentalne widma ramanowskie dikwasu PE oraz koniugatu AuNPs-PE z teoretycznymi odpowiednikami tych widm obliczonymi na podstawie założonego modelu. Widmo AuNPs-PE różni się znacząco od widma dikwasu PE. Widmo eksperymentalne AuNPs-PE charakteryzuje się poszerzonymi pasmami w odniesieniu do widma PE, co wskazuje na amorficzną postać substancji czynnej. Pomiędzy widmami eksperymentalnymi a obliczonymi, zauważalne są przesunięcia pasm, ale charakter widm jest zachowany, co umożliwia jakościowe porównania widm. Analiza widm wykazała, że pierwsze szerokie pasmo przy 1669 cm^{-1} na widmie eksperymentalnym AuNPs-PE pochodzi od drgań rozciągających grupy C=O (z grupy COOH). Przesunięcie tego pasma w kierunku niższych liczb falowych sugeruje oddziaływanie PE z nanocząstkami Au poprzez grupę COOH. Na tym widmie zidentyfikowano również główne pasma pochodzące od drgań pierścienia aromatycznego jak również od drgań deformacyjnych N-H i C-H. Obliczenia teoretyczne wykazały znaczny wzrost intensywności pasma przy 1430 cm^{-1} pochodzącego od oddziaływań grupy COOH z nanocząstkami Au. Na widmie eksperymentalnym AuNPs-PE pasmo to występuje przy 1384 cm^{-1} . Zmiany o podobnym charakterze zaobserwowano również na widmie eksperymentalnym AuNPs-PBS-PE, na którym pasmo przy 1389 cm^{-1} pochodzi od oddziaływań grupy COOH z nanocząstkami Au. Porównano również eksperymentalne widma AuNPs-citr-PE, dikwasu PE i kwasu cytrynowego z widmami obliczonymi AuNPs-citr i kwasu cytrynowego. Widmo eksperymentalne AuNPs-citr-PE różni się od widm eksperymentalnych dikwasu PE i kwasu cytrynowego oraz charakteryzuje się poszerzonymi pasmami, które wskazują na amorficzny charakter substancji czynnej. Analiza porównawcza widm do eksperymentalnego widma AuNPs-citr-PE wskazuje, że pasmo występujące przy 1671 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających grupy C=O (pochodzącej z COOH). Przesunięcie pasma pochodzącego od drgań rozciągających grupy C=O wskazuje na oddziaływanie dikwasu PE z nanocząstkami złota. Zaobserwowano, że pasmo przy 1539 cm^{-1} , pochodzące od drgań deformacyjnych N-H, jest najbardziej przesunięte w kierunku wyższych liczb falowych w porównaniu do widm AuNPs-PE i AuNPs-PBS-PE (rycina 9). Obliczenia teoretyczne dla koniugatu AuNPs-citr-PE również wykazały znaczny wzrost intensywności pasma przy 1400 cm^{-1} które pochodzi od oddziaływań grupy COOH z klasterem Au₅. Niestety tego pasma nie zidentyfikowano na eksperymentalnym widmie AuNPs-citr-PE przypuszczalnie z powodu znacznego poszerzenia pasm uniemożliwiających identyfikację.



Rycina 9. Porównanie eksperymentalnych widm koniugatów AuNPs-PE, AuNPs-PBS-PE i AuNPs-citr-PE.

Obecność krystalitów złota w trzech badanych koniugatach potwierdziły rezultaty badań za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej. Na dyfraktogramach koniugatów widoczne są szerokie piki pochodzące od złota. Obliczona szerokość połówkowa w połowie wysokości pików Au (111) miała podobną wartość dla trzech koniugatów i wynosiła około $0,2^\circ$. Oprócz pików pochodzących od złota widoczne są dodatkowe piki o bardzo małej intensywności pochodzące od faz nieorganicznych. We wszystkich badanych koniugatach zidentyfikowano fazę Na_3OCl , natomiast w koniugacie AuNPs-PBS-PE zidentyfikowano dodatkowo fazę NaCl . Ponieważ na dyfraktogramach koniugatów nie zaobserwowano pików pochodzących od substancji czynnej, dlatego stwierdzono, że występuje ona w postaci amorficznej.

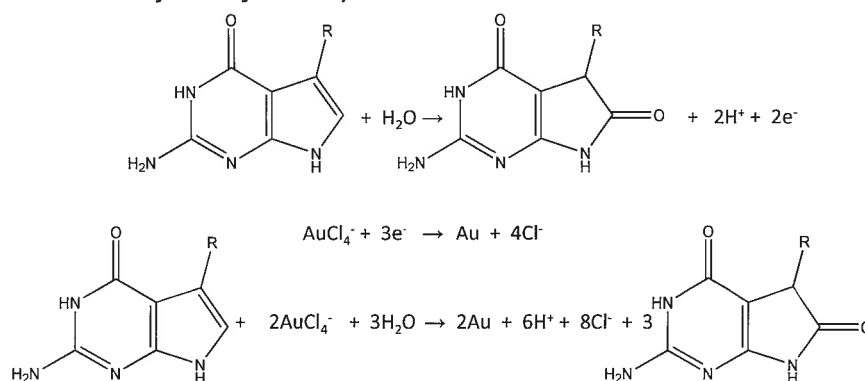
Za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej oraz spektroskopii ramanowskiej badano również liofilizowane mieszaniny przed i po reakcji. Na dyfraktogramie liofilizowanej mieszaniny przed reakcją widoczne są tylko piki pochodzące od fazy NaCl . Szerokie piki pochodzące od nanokrystalitów złota widoczne są na dyfraktogramie liofilizowanej mieszaniny poreakcyjnej. Brak pików pochodzących od substancji czynnej na obu dyfraktogramach sugeruje jej amorficzną postać.

Widma ramanowskie liofilizowanych mieszanin przed i po reakcji znacznie różniły się pomiędzy sobą oraz od widma substancji czynnej potwierdzając tym samym zmiany fazowe zachodzące podczas reakcji.

W trakcie prac opracowano stabilną syntezę koniugatów AuNP-PE o oczekiwanych rozmiarach nanocząstek i odpowiedni sposób ich oczyszczania. W celu otrzymania pełnej charakterystyki nowego produktu zastosowano multidyscyplinarne metody analityczne. Opracowano metody analityczne do kontroli syntezy (UV-Vis), potwierdzenia tożsamości (spektroskopie NMR, RS, elektrochemia, CE), czystości (CE), do charakterystyki nowego koniugatu (UV-Vis, TEM, XRPD, ELS, DLS), badania pokrycia nanocząstek złota substancją czynną (TGA). Ponadto analizowano osady oraz liofilizaty koniugatów nanocząstek złota z pemetreksedem wykorzystując metody rentgenowskiej

dyfrakcji proszkowej (XRPD), spektroskopie IR (ATR), RS oraz NMR. Zidentyfikowano i określono mechanizmy oddziaływania pemetreksedu z nanocząstkami złota. Analizy XRPD wykazały obecność złota. Analiza poszerzenia pików pochodzących od Au wykazała, że najmniejsze krystality Au wytworzono w mieszaninie liofilizowanej. W pozostałych próbkach poszerzenia pików pochodzących od Au były podobne, ale wskazujące na większe rozmiary krystalitów. W niektórych analizowanych osadach oraz w mieszaninie liofilizowanej wykryto NaCl. We wszystkich osadach obecne były również dodatkowe (ale te same) piki wskazujące na obecność niezidentyfikowanej fazy krystalicznej. Na dyfraktogramach nie wykazano obecności pemetreksedu w postaci krystalicznej, co wskazuje na jego amorficzną postać. Widma Ramana i IR osadów analizowano w odniesieniu do postaci krystalicznej i amorficznej pemetreksedu. Zarówno widma Ramana jak i IR charakteryzują się szerokimi pasmami, co potwierdza amorficzną postać pemetreksedu. Na widmach Ramana występują zmiany stosunków intensywności pasm pemetreksedu, znaczące przesunięcia pasm w zakresie $1670 - 1430 \text{ cm}^{-1}$ oraz pojawia się nowe pasmo przy $1467 - 1475 \text{ cm}^{-1}$. Zmiany te dotyczą drgań rozciągających: C=O, C=C, C=N oraz deformacyjnych N-H. Analiza wyżej wymienionych zmian prowadzi do wniosków dotyczących natury oddziaływań nanocząstek złota z pemetreksedem.

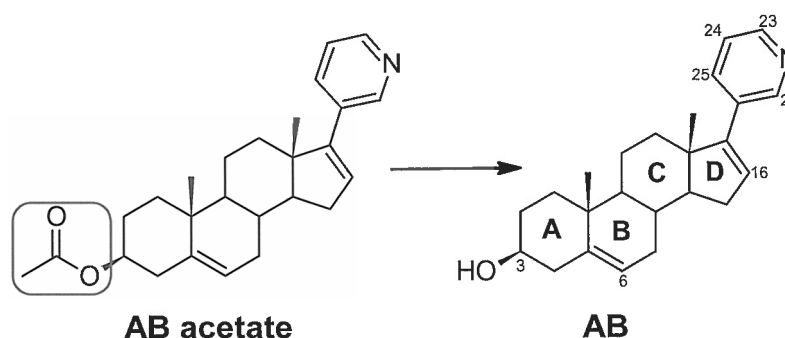
Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano mechanizm tworzenia koniugatu AuNPs-PE. Przeprowadzone badania wykazały, że PE może łączyć się bezpośrednio ze złotem przez grupy karboksylowe (-COOH) tworząc nanocząstki złota (AuNPs-PE). Wówczas pełni rolę zarówno reduktora jak i stabilizatora. W takim przypadku redukcja złota do nanocząstek złota wiąże się z utlenieniem PE. W koniugatach AuNPs-PE i AuNPs-PBS-PE, pemetreksed okazał się skutecznym ligandem dla jonów Au^{3+} poprzez tworzenie stabilnego pierścienia chelatującego. W wyniku kompleksowania zachodzi reakcja redoks, w której chelatowane jony Au^{3+} są redukowane in situ do atomów Au^0 , podczas gdy ugrupowanie C6-H pemetreksedu jest prawdopodobnie jednocześnie utleniane do odpowiedniego ugrupowania C6=O w sposób podobny do utleniania indoli [50]. Podobny mechanizm utleniania/redukcji PE można wywnioskować z przeprowadzonych badań elektrochemicznych. Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano mechanizm utleniania PE i redukcji Au^{3+} jak na rycinie 10.



Rycina 10. Propozycja mechanizmu utleniania PE i redukcji Au^{3+} .

H3 (AB, 3D)

Celem moich kolejnych badań, opisanych w artykule [H3], było opracowanie syntezy i pełna charakterystyka nanocząstek złota (AuNPs) połączonych z abirateronem (AB) (rycina 11).

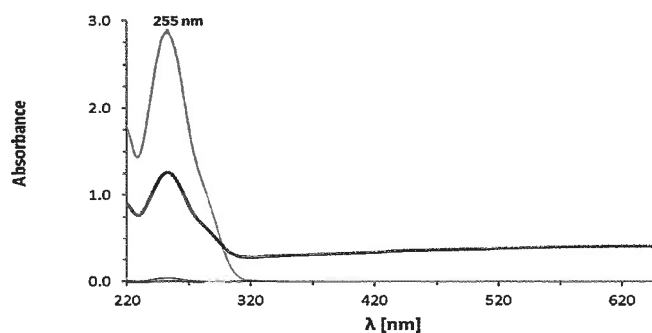


Rycina 11. Wzór strukturalny octanu abirateronu (AB acetate) i abirateronu (AB).

Abirateron (AB) jest aktywnym metabolitem octanu abirateronu. Jest nieodwracalnym inhibitorem 17 α -hydroksylazy/C17,20-lazy (CYP17), kluczowego enzymu w produkcji androgenów w jądrach i nadnerczach. Abirateron wykazuje niestety wiele skutków ubocznych. Może powodować miopatię i niedokrwistość. Wzrasta również ryzyko zwiększenia aktywności enzymów wątrobowych. Abirateron wchłania się trudno i jest podatny na proces hydrolizy przez esterazy. W związku z tym podawany jest w formie soli octanowej, która ma znacznie większą biodostępność oraz większą odporność na działanie tej grupy enzymów.

Prace związane z syntezą zaprojektowanych nanokoniugatów polegały na tworzeniu bezpośredniego połączenia AB ze złotem. Zastosowano metodę chemiczną otrzymywania AuNPs, która opiera się na redukcji jonów Au³⁺ do Au⁰. Przeprowadzono optymalizację syntezy, szczególnie opisaną w artykule. Badania wstępne polegały na wyborze rodzaju substancji do tworzenia koniugatu, pomiędzy octanem abirateronu a abirateronem. Związki te są hydrofobowe, dlatego bardzo ważnym etapem był dobór rozpuszczalnika, w którym rozpuszczono związki, a następnie poddano reakcji w środowisku wodnym. Optymalną mieszaniną rozpuszczalników, w których przeprowadzono syntezę był układ DMF/DMSO. Do kontroli syntezy i optymalizacji procesu oczyszczania opracowano metodę UV-Vis. Dodatkowo poprzez kontrolę zawartości złota w zliofilizowanych mieszaninach, sprawdzono wydajność reakcji. W celu określenia mechanizmu reakcji, przeprowadzono syntezę zarówno z octanem abirateronu jak i z abirateronem. Zaobserwowano, że reakcja z octanem abirateronu przebiega bardzo długo i z bardzo słabą wydajnością w porównaniu do reakcji z abirateronem. Jest to związane prawdopodobnie tym, że w pierwszym etapie następuje

hydroliza octanu abirateronu do abirateronu, a dopiero później tworzone są nanocząstki. Zaobserwowano, że zwiększenie czasu reakcji wpływa na wzrost wielkości nanocząstek. Powstała zatem hipoteza, że podczas redukcji złota do nanocząstek złota istotną rolę odgrywa grupa hydroksylowa (-OH). W badaniach z abirateronem przeprowadzono optymalizację oczyszczania koniugatu AuNPs-AB, stosując jako rozpuszczalniki DMF, acetonitryl i n-butanol oraz optymalizację prędkości wirowania. Najlepszą wydajność otrzymano przy zastosowaniu n-butanolu i prędkości wirowania 14 000 rpm. Do kontroli pozostałości nadmiaru AB w odciekach zastosowano metodę UV-Vis (rycina 12), która została również zwalidowana, aby wykazać jej przydatność, dokładność i precyzję w oznaczaniu pozostałości abirateronu w odciekach. Wykazano, że metoda jest liniowa, czuła i nie zawiera błędów systematycznych w zakresie 4-50 $\mu\text{g/mL}$. Granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio 3 $\mu\text{g/mL}$ i 4 $\mu\text{g/mL}$. Syntezy prowadzono w dwóch pH 7,4 i 3,6.



Rycina 12. Kontrola abirateronu w odciekach techniką UV-Vis: po pierwszym wirowaniu (czerwona linia); po dwóch wirowaniach (czarna linia); po trzech wirowaniach (niebieska linia): poniżej LOD.

Eksperymenty elektrochemiczne przeprowadzono przy użyciu woltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV) w roztworze DMSO, aby potwierdzić tworzenie nanocząstek złota modyfikowanych abirateronem. Na krzywych DPV obserwowano pik przy potencjale 1,1 V, który odpowiada utlenianiu abirateronu. Przedstawiono nową elektrochemiczną charakterystykę abirateronu wolnego i unieruchomionego na nanocząstkach złota. AB zawiera w swojej strukturze cykloheksanol, tak jak cholesterol, więc zaproponowano podobny mechanizm procesu elektrochemicznego. Dostępna literatura opisuje czteroelektronowe utlenianie cykloheksanolu w strukturze cholesterolu w roztworze acetonitrylu przy użyciu elektrody GCE, czego wynikiem jest obecność piku o potencjale 1,9 V [51, 52]. W badaniach obserwowano również jeden pik utleniania, co potwierdza skuteczną modyfikację nanocząstek złota abirateronem.

