

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Fizyki

Rozprawa doktorska

**Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy
do obrazowania i dostarczania leków**

mgr inż. Jakub Jagielski

Promotor
dr hab. Mikołaj Pochylski, prof. UAM

Promotor pomocniczy
dr Grzegorz Nowaczyk

Rozprawa doktorska zrealizowana w Centrum NanoBioMedycznym w ramach grantu
Sonata Bis 6 Narodowego Centrum Nauki pt.:
„Kubosomy-nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy do bioobrazowania”
UMO-2016/22/E/ST3/00458



Poznań, 2023

Dziękuję

Ś.p. prof. dr. hab. Stefanowi Jurdze za możliwość realizacji pracy doktorskiej w Centrum NanoBioMedycznym,

Prof. dr. hab. Mikołajowi Pochylskiemu za wiedzę i wzięcie pod skrzydła, kiedy stało się to konieczne,

dr. Grzegorzowi Nowaczykowi za wiedzę i opiekę w trakcie realizacji pracy doktorskiej,

Przyjaciółkom, Przyjaciołom, Koleżankom i Kolegom z Centrum NanoBioMedycznego za wspianą atmosferę.

Dziękuję

Rodzicom za nieocenione wsparcie na każdym etapie życia,

Aleksandrze za wskazanie co jest istotne w życiu i jak być lepszym człowiekiem,

Kiarze za to, że była zawsze, kiedy tego potrzebowałem.

1. WSTĘP.....	15
2. WSTĘP TEORETYCZNY	19
2.1 LIPIDOWE NANOCZĄSTKI CIEKŁOKRYSTALICZNE	19
2.2 SAMOORGANIZACJA LIPIDÓW.....	20
2.3 MINIMALNE POWIERZCHNIE SCHWARZA I SCHOENA JAKO TEORETYCZNE PODSTAWY POWSTAWANIA FAZ KUBICZNYCH.....	24
2.4 FAZY CIEKŁOKRYSTALICZNE	26
2.5 LIPIDY I SURFAKTANTY WYKORZYSTYWANE DO SYNTEZY LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH... 29	29
2.5.1 MONOOLEINIAN GLICEROLU (GMO).....	29
2.5.2 FITANTRIOL (PHT)	32
2.5.3 MONOLAURYNIAN GLICEROLU (GML)	34
2.5.4 PLURONIK F127	36
2.6 BIOLOGIA I BIOCHEMIA LIPIDÓW	38
2.6.1 FUNKCJE LIPIDÓW W KOMÓRCIE	38
2.6.2 LIPIDOWE FAZY CIEKŁOKRYSTALICZNE W KOMÓRKACH.....	39
2.6.3 CYTOTOKSYCZNOŚĆ LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	40
2.7 WYTWARZANIE LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	41
2.7.1 TECHNIKA „BOTTOM-UP”	41
2.7.2 TECHNIKA „TOP-DOWN”	41
2.8 METODY CHARAKTERYZACJI FIZYKOCHEMICZNEJ NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	43
2.8.1 DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA.....	43
2.8.2 ELEKTROFORETYCZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA	46
2.8.3 TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (TEM)	48
2.8.4 MAŁOKĄTOWE ROZPRASZANIE PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (SAXS).....	57
2.9 METODY WYKORZYSTYWANE DO OPISU WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	59
2.9.1 SPEKTROFOTOMETRIA ABSORPCYJNA UV-VIS.....	59
2.9.2 KONFOKALNA SKANINGOWA MIKROSKOPIA LASEROWA.....	61
2.9.3 ANALIZA GENOTOKSYCZNOŚCI	63
2.10 OPTYMALIZACJA WARUNKÓW SYNTEZY LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	65
3. CELE PRACY	71
4. SYNTEZA I ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNYCH LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH.....	72
4.1 MATERIAŁY	72
4.2 WYTWARZANIE LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	72
4.3 DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA (DLS).....	75
4.4 KRIOGENICZNA TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (CRYO-TEM)	75
4.5 ROZPRASZANIE PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO POD MAŁYMI KĄTAMI (SAXS)	76
4.6 ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNYCH I ANTYBAKTERYJNYCH.....	77

4.6.1 HODOWLE KOMÓRKOWE.....	77
4.6.2 TEST PROLIFERACJI KOMÓRKOWEJ WST-1.....	77
4.6.3 ANALIZA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO WYTWARZANIA REAKTYWNYCH FORM TLENU.....	78
4.6.4 ANALIZA INTEGRALNOŚCI CYTOSZKIELETU	79
4.6.5 ANALIZA EKSPRESJI GENÓW	79
4.6.6 ANALIZA ŚCIEŻEK INTERNALIZACJI	81
4.6.7 HODOWLA KOMÓREK BAKTERYJNYCH	82
4.6.8 WYZNACZANIE KRZYWYCH WZROSTU BAKTERII	82
5. WYNIKI I Dyskusja	83
5.1 SYnteza i opis właściwości fizykochemicznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych	83
5.1.1 SYnteza układów LLCNPs opartych na GMO i PHT.....	83
5.1.2 STABILNOŚĆ UKŁADÓW LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	83
5.1.3 ANALIZA STRUKTURALNA LLCNPs OPARTYCH O GMO I PHT.....	85
5.1.4 OBRAZOWANIE STRUKTUR CIEKŁOKRYSTALICZNYCH ZA POMOCĄ KRIOGENICZNEJ TRANSMISYJNEJ MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ	90
5.1.5 OPTymALIZACJA WARUNKÓW SYntezy LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH GMO/GML	93
5.1.5.1 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na średnicę hydrodynamiczną LLCNPs GMO/GML....	95
5.1.5.2 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na PDI LLCNPs GMO/GML	98
5.1.5.3 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na potencjał zeta LLCNPs GMO/GML	102
5.1.5.4 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na OD ₆₆₀ LLCNPs GMO/GML.....	104
5.1.5.5 Wyznaczenie optymalnych wartości masy GML i masy F127 dla GMO/GML.....	107
5.1.6 ANALIZA STABILNOŚCI UKŁADU GMO/GML.....	110
5.1.7 ANALIZA STRUKTURALNA UKŁADU GMO/GML.....	111
5.1.8 OBRAZOWANIE STRUKTUR CIEKŁOKRYSTALICZNYCH W UKŁADACH GMO/GML	117
5.2 CYTOTOKSYCZNOŚĆ LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	118
5.2.1 ANALIZA AKTYWNOŚCI PROLIFERACYJNEJ	118
5.2.2 ANALIZA POZIOMU REAKTYWNYCH FORM TLENU.....	126
5.2.3 ANALIZA INTEGRALNOŚCI CYTOSZKIELETU	136
5.2.4 ANALIZA EKSPRESJI GENÓW	141
5.2.5 ANALIZA DRÓG INTERNALIZACJI LIPIDOWYCH NANOCZĄSTEK CIEKŁOKRYSTALICZNYCH	150
5.2.6 ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH UKŁADÓW GMO/GML	152
6. WNIOSKI	156
7. ANEKS	159
8. BIBLIOGRAFIA.....	161

Wykaz skrótów

ACTB – z ang. *actin beta*, gen beta aktyny

ATCC – z ang. *American Type Culture Collection*, Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych

BSA – z ang. *bovine serum albumin*, albumina surowicy bydłowej

CDK1 – z ang. *cyclin-dependent kinase 1*, gen kinazy 1 zależnej od cyklin

cDNA – z ang. *complementary deoxyribonucleic acid*, komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy

CMC – z ang. *critical micelles concentration*, krytyczne stężenie micelarne

CPP – z ang. *critical packing parameter*, krytyczny parametr upakowania

DCF-DA – z ang. *dichlorofluorescein diacetate*, dwuoctan dwuchlorofluoresceiny

DHFR – z ang. *dihydrofolate reductase*, gen reduktazy dihydrofolianowej

DLS – z ang. *dynamic light scattering*, dynamiczne rozpraszanie światła

DMEM – z ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, modyfikowane medium komórkowe Eagle'a Dulbecco

DNA – z ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

ECHA – z ang. *European Chemicals Agency*, Europejska Agencja Chemiczna

FBS – z ang. *fetal bovine serum*, bydła surowica płodowa

FI – z ang. *fluid isotropic*, ciecz izotropowa

GADD45A1 – z ang. *growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha*, gen białka GADD45

GML – z ang. *glycerol monolaurate*, monołaurynian gliceroli

GMO – z ang. *glycerol monooleate*, monooleinian glicerolu

GRAS – z ang. *generally recognized as safe*, powszechnie uważane za bezpieczne

HBSS – z ang. *Hank's Balanced Salt Solution*, zbalansowany roztwór solny Hanka

HeLa – linia komórkowa komórek raka szyjki macicy

In cellulo – w komórce

In meso – w kryształach, w fazie krystalicznej

LLCNPs – z ang. *lipid liquid crystalline nanoparticles*, lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne

mRNA – z ang. *messenger ribonucleic acid*, matrycowy kwas rybonukleinowy

MSU 1.1 – linia komórkowa ludzkich fibroblastów

OD₆₆₀, OD₆₂₀ – z ang. *optical density*, gęstość optyczna mierzona dla fali długości 660 nm i 620 nm

OFAT – z ang. *one factor at time*, jeden czynnik w danym momencie

PDI – z ang. *polydispersity index*, współczynnik polidispersji

PHT – z ang. *phytrantriol*, fitantriol

pre-mRNA – z ang. *premature messenger ribonucleic acid*, dojrzewający matrycowy kwas rybonukleinowy

qPCR – z ang. *quantitative polymerase chain reaction*, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy

RE – retikulum endoplazmatyczne

RNA - z ang. *ribonucleic acid*, kwas rybonukleinowy

SAXS – z ang. *small angle X-ray scattering*, rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami

TEM – z ang. *transmission electron microscopy*, transmisyjna mikroskopia elektronowa

UV-Vis – z ang. *ultraviolet – visible*, zakres światła widzialnego i nadfioletu

Wykaz rycin

Ryc. 1 Schematyczne przedstawienie zmiany napięcia powierzchniowego układu w miarę zwiększania stężenia lipidu. Cyframi 1-4 zaznaczono charakterystyczne etapy procesu.	20
Ryc. 2 Zależność pomiędzy średnicą jądra nukleacji a energią swobodną. Sporządzone na podstawie [35].	22
Ryc. 3 Schematyczne przedstawienie cząsteczek w (A) objętości fazy oraz (B) na powierzchni fazowej za pomocą sprężynowego modelu energii powierzchniowej.	24
Ryc. 4 Potrójnie okresowe powierzchnie minimalne (A) prymitywna Schwarza, (B) diamentowa Schwarza, (C) żyroidalna Schoena. Obrazy wygenerowane za pomocą oprogramowania MatLab z wykorzystaniem kodu przedstawionego przez Muna i Pattersona [45].	25
Ryc. 5 Graficzne przedstawienie krytycznego parametru upakowania. V – objętość części hydrofobowej, a – pole powierzchni przekroju między częścią hydrofilową i hydrofobową, l – długość łańcucha hydrofobowego.	26
Ryc. 6 Przedstawienie zależności między wartością krytycznego parametru upakowania, powstającą strukturą cząsteczki amfifilowej i tworzonej fazy ciekłokrystalicznej.	28
Ryc. 7 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) monooleinianu glicerolu	29
Ryc. 8 Diagram fazowy monooleinianu glicerolu w zależności od zawartości wody oraz temperatury. Sporządzone na podstawie [60].	30
Ryc. 9 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) fitantriolu.	32
Ryc. 10 Diagram fazowy fitantriolu w zależności od zawartości wody oraz temperatury. Sporządzone na podstawie [74].	33
Ryc. 11 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) monolaurynianu glicerolu.	34
Ryc. 12 Schematyczne przedstawienie ułożenia cząstek lipidów w formie (A) – alfa i (B) – beta.	34
Ryc. 13 Diagram fazowy monolaurynianu glicerolu w zależności od zawartości wody i temperatury. Sporządzone na podstawie [81].	35
Ryc. 14 Wzór strukturalny kopolimeru trójblokowego Pluronic F127. Litery a (95-105) oraz b (54-60) wskazują na liczbę powtórzeń monomerów kolejno glikolu polietylenowego i glikolu polipropylenowego.	36
Ryc. 15 Diagram fazowy Pluronicu F127 w zależności od temperatury układu i stężenia Pluronicu F127 w wodzie. Sporządzone na podstawie [101].	37
Ryc. 16 Schemat funkcjonowania doświadczenia dynamicznego rozpraszania światła.	44
Ryc. 17 Przedstawienie sposobu wyznaczania wartości średnicy hydrodynamicznej oraz współczynnika polidispersyjności PDI z rozkładu wielkości nanocząstek uzyskanego za pomocą DLS. σ – odchylenie standardowe rozkładu.	46
Ryc. 18 Podwójna warstwa elektryczna wg. modelu Gouy-Chapman-Sterna.	47
Ryc. 19 Schemat budowy transmisyjnego mikroskopu elektronowego.	52
Ryc. 20 Schematyczne przedstawienie (a) idealnej soczewki elektromagnetycznej, skupiającej wiązkę elektronową w jednym punkcie, (b) aberracji sferycznej, (c) aberracji chromatycznej.	53
Ryc. 21 Rodzaje elektronów i promieniowań elektromagnetycznych emitowanych z preparatu na skutek interakcji z elektronami pierwotnymi.	54

Ryc. 22 A – schematyczne przedstawienie interakcji fali pierwotnej wiązki elektronowej i fal rozproszonych. B – wykresy Arganda przedstawiające sumaryczne przesunięcia fazowe fali pierwotnej w zależności od przesunięć fazowych fal rozproszonych. C – schematycznych wykres funkcji transferu kontrastu. Na panelu A strzałką czerwoną oznaczono falę nieugiętą, zaś strzałkami zieloną, niebieską i żółtą fale rozproszone. Kolory wektorów na panelach B 1-4 odpowiadają falom oznaczonym danymi kolorami na panelu A, zaś kolorem szarym oznaczone zostały wektory sumaryczne. Na panelu C danymi kolorami oznaczono poziomy kontrastu generowane przez falę nieugiętą i fale rozproszone oznaczone tymi samymi kolorami na panelach A i B.....	56
Ryc. 23 Rozpraszanie promieniowania elektromagnetycznego na strukturze krystalicznej. d – odległość międzypłaszczyznowa, θ – kąt padania/kąt odbicia.....	58
Ryc. 24 Możliwe przejścia elektronowe ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego.....	60
Ryc. 25 Diagram Jabłońskiego. Na zielono zaznaczona wzbudzenie elektronów w wyniku absorpcji. Na czerwono wskazano relaksację wibracyjną. Na pomarańczowo wskazano konwersję wewnętrzną. Na niebiesko wskazano fluorescencję.....	62
Ryc. 26 Schematyczne przedstawienie działania mikroskopii konfokalnej w czasie (A) oświetlania preparatu oraz (B) detekcji fluorescencji.	63
Ryc. 27 Centralny dogmat biologii molekularnej przedstawiający przepływ informacji genetycznej w organizmach żywych. Nazwy procesów zostały zapisane kursywą. Czerwone strzałki przedstawiają ekspresję genów w komórkach eukariotycznych.....	64
Ryc. 28 Schematyczne przedstawienie wykresu zależności intensywności od numeru cyklu otrzymywanej w ramach analizy qPCR. Na czerwono zaznaczono krzywe wyznaczone dla standardów o znanej początkowej ilości matrycy.....	65
Ryc. 29 Wykres zależności Y od X_1 dla $X_2 = 1$. Krzywa wyznaczona ze wzoru $Y_1 = 2 * X_1$	67
Ryc. 30 Wykres zależności Y_1 od X_2 dla $X_1 = 5$. Krzywa została wyznaczona ze wzoru $Y = X_2 + 10$	67
Ryc. 31 Wykres zależności Y_1 od X_2 dla $X_1 = 1$. Krzywa została wyznaczona ze wzoru $Y = 3 * X_2 + 1$	68
Ryc. 32 Powierzchnia odpowiedzi dla Y wyznaczona dla zakresu wartości czynników X_1 oraz X_2	68
Ryc. 33 Przestrzeń doświadczalna pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego dla trzech czynników X_1 , X_2 i X_3 . Każda z osi prezentuje kodowane wartości czynnika. w.k. – wartość kodowana.....	70
Ryc. 34 Przestrzeń doświadczalna pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego przedstawionego w Ryc. 33 rozszerzona do centralnego planu kompozycyjnego przez dodanie punktu centralnego „0” oraz oznaczonych gwiazdkami punktów osiowych w odległości ± 2 od punktu centralnego.....	70
Ryc. 35 Przestrzeń doświadczalna przedstawiająca wszystkie układy wielkości wejściowych tj. masy GML i masy F127 wykorzystane w dwupoziomowym planie czynnikowym i centralnym planie kompozycyjnym.	75
Ryc. 36 Rozkład wielkości lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO i PHT.	84
Ryc. 37 Schematyczne przedstawienie zakotwiczenia Pluronicu F127 w dwuwarstwą lipidową. Czerwone części surfaktantu są blokami hydrofilowymi, zaś zielone hydrofobowymi.....	85
Ryc. 38 Krzywa rozpraszania SAXS dla GMO 2%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.....	87
Ryc. 39 Krzywa rozpraszania SAXS dla GMO 20%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.	87

Ryc. 40 Krzywa rozpraszania SAXS dla PHT 2%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C. Refleks oznaczony * może być charakterystyczny dla liposomów.	88
Ryc. 41 Krzywa rozpraszania SAXS dla PHT 20%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.	88
Ryc. 42 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% wykonany w celu oszacowania ich rozmiaru. Strzałką został wyróżniony kryształ lodu powstający w trakcie pomiaru w wyniku topienia się próbki i ponownego zamrażania.	90
Ryc. 43 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% wykonany w celu określenia symetrii fazy ciekłokrystalicznej. W prawym górnym rogu przedstawiono wynik transformaty Fouriera, wskazujący na kubiczny charakter nanocząstki.	91
Ryc. 44 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 20%.	91
Ryc. 45 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 20%.	92
Ryc. 46 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych PHT 2%.	92
Ryc. 47 Diagnostyka modelu regresji liniowej średnicy hydrodynamicznej. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML C – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML od wartości zaobserwowanych.	96
Ryc. 48 Wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML w funkcji masy GML dla masy F127 = 2,25 mg.	97
Ryc. 49 Wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML w funkcji masy F127 dla masy GML = 4,5 mg.	97
Ryc. 50 Wykres interakcji pomiędzy masą GML i masą F127 oraz ich wpływ na przewidywaną średnicę hydrodynamiczną LLCNPs GMO/GML.	98
Ryc. 51 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę średnicy hydrodynamicznej LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.	98
Ryc. 52 Diagnostyka modelu regresji liniowej średnicy hydrodynamicznej. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej wartości PDI C – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości PDI od wartości zaobserwowanych.	100
Ryc. 53 Wykres zależności przewidywanych wartości PDI w funkcji masy GML.	101
Ryc. 54 Wykres zależności przewidywanych PDI w funkcji masy F127.	101
Ryc. 55 Wykres interakcji pomiędzy masą GML i masą F127 oraz ich wpływ na przewidywaną wartość PDI.	102
Ryc. 56 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę PDI LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.	102
Ryc. 57 Wykres zależności przewidywanych wartości potencjału zeta w funkcji masy GML.	103
Ryc. 58 Diagnostyka modelu regresji liniowej potencjału zeta. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach.	103
Ryc. 59 Diagnostyka modelu regresji OD ₆₆₀ . A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej wartości OD ₆₆₀ C – wykres wartości resztowych w kolejnych	

eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości OD ₆₆₀ od wartości zaobserwowanych.	105
.....	105
Ryc. 60 Wykres zależności przewidywanych wartości OD ₆₆₀ w funkcji masy GML.	106
Ryc. 61 Wykres zależności przewidywanych wartości OD ₆₆₀ w funkcji masy F127.	106
Ryc. 62 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę OD ₆₆₀ LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.	107
Ryc. 63 Wykres konturowy masy Pluronicu F127 i masy GML uwzględniający oczekiwane zakresy wartości badanych odpowiedzi. Żółtym polem oznaczono obszar spełniający zadane warunki.	108
Ryc. 64 Rozkład średnic optymalnych układów GMO/GML przez pierwsze 28 dni po fabrykacji.	110
Ryc. 65 Czasowe zmiany współczynnika polidispersji oraz potencjału powierzchniowego wyznaczone dla optymalnych układów GMO/GML w okresie 28 dni od syntezy.	111
Ryc. 66 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.	111
Ryc. 67 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w temperaturze 60°C.	112
Ryc. 68 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w temperaturze 35°C.	112
Ryc. 69 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.	113
Ryc. 70 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 w temperaturze 35°C.	113
Ryc. 71 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 27:3:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.	114
Ryc. 72 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 27:3:1,5 w temperaturze 35°C.	114
Ryc. 73 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.	115
.....	115
Ryc. 74 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5 w temperaturze 35°C.	115
Ryc. 75 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GML 2% w zakresie temperatur 20°C do 70°C.	116
Ryc. 76 Mikrograf cryo-TEM zoptymalizowanych układów GMO/GML.	117
Ryc. 77 Wyniki analizy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% i GMO 20% wobec linii komórkowych nowotworowych HeLa i prawidłowych MSU 1.1.	119
Ryc. 78 Wyniki analizy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych PHT 2% i PHT 20% wobec linii komórkowych nowotworowych HeLa i prawidłowych MSU 1.1.	120
Ryc. 79 Analiza cytotoksyczności LLCNPs GMO 2% i GMO 20% na sferoidach komórek HeLa.	122
Ryc. 80 Analiza cytotoksyczności LLCNPs PHT 2% i PHT 20% na sferoidach komórek HeLa.	123
Ryc. 81 Porównanie żywotności komórek HeLa i MSU 1,1 poddanych 3 godzinnej i 24 godzinnej inkubacji z zoptymalizowanymi układami GMO/GML.	125
Ryc. 82 Porównanie żywotności komórek HeLa i MSU 1.1 poddanych inkubacji z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi opartymi o czyste GMO oraz z zoptymalizowanymi układami GMO/GML.	126
Ryc. 83 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach HeLa po inkubacji z LLCNPs opartymi na GMO. Skala 20 µm.	128
Ryc. 84 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach HeLa po inkubacji z LLCNPs opartymi na PHT. Skala 20 µm.	129
Ryc. 85 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach MSU 1.1 po inkubacji z LLCNPs opartymi na GMO. Skala 20 µm.	131

Ryc. 86 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach MSU 1.1 po inkubacji z LLCNPs opartymi na PHT. Skala 20 μm .	132
Ryc. 87 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT.	133
Ryc. 88 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi o GMO.	134
Ryc. 89 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT.	134
Ryc. 90 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o GMO.	135
Ryc. 91 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO. Skala – 50 μm .	138
Ryc. 92 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT. Skala – 50 μm .	139
Ryc. 93 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO. Skala – 50 μm .	140
Ryc. 94 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT. Skala – 50 μm .	141
Ryc. 95 Względna znormalizowana ekspresja genu ACTB w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.	143
Ryc. 96 Względna znormalizowana ekspresja genu ACTB w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.	143
Ryc. 97 Względna znormalizowana ekspresja genu CDK1 w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.	145
Ryc. 98 Względna znormalizowana ekspresja genu CDK1 w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.	146
Ryc. 99 Względna znormalizowana ekspresja genu DHFR w komórkach HeLa i MSU 1,1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT,	147
Ryc. 100 Względna znormalizowana ekspresja genu DHFR w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.	147
Ryc. 101 Względna znormalizowana ekspresja genu GADD45A1 w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.	148
Ryc. 102 Względna znormalizowana ekspresja genu GADD45A1 w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.	149
Ryc. 103 Obrazy laserowej skaningowej mikroskopii konfokalnej komórek linii komórkowych MSU 1.1 inkubowanych z inhibitorami transportu komórkowego oraz z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi barwionymi Czerwienią Nilu, Skala - 50 μm .	151
Ryc. 104 Krzywa wzrostu bakterii E. coli inkubowanych w różnych stężeniach LLCNPs GMO/GML	153