Wykonano również obliczenia za pomocą metod chemii teoretycznej i kwantowej dla dwóch modeli oddziaływania nanocząstki złota z abirateronem w formie kompleksu Au₁₃---cząsteczka abirateronu. Porównywano energie oddziaływania (BE) dla klastra złota umieszczonego w pobliżu pirydynowego atomu azotu cząsteczki abirateronu oraz grupy OH

lub C=O (w octanie). Wyniki obliczeń wykazały, że cząsteczka abirateronu lub octanu abirateronu powinna przyłączyć się do rdzenia złota od strony fragmentu zawierającego pirydynowy atom azotu, umożliwiając przeciwnemu końcowi cząsteczki oddziaływanie z innymi składnikami otoczenia. Średniej wielkości energia oddziaływania, ok. 20 kcal/mol, jest tylko ok. 4-krotnie większa, niż np. energia oddziaływania dwóch cząsteczek wody (ok. 5 kcal/mol). Oceniono optymalną strukturę obu kompleksów, a także kompleksów abirateronu z mniejszą (Au₅) i większą (Au₂₀) ilością atomów Au. Ponadto przewidziano częstości drgań harmoniczných i intensywności pasm Ramana wraz z ich interpretacją w oparciu o drgania normalne. Umożliwiło to zinterpretowanie większości pasm oscylacyjnych w zakresie 1000-1800 cm⁻¹. Przewidziano teoretycznie zmiany częstości drgań w obszarze odpowiadającym zakresowi 1660-1580 cm⁻¹ i porównano je w widmami eksperymentalnymi, które potwierdziły jakościowe zmiany wynikające z utworzenia kompleksów abirateronu z nanocząstkami złota.

Analiza porównawcza teoretycznych widm ramanowskich obliczonych dla założonych modeli molekuly AB jak również koniugatów Au₁₃-(N)AB i Au₁₃-(OH)AB wykazała, że na widmach występują różnice w zakresie 1100 – 1000 cm⁻¹, w którym widoczne są dwa charakterystyczne pasma przy około 1080 i 1040 cm⁻¹. Na widmie AB oba pasma pochodzą od drgań całej molekuly. Na widmach koniugatów pierwsze pasmo pochodzi od drgań molekuly AB, natomiast drugie pasmo pochodzi głównie od drgań „oddychających” pierścienia pirydyny oraz drgań części steroidowej. Drugie pasmo ma największą intensywność na widmie koniugatu Au₁₃-(N)AB, co sugeruje, że oddziaływania abirateronu z nanocząstkami złota zachodzą poprzez atom azotu.

Widma ramanowskie koniugatów charakteryzują się szerokimi pasmami, przy czym większe rozmycie pasm zaobserwowano na widmie koniugatu otrzymanego w pH 7,4. Związane jest to z mniejszymi nanokrystalitami złota pokrytymi abirateronem. Interesujące było również, że na obu widmach występuje jedno charakterystyczne wąskie pasmo przy 1028 cm⁻¹. Porównanie wybranych, charakterystycznych liczb falowych z zakresu 1660 – 1580 cm⁻¹ z widm eksperymentalnych AB i Au₁₃-(N)AB wykazało, że pasma na widmach koniugatów są przesunięte w kierunku niższych liczb falowych w porównaniu do widma AB. Natomiast pasmo przy 1028 cm⁻¹ na widmach koniugatów było przesunięte w kierunku wyższych liczb falowych w odniesieniu do widma AB. Przesunięcie pasm z zakresu 1660 – 1580 cm⁻¹ w kierunku niższych liczb falowych oraz obecność intensywnego pasma przy 1028 cm⁻¹ na widmach koniugatów sugeruje oddziaływania molekuly AB z nanocząstkami złota poprzez atom azotu.

Na dyfraktogramach liofilizowanych mieszanin, uzyskanych w pH 3,6 i 7,4 zidentyfikowano abirateron, szerokie piki pochodzące od nanokrystalitów złota oraz w mieszaninie otrzymanej w pH 7,4, fazę NaCl. Odpowiednio dla mieszanin otrzymanych w pH 3,6 i 7,4 wyznaczono wartości szerokości połówkowych w połowie wysokości piku Au (111), które wynosiły 0,5 i 1,4°, a średnie wartości rozmiarów krystalitów złota, oszacowane za pomocą równania Scherrera, wynosiły około 19 i 6 nm. Obecność nanokrystalitów złota

w koniugatach potwierdziły rezultaty badań za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej, bowiem na dyfraktogramach koniugatów widoczne były szerokie piki pochodzące od złota. Obliczone szerokości połówkowe w połowie wysokości pików Au (111) wynosiły około 0,5 i 1,0° odpowiednio dla koniugatów otrzymanych w pH 3,6 i 7,4. Średnie wartości rozmiarów krystalitów złota wynosiły około 17 i 9 nm. Na dyfraktogramach koniugatów nie zaobserwowano pików pochodzących od substancji czynnej, dlatego stwierdzono, że występuje ona w postaci amorficznej. Analiza dyfraktogramów wykazała również, że faza NaCl występująca pierwotnie w mieszaninach reakcyjnych koniugatów może być skutecznie usunięta podczas oczyszczania. Badania wykazały, że oczyszczenie nie wpływa znacząco na średnie wartości rozmiarów nanokrystalitów złota.

Średni rozmiar nanocząstek wyznaczony techniką TEM wynosił odpowiednio 30 i 24 nm dla syntez przeprowadzonych odpowiednio w pH 3,6 i 7,4. Potencjał zeta dla tych wartości wynosił 11 mV i 13 mV.

Ilość abirateronu na powierzchni nanocząstek obliczono za pomocą termogravimetrii. Krzywa TGA abirateronu wykazuje 95,5% ubytek masy w zakresie od 250 do 600°C pochodzący od rozkładu. Dlatego ten zakres temperaturowy użyto do analizy ilościowej. Ilość abirateronu wyznaczona z krzywych TGA wynosiła 7,8 i 10,2% dla koniugatów AuNPs-AB otrzymanych odpowiednio w pH 3,6 i 7,4.

Przeprowadzone badania techniką NMR potwierdziły obecność abirateronu w badanych próbkach.

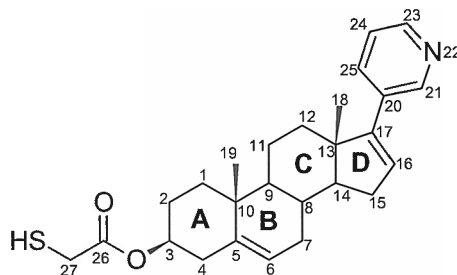
Opracowano nowatorską metodę syntezy koniugatu abirateronu z nanocząstkami złota, tworząc unikalny nanokoniugat o przewidywanych właściwościach przeciwnowotworowych i zastosowaniach biomedycznych.

H4 (TAB, 2D)

W kolejnych badaniach zaproponowano nową koncepcję syntezy z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych, w celu otrzymania koniugatów wykazujących większą stabilność od AuNPs-AB. Najślabsze bowiem oddziaływania z nanocząstkami złota zaobserwowano dla abirateronu, opisanego w pracy [H3]. Koncepcja pracy zakładała wprowadzenie grupy tiolowej do abirateronu, we fragmencie cząsteczki, który nie odpowiada za jego aktywność biologiczną.

Pierwszym etapem prac była synteza tiolowej pochodnej abirateronu, dla której przewidywano silniejsze oddziaływanie z nanocząstkami złota. Zaprojektowano kilka metod syntezy tiolowej pochodnej abirateronu, przy czym ostatecznie przeprowadzono estryfikację abirateronu za pomocą trytylowej pochodnej kwasu tioglikolowego. Pochodną wyizolowano za pomocą chromatografii kolumnowej, a jej struktura została potwierdzona metodami spektroskopowymi (NMR, MS). Przeprowadzono reakcję deprotekcji grupy trytylowej, w wyniku której, po oczyszczeniu chromatograficznym, wyizolowano oczekiwaną pochodną

tiolową abirateronu (TAB), której strukturę potwierdzono za pomocą badań NMR i MS. Wzór strukturalny nowego analogu abirateronu przedstawiono na rycinie 13.



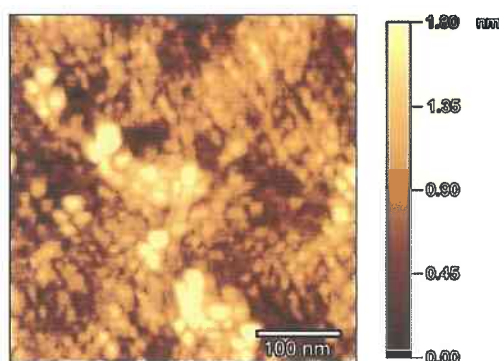
Rycina 13. Wzór strukturalny tioabirateronu (TAB).

Następnym etapem prac było badanie oddziaływań nowej tiolowej pochodnej abirateronu na płaskich powierzchniach złotych i z nanocząstkami złota. W tym celu zaprojektowano monowarstwę tioabirateronu na powierzchni elektrody złotej.

Samoorganizującą się monowarstwę (SAM) przygotowano przez chemiczne przyłączenie TAB do powierzchni elektrody złotej, a następnie zbadano za pomocą voltamperometrii cyklicznej. Badania wykonane w samym elektrolicie podstawowym w 0,2 M buforze fosforanowym (pH 7,0) potwierdzają formowanie się monowarstwy TAB. Świadczą o tym małe wartości pojemności dla TAB ($2,90 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), które wskazują na niską przepuszczalność monowarstwy dla jonów elektrolitu podstawowego i wody. Sugeruje to dość silną interakcję między grupami TAB i dobre upakowanie molekuł w monowarstwie. Jakość monowarstwy TAB na powierzchni złota potwierdzono wykonując badania w obecności próbnika redoks $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ rozpuszczonego w roztworze. Krzywe uzyskane dla zmodyfikowanej elektrody TAB wykazały jedynie wzrost prądu utleniania wraz ze wzrostem nadpotencjału, co sugeruje kinetyczną kontrolę procesu elektrody. Wykładniczy kształt krzywych voltamperometrycznych wskazuje na dobre właściwości blokujące monowarstwy TAB. Warstwa jest zwarta i dobrze zorganizowana, o czym świadczy brak sygnałów utleniania i redukcji próbnika redoks w badanym zakresie potencjału. Wskazuje to silną interakcję między cząsteczkami TAB ułożonymi w monowarstwie. Obliczono także powierzchnię przypadającą na jedną molekułę z piku desorpcji TAB w eksperymencie voltamperometrycznym. Pole powierzchni przypadające na jedną cząsteczkę wynosi $0,291 \text{ nm}^2$. Uzyskana wartość świadczy o dobrym uporządkowaniu i upakowaniu monowarstwy na elektrodzie złotej.

Ponadto zostało wykazane, że monowarstwa TAB ma tendencję do samorzutnego tworzenia nanocząstek złota po zanurzeniu jej do jonów złota. Potwierdzone zostało to za pomocą obrazowania techniką mikroskopii sił atomowych (AFM) (rycina 14). Obrazy AFM pokazały tworzenie nanocząstek złota w wyniku zanurzenia zmodyfikowanej elektrody złotej TAB w wodnym roztworze zawierającym 1 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Struktury te powstają w wyniku interakcji między związkiem TAB zaadsorbowanym na elektrodzie i jonami AuCl_4^- . Taki układ z nanocząstkami złota ma także katalityczne właściwości w procesie redukcji

tlenu, co potwierdzono wykonując badania elektrochemiczne. Pik redukcji tlenu zarejestrowany za pomocą elektrod złotych modyfikowanych TAB występuje przy mniej ujemnym potencjale niż dla niemodyfikowanej elektrody złotej, a maksymalna gęstość prądu redukcji tlenu wynosi $-248,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ i jest większa niż dla elektrody niemodyfikowanej o około 51%.



Rycina 14. Obraz AFM nanocząstek złota na monowastwie TAB zaadsorbowanej na płaskiej elektrodzie złotej po 72 h zanurzenia w roztworze 1 mM AuCl_4^- .

Otrzymane wyniki zapoczątkowały kolejny cykl prac tworzenia koniugatów AuNPs-TAB opisany w publikacji [H5].

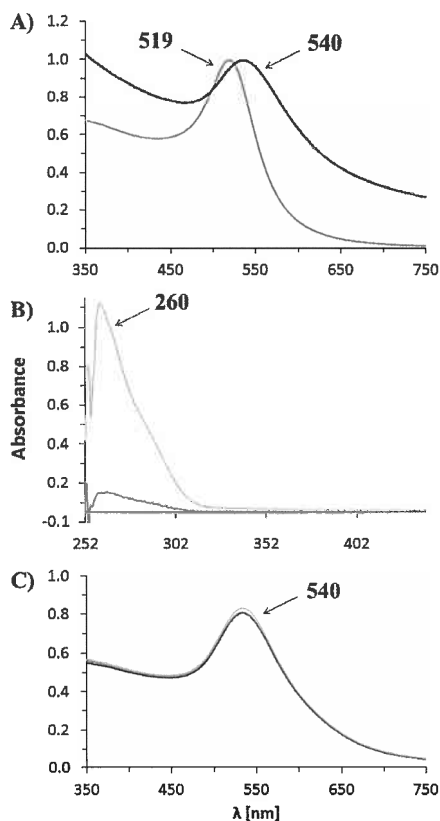
Uzyskane wyniki, opisane w pracach [H1-H4] zostały zaprezentowane jako komunikat ustny pt. "Design and molecular modeling of API-functionalized gold nanoparticles" na konferencji: XI Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku (MKNOL 2018) „Nauka dla przemysłu, przemysł dla nauki” dn. 14-16.11.2018 r. w Warszawie.

H5 (TAB, 3D)

Fizyczne oddziaływanie substancji czynnej z powierzchnią nanocząstek złota może być niekorzystne w terapii przeciwnowotworowej, ponieważ lek znajdujący się na nanocząstce już na etapie iniekcji może zostać wymieniony na inne związki zawarte w organizmie człowieka, które silniej oddziałują z powierzchnią nanocząstek. Proces ten może również prowadzić do agregacji nanocząstek złota. Problemy te zaobserwowano w przypadku nanocząstek złota fizycznie modyfikowanych abirateronem [H3], gdzie zaobserwowano najstarszą siłę wiązania pomiędzy składowymi koniugatu. W związku z tym nie może on efektywnie funkcjonować jako potencjalny nośnik abirateronu do komórek nowotworowych. Zaprojektowanie alternatywnego nośnika abirateronu wymagało zastosowania linkera, który powinien tworzyć wiązanie kowalencyjne z grupą hydroksylową pierścienia A abirateronu. Potencjalne przyłączenie linkera do cząsteczki pirydynowej abirateronu jest nieporządane ze względu na znany mechanizm metabolizmu abirateronu [53]. Konwersja abirateronu do metabolitu $\Delta 4$ -abirateronu (D4A) umożliwia 5-alfa- i 5-beta redukcję D4A przy węglu 5, dając sześć dodatkowych metabolitów abirateronu. Ważną obserwacją jest to, że podczas tych reakcji cząsteczka pirydyny pozostaje nienaruszona.

Cząsteczka pirydynowa sprzyja prawidłowemu rozpoznawaniu abirateronu przez enzymy steroidogenne, dlatego modyfikacje chemiczne powinny zachodzić np. w pierścieniu A z grupą hydroksylową. Ta strona cząsteczki abirateronu jest zaangażowana w dobrze znaną cząsteczkę octanu abirateronu stosowanego w tabletkach do terapii raka prostaty. Utworzenie wiązania estrowego z grupą hydroksylową abirateronu wykorzystano do syntezy tioabirateronu (TAB) opisanej w naszej poprzedniej pracy [H4].