Ryc. 105 Krzywa wzrostu bakterii <i>S. aureus</i> inkubowanych w różnych stężeniach LLCNPs GMO/GML,	154
Ryc. 106 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek HeLa poddanych inkubacji z A – GMO 2% przez 3 h, B – GMO 2% przez 24 h, C – GMO 2% przez 48 h, D – GMO 2% przez 72 h, E – GMO 20% przez 3 h, F – GMO 20% przez 24 h, G – GMO 20% przez 48 h, H – GMO 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.....	159
Ryc. 107 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek MSU 1.1 poddanych inkubacji z A – GMO 2% przez 3 h, B – GMO 2% przez 24 h, C – GMO 2% przez 48 h, D – GMO 2% przez 72 h, E – GMO 20% przez 3 h, F – GMO 20% przez 24 h, G – GMO 20% przez 48 h, H – GMO 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.	159
Ryc. 108 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek HeLa poddanych inkubacji z A – PHT 2% przez 3 h, B – PHT 2% przez 24 h, C – PHT 2% przez 48 h, D – PHT 2% przez 72 h, E – PHT 20% przez 3 h, F – PHT 20% przez 24 h, G – PHT 20% przez 48 h, H – PHT 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera. Dla A i E analiza post-hoc nie została wykonana, ponieważ analiza ANOVA nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami. ...	160
Ryc. 109 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek MSU 1.1 poddanych inkubacji z A – PHT 2% przez 3 h, B – PHT 2% przez 24 h, C – PHT 2% przez 48 h, D – PHT 2% przez 72 h, E – PHT 20% przez 3 h, F – PHT 20% przez 24 h, G – PHT 20% przez 48 h, H – PHT 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.	160

Wykaz tabel

- Tab. 1 Metryczka monooleinianu glicerolu.
- Tab. 2 Metryczka fitantriolu.
- Tab. 3 Metryczka monolaurynianu glicerolu.
- Tab. 4 Możliwe kombinacje wartości kodowanych kontrolowanych czynników X_1 , X_2 oraz X_3 , których wartości kodowane
- Tab. 5 Skład masowy lipidów i surfaktantu Pluronic F127 próbek oznaczonych jako GMO 2%, GMO 20%, PHT 2% i PHT 20%
- Tab. 6 Kombinacje optymalizowanych czynników w dwupoziomowym planie czynnikowym.
- Tab. 7 Kombinacje optymalizowanych czynników dodane w centralnym planie kompozycyjnym
- Tab. 8 Sekwencje starterów analizowanych genów. Startery zostały przedstawione w orientacji 5' -> 3'
- Tab. 9 Warunki reakcji qPCR
- Tab. 10 Charakterystyczne szeregi odwrotności odległości międzypłaszczyznowych dla określonych faz krystalicznych w lipidowych nanocząstkach ciekłokrystalicznych.
- Tab. 11 Podsumowanie analizy strukturalnej SAXS dla LLCNPs GMO 2%, GMO 20%, PHT 2% i PHT 20%.
- Tab. 12 Wartości wyjściowe średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidispersji, potencjału powierzchniowego zeta oraz gęstości optycznej OD_{660} zmierzone w ramach pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego.
- Tab. 13 Wartości wyjściowe średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidispersji, potencjału powierzchniowego zeta oraz gęstości optycznej OD_{660} zmierzone w ramach centralnego planu kompozycyjnego.
- Tab. 14 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.
- Tab. 15 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla współczynnika polidispersji PDI LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.
- Tab. 16 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla gęstości optycznej OD_{660} LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.
- Tab. 17 Oczekiwane zakresy wartości badanych odpowiedzi dla graficznej optymalizacji LLCNPs opartych na mieszaninie lipidów.
- Tab. 18 Porównanie przewidywanych na podstawie modeli odpowiedzi i odpowiedzi uzyskanych eksperymentalnie dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5.
- Tab. 19 Porównanie stałych sieci krystalicznej a , średnic kanałów wodnych r_{kw} oraz ułamków objętościowych wody φ_w w układach GMO:GML:F127 29:1:1,5, 27:3:1,5 i 26,5:3,5:1,5 w temp. 35°C. Szerokie pasmo krzywych rozpraszania SAXS w temp. 35°C wyznaczonych dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 uniemożliwia wykonanie analogicznych obliczeń.

1. Wstęp

W ostatnich dekadach nanotechnologia odgrywa kluczową rolę w zastosowaniach biomedycznych, oferując rozwiązania w diagnostyce, terapii i monitorowaniu zdrowia, tj. systemy zwiększające rozpuszczalność leków [1], celowane terapie [2], dostarczające lek bezpośrednio do nowotworów [3], czy teranostyka [4], czyli podejście obejmujące jednocześnie diagnostykę i terapię pacjenta.

Wraz z rozwojem cywilizacyjnym, ale również wraz z udoskonalaniem metod diagnostycznych, wzrasta wykrywalność chorób m.in. takich jak nowotwory [5]. Obecne, klasyczne podejście do terapii chorób nowotworowych opiera się na trzech filarach: chirurgii, radioterapii i chemioterapii [6]. Każda z tych metod niesie ze sobą niestety szereg negatywnych efektów. Podczas wycinania tkanki zmienionej nowotworowo, z jednej strony istnieje duże ryzyko wycięcia tkanki zdrowej, z drugiej strony w organizmie pacjenta często pozostają nowotworowe komórki macierzyste, które mogą być przyczyną powstawania nawrotów i przerzutów. Ponadto metody chirurgiczne są szczególnie trudne i niebezpieczne w przeprowadzeniu w przypadku nowotworów mózgu, gdzie wymagana jest niezwykła precyzja, w celu nienaruszenia kluczowych dla przeżycia ośrodków mózgu. W przypadku terapii radiologicznych i chemioterapii dużą przeszkodę stanowi brak specyficzności. Chemioterapeutyki mają na celu supresję wzrostu zmienionych nowotworowo tkanek, jednakże oddziałują one również na zdrowe komórki m.in. w szpiku kostnym czy jelitach prowadząc do osłabienia układu odpornościowego, nudności i wymiotów. Ponadto, niektóre nowotwory mogą wytworzyć oporność na działanie chemioterapeutyków, co jeszcze bardziej utrudnia ich terapię. Kolejną przeszkodą w wykorzystaniu chemioterapeutyków jest ich częsty charakter hydrofobowy. W związku z powyższym leki przeciwnowotworowe są często związkami trudno rozpuszczalnymi w wodzie, co wymusza stosowania ich w większych stężeniach, aby osiągnąć dawkę terapeutyczną. Celem radioterapii jest zniszczenie komórek nowotworowych poprzez wystawienie ich na działanie wysokoenergetycznego promieniowania radiacyjnego. Podobnie jak w przypadku chemioterapeutyków, istnieje jednak duże zagrożenie uszkodzenia komórek znajdujących się w pobliżu chorej tkanki, prowadząc do uszkodzeń skóry, zapalenia narządów wewnętrznych czy uszkodzenia tkanki nerwowej. Ponadto, stosowanie radioterapii może mieć negatywne skutki długofalowe, prowadząc do wytwarzania nowotworów wtórnych na skutek wystąpienia mutacji będących efektem działania promieniowania jonizującego.

Nadzieję na rozwiązanie powyższych problemów wynikających z zastosowania klasycznego podejścia w terapii chorób nowotworowych może być wykorzystanie nanotechnologii. Jednym z proponowanych podejść jest wykorzystanie nanoukładów jako nośników leków w terapiach celowanych, czyli precyzyjnym dostarczeniu leków bezpośrednio do komórek nowotworowych. Dzięki takiemu podejściu można uniknąć negatywnego wpływu chemioterapeutyków na zdrowe komórki pacjenta oraz zmniejszeniu ulega niezbędna do prawidłowego działania dawka leku. Istnieje wiele różnych podejść włączania leków do nanocząstek. Wyróżnić można między innymi rozpuszczanie leku w nanocząstkach,

enkapsulację czy też adsorpcję [7]. W celu dostarczenia nanonośników specyficznemu do zmienionych nowotworowo komórek, stosuje się funkcjonalizację nanocząstek przez przyłączanie do ich powierzchni ligandów specyficznych dla receptorów na powierzchni komórek nowotworowych [8], wykorzystuje się specyficzne dla mikrośrodowiska nowotworowego niskie pH, stosując układy rozpadające się w kwaśnym otoczeniu [9], lub polega się na efekcie wzmożonej przepuszczalności naczyń i zatrzymywania nanocząstek w tkance nowotworowej [10]. Istotnym w dostarczaniu leków za pomocą nanonośników jest także kontrola nad uwalnianiem dostarczanego leku. W tym celu projektuje się m.in. układy termoresponsywne, które w wyniku lokalnej zmiany temperatury podlegają przejściom fazowym, prowadząc do uwalniania leku, czy też systemy ulegające długotrwałej stopniowej degradacji, wydłużając tym samym okres uwalniania terapeutyka [11].

Nanocząstki o potencjalnych zastosowaniach w medycynie, w tym w dostarczaniu leków i środków kontrastujących, podzielić można ze względu na materiały z jakich są wytwarzane. Wyróżnia się nanocząstki nieorganiczne takiej jak nanocząstki złota, nanocząstki tlenku żelaza czy nanorurki węglowe oraz nanocząstki organiczne takie jak nanocząstki polimerowe oraz układy hybrydowe. Szczególnie interesujący przykład stanowią nanocząstki tworzone z wykorzystaniem lipidów, które dzięki swojemu biogennemu charakterowi, często wykazują niską cytotoksyczność. Lipidy, dzięki amfifilowej strukturze, posiadają zdolność do samoorganizacji, czyli samoistnego tworzenia wielocząsteczkowych regularnych struktur, które mogą wykazywać cechy faz ciekłokrystalicznych. Obecność obszarów hydrofilowych i hydrofobowych w takich fazach sprawia z kolei, że nanocząstki stworzone z lipidów stanowią potencjalne nośniki czynników zarówno polarnych, niepolarnych i amfifilowych. Ponadto, lipidowe fazy ciekłokrystaliczne i nanocząstki z nich wytworzone charakteryzują się dużą wewnętrzną powierzchnią właściwą, zwiększającą potencjalną efektywność wiązania do nanocząstek leków. Ostatecznie, układy takie w określonych warunkach ulegają przejściom fazowym, co umożliwia kontrolowane uwalnianie leków.

Powyższe cechy faz ciekłokrystalicznych i tworzonych z nich lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych motywuje badania i poszerzanie wiedzy w zakresie wykorzystania takich układów do zastosowań biomedycznych, w tym jako potencjalne nośniki leków oraz środków kontrastujących wykorzystywanych m.in. w obrazowaniu rezonansem magnetycznym.

Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne są układami wieloskładnikowymi. Pierwszy składnik stanowi lipid, którego struktura umożliwia samoorganizację do faz ciekłokrystalicznych takich jak faza heksagonalna czy kubiczna. Samoorganizacja lipidów zachodzi w środowisku wodnym, w związku z czym woda stanowi drugi, integralny składnik lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. Ostatnim składnikiem takich układów są surfaktanty, polimerowe stabilizatory, które przez nadanie nanocząstkom określonego dodatniego lub ujemnego ładunku powierzchniowego, uniemożliwiają agregację nanocząstek. Odpowiedni dobór proporcji składników wykorzystanych do stworzenia lipidowych nanocząstek umożliwia kontrolowanie nie tylko typu tworzonych przez nie faz ciekłokrystalicznych, ale także

manipulowanie ich właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak średnica hydrodynamiczna czy wartość potencjału zeta. Przykładowo w trójskładnikowym układzie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych złożonych z monooleinianu glicerolu, wody i glikolu propylenowego, kontrolując zawartość poszczególnych składników, można stworzyć układy wykazujące cechy fazy lamelarnej lub fazy kubicznej [12]. Na charakter wytworzonego układu wpływ mają również takie parametry jak temperatura, ciśnienie, siła jonowa czy wartość pH [13–16].

Ilość czynników wpływających na właściwości fizykochemiczne lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych sprawia, że niemożliwym jest określenie takich właściwości *a priori*. W związku z tym każdy układ o potencjalnym zastosowaniu jako nośnik leków czy środków kontrastujących musi zostać szczegółowo opisany, zarówno pod kątem właściwości fizykochemicznych jak i wpływu nanoukładu na organizmy żywe. Aby zminimalizować zużycie materiałów niezbędnych do opisanie badanego układu, a jednocześnie w celu uzyskania jak najbardziej szczegółowego opisu systemu, coraz częściej wykorzystywane są podejścia statystyczne znane jako projektowanie doświadczeń. Należą do nich m.in. ułamkowe plany czynnikowe [17], plany czynnikowe pozwalające na ocenę wpływu zmiany wartości kontrolowanych zmiennych na badaną odpowiedź [18], czy metodologie powierzchni odpowiedzi, takie jak centralny plan kompozycyjny, pozwalający na zaprojektowanie i wyznaczenie takich wartości parametrów wejściowych, dla których dane właściwości fizykochemiczne przyjmować będą oczekiwane wartości [19].