Wcześniejsze badania pokazały, że TAB tworzy uporządkowaną i dobrze upakowaną monowarstwę [H4] i wytworzono nanocząstki złota jako wynik zanurzenia elektrody złotej modyfikowanej TAB w roztworze wodnym zawierającym 1 mM $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Kontynuacją prac było zatem przyłączenie TAB do nanocząstek złota, wykorzystując syntezę Turkevicha [19] w pierwszym etapie. Jako prekursor złota zastosowano HAuCl_4 i cytrynian sodu w roztworze wodnym jako stabilizator i reduktor, w celu otrzymania cytrynianowych nanocząstek złota. W wyniku tego otrzymano AuNPs o ujemnym ładunku pochodzącym od stabilizujących cząstki jonów cytrynianowych. Nanocząstki te wymagają chemicznego przekształcenia dla konkretnego zastosowania. Dinkel i współpracownicy [54] opisali, że cytryniany są tylko luźno związane z nanocząstkami złota (6,7 kJ/mol) i łatwo je wymienić na różne cząsteczki z grupami kotwiczącymi, takimi jak tiole, aminy, karboksylany, fosfiny itp. Rozpoczęto zatem prace nad przyłączeniem tiolowej pochodnej abirateronu, opracowaną procedurą, która polegała na wymianie ligandu pomiędzy nanocząstkami złota z cytrynianami a tioabirateronem. Tworzenie się AuNPs-TAB monitorowano metodą wizualną, kontrolując zmianę barwy z czerwonej (AuNPs-citr) na głęboką purpurę oraz za pomocą spektroskopii UV-Vis (rycina 15). Wstępne eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem różnych rozpuszczalników (DMSO, DMF, 1-butanol) i stosunków molowych AuNPs-citr : TAB (1:1, 1:2, 1:5, 1:8, 1:10) oraz różnych czasów reakcji (0-8h). Reakcja pomiędzy tioabirateronem a AuNPs-citr została zainicjowana w ciągu kilku sekund, natomiast pełna wymiana ligandu cytrynianowego nastąpiła po 4h. Podczas syntezy konieczny był duży nadmiar TAB. Pasma SPR posłużyło do monitorowania procesu tworzenia AuNPs-TAB. AuNPs z cytrynianami charakteryzowały się wyraźnym pasmem plazmonów powierzchniowych przy długości fali około 519 nm (rycina 15A). Zaobserwowano przesunięcie pasma SPR z 519 nm do 540 nm, zależne od wielkości i kształtu cząsteczek. To przesunięcie piku absorpcji w kierunku wyższych długości fal jest związane ze zmianą lokalnej stałej dielektrycznej wokół AuNPs w wyniku adsorpcji TAB. Oczyszczanie nanocząstek złota z nadmiaru substancji czynnej kontrolowano za pomocą techniki UV-Vis (rycina 15B) w supernatancie oraz techniką NMR, którą wykorzystano również do kontroli odmycia osadów z cytrynianów. Podczas oczyszczania i wirowania nie obserwowano agregacji, na co wskazuje brak zmian w paśmie maksymalnej absorpcji UV-Vis osadu AuNPs-TAB w porównaniu z koniugatami w mieszaninie reakcyjnej (rycina 15C).



Rycina 15. Widma UV-Vis: A) AuNPs-citr - linia niebieska; koniugatu AuNP-S-AB - linia czarna (mieszanina reakcyjna); B) kontrola TAB w odciekach: po 1 wirowaniu (linia zielona); po 2 wirowaniach (linia fioletowa); po 3 wirowaniach (linia czerwona): poniżej LOD; C) osad nanocząstek po oczyszczeniu.

Przeprowadzone prace eksperymentalne były wspomagane przez teoretyczne obliczenia struktury przestrzennej małych klastrów złota Au_n z tiolową pochodną abirateronu. Obliczenia wykonano przy użyciu teorii funkcjonału gęstości B3LYP/6-31G(d,p) wraz z potencjałem efektywnym Lanl2dz dla atomów Au. Wykorzystano również uproszczoną teorię funkcjonału gęstości do obliczenia potencjału chemicznego oraz twardości chemicznej. W oparciu o modelowe układy uzyskano ocenę sposobu oddziaływania tioabirateronu z atomami złota oraz przewidziano parametry geometryczne monowarstwy tioabirateronu na powierzchni cząstek złota (m.in. oceniono grubość monowarstwy na ok. 17 Å). Oceniono również energię wiązania tioabirateronu z atomami złota, ok. -46 kcal/mol, której wartość odpowiada ocenom dla podobnych układów znanych z literatury (tj. ok. -40 do -50 kcal/mol). Porównując energie wiązania modelowego układu Au_5 -cytryniany o różnym stopniu jonizacji wskazano, że omawiana w pracy wymiana cytrynianu na tioabirateron w kompleksach ze złotem może zachodzić, gdy cytrynian jest zjonizowany jedno- lub dwukrotnie. Podobną ocenę uzyskano również przy użyciu całkowicie niezależnej teorii uproszczonej wykorzystującej pojęcia potencjału chemicznego i twardości chemicznej. Porównując przepływ ładunku elektronowego w badanym kompleksie zauważono, że ok. 0,3-0,4 jednostki atomowej ładunku przemieściło się od cząsteczki

tioabirateronu do klastra atomów złota skutkując wyraźną polaryzacją ładunku. Tioabirateron stał się zatem jednostką spolaryzowaną dodatnio, natomiast klaster złota jednostką spolaryzowaną ujemnie. W oparciu o teoretycznie obliczoną budowę tioabirateronu oraz dostępne w literaturze bazy danych biochemicznych wskazano, że tioabirateron należy do grupy cząsteczek chemicznych będących kandydatami na leki (ang. drug-like molecules) oraz że może wykazywać działanie selektywne w stosunku do niektórych enzymów odpowiedzialnych za metabolizm (możliwe działanie jako inhibitora cytochromu CYP2C9).

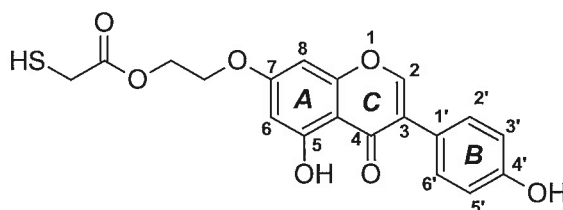
Wykonano również analizy IR w celu potwierdzenia obecności tioabirateronu na nanocząstkach złota. Na podstawie założonego modelu koniugatu (AuNPs-TAB) wykonano obliczenia optymalizacyjne za pomocą teorii funkcjonału gęstości (DFT). Efektem tych prac było m.in. otrzymanie teoretycznych widm IR dla AuNPs-TAB i TAB. Na początku porównano eksperymentalne i obliczone widma dla TAB i AuNPs-TAB w charakterystycznym zakresie $1800\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$. Największe zmiany pomiędzy widmami TAB i AuNP-TAB są obserwowane głównie w zakresie drgań rozciągających C=O. Widma teoretyczne z widmami eksperymentalnymi wykazują dobre dopasowanie w zakresie drgań rozciągających tej grupy. Na obliczonym widmie koniugatu AuNP-TAB, w zakresie $1850\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, widoczne są dwa pasma przesunięte w kierunku mniejszych wartości liczb falowych w odniesieniu do obliczonego widma TAB. Na eksperymentalnym widmie koniugatu, w zakresie $1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, również widoczne są dwa pasma przy 1728 i 1716 cm^{-1} , które są przesunięte w kierunku mniejszych wartości liczb falowych w odniesieniu do jednego pasma przy 1735 cm^{-1} obserwowanego na eksperymentalnym widmie TAB. Ten charakter przesunięcia w kierunku mniejszych wartości liczb falowych obserwowany na widmie koniugatu potwierdza oddziaływanie ligandu -S-AB z nanocząstkami złota. Obserwowany dublet przy ok 1720 cm^{-1} pochodzi ze sprzężenia grup karbonylowych znajdujących się na sąsiadujących molekułach -S-AB. Ten rodzaj rozdzielenia pasma jest znany w literaturze i potwierdza obecność dwóch populacji grup funkcyjnych, np. grup amidowych [55], hydroksylowych [56], w monowarstwie - związanych i niezwiązanych wiązaniami wodorowymi. W zakresie liczb falowych $1750\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ teoretyczne widma TAB i AuNPs-TAB nie różnią się od siebie znacząco. Również eksperymentalne widma TAB i AuNPs-TAB są podobne do siebie w zakresie $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$. Następnie porównano widma IR-ATR tioabirateronu i koniugatu AuNPs-TAB w całym zakresie $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. Pasma drgań rozciągających S-H na widmie TAB obserwuje się przy około 2529 cm^{-1} . Pasma to charakteryzuje się małą intensywnością i jest lepiej widoczne w widmie ramanowskim. Nie zaobserwowano tego pasma na widmie koniugatu, co jest spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem ligandu -S-AB z nanocząstkami złota.

Nowy koniugat scharakteryzowany został również metodami TEM, NMR i TGA. Badania biologiczne pozwoliły ustalić bezpieczne stężenie AuNPs-TAB (IC50) dla funkcji życiowych komórki. Badanie biokompatybilności wykazało, że AuNPs-TAB może być bezpieczny w zastosowaniu terapeutycznym do $25\text{ }\mu\text{M}$. Dodatkowo, eksperymenty

przeprowadzone na komórkach nabłonka prostaty dowiodły, że nowy związek TAB, jak również AuNPs-TAB, są bardziej biokompatybilne niż abirateron. Planowane są badania mające na celu określenie szlaków metabolicznych hepatocytów pod wpływem tiolowej pochodnej abirateronu, jak również wpływ jej na inhibicję cytochromu CYP17A.

H6 (TGE, 2D)

Zaproponowano tworzenie nowych pochodnych tiolowych wybranych API. Nowa idea zaowocowała opracowaniem procedury otrzymania nie tylko tiolowej pochodnej abirateronu, ale także tiolowej pochodnej genisteiny (rycina 16). Synteza została podzielona na 3 etapy: 1) otrzymanie trytylowego kwasu tiooctowego, 2) otrzymanie hydroksyalkilowej pochodnej genisteiny i 3) otrzymanie docelowej tiolowej pochodnej genisteiny. Opracowana w ramach projektu procedura syntezy TGE została opisana w publikacji [B15].



Rycina 16. Wzór strukturalny TGE.

Początkowe prace z nowym związkiem polegały na badaniu procesów redukcji i utlenienia na elektrodzie napyłanej złotem w celu określenia możliwości tworzenia nanocząstek złota, badano również mechanizmy zachodzące w monowarstwie.

W artykule [H6] tiolowana pochodna genisteiny (TGE) została przyłączona do elektrody złotej. Obecność grupy tiolowej pozwala na spontaniczne przyłączenie cząsteczek TGE w procesie samoorganizacji do powierzchni złota. W rezultacie na elektrodzie złotej samorzutnie tworzy się monowarstwa tego związku. Zaletą takich układów jest nanomolarna ilość TGE unieruchomiona na elektrodzie. Dodatkowo interpretacja krzywych cyklicznych jest łatwiejsza, ponieważ związek był obecny tylko na elektrodzie i nie było dopływu wolnego związku z głębi roztworu, jak to małe miejsce przy genisteinie rozpuszczonej w roztworze. Utlenianie TGE zaadsorbowanej na elektrodzie złotej badano metodą woltamperometrii cyklicznej w PBS pH 7,4. Gdy potencjał zmodyfikowanej elektrody TGE zmieniał się od -0,3 V do 0,3 V, na krzywych woltamperometrycznych nie zaobserwowano prądu Faradajowskiego. Jeśli potencjał rejestrowano w szerszym zakresie potencjałów, osiągając bardziej dodatnie wartości, obserwowano nieodwracalny pik utleniania przy 0,59 V (pik a1) i quasi-odwracalną parę pików przy potencjale bliskim 0,17 V (piki c2 i a2). Po pierwszym cyklu pik a1 szybko zanikał, a piki c2 i a2 wzrastały. Zależność prądów pików c2 i a2 od szybkości zmian potencjału wykazała, że wraz ze wzrostem szybkości zmian potencjału, na krzywych woltamperometrycznych zaobserwowano wzrost gęstości prądu pików utleniania i redukcji. Prąd pików c2 i a2 zależał liniowo od szybkości

zmian potencjału w zakresie 0,020–2 V/s, co wskazywało na obecność układu zaadsorbowanego na elektrodzie złotej. Podobne krzywe voltamperometryczne zarejestrowali inni autorzy dla związków 4-aminotiofenolu i 4-hydryksotiofenolu [57-62], a także opisano w pracy przeglądowej przez Oliveira-Brett i współpracowników [63]. Obserwowane piki wyjaśniono powstawaniem dimerów w pierwszym etapie, a następnie tworzeniem się układu chinon/hydrochinon.

W celu badania właściwości elektrod modyfikowanych utlenioną monowarstwą TGE przeprowadzono testy w buforze fosforanowym o różnym pH w zakresie od 5,5 do 8,0. Zbadano zależność potencjału pików a2/c2 od pH roztworu. Na krzywych voltamperometrycznych zaobserwowano, że wraz ze spadkiem pH roztworu para pików a2/c2 przesuwają się do wyższych potencjałów, a gęstość prądu pików maleje. Została wyznaczona zależność między gęstością prądu pików anodowego i katodowego. Nachylenie krzywej dla pików katodowych wynosiło około 45 mV na jednostkę pH, co jest bliskie wartości 59 mV dla dwuelektronowego i dwuprotonowego procesu. Wykazano liniową zależność potencjału pików a2 od pH, z nachyleniem krzywej 74 mV na jednostkę pH, które nieznacznie odbiegało od wartości 59 mV. Otrzymane wartości wskazują również na dwuelektronowy i dwuprotonowy proces redoks. Jest to bardzo ciekawa obserwacja, ponieważ piki c2/a2 pojawiają się dopiero po utlenieniu związku (pik a1), co oznacza, że grupa hydroksylowa C4' w pierścieniu B genisteiny nie utlenia się w pierwszym cyklu. Pik a1 należy przypisać utlenianiu grup hydroksylowych C5 przy pierścieniu A genisteiny, ponieważ grupa C7 przy pierścieniu A genisteiny jest zablokowana przez łącznik z grupą tiolową. Pik a1 może być również odpowiedzialny za przyłączenie grupy -OH w pierścieniu B przy C3' lub C5' genisteiny. W pierścieniu B powstaje układ chinon/hydrochinon, co przejawia się obecnością pary pików a2/c2, które odpowiadają procesowi $2e^-/2H^+$. Dodatkowo pik a1 jest bardzo duży (prąd pików, ładunek pod pikami) w porównaniu do pików a2/c2, co może sugerować, że zachodzi tam więcej niż jeden proces. Wyjaśniono to zjawisko równoczesnym procesem polimeryzacji i przyłączenia grupy -OH do pierścienia B tiogenisteiny.

W kolejnym eksperymencie jakość monowarstwy TGE na złocie sprawdzono w obecności próbnika redoks $[Fe(CN)_6]^{4-}$ rozpuszczonego w roztworze. Badania przeprowadzono w odtlenionym 0,5 M KCl zawierającym 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$. Podczas rejestracji pierwszego cyklu, na krzywej voltamperometrycznej, w badanym zakresie potencjałów, zaobserwowano jedynie pik utleniania próbnika redoks o gęstości prądu $215 \mu A/cm^2$ i potencjale 0,60 V. W tym cyklu zachodzi również utlenianie monowarstwy (pik a1 opisany w poprzednim akapicie), co odpowiada polimeryzacji cząsteczek TGE i przyłączeniu grupy -OH do pierścienia B. W kolejnym cyklu pik utleniania przesuwają się do bardziej dodatnich potencjałów, a gęstość prądu zmniejsza się. Wynikać to może ze zorganizowania monowarstwy na elektrodzie oraz słabszego wnikania próbnika redoks w monowarstwę. Może to być spowodowane tworzeniem się polimeru na elektrodzie. W trzecim i kolejnych cyklach maksymalna gęstość prądu nieznacznie maleje, a potencjał pików przesuwają się do bardziej dodatnich wartości, co świadczy o stabilizacji monowarstwy.

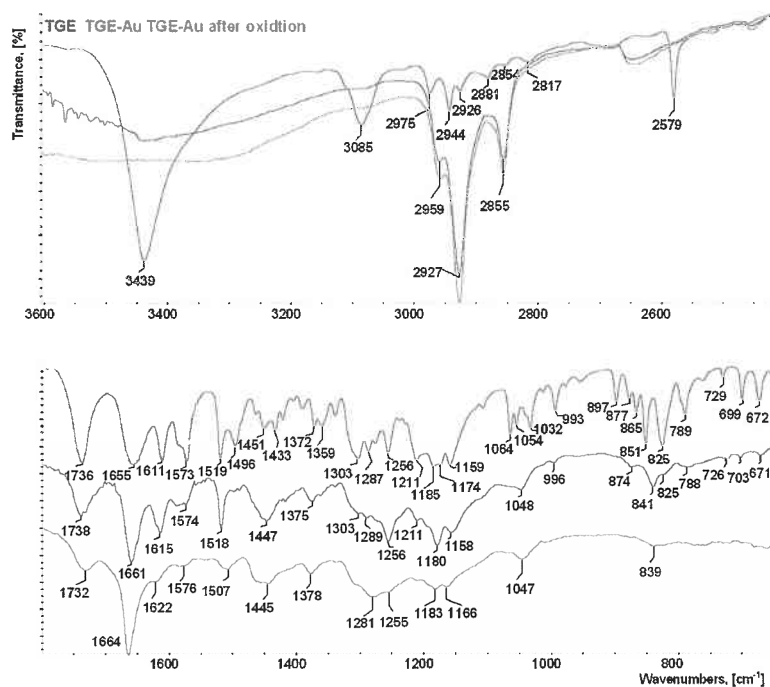
Desorpcję monowarstwy TGE zaadsorbowanej na elektrodach złotych przeprowadzono również poprzez rejestrację krzywych woltamperometrycznych w szerokim zakresie potencjałów w 0,1 M roztworze wodorotlenku sodu. Na krzywych woltamperometrycznych zaobserwowano piki redukcji w zakresie potencjałów od -0,7 V do 1,2 V. Sugeruje to, że związek zaadsorbowany na elektrodzie oddziałuje z elektrodą poprzez wiązanie S-Au i tworzy również silne oddziaływania międzycząsteczkowe TGE-TGE. Doświadczenie to potwierdza obecność monowarstwy TGE na elektrodzie złotej. W przypadku badań tiogienisteiny na elektrodzie złotej łatwiej jest interpretować wyniki w porównaniu z badaniami prowadzonymi z geniesteiną rozpuszczoną w roztworze, gdzie występuje silna adsorpcja zarówno substratów, jak i produktów reakcji elektrodowych. Na podstawie obserwacji i badań Oliveira-Brett i współpracowników [63] oraz przeprowadzonych badań elektrochemicznych TGE-Au wysunięto wnioski:

- TGE zaadsorbowana na powierzchni elektrody złotej tworzy dobrze upakowaną monowarstwę.
- W wyniku utleniania TGE powstaje nowy związek.
- Badania w roztworach o różnych pH świadczą o tym, że wymieniane są $2e^-/2H^+$ podczas procesów redoks, co może odpowiadać parze chinon/hydrochinon.
- TGE można zdesorbować z powierzchni elektrody złotej do roztworu.

Zastosowano techniki spektrometryczne i spektroskopowe wsparte obliczeniami metodami chemii teoretycznej i modelowaniem molekularnym dla układów modelowych do identyfikacji nowego związku powstającego na elektrodzie w wyniku utlenienia tiogienisteiny. Przeprowadzone badania z zastosowaniem techniki spektrometrii mas MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Mass Spectrometry) wymagały opracowania niekonwencjonalnego sposobu przeprowadzenia analizy. W typowym pomiarze metodą MALDI, kroplę roztworu próbki (o objętości rzędu dziesiątych części μL) umieszcza się na podstawie ze stali nierdzewnej, miesza z roztworem organicznej matrycy i po wyschnięciu poddaje analizie. W opisywanych tu badaniach widmo masowe musiało być rejestrowane bezpośrednio z powierzchni elektrody złotej, na której analit obecny w formie monowarstwy był uprzednio poddany elektrochemicznemu utlenieniu. Bezpośrednio przed rejestracją widma mas elektroda była pokrywana organiczną matrycą, której rola polegała na absorpcji promieniowania lasera jonizującego próbkę. Matryca została wybrana spośród następujących związków: kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA), kwas synapinowy (SA), kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB), kwas 3-hydroksypikolinowy (HPA), 2,4,6-trihydroksyacetonfenon (THAP). Kryteriami wyboru matrycy były: stosunek intensywności sygnałów próbki do szumu oraz interferencja sygnałów matrycy z sygnałami analitu. Najlepsze wyniki uzyskano z udziałem matrycy DHB i dla niej wykonano interpretację sygnałów. Odniesieniem dla widm uzyskanych dla analitu obecnego na elektrodach złotych były wyniki pomiarów tiogienisteiny uzyskane w standardowym eksperymencie MALDI – z zastosowaniem podstawy ze stali nierdzewnej. W tych warunkach niezwiązana tiogienisteina w różnych matrycach obserwowana jest jako jon m/z 389 Da $[M+H]^+$.

Dodatkowo obserwowane są addukty z sodem i potasem: m/z 411 Da $[M+Na]^+$, m/z 427 $[M+K]^+$. Na widmie elektrody z unieruchomioną TGE przed utlenieniem obserwowany jest jon m/z 774 Da. Zaobserwowano więc, że TGE z monowastwy wybijana jest przez laser jako disiarczek. Ciekawym zjawiskiem jest związek powstający po utlenieniu TGE na elektrodzie. Na widmie elektrody z unieruchomioną TGE po utlenieniu obserwowane są dwa istotne jony m/z 1148 Da i 1132 Da. Zaproponowano więc mechanizm utleniania, w wyniku którego prawdopodobnie łączą się trzy cząsteczki TGE z jednoczesną modyfikacją w strukturze. Zaobserwowano również na widmie oderwanie grupy karbonylowej przy m/z 1132 Da. W literaturze opisano przypadek, w którym utlenienie genisteiny polega na tworzeniu dimerów i trimerów w pozycji orto pierścienia B. Opisane w pracy [H6] badania wskazują na prawdopodobną polikondensację/polimeryzację tiogenisteiny jako wynik utlenienia z jednoczesnym utlenieniem pierścienia B.

Na rycinie 17 zestawiono trzy widma IR: tiogenisteiny (widmo transmisyjne próbki anizotropowej zarejestrowane dla pastylki z KBr) oraz tiogenisteiny na elektrodzie Au przed i po utlenieniu (widma IR-ATR). Obecność grup hydroksylowych w cząsteczce tiogenisteiny (TGE) potwierdza wyraźne pasmo przy 3439 cm^{-1} . Pierwsza charakterystyczna różnica między widmem TGE i obu widmami TGE na elektrodzie Au przed i po utlenieniu jest widoczna w charakterystyce pasma pochodzącego od drgań rozciągających grup $-OH$. W przeciwieństwie do widma anizotropowej próbki TGE na dwóch pozostałych widmach widoczne jest szerokie pasmo w zakresie od 3600 do 3200 cm^{-1} . Biorąc pod uwagę, że w cząsteczce TGE dwie grupy hydroksylowe mogą uczestniczyć w wiązaniach wodorowych między- i wewnątrzcząsteczkowych, poszerzenie pasma na obu widmach TGE na elektrodzie Au przed i po utlenieniu sugeruje zmiany w obrębie wiązań wodorowych. Pasma pochodzące od drgań rozciągających C-H z pierścieni aromatycznych i grupy metylenowej cząsteczki TGE obserwuje się w zakresie od 3085 do 2817 cm^{-1} . Zmianę w wartościach liczb falowych tych drgań zastosowano do rozróżnienia konformacji łańcuchów alkilowych pomiędzy konformacją *all-trans* - quasi krystaliczną, która występuje w ściśle uporządkowanych monowarstwach a konformacją wynikającą z nieuporządkowania łańcuchów w fazie ciekłej z defektami typu *gauche*. Ogólnie obserwowanym trendem dla alkanotoli zawierających więcej niż dziesięć atomów węgla w łańcuchach jest wzrost wartości liczb falowych przy których występują asymetryczne i symetryczne drgania rozciągające grupy metylenowej, odpowiednio od około 2918 do 2924 cm^{-1} i od około 2851 do 2855 cm^{-1} podczas przejścia z nieuporządkowanego stanu do stanu quasi krystalicznego. Krótsze łańcuchy również wykazują charakterystykę widma jak dla stanu nieuporządkowanego.



Rycina 17. Zestawienie widm IR: TGE (w pastylce z KBr), TGE na elektrodach Au przed i po utlenienie (ATR). Okno górne 3600–400 cm^{-1} ; okno dolne 1800–650 cm^{-1} .

Na widmach TGE na elektrodach Au przed i po utlenieniu widoczne są dwa charakterystyczne, bardzo intensywne pasma przy 2927 i 2855 cm^{-1} , które pochodzą od drgań asymetrycznych i symetrycznych grupy metylenowej. Pasma te są przesunięte o 1 cm^{-1} w kierunku większych wartości liczb falowych w odniesieniu do ich odpowiedników na widmie TGE. Ta zmiana nie dowodzi uporządkowania quasi krystalicznego, jak w przypadku modelowych alkanotoli, ponieważ cząsteczka TGE charakteryzuje się krótkim łańcuchem alkilowym. Aby oszacować kąty obrotu molekuł wokół własnej osi i ich nachylenia względem normalnej do powierzchni złota, porównano wartości intensywności dla pasm pochodzących od drgań asymetrycznych i symetrycznych grupy metylenowej oraz drgań rozciągających asymetrycznych grupy C-O-C z widm TGE (pastylka z KBr) i TGE na Au (IR-ATR). Kąty obrotu i nachylenia wynosiły odpowiednio 43 i 77°.

Pasma pochodzące od drgań rozciągających S-H w cząsteczce TGE obserwuje się przy 2579 cm^{-1} zarówno na widmie IR jak i ramanowskim. Brak tego pasma na obu widmach TGE na elektrodach wskazuje na utworzenie nowego wiązania bezpośrednio przez atom siarki do powierzchni elektrody Au.

W cząsteczce TGE obecne są dwie grupy karbonylowe, jedna w łańcuchu, a druga w pierścieniu. Porównanie dwóch wartości 1736 i 1655 cm^{-1} z wartością odniesienia 1647 cm^{-1} dla grupy karbonylowej z cząsteczki genisteiny (GE) pozwala przyporządkować pasmo przy 1655 cm^{-1} do pierścienia i pasmo przy 1736 cm^{-1} do łańcucha. Przypuszcza się, że grupa karbonylowa z pierścienia uczestniczy w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym z sąsiadującą grupą hydroksylową. Pasma pochodzące od drgań rozciągających grupy karbonylowej z łańcucha na widmie TGE na elektrodzie Au jest lekko przesunięte

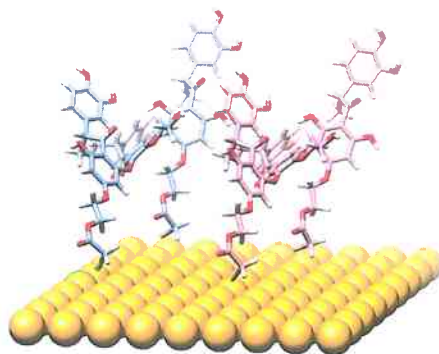
w kierunku większych wartości liczb falowych od 1736 cm^{-1} do 1738 cm^{-1} co może wskazywać na zerwanie wiązania $C = O \dots H-S$. Ale na widmie TGE na elektrodzie Au po utlenieniu, pasmo od drgań rozciągających grupy karbonylowej jest przesunięte w przeciwnym kierunku do wartości 1732 cm^{-1} . Pasma drgań rozciągających grupy karbonylowej przyporządkowanej pierścieniowi na widmie TGE na elektrodzie Au jest przesunięte w kierunku większych wartości liczb falowych z 1655 na 1661 cm^{-1} co wskazuje na osłabienie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego $C=O-O-H$, które może być spowodowane wzmocnieniem interakcji międzycząsteczkowych z sąsiednimi cząsteczkami. Jednocześnie obserwuje się jednak wzrost intensywności względnej tego pasma. Na widmie TGE na elektrodzie Au po utlenieniu pasmo to jest przesunięte do wartości 1664 cm^{-1} . Przypuszcza się, że ta znacząca zmiana w kierunku większych wartości jest spowodowana przez rozerwanie wewnątrzcząsteczkowego wiązania $C=O-O-H$ pierścienia C podczas reakcji utleniania.

Pasma pochodzące od drgań rozciągających $C=C$ na widmach IR i ramanowskim TGE widoczne są w zakresie od 1611 do 1496 cm^{-1} . Pasma przy 1611 cm^{-1} na widmie TGE jest przesunięte w kierunku większych liczb falowych do 1615 cm^{-1} i 1622 cm^{-1} na widmach TGE na elektrodzie Au odpowiednio przed i po utlenianiu. Warto zaznaczyć, że większe przesunięcie pasma $C=C$ jest w odniesieniu do widma TGE po utlenieniu oraz zmniejszyła się względna intensywność tego pasma. Podobne zachowanie obserwuje się dla pasm: 1573 cm^{-1} (TGE), 1574 cm^{-1} (TGE na Au elektrodzie przed utlenieniem) i 1576 cm^{-1} (po utlenieniu) oraz dla dubletu pasm przy 1519 cm^{-1} i 1496 cm^{-1} (TGE). Obserwacje całego zakresu drgań rozciągających $C=C$ wskazują na głębokie zmiany w trzech pierścieniach utlenionego związku TGE na powierzchni Au. Na widmach IR i ramanowskim TGE w zakresach drgań deformacyjnych grupy metylenowej i hydroksylowej obserwuje się dwa oddzielne dublety odpowiednio przy 1451 cm^{-1} i 1433 cm^{-1} oraz przy 1372 cm^{-1} i 1359 cm^{-1} . Na obu widmach TGE na elektrodzie Au przed i po utlenieniu, widoczne są szerokie pasma od drgań deformacyjnych grup metylenowych odpowiednio przy 1447 cm^{-1} i 1445 cm^{-1} . Na tych widmach obserwuje się również szerokie pasma od grup hydroksylowych przy 1375 cm^{-1} i 1378 cm^{-1} . Na widmach IR i ramanowskim TGE widoczny dublet przy 1174 cm^{-1} i 1159 cm^{-1} pochodzi od asymetrycznych drgań rozciągających $C-O-C$ i drgań rozciągających $C-OH$. Pasma od symetrycznych drgań rozciągających grupy $C-O-C$ obserwuje się na widmie ramanowskim przy 993 cm^{-1} i 877 cm^{-1} . Natomiast na widmie IR dla TGE na elektrodzie Au przed utlenieniem dublet występuje przy 1180 cm^{-1} i 1158 cm^{-1} a na widmie TGE po utlenieniu dublet jest znacznie przesunięty o około 10 cm^{-1} do wartości 1183 cm^{-1} i 1166 cm^{-1} . Na widmie IR dla TGE pasma od drgań deformacyjnych $C-H$ poza płaszczyzną od pierścieni aromatycznych są widoczne przy 851 cm^{-1} i 825 cm^{-1} . Na widmach TGE na elektrodach Au przed i po utlenieniu te pasma występują przy ok. 841 cm^{-1} i 839 cm^{-1} . Ponadto warto zauważyć, że pasmo przy 839 cm^{-1} jest bardzo szerokie i ma mniejszą intensywność niż pasmo przy 841 cm^{-1} , co może świadczyć o tym, że utlenianie TGE wpływa na pierścienie cząsteczki.

Równoległe do badań eksperymentalnych wykonano obliczenia metodami chemii teoretycznej i modelowania molekularnego dla układów modelowych. Obliczenia kwantowe wykonano przy pomocy teorii funkcjonału gęstości w wersji B3LYP z średniej wielkości bazami atomowymi 6-31G(d), 6-31G(d,p) oraz 6-311++G(d,p) dla atomów H, C, N, O, S zależnie od wielkości badanego układu. W przypadku modelowania dużych układów (ok. 800 atomów), skorzystano z półempirycznej metody chemii kwantowej PM7. Zaprojektowano model monowarstwy TGE na powierzchni złota odpowiadający fragmentowi elektrody Au lub fragmentowi zewnętrznej powierzchni nanocząstki złota. Model tworzyło 81 atomów Au o geometrii powierzchni Au(111) oraz 26 cząsteczek TGE. Po częściowej optymalizacji metodą PM7 uzyskano niemal równoległe ułożenie cząsteczek TGE względem siebie i które równocześnie były prostopadłe do powierzchni Au. Położenia atomów Au nie podlegały optymalizacji. Na podstawie geometrycznych rozmiarów cząsteczek TGE oceniono grubość monowarstwy o wartości ok. 21 Å. Najkrótsza odległość między atomami siarki wynosiła ok. 5 Å, zaś między sąsiednimi cząsteczkami TGE ok. 8 Å.

Następnie obliczono niektóre własności spektralne biocząsteczki w oddziaływaniu z powierzchnią złota w celu porównania z widmami eksperymentalnymi. Na podstawie obliczeń kwantowych w ramach teorii funkcjonału gęstości (B3LYP/6-31G(d,p)) zinterpretowano w widmie IR niewielkie, ok. 6 cm^{-1} przesunięcie pasma karbonylowego C(4)=O w kierunku wyższych częstości obserwowane po utworzeniu monowarstwy TGE na nanocząstkach Au. Poprzez porównanie częstości drgań grupy C(4)=O w cząsteczce TGE z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym i bez takiego wiązania wykazano, że obserwowany empirycznie wzrost częstości drgania grupy karbonylowej pochodzi z efektu osłabienia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, które najprawdopodobniej jest konsekwencją zbliżenia się sąsiednich cząsteczek TGE wskutek utworzenia monowarstwy na powierzchni Au i utworzenia dodatkowych oddziaływań międzymolekularnych z udziałem grupy C(5)-OH.