Istotnym warunkiem wprowadzenia na rynek jakichkolwiek układów o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym, w tym jako potencjalnych nośników leków i środków kontrastujących, jest szczegółowa analiza jego odpowiedzi biologicznej. Wiedza ta pozwala m.in. na określenie dawek terapeutycznych wywołujących oczekiwany efekt, ale także rozpoznanie potencjalnych efektów ubocznych, mogących mieć wpływ na warunki stosowania leku. Prowadzone w tym celu analizy biologiczne uwzględniają wpływ badanego materiału na kluczowe dla przeżycia komórek procesy w funkcji stężenia oraz czasu inkubacji komórek z terapeutycznym. Badania takie mają na celu wyznaczenie dawek wywołujących efekt cytotoksyczny nanoukładów w komórkach oraz określenie mechanizmów cytotoksyczności wywoływanych przez badany materiał.

W poniższej pracy przedstawione zostały badania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu i fitantriolu jako potencjalnych nanosystemów dostarczania leków oraz środków kontrastujących. Badane układy wytworzone zostały metodą top-down, polegającą na rozbijaniu fazy ciągłej lipidów do wymiarów nanometrycznych i ich następnej stabilizacji za pomocą kopolimeru trójblokowego z grupy Pluroników. Badane układy zostały scharakteryzowane pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i stabilności dyspersji za pomocą technik fizycznych takich jak metoda dynamicznego rozpraszania światła, elektroforetycznego rozpraszania światła, techniki rozpraszania promieniowania rentgenowskiego czy kriogeniczna transmisyjna mikroskopia

elektronowa. Jednym z warunków wykorzystania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w zastosowaniu biomedycznych, takich jak dostarczanie leków, jest dobre zrozumienie ich oddziaływania na organizmy żywe. W związku z powyższym, nanosystemy zostały również zbadane pod kątem odpowiedzi biologicznych ludzkich komórek raka szyjki macicy HeLa, ludzkich prawidłowych komórek fibroblastów MSU 1.1 oraz sferoidów komórek HeLa. W badaniach tych uwzględniono analizę aktywności proliferacyjnej, analizę poziomu generowanych reaktywnych form tlenu, ocenę integralności cytoszkieletu, dróg wnikania nanocząstek czy genotoksyczności. Ponadto, w pracy zaprojektowano nowy układ lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu domieszkowanego monolaurynianem glicerolu jako potencjalnego nośnika antybiotyków, wykazującego niezależne od antybiotyków właściwości antybakteryjne. W celu optymalizacji warunków syntezy wskazanego układu wykorzystano statystyczne metody projektowania doświadczeń, tj. dwupoziomowy plan czynnikowy oraz centralny plan kompozycyjny. Zaprojektowany układ został ponownie szczegółowo scharakteryzowany pod kątem jego właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych. Poza analizą aktywności proliferacyjnej komórek HeLa i MSU 1.1 wykonano również analizę wzrostu bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* w celu wykazania potencjalnych właściwości antybakteryjnych zsyntetyzowanych nanocząstek.

2. Wstęp teoretyczny

2.1 Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne

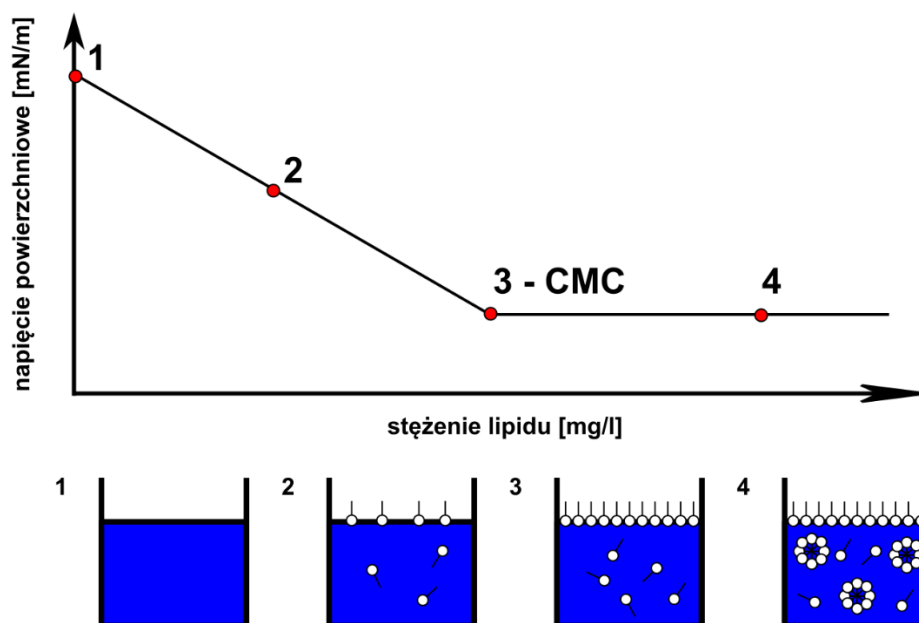
Związki amfifilowe, to znaczy takie, które w swojej strukturze posiadają zarówno części hydrofilowe i hydrofobowe, w środowisku wodnym zdolne są do samoorganizacji do szeregu termodynamicznie stabilnych faz ciekłokrystalicznych [20]. Fazą ciekłokrystaliczną nazywamy pośredni stan skupienia między stanem ciekłym a krystalicznym, w którym układ łączy cechy charakterystyczne zarówno dla stanu ciekłego jak i krystalicznego tzn. posiada zdolność płynięcia, dostosowuje kształt do kształtu naczynia, w którym się znajduje, ale również posiada dalekozasięgową wewnętrzną symetrię [21].

Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne (LLCNPs z ang. *lipid liquid crystalline nanoparticles*) są grupą organicznych nanoukładów stanowiących obiecujące systemy do dostarczania leków i środków kontrastujących wykorzystywanych m.in. w obrazowaniu za pomocą rezonansu magnetycznego [22–24]. LLCNPs nazywane są trójskładnikowe dyspersje wodne amfifilowych cząstek lipidów samoorganizujących się do faz ciekłokrystalicznych o dalekozasięgowej heksagonalnej lub kubicznej symetrii, stabilizowane poprzez nadanie nanocząstkom określonego potencjału zeta dzięki obecności stabilizatorów. Złożona struktura faz ciekłokrystalicznych tworzonych przez określone lipidy sprawia, że nanocząstki z nich otrzymane charakteryzują się obecnością regionów hydrofilowych i hydrofobowych oraz posiadają dużą powierzchnię właściwą, dzięki czemu mogą w nich być łatwiej rozpuszczane zarówno czynniki polarne i niepolarne. Ma to szczególne zastosowanie w przypadku dostarczania leków przeciwnowotworowych, które w dużej mierze są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie [25,26]. Najczęściej wykorzystywanymi lipidami do syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych są monooleinian glicerolu i fitantriol [27], które przy określonych stosunkach masowych lipidu i wody, wykazują charakter heksagonalnych i kubicznych faz ciekłokrystalicznych. Do najczęściej wykorzystywanych stabilizatorów układów LLCNPs należą polimery trójblokowe z grupy Pluroników. Pluronik F127 zbudowany jest z łańcucha hydrofobowego tworzonego przez glikol polipropylenowy, do którego końców dobudowane są dwa hydrofilowe łańcuchy glikolu polietylenowego. Hydrofilowy charakter łańcuch glikolu polietylenowego wynika z obecności tlenu w strukturze monomeru, mogącego tworzyć wiązania wodorowe z cząstkami wody. W lipidowych nanocząstkach ciekłokrystalicznych części niepolarne surfaktantu wbudowują się w obszary niepolarne dwuwarstwy tworzonej przez lipidy, eksponując tym samym hydrofilowe łańcuchy do środowiska wodnego nadając tym samym nanocząstkom wypadkowy ujemny zeta potencjał [22]. Dzięki wykorzystaniu m.in. lipidów kationowych czy innych stabilizatorów nanocząstkom można nadać również dodatni zeta potencjał. Układy takie również stanowią stabilne dyspersje, ponieważ oddziaływania elektromagnetyczne między nanocząstkami o jednoimiennym zeta potencjale zapobiegają agregacji nanocząstek. Surfaktanty pełnią nie tylko funkcję stabilizatorów, ale stanowią również potencjalne miejsce funkcjonalizacji układu. Aleandri i wsp. [28] wykorzystali Pluronik PF108 do przyłączenia biotyny w celu zwiększenia efektywności dostarczania kubosomów naładowanych lekiem przeciwnowotworowym

paclitakselem do komórek nowotworowych raka szyjki macicy [28]. Caltagirone i wsp. dzięki przyłączeniu kwasu foliowego do tego samego stabilizatora, zwiększyli efektywność dostarczania teranostycznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych transportujących lek przeciwnowotworowy (kamptotecynę) oraz sondę fluorescencyjną (skuarynę) do komórek HeLa [29].

2.2 Samoorganizacja lipidów

Krystalizacją nazywany jest proces przejścia fazowego z fazy ciekłej lub gazowej do fazy krystalicznej [30]. Proces krystalizacji związków tworzących liotropowe fazy ciekłokrystaliczne dzieli się na cztery podstawowe etapy (Ryc. 1). Pierwszym etapem jest osiągnięcie stanu przesylenia cieczy. Przy niskim stężeniu lipidu w wodzie (Ryc. 1.1, Ryc. 1.2), cząsteczki lipidów pozostają w formie monomerycznej oraz gromadzą się na granicy faz ciecz/powietrze, kontaktu części hydrofilowych cząsteczek lipidów z wodą prowadząc do zmniejszenia napięcia powierzchniowego układu, a tym samym do zmniejszenia energii swobodnej układu [31]. Wraz ze zwiększaniem stężenia lipidu w układzie, wzrasta jego udział na granicy faz ciecz powietrze, aż do momentu wysycenia interfazy (Ryc. 1.3). Stężenie lipidu, przy którym dalsze zwiększanie jego stężenia nie prowadzi do zmniejszania napięcia powierzchniowego układu nazywane jest krytycznym stężeniem micelarnym (CMC z ang. *critical micelles concentration*) [32]. Powyżej krytycznego stężenia micelarnego, dalsze zwiększanie stężenia lipidu prowadzi do drugiego etapu krystalizacji, czyli nukleacji– procesu powstawania agregatów cząsteczkowych, zachodzącego w całej objętości roztworu (Ryc. 1.4).



Ryc. 1 Schematyczne przedstawienie zmiany napięcia powierzchniowego układu w miarę zwiększania stężenia lipidu. Cyframi 1-4 zaznaczono charakterystyczne etapy procesu.

Nukleacja homogenna jest procesem stochastycznym. W wyniku chaotycznego poruszania się cząsteczek lipidów w fazie wodnej i ich oddziaływania między sobą, spontanicznie powstają

niewielkie, amorficzne agregaty, które następnie rozpadają się ponownie do postaci monomerycznej [33]. Proces ten opisuje wzór:

$$\Delta G = \Delta G_S + \Delta G_V \quad (1)$$

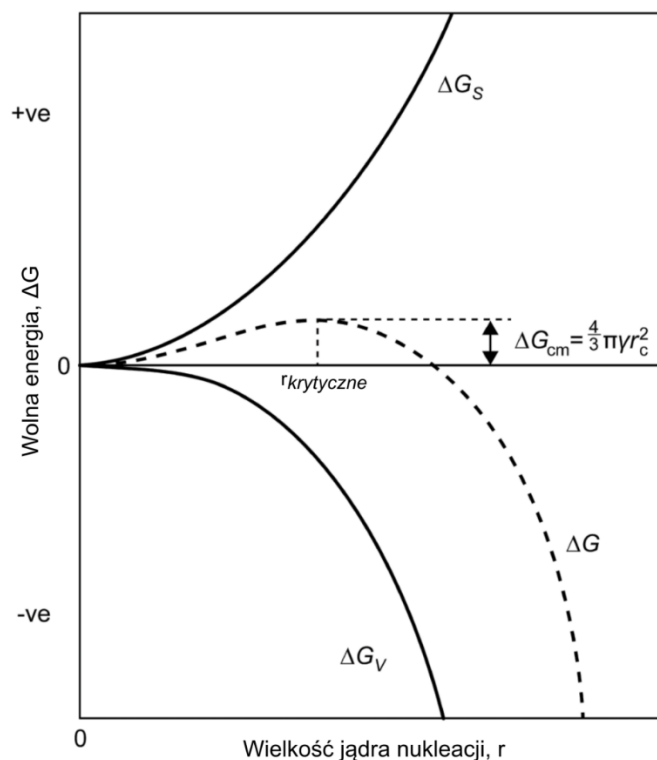
gdzie ΔG – różnica między entalpią swobodną układu niezagregowanego (postać monomeryczna) a zagregowanego (postać micelarna/ krystaliczna), ΔG_S - zmiana entalpi związana z utworzeniem powierzchni międzyfazowej (woda / krystalit (micela)), ΔG_V – zmiana entalpi swobodnej związana ze zmianą pewnej objętości roztworu niezagregowanego w objętość agregatu [34]. Dla układów przesyconych, ΔG_V przyjmuje wartości ujemne, a co za tym idzie prowadzi do obniżenia energii swobodnej Gibbsa. ΔG_S zwiększa energię swobodną układu proporcjonalnie do powierzchni powstających agregatów.