Ponieważ w trakcie pomiarów techniką MALDI-MS powierzchni elektrody Au pokrytej monowarstwą TGE i po jej elektrochemicznym utlenieniu stwierdzono obecność związku o zdecydowanie większej masie, a z kolei widma ATR-IR wskazywały, że widmo nieznanego związku nie może być sumą widm monomerów TGE, przypuszczano zatem, że nieznaną związek powstał z połączenia min. trzech cząsteczek TGE. Otwartą kwestią był sposób połączenia trzech cząsteczek TGE wiązaniami chemicznymi. W tej sytuacji zaproponowano badania modelowe. Najpierw zbadano rozkład gęstości spinowej utlenionej cząsteczki TGE, która była pozbawiona jednego atomu wodoru grupy (C-4')-OH. Na tej podstawie oceniono prawdopodobne miejsca w cząsteczce TGE podatne na utworzenie wiązań chemicznych, przypuszczalnie C-C lub C-O. W trakcie opracowania modelu zaproponowano kilka struktur quasi-trimerów TGE (rycina 18), m.in. połączonych wiązaniem dwusiarczkowym jak i połączonych wiązaniami aryl-O-aryl. Odległość między atomami siarki w sąsiednich quasi-trimerach TGE wynosi ok. 13 Å, natomiast wewnątrz quasi trimerów odległość S-S wynosi ok. 11 Å.



Rycina 18. Molekularny model dwóch quasi-trimerów TGE na powierzchni Au81.

W artykule zweryfikowano właściwości przeciwnowotworowe zmodyfikowanej struktury cząsteczki genisteiny opierającej się na podstawieniu w miejscu C7-OH łącznika etylowego i reszty kwasu tioglikolowego. We wstępnych badaniach biologicznych stwierdzono, że TGE wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka prostaty DU145 niż sama genisteina (GE). Ponadto, wydedukowana w niniejszej pracy forma trimerów TGE po utlenieniu może zwiększać odpowiedź biologiczną w porównaniu z lekiem macierzystym ze względu na synergizację tej odpowiedzi. Najczęściej leki dimeryczne/trimeryczne nie są uwalniane (lub rozszczepiane) w komórce, więc mogą działać jako zupełnie nowa jednostka molekularna wewnątrz komórek docelowych.

Przebiegające procesy utleniania i redukcji oraz wyniki badań biologicznych świadczą o tym, że tiogenisteina może mieć ciekawe zastosowanie biomedyczne również jako część koniugatu AuNPs-TGE. Zasadne jest więc zaprojektowanie i przeprowadzenie syntez zmierzających do wytworzenia nanocząstek złota z tiogenisteiną [HO - manuskrypt przygotowywany do druku]. Szerszy aspekt tego spojrzenia wskazuje, że tworzenie tiolowych pochodnych API jest procesem czasochłonnym i przebiegającym ze słabą wydajnością z koniecznością blokowania grupy -SH (trytylowanie grupy). Etap ten można ominąć przyłączając linker tiolowy do nanocząstki złota. Następnie opracować metodę tworzenia wiązania estrowego z wybranym API na nanocząstce złota, dlatego planowana jest kontynuacja prac.

Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac / podsumowanie publikacji / wnioski

Większość stosowanych leków to związki o niskiej masie cząsteczkowej, które charakteryzują się szybkim metabolizmem i szybkim wydalaniem z organizmu, niekorzystną biodystrybucją oraz niewielką wybiórczością działania terapeutycznego. Medycyna ma już szeroki wachlarz środków do leczenia różnych chorób, natomiast problemem jest ich

właściwe użycie i wybiórcze ich dostarczenie w celu zapewnienia optymalnego efektu terapeutycznego. Nowoczesne systemy dostarczania leków, a nie jedynie sama substancja czynna, umożliwiają zwiększenie skuteczności leczenia. Selektywność oraz skuteczność leków istotnie zwiększa potencjał nanocząstek stosowanych w terapii nowotworowej jako nośniki leków przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. W opisywanych pracach przedstawiłam koncepcję nanocząstek złota i płaskich powierzchni złota z przyłączonymi, wybranymi substancjami farmaceutycznymi i ich nowymi analogami (tiogienisteiną, tioabirateronem).

Moim osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest opracowanie syntez oraz zaprojektowanie multidyscyplinarnych badań analitycznych w celu otrzymania szerokiej charakterystyki unikalnych koniugatów AuNPs-API o przewidywanych właściwościach przeciwnowotworowych i zastosowaniach biomedycznych. Zaproponowałam nową formę leku dla genisteiny połączonej z nanocząstkami złota (AuNPs-GE), pemetreksedu (AuNPs-PE), abirateronu (AuNPs-AB), tioabirateronu (AuNPs-TAB) oraz nowe monowarstwy z tioabirateronem (SAMs – TAB) i tiogienisteiną (SAMs – TGE).

W artykułach przedstawiłam proste i szybkie sposoby otrzymywania koniugatów, które nie zostały opisane dotychczas w literaturze. Opracowałam syntezy stabilnych koniugatów o oczekiwanych rozmiarach nanocząstek i zoptymalizowałam sposób ich oczyszczania. Wytworzone koniugaty zostały scharakteryzowane pod względem tożsamości, czystości, rozmiaru i ładunku, zaproponowanymi przeze mnie metodami analitycznymi, które potwierdziły ich odpowiednią jakość.

Podczas syntez otrzymywałam próbki polidispersyjne i monodispersyjne nanocząstek złota. Kierunek prac zmierzał do otrzymania nanocząstek złota monodispersyjnych, o jak najbardziej zbliżonych rozmiarach. Rozmiary nanocząstek obrazowano za pomocą technik TEM, XRPD i mierzono za pomocą DSL oraz opracowaną przeze mnie nową metodą ICP-MS [H0]. Podczas optymalizacji oczyszczania istotne było kontrolowanie wolnej (niezwiązanej) substancji czynnej. Opracowałam metodę UV-Vis do oznaczenia pozostałości substancji czynnych w mieszaninach reakcyjnych i odciekach. Technikę UV-Vis stosowałam nie tylko do określenia właściwości otrzymanych koniugatów ale również do kontroli tworzenia nanocząstek złota w mieszaninach reakcyjnych oraz do badania stabilności otrzymanych osadów w buforze PBS. Do interpretacji wykorzystałam widma absorpcji nanokryształów metali, które występują w zakresie widzialnym i są one zdominowane przez pasma plasmonu (SPR). W celu określenia stopnia naładowania otrzymanych koniugatów wyznaczano potencjał zeta techniką ELS. Zaproponowałam również mechanizmy powstawania otrzymanych koniugatów na podstawie przeprowadzonych metod obliczeniowych, widm IR, ramanowskich i badań elektrochemicznych. Analiza widm oscylacyjnych otrzymanych przy zastosowaniu techniki spektroskopii IR jak również komplementarnej do niej spektroskopii ramanowskiej, pozwoliła na analizę zarówno struktury badanych cząsteczek, jak i ich oddziaływań z otoczeniem. Tym samym była odpowiednią techniką do detekcji tworzących się wiązań nośnik -

substancja czynna. Otrzymane widma IR i ramanowskie koniugatów cechowały się zmianą położenia wybranych pasm w porównaniu z widmami przyłączanych substancji, co wskazywało na powstawanie wiązań pomiędzy tymi substancjami, a nanocząstkami złota. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego była również z powodzeniem stosowana do detekcji substancji czynnej w koniugatach, wymagało to jednak wcześniejszego dokładnego oczyszczenia nadmiaru substancji czynnej, niezwiązanej z nanocząstkami złota. Do badania nanocząstek złota stosowano również techniki elektrochemiczne aby potwierdzić obecność przyłączonej, elektroaktywnej substancji farmaceutycznej do nanocząstek złota. Badania te pozwoliły również na wyznaczenie stężenia powierzchniowego substancji na nanocząstkach złota, jak również potwierdzenia mechanizmów reakcji utleniania/redukcji. Zaproponowane przeze mnie metody elektrochemiczne służyły do badania właściwości redoks tworzenia nanocząstek. Dodatkowo prace elektrochemiczne zastosowane zostały do badania oddziaływań API na płaskich powierzchniach złota, badania oddziaływań pomiędzy API zaadsorbowanymi na elektrodach, gęstości upakowania, procesów redoks, w tym oddziaływań monowarstwy z jonami złota.

Zgodnie z moimi założeniami, modelowanie molekularne stanowiło pomoc, wzmocnienie i uzupełnienie badań eksperymentalnych. Analiza wyników badań eksperymentalnych i teoretycznych doprowadziły do wyboru opisanej metodyki badań opartej o podejście hybrydowe, które łączy metody chemii kwantowej oraz mechaniki molekularnej do przewidzenia struktury przestrzennej i niektórych własności fizykochemicznych biokoniugatów średniej wielkości zbudowanych z klastrów atomów złota Au oraz biocząsteczek. Klastry atomów złota stanowiły model fragmentu zewnętrznej powierzchni nanocząstek złota. Wybrane biocząsteczki stanowiły model składników monowarstwy otaczającej nanocząstki. W wyniku przeprowadzonych badań teoretycznych uzyskano oceny najbardziej korzystnych miejsc przyłączenia biocząsteczek do nanocząstek, siłę wiązania i geometrię dopasowania. Oceniono również możliwość zajścia wybranych reakcji chemicznych związanych z równoległe prowadzonymi eksperymentami laboratoryjnymi.

Otrzymane wyniki badań biologicznych wykonanych na wybranych liniach komórkowych, świadczą o dużo lepszych parametrach nowych analogów jak i otrzymanych koniugatów w porównaniu z wolnymi API.

Moim osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego było również wykazanie zbioru metod analitycznych, które należy zastosować, aby dokonać pełnej charakterystyki tworzonych w nanotechnologii połączeń nanocząstek z substancją czynną. W swoich badaniach wykazałam konieczność stosowania szerokiego spektrum metod analitycznych, w celu opracowania pełnej charakterystyki nowych koniugatów, co jest niezbędne do określenia jakości stosowanych koniugatów, a w konsekwencji bezpieczeństwa ich stosowania. Zastosowanie tak szerokiego spektrum komplementarnych technik pozwoliło na opracowanie charakterystyki nanokoniugatów

zgodnej z wymaganiami i wytycznymi EMEA, ICH dotyczących substancji czynnych i produktów leczniczych. Charakterystyka ta wykracza daleko poza ramy opisywanych w literaturze metod stosowanych dla tego typu połączeń. Wyniki badań zostały opublikowane w pracach prezentowanych w cyklu osiągnięcia naukowego jak i w pracach poza cyklem. Dodatkowo bycie koordynatorem tych badań pozwoliło mi na całościowe spojrzenie na postawiony cel prac i jego realizację oraz pokazało konieczność poszukiwania nowych rozwiązań w farmacji.

Prowadzone przeze mnie prace były interdyscyplinarne i dotyczyły badań syntetycznych i analitycznych. Do najważniejszych rezultatów wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego należy:

- optymalizacja i opracowanie warunków syntezy koniugatów nanocząstek złota z genisteiną, pemetreksedem, abiarteronem i tioabirateronem;
- opracowanie metod kontroli międzyoperacyjnej, wydajności procesu syntezy i oczyszczania;
- opracowanie metod badania stabilności otrzymanych koniugatów;
- opracowanie metod badania tożsamości i czystości otrzymanych koniugatów;
- zaproponowanie mechanizmów oddziaływania nowych analogów substancji czynnych na powierzchniach płaskich elektrod złotych i na nanocząstkach złota;
- opracowanie alternatywnej koncepcji, w stosunku do obecnie stosowanych, kompleksowego, farmaceutycznego podejścia, a więc analizy jakościowej i ilościowej w nanotechnologii;
- opracowanie multidyscyplinarnej koncepcji w celu uzyskania pełnej charakterystyki unikalnych nanokoniugatów do zastosowania w terapii onkologicznej.

Wyniki moich badań, opublikowane w cyklu wchodzącym w skład osiągnięcia naukowego, dokumentują zrealizowanie postawionego celu naukowego. Dają jednocześnie odpowiedź na wymagania stawiane współczesnej analizie farmaceutycznej oraz wskazują na ich znaczenie i potencjalne zastosowanie w nanoterapii. Nanotechnologia może być bowiem z powodzeniem stosowana jako rozwiązanie problemu biodostępności dla substancji czynnych, które zostały wstrzymane w badaniach przedklinicznych i klinicznych z powodu nieoptymalnych właściwości farmakokinetycznych lub biochemicznych np. słabej rozpuszczalności w wodzie. Prowadzone przeze mnie badania podstawowe są niezwykle istotne z punktu widzenia zdrowia pacjenta. Również są bardzo ważne z punktu widzenia rozwoju polskiej farmacji i łączą wiedzę z zakresu fizyki, chemii, medycyny i nanotechnologii.

Kontynuacja prac

Dokonany przeze mnie, kilkanaście lat temu, wybór nanotechnologii jako kierunku przyszłościowego w badaniach farmaceutycznych, okazał się trafny. Moja praca w tej tematyce rozpoczyna się publikacjami przeglądowymi w latach 2007 - 2008, a kończy się pracami oryginalnymi z ostatnich lat (2017-2021). Obecnie kontynuuję moje badania w kierunku przyłączenia nowych tiolowych substancji czynnych do nanocząstek złota.

Prowadzę prace związane z syntezą przez sprzężanie API na nanocząstce oraz syntezę z zastosowaniem wymiany z roztworu. Wstępne wyniki badań na liniach komórkowych wskazują, że nowe koniugaty wykazują wyższą cytotoksyczność. Dodatkowo prowadzę utlenianie nowych analogów API w roztworze i na powierzchniach płaskich złota stosując różne sondy w celu oceny właściwości przeciwutleniających. Do wygenerowania metabolitów/produktów degradacji nowych związków stosuję system Roxy i prowadzę identyfikację powstałych produktów techniką LC-MS/MS. System Roxy jest komplementarny do klasycznych technik badania metabolizmu (leków, narkotyków, produktów naturalnych, dopalaczy) i daje możliwość prowadzenia reakcji utleniania/redukcji/aktywacji przy praktycznie zerowej adsorpcji próbki. Obecnie powstaje publikacja podsumowująca uzyskane wyniki [H0].

Moje wieloletnie badania mają służyć głębszemu zrozumieniu właściwości nanocząstek złota, ich biodystrybucji oraz oddziaływań w organizmie do przyszłych zastosowań biomedycznych. Prowadzone przeze mnie badania są więc wielokierunkowe, ponieważ angażują kompetencje różnych zespołów badawczych z wielu pokrewnych dziedzin. Skuteczna terapia to bowiem wykorzystanie synergicznego działania kilku czynników od nanocząstek złota jako nośników leków, poprzez ich właściwości do tworzenie reaktywnych form tlenu, do aktywności samej substancji czynnej.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

- Ekspert w Programie PO IR od września 2018 roku - Fundacja na rzecz Nauki Polskiej
- Współpraca z Wydziałem Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego z Katedrą Farmakobiologii Zakładu Cytobiologii – dr Elżbieta Menaszek
- Współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z Pracownią Teorii i Zastosowań Elektrod – prof. dr hab. Renata Bilewicz, dr hab. Krzysztof Stolarczyk
- Współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z Pracownią Chemii Kwantowej - prof. dr hab. Andrzej Leś
- Współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z Laboratorium Badań Strukturalnych (LBS) – prof. dr hab. Krzysztof Woźniak
- Współpraca z Wydziałem Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z Zakładem w Katedrze Biochemii i Chemii Klinicznej - Prof. dr hab. n. farm. Danuta Zapolska-Downar†
- Projekt międzynarodowy - współpraca z firmą GLG Pharma S.A. Projekt POIR.01.02.00-00-0036/15, "Rozwój terapii celowanej wobec potrójnie negatywnego raka piersi w oparciu o innowacyjne inhibitory białka STAT-3 tj. cząsteczki GLG-805 lub GLG-302 oraz rozwój testów diagnostycznych opartych na metodach immunochemicznych

do szybkiej diagnostyki nowotworu TNBC spowodowanego obecnością zaktywowanego białka STAT-3, a także próby monitorowania stężenia białka w odpowiedzi na terapię za pomocą cząsteczek GLG-805 lub GLG-302". W międzynarodowym projekcie IF współpracował z firmą GLG Pharma S.A Dla opracowanej również w IF formy farmaceutycznej - dożylniej i/lub doustnej – przygotowano wnioski patentowe wynikające z przeprowadzonych prac. W ramach tego projektu otrzymano kilka nowych postaci substancji czynnej, z których najlepszą zastrzeżono w patencie WO 2019/182463 A1 (22.03.2019) pt. "Acid addition salt of pyrimethamine", autorzy: Ł. Kaczmarek, M. Łaszcz, G. Huszcza, M. Skaźnik, M. Zezula, A. Groman, **E. Stolarczyk**, M. Kubiszewski, K. Trzcńska, K. Kuziak.