Dla sferycznych zarodków nukleacji wzór można przedstawić jako:

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma - \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_V \quad (2)$$

gdzie r – średnica zarodka nukleacji, γ – napięcie powierzchniowe.

Zmiana energii swobodnej posiada pewne maksimum (Ryc. 2). Jeżeli spontanicznie utworzy się zarodek nukleacji o promieniu większym od $r_{krytyczne}$, to termodynamicznie korzystne, czyli prowadzące do zmniejszanie energii swobodnej, będzie zwiększanie promienia zarodka. W efekcie zarodek rośnie, a wraz z nim objętość fazy krystalicznej.



Ryc. 2 Zależność pomiędzy średnicą jądra nukleacji a energią swobodną. Sporządzone na podstawie [35].

Powszechniejszym procesem jest nukleacja heterogenna zachodząca, gdy w układzie znajdują się m.in. zewnętrzne zanieczyszczenia o wysokiej powierzchni właściwej, która wiąże się z wysoką powierzchniową energią swobodną. Ułatwiony proces nukleacji na takich ośrodkach tłumaczony jest między innymi przez zwiększenie prawdopodobieństwa kontaktu między cząsteczkami lipidów w wyniku wyższych lokalnych stężeń oraz dążenia cząsteczek lipidów do zmniejszenia energii na granicy faz. Relację między entalpią swobodną nukleacji homogennej i heterogennej opisuje wzór:

$$\Delta G_{hetero} = \varphi \Delta G_{homo} \quad (3)$$

gdzie:

$$\varphi = \frac{(2 + \cos \Theta)(1 - \cos \Theta)^2}{4} \quad (4)$$

gdzie Θ jest kątem zwilżania między zewnętrznym ośrodkiem nukleacji a substratem [36].

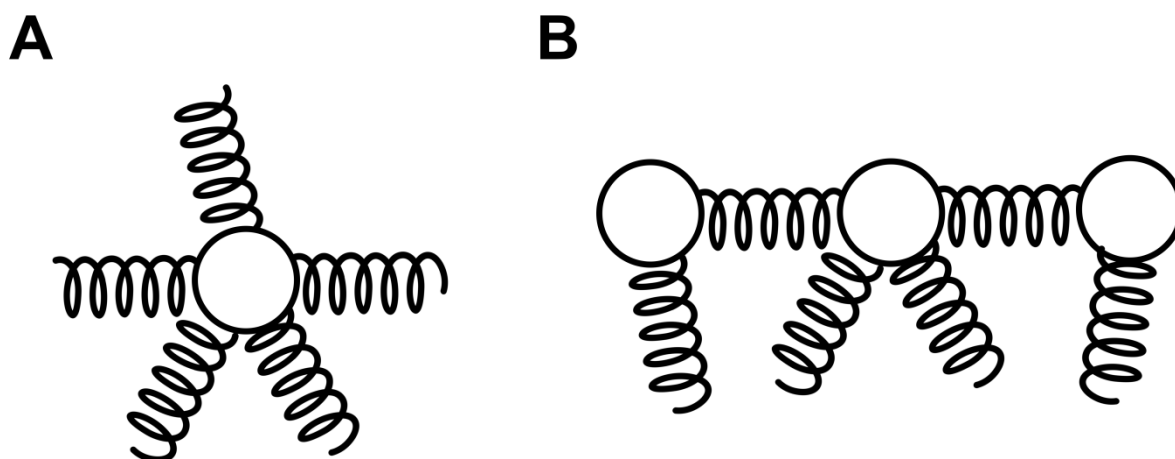
Powierzchnia zarodka nukleacji staje się miejscem przyłączania kolejnych cząsteczek lipidów. Wzrost kryształu jest wypadkową dwóch procesów: szybkości przyłączania się nowych monomerów do powstającego kryształu i dyfuzji tych monomerów z powierzchni kryształu do roztworu. Relację tych dwóch procesów, a także kinetykę wzrostu kryształów opisuje prawo dyfuzji Ficka:

$$J = 4\pi r^2 D \frac{dC}{dx} \quad (5)$$

gdzie J – całkowity przepływ monomerów przez sferyczną płaszczyznę o promieniu r , D – stała dyfuzji, $\frac{dC}{dx}$ – gradient stężenia monomerów.

2.3 Minimalne powierzchnie Schwarza i Schoena jako teoretyczne podstawy powstawania faz kubicznych

W układzie dwóch niemieszających się składników, takich jak lipid i woda, pomiędzy fazami występuje region nazywany powierzchnią międzyfazową (z ang. *interface*) [37]. W stabilnych układach dwufazowych taki region posiada pewną swobodną energią powierzchniową (z ang. *interfacial free energy*), będącą równą pracy, którą należy wykonać, aby zwiększyć powierzchnię międzyfazową. Energia ta jest wynikiem różnego rozkładu oddziaływań międzyatomowych i międzycząsteczkowych pomiędzy atomami i cząsteczkami znajdującymi się w objętości fazy i na jej powierzchni. W sprężynowym modelu energii powierzchniowej, atomy i cząsteczki można przedstawić w postaci kul połączonych sprężynami (Ryc.3). W fazie ciągłej, pojedyncze cząsteczki wystawione są na równoważące się siły przyciągania i odpychania z każdej strony (Ryc. 3, A). Z kolei na granicy faz, siły przyciągające pochodzące od atomów i cząsteczek są większe, niż te pochodzące spoza fazy (Ryc. 3, B).



Ryc. 3 Schematyczne przedstawienie cząsteczek w (A) objętości fazy oraz (B) na powierzchni fazowej za pomocą sprężynowego modelu energii powierzchniowej.

Zgodnie z prawami termodynamiki, układ dąży do minimalizacji energii układu [37]. W przypadku obszarów międzyfazowych jest to równoznaczne z redukowaniem powierzchni międzyfazowej do minimum. Bryłą, która ma najkorzystniejszy termodynamicznie stosunek powierzchni do objętości jest kula. W przypadku układów lipid woda, kształt taki przyjmują między innymi liposomy czy micle. Jednakże sfery nie są jedynymi powierzchniami, spełniającymi warunek minimalizacji energii układu.

Minimalna powierzchnia w matematyce oznacza powierzchnię o zadanych warunkach brzegowych, która dla każdego punktu posiada otoczenie o najmniejszym polu powierzchni spośród innych powierzchni o tych samych warunkach brzegowych, co skutkuje również średnią krzywizną powierzchni wynoszącą zero [38].

Jako pierwszy nad zagadnieniem krzywizn pochylił się Euler, analizując najmniejszą całkowitą powierzchnię rozciągającą się między dwoma okręgami [39]. W 1762 roku Lagrange sformułował ogólne pytanie o wyznaczanie minimalnej powierzchni o zadanych brzegach,

nazwane później zagadnieniem Plateau [39]. Pomimo tego, że przez kolejne blisko 200 lat badano różne płaszczyzny o powierzchniach minimalnych, dopiero w 1931 roku Jesse Douglas i niezależnie w 1933 roku Radó [40,41] udowodnili istnienie powierzchni minimalnych dla dowolnych warunków brzegowych.

W 1890 roku Schwarz [42,43] przedstawił opracowane przez siebie dwie potrójnie okresowe powierzchnie minimalne, nazwane później przez Schoena postacią prymitywną P i diamentową D.

W celu opisanie i przedstawienia powierzchni minimalnych, opracowane zostały przybliżenia w postaci równań funkcji trygonometrycznych [44].

Przybliżenie minimalnej powierzchni P przyjmuje postać:

$$\cos(x) + \cos(y) + \cos(z) = 0 \quad (6)$$

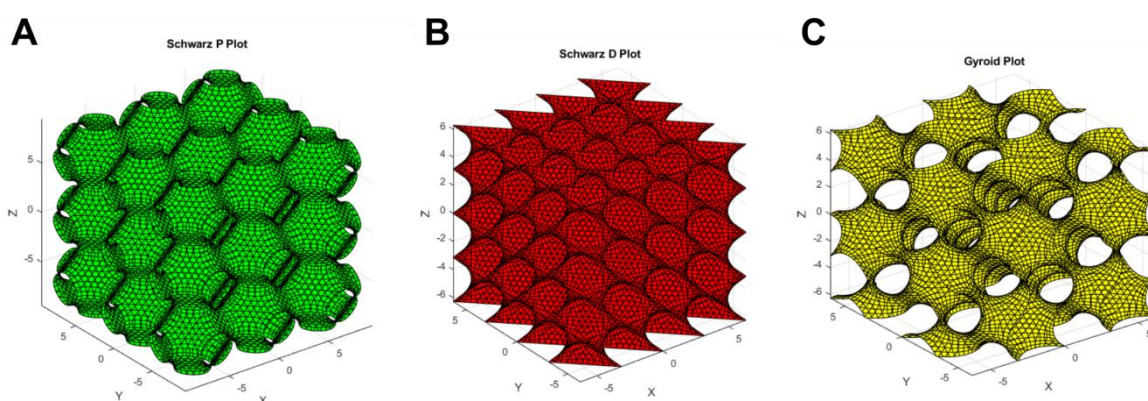
Przybliżenie minimalnej powierzchni D przyjmuje postać:

$$\cos(x) \cos(y) \cos(z) - \sin(x) \sin(y) \sin(z) = 0 \quad (7)$$

W 1970 roku Schoen, prócz nazwania powierzchni minimalnych przedstawionych przez Schwarza, opracował i przedstawił trzecią potrójnie okresową powierzchnię minimalną – żyroidalną G. Przybliżenie powierzchni minimalnej G można przedstawić jako:

$$\sin(x) \cos(y) + \sin(z) \cos(y) + \sin(y) \cos(z) = 0 \quad (8)$$

Przedstawione powyżej powierzchnie minimalne, tj. prymitywna, diamentowa i żyroidalna, prócz znaczenia czysto matematycznego, stanowią cechą charakterystyczną kubicznych lipidowych faz ciekłokrystalicznych.



Ryc. 4 Potrójnie okresowe powierzchnie minimalne (A) prymitywna Schwarza, (B) diamentowa Schwarza, (C) żyroidalna Schoena. Obrazy wygenerowane za pomocą oprogramowania MatLab z wykorzystaniem kodu przedstawionego przez Muna i Pattersona [45].

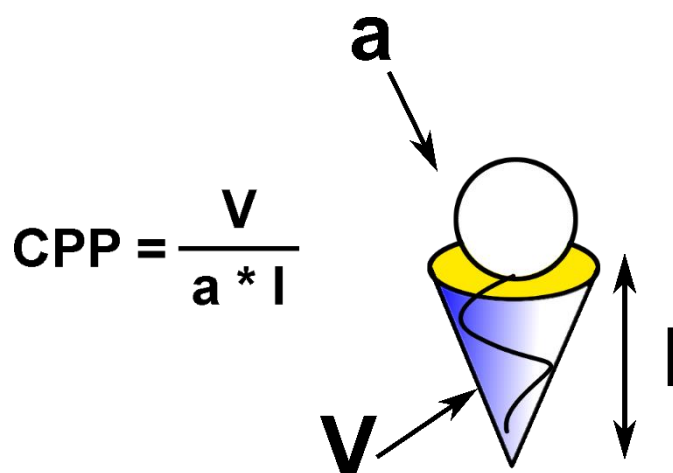
2.4 Fazy ciekłokrystaliczne

Efekty steryczne, wynikające bezpośrednio ze struktury przestrzennej lipidu definiują tworzoną przez samoorganizujące się cząsteczki lipidu fazę ciekłokrystaliczną. Strukturę przestrzenną lipidów opisuje krytyczny parametr upakowania (ang. *critical packing parameter*) definiowany jako:

$$CPP = \frac{V}{a * l} \quad (9)$$

gdzie V – objętość części hydrofobowej, a – pole powierzchni przekroju między częścią hydrofobową a hydrofilową, l – długość łańcucha hydrofobowego (Ryc. 5) [46,47].