- Projekt międzynarodowy - projekt Nr 778051 o akronimie „ORBIS” (Open Research Biopharmaceutical Internship Support), który uzyskał 5 lipca 2017 roku dofinansowanie Komisji Europejskiej w konkursie Research and Innovation Staff Exchange w ramach Działania Marii Skłodowskiej Curie Programu Ramowego Horyzont 2020 (H2020-MSCARISE-2017). Zasadniczym celem Projektu była międzynarodowa integracja akademickich i przemysłowych badań nad lekiem. W projekcie uczestniczyły cztery europejskie i jeden amerykański ośrodek naukowy oraz cztery europejskie firmy farmaceutyczne. Projekt wychodzi naprzeciw aktualnym oczekiwaniom społecznym dotyczącym konieczności zintensyfikowania procesu wprowadzenia do terapii coraz lepszych leków. Badania w projekcie zmierzają do poprawy skuteczności badań nad lekiem. Zakłada się, że poprawę tą można uzyskać poprzez podwyższenie efektywności prac naukowych na wczesnych etapach badań nad lekiem. Zintegrowane międzynarodowe działania ośrodków naukowych i firm farmaceutycznych dotyczyły, m.in. podwyższenia biodostępności i przenikalności leków, szczególnie z II i IV klasy systemu klasyfikacji Biopharmaceutics Classification System. Projekt jest realizowany poprzez międzynarodową i międzysektorową wymianę naukową młodych i doświadczonych badaczy pomiędzy ośrodkami naukowymi i przemysłowymi. Staże naukowe i technologiczne przyczyniają się również do rozwoju naukowego wykonawców Projektu i do wzrostu ich umiejętności technologicznych. Projekt umacnia dotychczasowe i stwarza nowe kierunki długofalowej współpracy wykonawców w dziedzinie badań nad lekiem. Upowszechnienie wyników badań w środowisku naukowym i w domenie publicznej przyczynia się do szerszego zrozumienia znaczenia wczesnych etapów badań nad lekiem dla podwyższenia skuteczności procesu tworzenia leku i jego dostępności dla społeczeństwa. **Rezultatem staży pracowników z ośrodków konsorcjantów było pozyskanie zleceń dla Instytutu na analizy substancji czynnych za pomocą NMR oraz GC-MS.**
- Program Ramowy UE (7PR), akronim: DECIDE, "Decision-making within cells and differentiation entity therapies". Lata realizacji 2013-2017. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania metod GCMS i MS.**
- Współpraca z firmami farmaceutycznymi (informacje poufne) w zakresie opracowania,

walidacji, transferów metod GC-FID, GC-MS, LC-MS/MS analiz oraz identyfikacji zanieczyszczeń za pomocą techniki LC-MS/MS.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne

Od 2000 do 2020 roku byłam zatrudniona w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie, w jednostce badawczo-rozwojowej ukierunkowanej na działalność naukową, badawczą i wdrożeniową, z ograniczoną funkcją dydaktyczną. Ze względu na specyfikę pracy, moja działalność dydaktyczna w Instytucie była skierowana głównie na szkolenia nowych pracowników, praktykantów, stażystów w zakresie metod chromatograficznych oraz zastosowania spektrometrii mas w badaniach substancji czynnych i produktów leczniczych. W latach 2007-2021 prowadziłam dodatkowo prace dydaktyczne wymienione poniżej:

- **Wygłosiłam wykład szkoleniowy na zaproszenie „V Akademia Chemii Analitycznej”**, 19.09-22.09.2021 r. Jachranka, „Spektrometria mas w chromatografii cieczowej – praktyczne zastosowania”. Tytuł wykładu: „Spektrometria mas w aplikacjach farmaceutycznych ze szczególnym uwzględnieniem *N*-nitrozoamin”.
- **Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej** w ramach V edycji programu "Doktorat wdrożeniowy" realizowanego pod promotorstwem dr hab. Joanny Giebułtowicz, na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Tytuł pracy doktorskiej: „Analiza związków azotoorganicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem *N*-nitrozoamin”. Opracowane w ramach doktoratu innowacyjne metody chromatograficzne dla oznaczania nitrozoamin oraz innych lotnych związków azotoorganicznych w substancjach czynnych API będą mogły być używane rutynowo w analizach zwolnieniowych API, zapewniając bezpieczeństwo lekowe w Polsce.
- **Współkierowałam pracę dyplomową** pani Katarzyny Kołeckiej w semestrze letnim 2020/2021 r., numer indeksu: 40878, kierunek studiów: Wydział Chemii UW. Celem badań było monitorowanie właściwości pochodnych tiolowych przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych substancji czynnych zaadsorbowanych na elektrodach złotych lub nanocząstkach złota (AuNPs) oraz określenie mechanizmów oddziaływań tego typu układów w organizmach biologicznych. Przedmiotem badań w tym projekcie była diosgenina i jej pochodna tiolowa.
- **Przeprowadziłam szkolenia i byłam opiekunem merytorycznym stażystów i stypendystów ORBIS** w Zakładzie Analitycznym.
- **Byłam opiekunem praktykantów z Uniwersytetu Warszawskiego**, Wydział Chemii, 2016r.
- **Zorganizowałam i wygłosiłam cykl wykładów w ramach szkoleń wewnętrznych**

dla pracowników w Instytucie Farmaceutycznym w latach 2005-2015 np.:

„Zastosowanie spektrometrii mas w badaniu profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych”,

„Badanie zanieczyszczeń w substancjach farmaceutycznych (API)”,

„Strategie w badaniu struktur i identyfikacji zanieczyszczeń”,

„Statystyka w chemii analitycznej”.

- **Wygłosiłam wykład na zproszenie** pt. „Spektrometr QTRAP 3200” – spotkanie użytkowników: AB SCIEX; Warszawa 2007 r.
- **Wygłosiłam wykład na zaproszenie** pt. „Wykorzystanie tandemowego spektrometru mas QTRAP sprzężonego z wysokosprawnym chromatografem cieczowym w badaniu profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych” - Wydział Chemii UW; Warszawa 2007 r.
- **Przygotowałam seminarium szkoleniowe** pt. „Spektrometria mas a metody chromatografii cieczowej” zorganizowane w Instytucie Farmaceutycznym; Warszawa 2007 r.
- **Wygłosiłam wykład** pt. „Pomiary metodą LC-MS/MS” – otwarcie Laboratorium Badań Strukturalnych: Wydział Chemii UW; 2007 r.
- **Wygłosiłam wykład** pt. „Nowe podejście do syntazy tymidylanowej jako głównego celu molekularnego w chemioterapii” w Instytucie Farmaceutycznym; 2001 r.

Działalność organizacyjna

- Komitet organizacyjny Trzeciej Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku, Piła 2002 r.
- Współorganizator warsztatów pt. „Piaskownica chemiczna” w Przedszkolu nr 103 (29.09.2009 r., 07.10.2015 r.), Przedszkolu nr 106 (27.03.2017 r.) w Warszawie i Szkole Podstawowej nr 114 w Warszawie (20.04.2012 r., 04.06.2018 r., 13.06.2018 r.)

Działalność popularyzująca naukę

W ramach działalności popularyzujących naukę byłam recenzentem **grantu NCN** w roku 2017 oraz recenzowałam prace naukowe dla poniższych czasopism:

- **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**
- **Acta Poloniae Pharmaceutica & Drug Research**
- **Biomedical Chromatography**
- **Analytica Chimica Acta**

Publikacje konferencyjne popularyzujące naukę z publiczną prezentacją w formie wystąpień ustnych i plakatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach. Wykaz konferencji w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.

Publikacje popularyzujące naukę w polskich czasopismach nieposiadających IF:

- **E.U. Stolarczyk^{*^}, K. Stolarczyk, M. Kubiszewski, Właściwości i zastosowanie**

nanocząstek złota jako selektywnych nanonośników leków w transporcie antynowotworowych substancji czynnych, **Farm. Pol.**, **71(2) (2015) 111**

- P.J. Rudzki, **E.U. Stolarczyk**[^], *I Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas*, **Farm. Pol.**, **13 (2008) 616**
- **E.U. Stolarczyk**^{**}, K. Stolarczyk, *Perspektywy nanotechnologii w medycynie i farmacji i jej wpływ na przemysł farmaceutyczny*, **Przem. Farm.**, **8 (2008) 59**
- **E.U. Stolarczyk**^{*}, A. Kutner, *Nowe strategie w badaniu profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych*, **Farm. Pol.** **64 (2008) 646**
- **E.U. Stolarczyk**^{*}, A. Kutner, *Zastosowanie spektrometrii mas w analizie farmaceutycznej zanieczyszczeń organicznych*, **Farm. Pol.** **65 (2009) 586**

7. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze.

7.A. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora. Wykaz publikacji w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.

Swoją działalność naukową, która zakończyła się obroną pracy magisterskiej, rozpoczęłam na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W Pracowni Analizy Przepływowej i Chromatografii u prof. dr hab. Marka Trojanowicza prowadziłam prace z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, badałam kolumny zawierające fazę stacjonarną z unieruchomionym na żelu krzemionkowym kompleksem Fe (III) z protoporfiryną (Prop) i tetrafenylporfiryną (TPP). Badałam przydatność wspomnianych kolumn do rozdzielania anionów i określiłam mechanizmy oddziaływań wpływających na retencję analitów. Moje zainteresowania układami biologicznymi, które natura wybrała jako centra aktywne wielu enzymów i biologicznie ważnych związków, a podstawą wielu procesów życiowych jest rozpoznawanie anionów, miały na celu sprawdzenie możliwości połączenia tych dwóch aspektów i wykorzystania nowych faz stacjonarnych do rozdzielania anionów. Promotorem mojej pracy magisterskiej pt.: „*Zastosowanie kolumn porfiryńowych do chromatografii anionów*” była prof. dr hab. Krystyna Pyrzyńska. Wyniki badań zostały opublikowane w postaci artykułu [A1].

Moje zainteresowania analityczne nie tylko koncentrowały się wokół technik separacyjnych, ale i spektrometrii mas na początku w eko-analicyce, później w analicyce farmaceutycznej. Dlatego jeszcze będąc studentką zostałam zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w celu opracowania metod specyjnego oznaczania żelaza w wodach naturalnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz układu przepływowego (FIA-AAS). Następnie duży wpływ na moje zainteresowania miały badania i wykłady prowadzone przez prof. dr hab. Witolda Danikiewicza. W 2004 roku uczestniczyłam w semestralnych wykładach dla doktorantów ICHO PAN w zakresie

zastosowania spektrometrii mas w chemii organicznej i biochemii organizowane przez Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk.

W trakcie pracy w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie, będąc referentem analitycznym i wykonawcą prac analitycznych, stosowałam chromatografię gazową (GC) połączoną z różnymi metodami detekcji: GC-FID, GC-FID (HS), GC-MS do badania lotnych związków organicznych, do analizy ilościowej i jakościowej substancji farmaceutycznych i produktów leczniczych. Prace dotyczyły opracowania metod analitycznych i ich walidacji zgodnie z wytycznymi farmaceutycznymi (ICH, Q2R1, Q2R2). Nie wszystkie wyniki z tych prac mogłam opublikować ze względu na umowy o poufności z kontrahentami. Wyniki dotyczące oznaczania lotnych związków substancji farmaceutycznej kwetiapina zostały opublikowane w artykule [A2].

W tym okresie pracy rozszerzałam zakres wykorzystywanej przeze mnie aparatury, oraz zdobyłam szeroką wiedzę w dziedzinie stosowania najnowszych technik analitycznych, takich jak chromatografia cieczowa wyposażona w różne układy detekcji, w tym tandemową spektrometrię mas i inne techniki łączone. Wynikiem tego etapu prac był artykuł przeglądowy na temat najnowszych osiągnięć technicznych w spektrometrii mas w badaniu profilu zanieczyszczeń [A3] oraz opis najciekawszych doniesień z I Konferencji Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas [A5]. W spektrometrze mas substancja ulega jonowym reakcjom chemicznym, a jak w przypadku każdej reakcji chemicznej jej wynik jest zależny od wielu czynników, takich jak matryca, stężenie, temperatura itp. I to właśnie stanowi o stopniu komplikacji tej metody i tworzeniu nowych rozwiązań konstrukcyjnych, w celu uzyskania jak najlepszych wyników. Nowe metody wytwarzania, rozdzielania i detekcji jonów, zbierania i przetwarzania danych stanowią o szybkim postępie w spektrometrii mas, oraz prowadzą do rozwoju technologii całkowicie nowych instrumentów. Dzięki swojemu doświadczeniu oraz zainteresowaniom naukowym w dziedzinie najnowszej aparatury badawczej byłam współtwórcą nowoczesnego, specjalistycznego Laboratorium Badań Strukturalnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, którego najważniejszym elementem był nowoczesny, wysokiej klasy aparat LC-MS/MS. W laboratorium tym wykonałam zasadniczą część badań, opisanych w ramach pracy doktorskiej.

Równolegle zainicjowałam w Instytucie stosowanie metody LC-MS/MS do badania substancji czynnych (API, ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*), produktów leczniczych i ich zanieczyszczeń. Opisałam nowe strategie w badaniu profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych [A7] oraz zastosowanie spektrometrii mas w analizie farmaceutycznej zanieczyszczeń organicznych [A8], nie tylko starszej techniki GC-MS ale właśnie rozwijającej się wówczas w Polsce chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas. W 2000 roku, gdy zaczynałam pracę w Instytucie Farmaceutycznym analiza zanieczyszczeń polegała głównie na badaniu czystości metodą HPLC (ang. *purity profile*). Takie podejście okazało się jednak niewystarczające. Zaostrzające się wytyczne EMEA i ICH zmusiły firmy farmaceutyczne oraz jednostki badawcze do identyfikacji zanieczyszczeń powstających w API czy produktach leczniczych oraz oznaczanie np. zanieczyszczeń genotoksycznych na coraz

niższym poziomie. Obecnie w badaniach analitycznych API należy przedstawić pełne badanie profilu zanieczyszczeń (ang. *impurity profile*). Definicja profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych została podana przez Międzynarodową Konferencję ds. Harmonizacji Wymagań dla Leków (ICH) jako „opis zidentyfikowanych i niezidentyfikowanych zanieczyszczeń obecnych w nowej substancji leczniczej”. Jest to wspólna nazwa dla całej działalności analitycznej, w której ważnym punktem jest identyfikacja i określanie struktur zanieczyszczeń, a nie tylko ich oznaczenie ilościowe. Transformacja, która nastąpiła w przemyśle farmaceutycznym, spowodowała, że spektrometria mas okazała się niezastąpiona w tej gałęzi przemysłu.

W grudniu 2009 r. otrzymałam tytuł doktora nauk farmaceutycznych na podstawie przedstawionej i obronionej rozprawy doktorskiej pt. „Opracowanie metod oznaczania profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych latanoprost i kwetiapina z zastosowaniem chromatografii i spektrometrii mas”. Promotorem pracy był prof. dr hab. Andrzej Kutner, pracę obroniłam na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania opisane w pracy doktorskiej stanowią część prac badawczych realizowanych w Instytucie, a część z nich również została opublikowana w artykule [A9].

Już w tym okresie zauważyłam, że badanie jakości substancji farmaceutycznych to tylko jeden z punktów potrzeb przemysłu farmaceutycznego. Moim kolejnym naukowym zainteresowaniem stało się zastosowanie nanotechnologii w medycynie i w przemyśle farmaceutycznym [A4, A6], co jest uzasadnione poszukiwaniem leków o mniejszej toksyczności oraz przede wszystkim leków ograniczających swoje działanie tylko do ogniska chorobowego. Tak zaczęła się moja przygoda z nanotechnologią.

7.B. Omówienie działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia naukowego doktora bez pozycji wymienionych w punkcie 4. Wykaz publikacji w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora byłam samodzielnym referentem analitycznym kilku projektów badawczych realizowanych w ramach krajowych i zagranicznych projektów i umów z firmami farmaceutycznymi. We wszystkich tych opracowaniach rozwiązywałam skomplikowane problemy analityczne, a wyniki tych prac spełniały najwyższe wymagania partnerów badawczych Instytutu. Moje prace dotyczyły jakości substancji farmaceutycznych. Nie wszystkie wyniki z tych prac mogłam opublikować ze względu na umowy o poufności podpisywane z kontrahentami.

Droga powstania leku jest bardzo długa. Dłuższa w przypadku leków oryginalnych niż generycznych i składa się z kilku etapów: od badań modelowych, których celem jest wybór odpowiedniej molekuly spełniającej wysokie wymagania dla substancji farmaceutycznej,

poprzez syntezę w skali laboratoryjnej, technologię wytwarzania substancji, technologię formy leku, opracowanie metod analitycznych do charakterystyki substancji i produktu, po metody bioanalityczne, które mają zastosowanie w dalszych etapach (badania farmakokinetyczne, badania przedkliniczne, badania kliniczne). W większości tych etapów zastosowanie ma spektrometria mas. Na jakość i trwałość substancji czynnej i produktu farmaceutycznego wpływa określenie rodzaju zanieczyszczeń i ustalenie jego profilu (za pomocą analiz jakościowych i ilościowych), badania stabilności a do tego wszystkiego opracowanie odpowiednich metod analitycznych. Elementem zarządzania jakością jest bowiem ocena narażenia i identyfikacja zagrożeń. Pacjenci chcą wiedzieć jak lek wpływa na ich organizm. Jeżeli już muszą zażywać leki to chcą zażywać leki bezpieczne.

Wiele potencjalnych zanieczyszczeń pochodzi z procesu syntezy substancji farmaceutycznej i obejmuje materiały wyjściowe, produkty pośrednie, odczynniki, rozpuszczalniki, katalizatory i produkty uboczne. W wyniku działania niekorzystnych czynników w procesie syntezy lub podczas przechowywania, substancja farmaceutyczna może ulec degradacji dając produkty rozkładu. Wiele potencjalnych zanieczyszczeń może pochodzić również z procesu wytwarzania leku i obejmuje zanieczyszczenia wprowadzane z API, zanieczyszczenia wprowadzane z placebo, produkty rozkładu na różnych etapach, produkty uboczne jako wynik reakcji nawet z materiałem opakowaniowym.

Strategie kontroli jakości farmaceutyków obejmują więc kontrolę poziomów zanieczyszczeń w surowcach, rozpuszczalnikach i reagentach, kontrolę międzyoperacyjną na etapach pośrednich, kontrolę jakości produktów do zwolnienia i to wszystko składa się na tzw. profil zanieczyszczeń, o którym pisałam już wcześniej. To wszystko składa się również na opisywany charakter mojej pracy.

W trakcie badań naukowych, po doktoracie, jednocześnie kontynuowałam prace związane z zastosowaniem chromatografii gazowej [B5] jak i rozwijałam prace z zastosowaniem chromatografii cieczowej i gazowej z detekcją spektrometrii mas do badania profilu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych [B4] podczas opracowywania technologii w projektach badawczych oraz w celowych tematach realizowanych w Instytucie Farmaceutycznym jako referent analityczny i wykonawca analiz. Zapewniało to odpowiednią kontrolę prac syntetycznych i gwarantowało otrzymanie produktu o odpowiedniej jakości. Przygotowana przeze mnie dokumentacja była następnie wykorzystywana do dokumentacji rejestracyjnej substancji czynnej.

W ramach realizacji projektów, które częściowo opisałam w punkcie 7.C., badałam pozostałości rozpuszczalników i lotnych substancji organicznych oraz przeprowadzałam walidacje opracowanych metod zgodnie z wytycznymi ICH. Wyniki z tych prac nad następującymi substancjami czynnymi były tematem publikacji, których jestem współautorem: latanoprost [B1], kwetiapina [B3], bosentan [B6], imatinib [B8], dutasteryd [B9], prasugrel [B13] i travoprost [B14]. Prace prowadzone były nie tylko dla substancji API ale zgodnie z wytycznymi również dla materiałów wyjściowych, czego przykładem jest publikacja [B12].

Niezależnie od rodzaju badanych zanieczyszczeń, zakres moich badań technikami LC-MS/MS obejmował: opracowanie metodyki, określenie struktury i badanie profilu zanieczyszczeń. Opracowanie metodyki obejmowało dobór faz ruchomych umożliwiających detekcję zanieczyszczeń techniką MS, dobór odpowiednich trybów skanowania i optymalizację parametrów MS zależnych od związku i fazy ruchomej. Zastosowanie spektrometrii mas do identyfikacji zanieczyszczeń w substancjach i produktach farmaceutycznych opisałam w artykule przeglądowym [B4]. Prowadzone przeze mnie badania profilu zanieczyszczeń obejmowały identyfikację zanieczyszczeń pochodzących z drogi syntezy, identyfikację zanieczyszczeń powstających w badaniach stabilności [B2, B10] i stresowych oraz oznaczenia ilościowe na ustalonym poziomie stężeń zgodnie z wytycznymi ICH Q3A(R2), Q3B(R2). Szczególnie istotne jest określenie zanieczyszczeń genotoksycznych, które opisałam wraz z współautorami w publikacji [B8], ponieważ związki te uszkadzają w sposób bezpośredni lub pośredni DNA. Limity dla tych zanieczyszczeń obliczane są na podstawie koncepcji TTC, którą przyjęto na poziomie 1,5 µg/dzień [64]. Dla związków genotoksycznych obowiązują dużo niższe limity niż dla standardowych zanieczyszczeń. Dlatego w dokumentacji rejestracyjnej należy wyszczególnić wszystkie substancje o potencjalnym działaniu genotoksycznym i rakotwórczym.

Proces identyfikacji zanieczyszczeń polega na poszukiwaniu znanych i nieznanymi związków poprzez skanowanie kwadrupolem, skanowanie pułapką jonową, wykorzystywanie widm fragmentacyjnych (PI). W przypadku znanych związków stosowałam tryby MRM i PI, które zapewniają jednocześnie wysoką czułość oznaczeń. W pierwszej kolejności interpretowałam widma fragmentacyjne badanej substancji. Następnie porównywałam widma fragmentacyjne substancji głównej z widmem fragmentacyjnym badanego zanieczyszczenia w celu znalezienia fragmentów wspólnych i wspólnych różnic w utracie cząsteczek obojętnych. Następnie interpretowałam strukturę badanego zanieczyszczenia. Badania dotyczące szeroko rozumianych organicznych zanieczyszczeń, w tym zanieczyszczeń genotoksycznych, są przeze mnie kontynuowane.

Technikę LC-MS/MS wykorzystałam również do analiz, które miały na celu identyfikację alkaloidów w glistniku jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.). Identyfikacja substancji niebiałkowych, które towarzyszą białkom o aktywności nukleolitycznej była bardzo istotna podczas realizacji projektu. Badania te były prowadzone w ramach grantu 2011/03/B/NZ9/01335 w konsorcjum z Wydziałem Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Wyniki analiz zostały opublikowane w artykule [B18].

Inny projekt, w którym brałam udział dotyczył badania form polimorficznych abirateronu, czego wynikiem jest publikacja [B17].

Kolejny nurt moich badań obejmuje *N*-nitrozaminy (NA), dla których limity ustalono na poziomie 30 ppb [65-69] – dużo niższym niż nawet dla zanieczyszczeń genotoksycznych. Oznaczanie NA jest bardzo trudne, ponieważ są małymi, polarnymi związkami i często współwymywiają się z innymi zanieczyszczeniami z próbki badanej. Pierwsze doniesienia o potencjalnym zagrożeniu i toksyczności *N*-nitrozoamin pojawiły się już w latach 50. XX w.,

ale to w lipcu 2018 r. szczególną uwagę zwrócono na tę grupę związków za sprawą *N*-nitrozodimetyloaminy (NDMA). Jej wykrycie w partii produktów farmaceutycznych zawierających walsartan zapoczątkowało największe na skalę światową badania oraz wprowadzenie nowych regulacji dotyczących tej grupy związków. Doprowadziło to do wycofania niektórych produktów farmaceutycznych, dokonania kontroli procesów technologicznych wytwarzania substancji czynnych i produktów leczniczych oraz przeglądu i aktualizacji przepisów regulujących kontrolę NA. Konsekwencją tych działań było ustanowienie nowych wytycznych, a także kontrola i analiza ryzyka powstawania NA w innych substancjach czynnych. Wynikiem tych analiz było wykrycie podobnych zanieczyszczeń (NDMA) w lekach stosowanych w leczeniu zgagi i wrzodów żołądka (ranitydyna) oraz w terapii cukrzycy (metformina). Okazało się więc, że nowe wytyczne nie będą obejmowały tylko związków z grupy sartanów, ale będą dotyczyć szerszej grupy leków. Restrykcyjne spojrzenie na *N*-nitrozoaminy w przemyśle farmaceutycznym przełożyło się również na inne gałęzie przemysłu. Nowe aspekty metodyki oznaczania *N*-nitrozoamin opisano w artykule, w którym jestem współautorem i autorem korespondencyjnym [B16]. Badania są kontynuowane przez Panią mgr Annę Witkowską w ramach doktoratu wdrożeniowego, w którym jestem promotorem pomocniczym.

Moje kolejne zawodowe zainteresowania dotyczą nanonośników leków w szczególności przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. Nowoczesne systemy dostarczania leków do leczonego organu na bazie nanocząstek umożliwiają zwiększenie skuteczności leczenia w porównaniu z zaaplikowaniem samej substancji czynnej leczonemu pacjentowi. Tego typu badania są niezwykle ważne z punktu widzenia rozwoju farmacji i mogą przynieść znaczny postęp w leczeniu i diagnostyce wielu chorób, w tym również nowotworowych. Właściwości i zastosowanie nanocząstek złota jako selektywnych nanonośników leków w transporcie antynowotworowych substancji czynnych zostały opisane w publikacji [B7]. Badania przedstawione w pracy [B19] dowodzą, że nanocząstki modyfikowane cytrynianami (AuNPs-citr) tak samo zachowują się w roztworze jak i w matrycy żelowej. Spektroskopia Ramana i obrazy SEM wyraźnie pokazują brak agregacji i jednorodne, homogeniczne rozmieszczenie AuNPs-citr w żelu C12ALA, co jest również istotne z punktu widzenia możliwości zastosowania C12ALA-AuNPs jako medium transportującego leki do celowanego miejsca w organizmie. Kolejne prace w tej tematyce są przedmiotem cyklu habilitacyjnego.

Następną częścią powyższego zagadnienia była moja koncepcja zastosowania elektroforezy kapilarnej (CE) i spektroskopii UV-Vis do kontroli międzyoperacyjnej procesu syntezy koniugatów nanocząstek złota z substancjami czynnymi (API), genisteiną i pemetrekselem. W badaniach przedstawionych w publikacji [B11] zastosowano CE do badania pozostałości niezwiązanych substancji czynnych jako elementu badania czystości produktu końcowego, a więc badania stopnia oczyszczania poprzez analizę odcieków. Metody te zostały również zastosowane do potwierdzenia tożsamości koniugatów, przy długościach fal charakterystycznych dla otrzymanych koniugatów i wyznaczonych podczas

syntezy.

Moja kolejna koncepcja dotyczyła otrzymania bardziej stabilnych koniugatów poprzez syntezę tiolowych analogów wybranych substancji czynnych, co zostało opisane w publikacji [B15]. Prace nad syntezą i charakterystyką tiolowych pochodnych substancji farmaceutycznych oraz unieruchomieniem ich na powierzchni dwuwymiarowej (elektrodach złotych) i trójwymiarowej (nanocząstkach złota) za pomocą silnych, stabilnych kowalencyjnych wiązań, są kontynuowane.

7.C. Udział w projektach badawczych.

Byłam lider tematu „Nanocząstki złota jako nośniki” w ramach działalności statutowej, w trakcie realizacji którego przygotowałam Grant do Narodowego Centrum Nauki (NCN) i otrzymałam z niego finansowanie. Grant pt. Nanomateriały kompozytowe - Synteza, charakterystyka oraz badanie oddziaływań nanocząstek złota z przyłączonym abirateronem realizowałam w latach 2017/2018. Numer rejestracyjny działania to 2017/01/X/ST4/01182, w ramach konkursu MINIATURA 1 na pojedyncze działania naukowe.

Brałam udział w opracowaniu technologii i w projektach badawczych oraz w celowych tematach realizowanych w Instytucie Farmaceutycznym jako referent analityczny i wykonawca analiz technikami GC-FID, GC-FID (HS), GC-MS i LC-MS/MS. Funkcja referenta analitycznego polegała na nadzorowaniu wszystkich prac analitycznych w ramach realizacji projektu. Zapewniało to odpowiednią kontrolę prac syntetycznych i gwarantowało otrzymanie produktu o odpowiedniej jakości. Przygotowywałam i sprawdzałam opracowania analityczne oraz raporty z walidacji metod analitycznych opracowanych w ramach Pracowni. Przygotowana dokumentacja była następnie wykorzystywana do dokumentacji rejestracyjnej substancji czynnej. Ponadto przygotowuję sprawozdania dotyczące badania pozostałości rozpuszczalników i lotnych substancji organicznych. Wykonuję analizy identyfikacji zanieczyszczeń organicznych w substancjach czynnych w tym również zanieczyszczeń genotoksycznych z projektów realizowanych w Instytucie jak również na zlecenia zewnętrzne. Poniżej wymieniam projekty, w których wkład mojej pracy oceniam jako znaczący.

- Projekt statutowy realizowany w Ł-ICHP w 2021 r., „Synteza, modelowanie molekularne i analiza powierzchni nanocząstek złota funkcjonalizowanych za pomocą przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych substancji czynnych do zastosowań biomedycznych” – **główny wykonawca**.
- Projekty statutowe realizowane w IF w lata 2013-2018, „Nanocząstki złota jako nośniki” – **lider projektów**.
- Grant NCN 2017/01/X/ST4/01182, lata realizacji 2017-2018, „Nanomateriały kompozytowe - Synteza, charakterystyka oraz badanie oddziaływań nanocząstek

złota z przyłączonym abirateronem” – lider projektu.

- Projekt UDA-POIG.01.03.01-14-068/08-00, NCBiR, lata realizacji 2009-2015, „Opracowanie innowacyjnych technologii leków oftalmicznych o szczególnym znaczeniu terapeutycznym i społecznym”. Zadanie pt. „Opracowanie technologii substancji farmaceutycznej bimatoprost oraz postaci farmaceutycznej preparatu – krople oczne 0,3 mg/mL, do stosowania w leczeniu jaskry pierwotnej. **Referent analityczny w latach 2009/2010 odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- Projekt UDA-POIG.01.03.01-14-068/08-00, NCBiR, lata realizacji 2009-2015, „Opracowanie innowacyjnych technologii leków oftalmicznych o szczególnym znaczeniu terapeutycznym i społecznym”. Zadanie pt. „Opracowanie technologii syntezy substancji farmaceutycznej trawoprost oraz postaci farmaceutycznej preparatu - krople oczne 40 µg/mL, do stosowania w leczeniu jaskry. **Referent analityczny w latach 2009/2010 odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- Projekt INNOTECH-K1/IN1/14/159003/NCBR/12; NCBiR, lata realizacji 2012-2015, „Opracowanie technologii wytwarzania preparatu stosowanego w terapii chorób układu krążenia – Olmesartan medoxomil”. Projekt realizowany przez Konsorcjum w składzie: Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne Lek-Am Sp.żo.o – Lider, Instytut Farmaceutyczny. **Referent analityczny w 2012 r. odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- 6 P05 2004 C/06533, Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, potem MNiSW, lata realizacji 2005-2008; „Uruchomienie produkcji substancji czynnej leku antypsychotonicznego – Quetiapine”, projekt celowy. **Referent analityczny odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- 6 ZR7 2005 C/06662, Ministerstwo Edukacji i Nauki, lata realizacji 2006-2007; „Uruchomienie produkcji substancji czynnej leku przeciwjaskrowego – Latanoprost”, projekt celowy. **Referent analityczny odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej oraz dokumentacji rejestracyjnej w formie CTD. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- Umowa z przemysłem 23/2003, lata realizacji 2003-2005; „Opracowanie syntezy substancji Quetiapine w skali laboratoryjnej”. **Referent analityczny odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie**

technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.