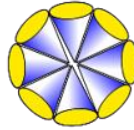

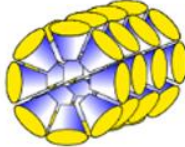
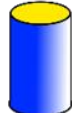
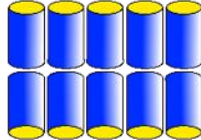
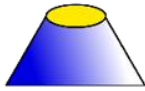

Obecność części hydrofilowych o dużym przekroju poprzecznym prowadzi do zmniejszenia się CPP oraz zwiększenia ich efektów sterycznych w procesie samoorganizacji, prowadząc do zwiększenia się krytycznego parametru upakowania. Podobny efekt obserwowany jest w przypadku zwiększania się długości łańcucha hydrofobowego. Z drugiej strony, występowanie wiązań podwójnych w obrębie łańcucha węglowego lipidu skutkuje rozgałęzieniem się łańcucha, a co za tym idzie do zwiększenia objętości części hydrofobowej, która prowadzi do zwiększenia wartości CPP.



Ryc. 5 Graficzne przedstawienie krytycznego parametru upakowania. V – objętość części hydrofobowej, a – pole powierzchni przekroju między częścią hydrofilową i hydrofobową, l – długość łańcucha hydrofobowego.

Fazą ciekłokrystaliczną, inaczej mezofazą, określa się taki stan układu, który w zdefiniowanym zakresie temperatury, ciśnienia i stężenia wykazuje cechy zarówno stanu ciekłego [48], m.in. przyjmowanie kształtu naczynia w jakim się znajduje, jak i stałego, tj. zachowanie dalekozasięgowej, wewnętrznej symetrii. Podstawowy element układu samoorganizujący się do fazy ciekłokrystalicznej nazywa się mezogenem [49]. Fazy ciekłokrystaliczne, ze względu na sposób powstawania dzieli się na liotropowe, czyli charakterystyczne dla określonych stężeń mezogenu w rozpuszczalniku [50–52] i termotropowe, czyli powstające jedynie w charakterystycznym zakresie temperatur [50–52].

Kiedy cząsteczka lipidu posiada stosunkowo długą część hydrofobową przy jednoczesnym zachowaniu niskiej objętości, np. w sytuacji, kiedy wiązania w części polarnej są nasycone i nierozgałęzione, oraz cechują się większą wartością a ($CPP < \frac{1}{3}$), mezogeny mają tendencję do samoorganizacji się w sferyczne micelle (Ryc. 6). Gdy struktura przestrzenna lipidu przypomina ścięty stożek, m.in. w sytuacji, kiedy wartość a się zmniejsza ($CPP = (\frac{1}{3}, \frac{1}{2})$) micelle wydłużają się tworząc długie kanały otoczone rozpuszczalnikiem, które zorganizowane są w sieci heksagonalnej. Lipidy o krytycznym parametrze upakowania $CPP \approx 1$ posiadają tendencję do samoorganizacji do faz kubicznych. Złożona wewnętrzna struktura kubicznych faz ciekłokrystalicznych wynika z obecności dwóch kanałów wodnych oddzielonych dwuwarstwą lipidową, która tworzy powierzchnie minimalne przedstawione w poprzednim podrozdziale. W efekcie powierzchnia właściwa struktur ciekłokrystalicznych o kubicznej symetrii jest zdecydowanie większa w porównaniu do innych lipidowych struktur ciekłokrystalicznych o podobnych rozmiarach [22]. Gdy wartość CPP wynosi jeden, czyli w momencie, kiedy struktura przestrzenna lipidu przypomina cylinder, układ samoorganizuje się w strukturę dwuwarstwy. Dla wyższych wartości CPP wynikających m.in. z zwiększaniem się objętości części hydrofobowej, prowadzi do powstania struktury klina. Wówczas, wraz z wzrastającym krytycznym czynnikiem upakowania układ zaczyna tworzyć kolejno odwrócone fazy heksagonalne i micelarne. Warto podkreślić jest jednak fakt, że struktura przestrzenna mezogenu nie jest jedynym parametrem definiującym powstawanie struktur krystalicznych, jako iż proces samoorganizacji jest również funkcją siły jonowej układu, temperatury oraz stężenia mezogenu, co zostało wspomniane powyżej.

WARTOŚĆ CPP	KONFORMACJA PRZESTRZENNA	TWORZONA FAZA
$CPP < 1/3$	 struktura stożka	 faza micelarna
$CPP = (1/3 - 1/2)$	 struktura ściętego stożka	 faza heksagonalna
$CPP = 1$	 struktura cylindryczna	 faza lamelarna
$CPP > 1$	 struktura klina	 odwrócona faza heksagonalna

Ryc. 6 Przedstawienie zależności między wartością krytycznego parametru upakowania, powstającą strukturą cząsteczki amfifilowej i tworzonej fazy ciekłokrystalicznej.

Określanie wartości krytycznego współczynnika upakowania nie jest w żaden sposób usystematyzowane i pomimo podjęcia wielu prób stworzenia teoretycznej metody obliczania CPP [53–55], proces ma charakter bardziej rozważań hipotetycznych niż procesu empirycznego.

2.5 Lipidy i surfaktanty wykorzystywane do syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

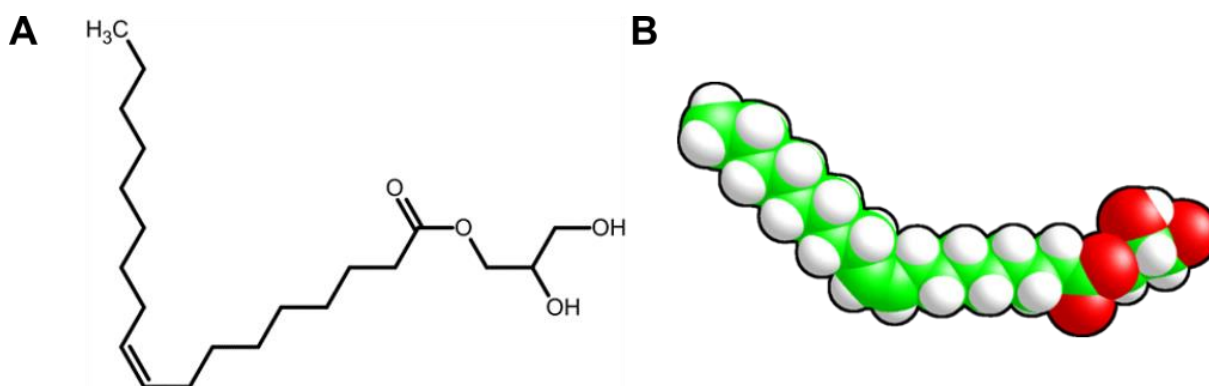
2.5.1 Monooleinian glicerolu (GMO)

Monooleinian glicerolu (nazwa systematyczna: 1-(*cis*-9 oktadekanoil)-*rac*-glicerol) (GMO z ang. *glycerol monooleate*) w skali makroskopowej jest lepłą, żółtą cieczą [56] o charakterystycznym, słodkim zapachu [57]. W skali molekularnej monooleinianu glicerolu zbudowany jest z glicerolu, do którego przyłączony jest wiązaniem estrowym kwas oleinowy w pozycji 1 (Ryc. 7).

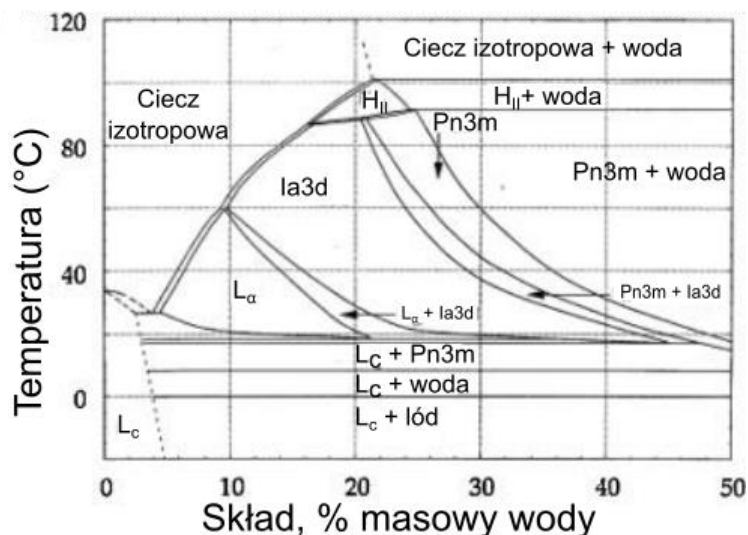
Hydrofilowy charakter „głowy” monooleinianu glicerolu wynika z obecności grup hydroksylowych przy węglach nietworzących wiązania estrowego. Grupy te tworzą wiązania z nierównomiernym rozłożeniem cząstkowego ładunku elektrycznego, dzięki czemu zyskują hydrofilowy charakter i tworzą wiązania wodorowe z otaczającymi cząsteczkami wody. Drugą część monooleinianu glicerolu stanowi 18 węglowy kwas oleinowy z wiązaniem podwójnym między węglami 9 i 10 w konfiguracji *cis*. Sam łańcuch wykazuje charakter silnie hydrofobowy, w efekcie czego GMO jest cząsteczką amfifilową.

Monooleinian glicerolu jest lipidem nierozpuszczalnym w wodzie, jednak rozpuszczalnym w etanolu, chloroformie i eterze [58]. Lipid jest przyjęty przez Agencję Żywności i Leków jako bezpieczny i zaliczany jest do grupy związków GRAS [4], czyli powszechnie uznawanych za bezpieczne. Wysoka biodostępność i biodegradowalność GMO wynikają z dużej podatności lipidu na lipolizę przez działanie esteraz obecnych w tkankach człowieka. Ponadto niska toksyczność lipidu pozwala na jego wykorzystanie w celach biomedycznych.

Konformacja *cis* w łańcuchu alifatycznym sprawia, że część hydrofobowa lipidu znacznie zwiększa swoją objętość, co prowadzi do zwiększenia krytycznego parametru upakowania CPP, który w przypadku GMO przyjmuje wartości większe od 1. W efekcie, monooleinian glicerolu zdolny jest do samoorganizacji w kierunku faz odwróconych, w tym dwuciągłej, odwróconej fazy kubicznej.



Ryc. 7 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) monooleinianu glicerolu



Ryc. 8 Diagram fazowy monooleinianu glicerolu w zależności od zawartości wody oraz temperatury. Sporządzone na podstawie [60].

W zależności od temperatury GMO wykazuje się wysokim poziomem polimorfizmu faz. W niskich temperaturach, lipid organizuje się do faz lamelarnych (L_C , L_α) niezależnie od zawartości wody. Faza lamelarna L_C powstaje w niższych temperaturach i charakteryzuje się wysokim poziomem uporządkowania cząstek lipidów w dwuwarstwie. Po osiągnięciu charakterystycznej termotropowej temperatury przejścia fazowego, powstaje faza L_α cechująca się wysoką płynnością i większą dynamiką w porównaniu do fazy L_C [61]. W temperaturach wynoszących ok. 10°C, współistnieją faza lamelarna L_C oraz kubiczna faza o symetrii żyroidalnej $la3d$. Wraz ze wzrastającą temperaturą w przedziale 20°C do ok. 80°C, przy udziale wody wynoszącym do 20%, układ wciąż organizuje się do fazy płytkowej, jednak wzrost udziału wody sprawia, że system samoorganizuje się do ciekłokrystalicznych faz kubicznych o symetriach kolejno żyroidalnej ($la3d$) i prymitywnej ($Pn3m$) w wysokich stężeniach wody. W temperaturach sięgających 80°C i przy udziale wody od ok. 20% przeważającą fazę stanowi faza heksagonalna odwrócona (H_{II}). Odwróconą fazę heksagonalną tworzą nieograniczenie długie odwrócone micelle tworzące kanały wodne. Przy bardzo wysokich temperaturach, przewyższających 100°C, ale również powyżej 40°C przy bardzo niskich zawartościach wody, GMO tworzy ciecz izotropową (FI z ang. *fluid isotropic*).