- 6 P05 0012 2002 C / 05829, lata realizacji 2002-2005; „Uruchomienie produkcji substancji czynnej leku onkologicznego, odpowiednika preparatu Aromasin”, projekt celowy. **Referent analityczny odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS, LC-MS/MS.**
- Umowa z przemysłem nr 31/2002, lata realizacji 2002-2003; „Synteza pochodnych chinoksalinonów”. **Referent analityczny odpowiedzialny za koordynację prac analitycznych i przygotowanie dokumentacji w zakresie technologii substancji czynnej. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Projekt UDA-POIG.01.03.01-14-068/08-00, pt. "Opracowanie innowacyjnych technologii leków oftalmicznych o szczególnym znaczeniu terapeutycznym i społecznym". Zadanie pt. "Opracowanie technologii substancji farmaceutycznej olopatadyna oraz postaci farmaceutycznej preparatu - krople oczne 1mg/mL, do stosowania w leczeniu objawów ocznych sezonowego alergicznego zapalenia spojówek". Lata realizacji 2008-2015. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Projekt UDA-POIG.01.03.01-14-069/08-00, pt. "Innowacyjne technologie leków onkologicznych o szczególnym znaczeniu terapeutycznym i społecznym", zadanie "Opracowanie technologii substancji farmaceutycznej temozolomid oraz postaci farmaceutycznej preparatu - kapsułki DC a 5 mg, 20 mg, 100 mg, i 250 mg, do stosowania w chemioterapii glejaka złośliwego". Lata realizacji 2008-2015. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Projekt POIR.01.02.00-00-0036/15, pt. "Rozwój terapii celowanej wobec potrójnie negatywnego raka piersi w oparciu o innowacyjne inhibitory białka STAT-3 tj. cząsteczki GLG-805 lub GLG-302 oraz rozwój testów diagnostycznych opartych na metodach immunochemicznych do szybkiej diagnostyki nowotworu TNBC spowodowanego obecnością zaktywowanego białka STAT-3, a także próby monitorowania stężenia białka w odpowiedzi na terapię za pomocą cząsteczek GLG-805 lub GLG-302". W międzynarodowym projekcie Instytut Farmaceutyczny współpracował z firmą GLG Pharma S.A. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Umowa z przemysłem nr 6/2017, lata realizacji 2017-2019. Informacje mają charakter poufny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Umowa z przemysłem nr 9/2017, lata realizacji 2017-2019. Informacje mają charakter

poufny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**

- INNOTECH-K2/IN2/65/182982/NCBR/13, lata realizacji 2013-2018, „Synteza i nowa technologia produkcji leku zawierającego inhibitor 5 - α reduktazy”. Projekt realizowany w ramach konsorcjum Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o. - Lider, Instytut Farmaceutyczny, F1 Pharma sp. z o.o. - Partner. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Umowa z przemysłem nr 1/2016, lata realizacji 2016-2020. Informacje mają charakter poufny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Umowa z przemysłem nr 2/2016, lata realizacji 2016-2017. Informacje mają charakter poufny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- Umowa z przemysłem nr 5/2011, lata realizacji 2011-2014 Informacje mają charakter poufny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania i walidacji metod GC, GCHS, GCMS.**
- INNOMED/I/10/NCBR/2014, lata realizacji 2014-2019, „Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania przeciwnowotworowego produktu leczniczego hamującego biosyntezę androgenów”. Projekt realizowany przez Konsorcjum w składzie: Vipharm S.A. – Lider, Instytut Farmaceutyczny. **Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania metod GCMS i MS.**
- Grant: 2011/03/B/NZ9/01335: *Badania właściwości farmakologicznych składników soku mlecznego i ekstraktów z glistnika jaskótcze ziele (Chelidonium majus L.)*. Projekt realizowany przez: Wydział Biologii Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu (2012-2015). Instytut Farmaceutyczny realizował Zad. 4. Identyfikacja substancji niebiałkowych, które towarzyszą białkom o aktywności nukleolitycznej zawartych we frakcjach po rozdzielaniu metodą LC-MS/MS. **Wykonawca prac analitycznych metodą LC-MS/MS.**
- Program Ramowy UE (7PR), akronim: DECIDE, "Decision-making within cells and differentiation entity therapies". Lata realizacji 2013-2017. Wykonawca prac analitycznych w zakresie opracowania metod GCMS i MS.

7.D. Uzyskane i zgłoszone patenty.

- **195728B1 (P-361347) (2007)** "Sposób wytwarzania 11-(1-piperazyinylo)dibenzo[b,f][1,4]tiazepiny", Ł. Kaczmarek, K. Badowska-Rostonek, **E. Stolarczyk**, W. Szelejewski, PL
- **EP 1660469 B1 (2007)** "Process for the preparation of 11-(1-piperazinylo)dibenzo[b,f][1,4]thiazepine, an intermediate in the synthesis

of the antipsychotic drug Quetiapine” (Ł. Kaczmarek, K. Badowska-Rostonek, **E. Stolarczyk**, W. Szelejewski)

- **P-424999** (22.03.2018) „Farmaceutycznie akceptowalna sól 5-(4-chlorofenylo)-6-etylo-2,4-pyrimidynodiaminy”, Ł. Kaczmarek, M. Łaszcz, G. Huszcza, M. Skaźnik, M. Zezula, A. Groman, **E. Stolarczyk**, M. Kubiszewski, K. Trzcńska, K. Kuziak.

7.E. Nagrody za działalność naukową.

- Srebrny Medal na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków, IWIS 2016, “Synthesis and characterization of genistein conjugated with gold nanoparticles”, **E.U. Stolarczyk**, K. Stolarczyk, M. Łaszcz, M. Kubiszewski, W. Maruszak, W. Olejarz, D. Bryk, A. Groman, K. Kuziak, J. Zagrodzka, D. Lasek, D. Zapolska-Downar, P. Wroczyński, R. Bilewicz.
- I nagroda: Dyplom X MKNOL 2016, „Synteza, charakterystyka oraz badania cytotoksyczności nanocząstek złota z przyłączoną genisteiną” **E.U. Stolarczyk**, K. Stolarczyk, M. Łaszcz, M. Kubiszewski, W. Maruszak, W. Olejarz, D. Bryk.
- „Technologia wytwarzania aktywnej substancji latanoprost i leku stosowanego w terapii jaskry” - laureat XII edycji Konkursu „Polski Produkt Przyszłości” 2008 r.; twórcy rozwiązania: dr Jacek Martynow, dr Julita Szyk, doc. dr Wiesław Szelejewski i inni, **E.U. Stolarczyk**.
- Dyplom Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2008, za projekt pn. “Latanoprost – nowa oryginalna technologia wytwarzania substancji aktywnej leku”; twórcy: dr Jacek Martynow, prof. dr hab. Osman Achmatowicz i inni, dr **E. Stolarczyk**.
- Srebrny Medal na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków, IWIS 2007, za wynalazek pn. “Process of preparation of 11-(1-piperaziny)dibenzo[b,f][1,4]tiazepine, an intermediate in the synthesis of the antipsychotic drug Quetiapine”; twórcy: prof. dr hab. Ł.Kaczmarek, K. Badowska-Rostonek, mgr inż. U.Frączek, dr **E. Stolarczyk**.
- Złoty Medal na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków, IWIS 2007, za projekt pn. “Latanoprost – nowa oryginalna technologia wytwarzania substancji aktywnej leku”; twórcy: dr Jacek Martynow, prof. dr hab. Osman Achmatowicz i inni, dr **E. Stolarczyk**.
- Srebrny Medal na 55 Światowej Wystawie Wynalazków, Badań Naukowych i Nowych Technologii w Brukseli (2006) za wynalazek pn. “Preparation proces of 13,14-dihydro-PGF2a derivatives”; twórcy: dr Jacek Martynow, prof. dr hab. Osman Achmatowicz i inni, dr **E. Stolarczyk**.

Piśmiennictwo

[1] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.

[2] M. Krzakowski (red.). Onkologia kliniczna. 2001. tom 1, 2.


[3] J. Lee, D.K. Chatterjee, M.H. Lee and S. Krishnan, Cancer Letters, 347 (2014) 46.

[4] K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz, Molecular Pharmaceutics 16 (2019) 1.

- [5] P.V. Kamat, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 7729.
- [6] S. Link, M.A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 4212.
- [7] G. Mie, *Ann. Physik* 25 (1908) 377.
- [8] K.H. Su, Q.H. Wei, X. Zhang, J.J. Mock, D.R. Smith, S. Schultz, *Nano Lett.* 3 (2003) 1087.
- [9] N. Kumar Chaki, K.P. Vijayamohanan, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 2552.
- [10] A. Kumar, X. Zhang, X-J. Liang, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 593.
- [11] Y-Ch. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, *Nanoscale* 4 (2012) 1871.
- [12] E.C Dreaden, L.A Austin, M.A Mackey, M.A El-Sayed, *Ther Deliv.* 3 (2012) 457.
- [13] R. Arvizo, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Expert Opin Drug Deliv.* 7 (2010) 753.
- [14] S.C. Coelho, M. Rangel, M.C. Pereira, M.A.N. Coelho, G. Ivanova, *Phys.Chem.Chem.Phys.* 17 (2015) 18971.
- [15] *Biological and Pharmaceutical Applications of Nanomaterials*, Edited by Polina Prokopovich, Taylor & Francis Group, 2016
- [16] M.C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293.
- [17] A.N. Shipway, E. Katz, I. Willner, *Chem. Phys. Chem.* 1 (2000) 18.
- [18] S.D. Perrault, W.C.W. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 17042.
- [19] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55.
- [20] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 15700.
- [21] J.R.G. Navarro, F. Lerouge, C. Ceperaga, G. Micouin, A. Favier, D. Chateau, M.-T. Charreyre., P.-H. Lanoë, C.Monnerneau, F.Chaputa, S.Marotte, Y.Leverrier, J.Marvel, K. Kamada, C. Andraud, P.L. Baldeck, S. Parola, *Biomaterials* 34 (2013) 8344.
- [22] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, *Chem. Commun.* 7 (1994) 801.
- [23] A. Manna, P. Chen, H. Akiyama, T. Wei, K. Tamada, W. Knoll, *Chem. Mater.* 15 (2003) 20.
- [24] M.N. Martin, J.I. Basham, P. Chando, S.-K. Eah, *Langmuir* 26 (2010) 7410.
- [25] R.G. Nuzzo, B.R. Zegarski, L.H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 733.
- [26] G.Mani, D.M. Johnson, D. Marton, M.D. Feldman, D. Patel, A.A. Ayon, C.M. Agrawal, *Biomaterials* 29 (2008) 4561.
- [27] A.P. Mazurek, L. Kozerski, J. Sadlej, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, J.C. Dobrowolski, J.K. Maurin, K. Binięcki, J. Witowska, P. Fiedor, J. Pachecka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2 (1998) 1223.
- [28] Cz. Radzikowski, J. Wietrzyk, G. Gryniewicz, A. Opolski, *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)* 58 (2004) 128.
- [29] El-Batal et al. *SpringerPlus* 2 (2013) 129, <http://www.springerplus.com/content/2/1/129>.
- [30] US 8,586,096 B2 patent (claim no US2009/0117045 A1); Soy or lentil stabilized gold nanoparticles and method for making same; K.K. Katti, R. Kannan, K.K. Katti, N. Chanda, Columbia, Ravi Shukla.
- [31] Ch. Singh, R.K. Baboota, P.K. Naik, H. Singh, *Adv. Mat. Lett.* 3(4) (2012) 279.

- [32] S.E. Mansou, M. Pattanayak, P.L. Nayak, Middle-East Journal of Scientific Research 21(12) (2014) 2257.
- [33] A Thesis presented to the Faculty of the Graduate School University of Missouri; SWAPNA MEKAPOTHULA Dr. Chada S. Reddy and Dr. Kattesh V. Katti, Thesis Supervisors; MAY 2008 A.
- [34] US 8,333,994 B2 (2012), US2009/074674 A1, US 2013/084248 A1, (US2008) Stabilized, biocompatible gold nanoparticles and enviro-friendly method for making same, Kattesh V. Katti, Raghuraman Kannan, Kavita K. Katti, Satish Kumar Nune.
- [35] O.M. Popa, V.C. Diculescu, Electroanalysis 25 (2013) 1201.
- [36] E.J. Yearley, E.A. Zhurova, V.V. Zhurov, A.A. Pinkerton, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 15013.
- [37] M. Breton, G. Precigoux, C. Courseille, M. Hospital, Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. 31 (1975) 921.
- [38] R. Sekine, E.G. Robertson, D. McNaughton, Vibrational Spectroscopy 57 (2011) 306.
- [39] M. Hazarika, R.M. White, B.P. Booth i wsp. Clin. Cancer Res. 11 (2005) 982.
- [40] L. Su, G. Liu, X. Hao i wsp. Eur. J. Cancer 47 (2011) 2471.
- [41] Charakterystyka produktu leczniczego Alimta®. Dostępne na: <http://www.ema.europa.eu>, data dostępu: 15.01.2012
- [42] D.M. Kowalski, P. Krawczyk, P. Jaśkiewicz, P. Badurak, M. Krzakowski, Onkologia w Praktyce Klinicznej 7 (2011) 292.
- [43] X. Zhang, Ch.Q. Sun, H. Hirao, Phys. Chem. Chem. Phys. 15 (2013) 19284.
- [44] S. Avvakumova, P. Verderio, G. Speranza, F. Porta, J. Phys. Chem. C 117 (2013) 3002.
- [45] K.R.F. Somers, E.S. Kryachko, A. Ceulemans, Chem. Phys. 301 (2004) 61.
- [46] B. Malfoy, J.A. Reynaud, J. Electroanal. Chem. 114 (1980) 213.
- [47] T. Hu, G. Dryhurst, J. Electroanal. Chem. 432 (1997) 7.
- [48] R.N. Goyal, N. Kumar, N.K. Singhal, Bioelectrochem. Bioenerg. 45 (1998) 47.
- [49] V. Brabec, V. Mornstein, Biophys. Chem. 12 (1980) 159.
- [50] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Electroanal 23 (2011) 1337.
- [51] Y.Y. Hosokawa, H. Hakamata, T. Murakami, S. Aoyagi, M. Kuroda, Y. Mimaki, A. Ito, S. Morosawa, F. Kusu, Electrochim. Acta 54 (2009) 6412.
- [52] A. Kotani, H. Hakamata, N. Nakayama, F. Kusu, Electroanalysis 23 (2011) 2709.
- [53] Z. Li, M. Alyamani, J. Li, K. Rogacki, M. Abazeed, S.K. Upadhyay, S.P. Balk, M.E. Taplin, R.J. Auchus, N. Sharifi, Nature 533 (2016) 547.
- [54] R. Dinkel, B. Braunschweig, W. Peukert, J. Phys. Chem. C. 120 (2016) 1673.
- [55] S. Sek, B. Palys, R. Bilewicz, J. Phys. Chem. B. 106 (2002) 5907.
- [56] C.E.D. Chidsey, D.N. Loiacono, Langmuir. 6 (1990) 682.
- [57] W.A. Hayes, C. Shannon, Langmuir 12 (1996) 3688.
- [58] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 16 (1995) 1655.
- [59] Q. Jin, J.A. Rodriguez, C.Z Li, Y. Darici, N.J. Tao, Surf. Sci. 425 (1999) 101.

- [60] S.R. Johnson, S.D. Evans, S.W. Mahon, A. Ulman, Langmuir 13 (1997) 51.
- [61] K. Stolarczyk, R. Bilewicz, Electroanalysis 16 (2004) 1609.
- [62] K. Stolarczyk, B. Pałys, R. Bilewicz, J. Electroanal. Chem. 564 (2004) 93.
- [63] A.M. Chiorcea-Paquim, T.A. Enache, E. De Souza Gil, A.M. Oliveira-Brett, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 19 (2020) 1680.
- [64] CH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk; 25 August 2015 EMA/CHMP/ICH/83812/2013 Committee for Human Medicinal Products.
- [65] EMA 04.2015 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit_en.pdf.
- [66] wytyczna ICH M7 (R1) (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk)-05.2017 https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.
- [67] Assessment report „Nitrosamine impurities in human medicinal products”-06.2020 https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
- [68] EMA “Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article5(3) of Regulation(EC)No726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products” -04.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf.
- [69] European Pharmacopoeia opublikowała w Pharmed Europa propozycję rozdziału 2.5.42. N-Nitrosamines in active substances. Oficjalna publikacja będzie w suplementie 10.6.

.....

(podpis wnioskodawcy)