Monooleinian glicerolu, dzięki wysokiemu poziomowi polimorfizmu i zdolności do inkorporacji czynników zarówno hydrofilowych jak i hydrofobowych, stanowi podmiot zainteresowań w dziedzinie nanobiomedycyny. Zhen i wsp. [62] zaproponowali wykorzystanie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO do dostarczania siRNA, jako potencjalny system do terapii genowej. Angelova i wsp. [63] stworzyli termoczuły system oparty na monooleinianie glicerolu do dostarczania białek. Shi wraz z zespołem [64] zsyntetyzowali i zbadali *in vitro* i *in vivo* nanocząstki ciekłokrystaliczne GMO z dodatkiem hydrofobowego leku oridoniny, jako potencjalny system do leczenia przeciwnowotworowego. Monooleinian glicerolu jest również badany pod względem przezskórnego dostarczania leków. Pereira i wsp. [65] opracowali układ oparty na GMO do przezskórnego dostarczania progesteronu. Peng i

wsp. [12,66] zaprojektowali lipidowe nanocząstki z dodatkiem kapsaicyny do przezskórnego dostarczania leków o długim czasie uwalniania. Cohen-Avrahami i wsp. [67] przedstawili układ lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO i sfunkcjonalizowanych białkiem TAT do przezskórnego dostarczania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, diklofenaku i celecoxibu. Dzięki dużej zdolności do inkorporacji zarówno czynników hydrofilowych, jak i hydrofobowych, lipidowe nanocząstki oparte na GMO badane są również pod kątem dostarczania czynników kontrastujących wykorzystywanych m.in. w obrazowaniu rezonansem magnetycznym. Gupta i wsp. [68] w 2014 roku zaproponowali system oparty na GMO z dodatkiem amfifilowego układu DTPA-Gd(III), jako potencjalny środek kontrastujący dla obrazowania rezonansem magnetycznym. Następnie ten sam zespół zaproponował podobny układ, tym razem do dostarczania paramagnetycznych, amfifilowych chelatów [69]. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na GMO są również przedmiotem badań pod kątem układów teranostycznych, tzn. wykorzystywanych zarówno do terapii i jak i w celach diagnostycznych. Meli i wsp. [70] przedstawili system sfunkcjonalizowany kwasem foliowym załadowany lekiem przeciwnowotworowym (docetakselem) oraz fluorescencyjnym barwnikiem (rodaminą) jako potencjalny układ teranostyczny do diagnozy i terapii przeciwnowotworowej.

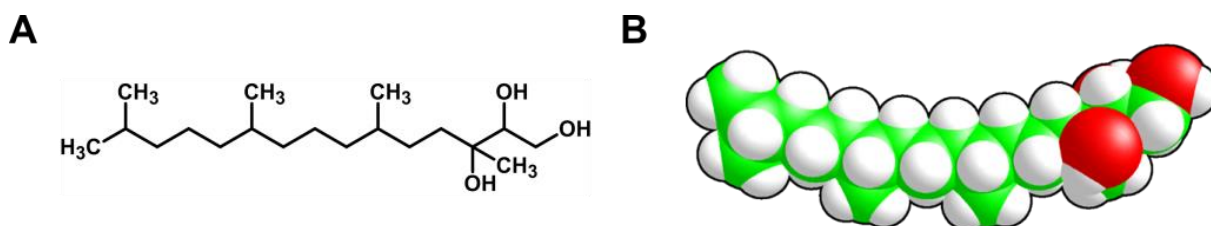
Tab. 1 Metryczka monooleinianu glicerolu.

Nazwa systematyczna	1-(cis-9 oktadekanoil)- <i>rac</i> -glicerol
Nazwy zwyczajowa	monooleinianu glicerolu, 1-monooleinian,
Wzór chemiczny	C ₂₁ H ₄₀ O ₄
Masa cząsteczkowa	356,55 g/mol
Temperatura topnienia	36°C
CPP	>1

2.5.2 Fitantriol (PHT)

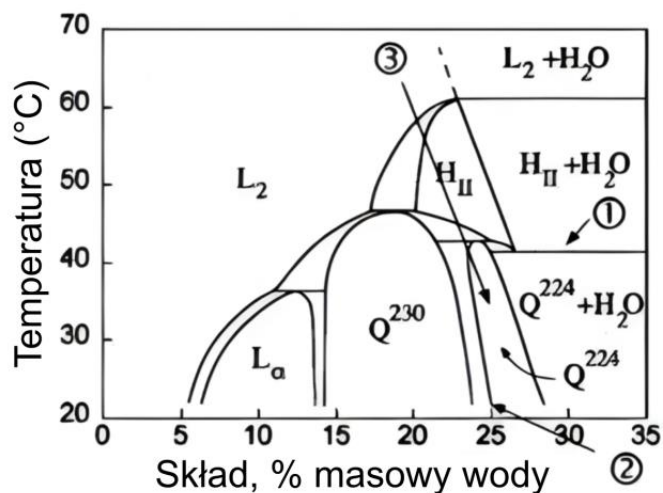
Fitantriol (nazwa systematyczna: 3,7,11,15-tetrametylheksadekane-1,2,3-triol) (PHT, z ang. *phytantriol*) w temperaturze pokojowej jest lepkiem, bezbarwnym do lekko żółtego koloru triolem o lekko słodkim zapachu [71]. Rozważając strukturę molekularną fitantriolu, jest to heksadekan, z przyłączonymi grupami metylowymi przy węglach 3, 7, 11, 15 oraz trzema grupami wodorotlenowymi przy węglach 1,2 i 3, pełniących rolę hydrofilowej „głowy” (Ryc. 9). Obecność grup hydroksylowych, tworzących wiązania spolaryzowane, nadaje tej części lipidu wysoki poziom hydrofilowości. Wraz z niespolaryzowanym łańcuchem węglowym, fitantriol jest cząsteczką amfifilową.

PHT, podobnie jak GMO jest związkiem nierozpuszczalnym w wodzie, jednak łatwo rozpuszczalnym w etanolu, glikolu propylenowym i olejach. PHT jest związkiem silnie drażniącym. Według Europejskiej Agencji Chemicznej (ECHA z ang. *European Chemicals Agency*), działa drażniąco na skórę oraz może wywoływać reakcje alergiczne [72]. Pomimo tego, ze względu na właściwości nawilżające oraz wspomaganie wchłaniania, w 2002 roku na rynku istniało ponad 100 produktów zawierających fitantriol o procentowej zawartości od 0,0002% do 1% [73]. Krytyczny parametr upakowania fitantriolu jest większy od jedności, przez co PHT może tworzyć odwrócone fazy ciekłokrystaliczne.



Ryc. 9 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) fitantriolu.

Podobnie jak monooleinian glicerolu, fitantriol wykazuje polimorfizm tworzonych faz (Ryc. 10). Przy niskiej zawartości wody sięgającej 5%, fitantriol ma tendencję do formowania fazy micelarnej (L₂). Tendencja ta utrzymuje się przy jednoczesnym wzroście temperatury i zawartości wody do poziomu kolejno 70°C i 35% w/w wody. Przy niższych temperaturach, w zakresie 20°C do 40°C i zawartości wody od 5% do 10%, PHT formuje fazę lamelarną. Wraz ze wzrostem zawartości wody, do około 25% i temperaturą sięgającą 45°C faza lamelarna przechodzi do fazy kubicznej o symetrii G. Dalsze zwiększanie zawartości wody w układzie prowadzi do powstawania fazy kubicznej o symetrii D. Przy udziale wody wynoszącym od 20% do 35% i temperaturze od 40°C do 60°C, fitantriol samoorganizuje się do fazy H_{II}.



Ryc. 10 Diagram fazowy fitantriolu w zależności od zawartości wody oraz temperatury. Sporządzone na podstawie [74].

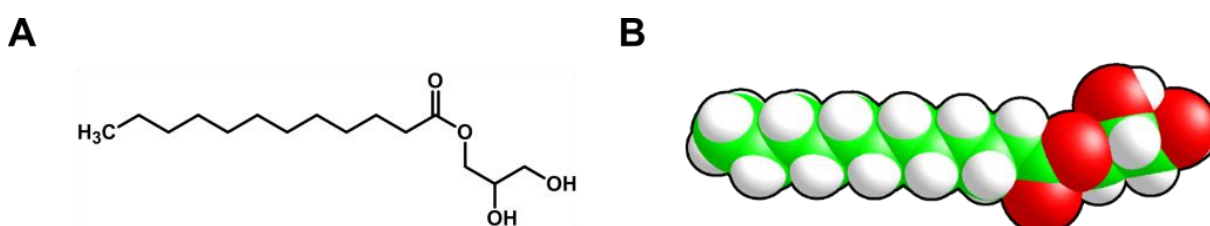
Dzięki potencjalnym zastosowaniom w biomedycynie, fitantriol zyskał duże zainteresowanie. Qin i wsp. [75] opracowali, zsyntetyzowali i zbadali układ emboliczny (przeciwzatorowy) oparty na fitantriolu jako nośnik o długim czasie uwalniania przeciwnowotworowego leku hydroksykamptotecyny. Podobną próbę podjął zespół Ali i wsp. [76] tworząc system oparty na fitantriolu z dodatkiem innych monoacylogliceroli z dodatkiem tego samego leku przeciwnowotworowego. Sun i wsp. [77] opracowali system oparty na fitantriolu sfunkcjonalizowany polietyloglikolem z dodatkiem nanocząstek tlenku żelaza, otrzymując system, który pod wpływem zmiennego pola magnetycznego, zdolny jest do przejścia fazowego z lamelarnej fazy tworzącej liposomy do fazy kubicznej i heksagonalnej, prowadząc potencjalnie do uwalniania leku w określonym momencie. W 2018 roku, Wan wraz z zespołem [78] opracowali system oparty na fitantriolu do przezskórnego dostarczania *trans*-cynamaldehydu – czynnika zmniejszającego odczyn zapalny w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Tab. 2 Metryczka fitantriolu.

Nazwa systematyczna	3,7,11,15-tetrametyloheksadekano-1,2,3-triol
Nazwy zwyczajowa	fitantriol
Wzór chemiczny	$C_{20}H_{42}O_3$
Masa cząsteczkowa	330,50 g/mol
Temperatura topnienia	56°C
CPP	>1

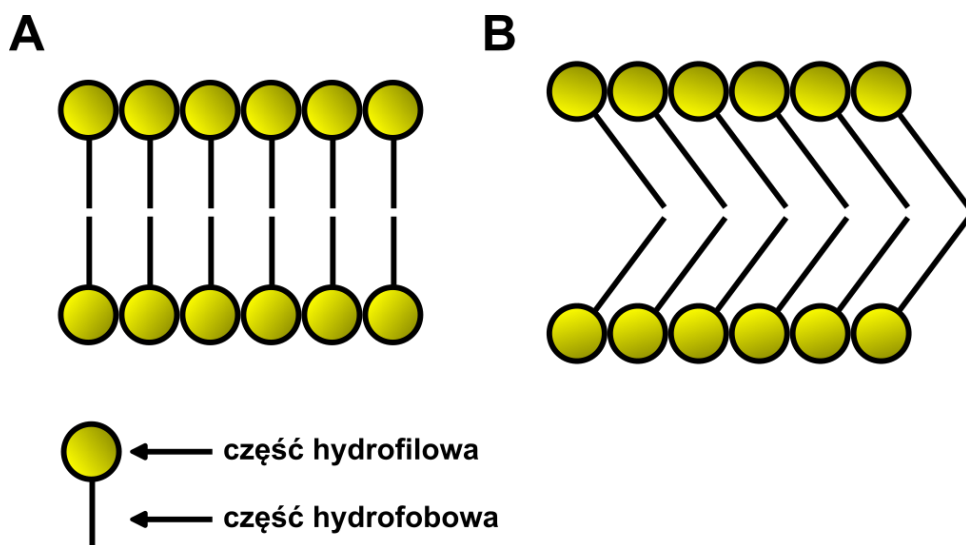
2.5.3 Monolaurynian glicerolu (GML)

Monolaurynian glicerolu (nazwa systematyczna: 1-lauryoil-*rac*-glicerol) (GML, z ang. *glycerol monolaurate*) w temperaturze pokojowej przyjmuje postać bezzapachowego, białego, krystalicznego proszku [79]. Na poziomie molekularnym monolaurynian glicerolu jest podobny do monooleinianu glicerolu. Podstawę lipidu stanowi glicerol, który przez obecność grup hydroksylowych wykazuje charakter hydrofilowy (Ryc. 11). Do węgla w pozycji pierwszej, wiązaniem estrowym przyłączony jest 12 węglowy, nasycony kwas laurynowy. Krytyczny parametr upakowania dla GML wynosi około 1, więc lipid ma tendencję do samoorganizacji do dwuwarstwy [14]. Monolaurynian glicerolu sklasyfikowany jest przez ECHA jako silnie drażniący związek [80].



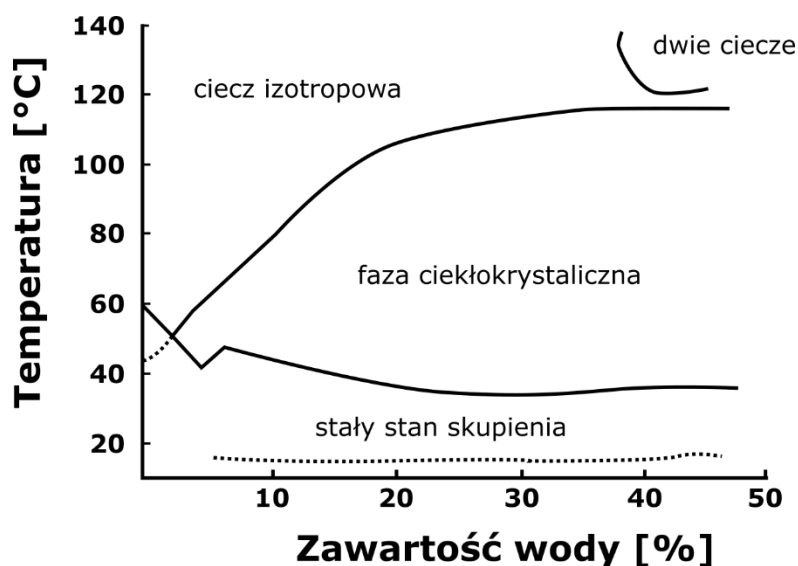
Ryc. 11 Wzór strukturalny (A) oraz struktura piłeczkowa (B) monolaurynianu glicerolu.

Polimorfizm faz monolaurynianu glicerolu w binarnych systemach lipid-woda jest słabo poznany. Najbardziej kompletny diagram fazowy GML-H₂O przedstawił Lawrence [81] (Ryc. 13). Przy zerowym udziale wody zaobserwować można dwie różne temperatury topnienia, wynoszące kolejno 46°C i 63°C [82]. Podwójny punkt topnienia przypisywany jest występowaniu dwóch form krystalicznych – mniej stabilnej formy alfa powstającej w wyniku równoległego ułożenia łańcuchów hydrofobowych (Ryc. 12 A) oraz stabilniejszej formy beta, w której części hydrofobowe lipidów ułożone są względem siebie pod stałym kątem (Ryc. 12 B) [83].



Ryc. 12 Schematyczne przedstawienie ułożenia cząstek lipidów w formie (A) – alfa i (B) – beta.

Przy temperaturach sięgających 50°C dla 5% udziału wody, do 115°C przy 50% udziale wody monolaurynian glicerolu występuje w formie ciekłokrystalicznej, przyjmując postać sferulitów (rodzaju wielowarstwowych liposomów), składających się z naprzemiennie ułożonych dwuwarstw lipidowych oraz regionów amorficznych [84,85]. Zwiększając temperaturę fazy ciekłokrystalicznej GML następuje przejście do postaci cieczy izotropowej.



Ryc. 13 Diagram fazowy monolaurynianu glicerolu w zależności od zawartości wody i temperatury. Sporządzone na podstawie [81].

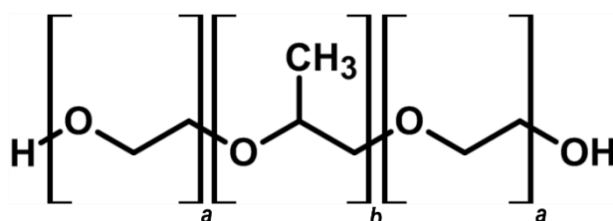
Na szczególną uwagę zasługuje szereg aktywności biologicznych wykazywanych przez monolaurynian glicerolu. Shimada i wsp. [86] wykazali istotnie wyższą cytotoksyczność lipidu wobec komórek linii komórkowych nowotworu nerek (A-498) oraz nowotworu trzustki (PACA-2) w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto, według badań zespołu Kabary i Petschowa [87,88], monolaurynian glicerolu wykazuje wysoką aktywność antybakteryjną przeciw bakteriom gram pozytywnym oraz bakteriom *Helicobacter ssp.* Pod wpływem GML wykazano również inhibicję wzrostu odpornej na wankomycynę bakterii *Enterococcus faecali* [89] oraz inhibicję syntezy toksyny wstrząsu toksycznego 1 TSST-1 (z ang. *toxic shock syndrome toxin-1*) [90]. W ostatnim czasie zainteresowanie wobec monolaurynianu glicerolu szczególnie wzrasta w związku z doniesieniami o antywirusowym działaniu lipidu przeciw wirusowi HIV [91]. Ponadto u pacjentów, którzy przeszli COVID-19 zaobserwowano znacząco podwyższony poziom monolaurynianu glicerolu w krwi, co autorzy wiążą z potencjalnie protekcyjnym działaniem GML przeciw SARS-CoV2 [75–77].

Tab. 3 Metryczka monolaurynianu glicerolu.

Nazwa systematyczna	dodekarian 2,3-dihydroksypropylu
Nazwy zwyczajowa	monolaurynian glicerolu, 1-monolaurin
Wzór chemiczny	C ₁₅ H ₃₀ O ₄
Masa cząsteczkowa	274,40 g/mol
Temperatura topnienia	63°C
CPP	≈1

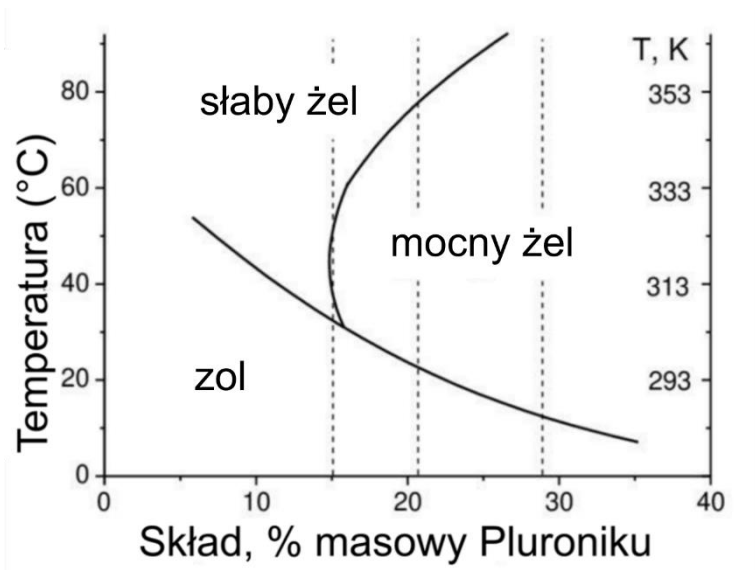
2.5.4 Pluronic F127

Pluronic F127 (również Poloksamer 407) jest trójblokowym kopolimerem składającym się z 54-60 grup hydrofobowego glikolu polipropylenowego (PPG z ang. *polypropylene glycol*) oskrzydłonego przez 95-105 grup hydrofilowego glikolu polietylenowego (PEG z ang. *polyethylene glycol*) tworząc ostatecznie strukturę $(\text{PEG})_{100}\text{-(PPG)}_{65}\text{-(PEG)}_{100}$ (Ryc. 14). Pluronic F127 jest bardzo łatwo rozpuszczalny w wodzie i wykazuje cechy odwracalnego termozelowania. W niskich temperaturach, cząsteczki Pluronicu występują w formie monomerycznej, tworząc płynny roztwór wodny. W temperaturze pokojowej dochodzi do dehydratacji grup PPG oraz hydratacji grup PEG i w efekcie agregacji cząstek Pluronicu do sferycznych miceli. Przy wzrastającej temperaturze układu zachodzi przejście z fazy żolowej do żelowej na skutek uporządkowanego łączenia się miceli do struktur supermolekularnych (Ryc. 15). Część Pluroniców, w tym F127 zostały uznane przez Agencję Żywności i Leków jako nietoksyczne i wykorzystywane są w przemyśle, przede wszystkim jako surfaktanty w kosmetykach, ułatwiające dyspergowanie hydrofobowych składników.



Ryc. 14 Wzór strukturalny kopolimeru trójblokowego Pluronic F127. Litery a (95-105) oraz b (54-60) wskazują na liczbę powtórzeń monomerów kolejno glikolu polietylenowego i glikolu polipropylenowego.

Dzięki swoim szczególnym właściwościom, Pluronic F127 znajduje zastosowanie również w nanotechnologii - samodzielnie do dostarczania leków lub jako środek stabilizujący lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne. Ma i wsp. [95] zaproponowali układ złożony z Pluronicu 127 sfunkcjonalizowanego kwasem poliakrylowym, jako system do dostarczania leków. Kant i wsp. [96] opisali zastosowanie żelu z Pluronicu 127 jako miejscowego środka wspomagającego leczenie ran skórnych. Akkari i wsp. [97] z kolei zaprojektowali oraz zbadali binarny układ hydrożelowy składający się z Pluronicu F127 oraz Pluronicu F68, jako termoczuły system do dostarczania ropiwakainy do miejscowej anestezji. W lipidowych nanocząstkach ciekłokrystalicznych Pluronic F127 stanowi składnik stabilizujący układ, poprzez nadanie nanocząstkom ujemnego ładunku powierzchniowego wskutek ekspozycji hydrofilowych bloków PEG. Akhlaghi i wsp. [98] zbadali wpływ metod syntezy i zawartości Pluronicu F127 w roztworach lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na fitantriolu, wykazując optymalny stosunek fitantriol:Pluronic F127 na poziomie 4:1, skutkujący stabilnym roztworem LLCNPs przez okres 4 miesięcy. Rarokar i wsp. [99] zbadali lipidowe nanocząstki oparte na GMO i stabilizowane Pluronicem F127 oraz F68, jako potencjalny termoresponsywny układ do dostarczania leku przeciwnowotworowego docetakselu. Tilley i wsp. [100] z kolei przeanalizowali wpływ różnych stężeń Pluronicu F127 na powstające struktury ciekłokrystaliczne monooleinianu glicerolu oraz fitantriolu z dodatkiem witaminy E.



Ryc. 15 Diagram fazowy Pluroniku F127 w zależności od temperatury układu i stężenia Pluroniku F127 w wodzie. Sporządzone na podstawie [101].

2.6 Biologia i biochemia lipidów

2.6.1 Funkcje lipidów w komórce

Lipidy stanowią szeroką grupę związków organicznych do których należą m.in. fosfolipidy, glikolipidy, cholesterol i steroidy [102]. Szerokie spektrum właściwości strukturalnych i fizykochemicznych sprawia, że lipidy w komórce spełniają szereg funkcji odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy.

Główną funkcją lipidów w komórce jest funkcja strukturalna. Fosfolipidy samoorganizujące się do fazy lamelarnej i innych faz ciekłokrystalicznych stanowią podstawę struktury błon komórkowych, systemu błon wewnątrzkomórkowych oraz organelli komórkowych [103]. Błona komórkowa jest dynamiczną, półpłynną strukturą składającą się z fosfo- i glikolipidów, przechodzących przez błonę białek integralnych oraz kanałów białkowych, zanurzonych w błonie białek peryferyjnych oraz zaabsorbowanych na powierzchni białek powierzchniowych [104]. Głównym zadaniem błony komórkowej jest oddzielenie wnętrza komórek od środowiska zewnętrznego. Dzięki obecności systemu kanałów białkowych błona komórkowa w sposób pasywny, aktywny oraz na drodze ułatwionej dyfuzji reguluje transport substancji ze środowiska zewnętrznego do komórki oraz na odwrót [105]. Szczególny przykład takiego transportu stanowi aktywny transport jonów K^+ oraz Na^+ w komórkach nerwowych, dzięki czemu pomiędzy wnętrzem komórki a macierzą komórkową tworzy się potencjał błonowy, który propaguje jako impuls nerwowy [106]. Dzięki obecności na powierzchni błony komórkowej białek oraz glikolipidów, błona komórkowa pośrednio bierze udział w procesach immunologicznych, pozwalając na rozpoznawanie antygenów oraz procesach adhezji, współtworząc ogniska adhezji [107]. Ponadto wewnętrzna strona błony komórkowej stanowi punkt zaczepienia dla systemu włókien aktynowych, filamentów pośrednich i mikrotubul, tworzących cytoskielet [108].

Wewnątrzkomórkowy system błon nazywany jest retikulum endoplazmatyczne (RE) i podzielone jest na RE gładkie i RE szorstkie [109]. Oba rodzaje retikulum endoplazmatyczne biorą udział w kompartmentacji komórek, wyznaczając oddzielone od siebie obszary, umożliwiając jednoczesne zachodzenie w komórce reakcji przeciwnych sobie, np. utlenianie-redukcja [110]. RE gładkie bierze udział w procesach metabolicznych lipidów oraz eliminowaniu substancji toksycznych [111]. RE szorstkie od gładkiego odróżnia obecność na jego powierzchni rybosomów – kompleksów białek i RNA biorących udział w procesie translacji białek [112]. Wewnątrzkomórkowe błony biorą również udział w tworzeniu innych organelli, czyli wyspecjalizowanych funkcjonalnie struktur komórkowych, takich jak mitochondria czy jądra komórkowe [109].

Lipidy występują w komórce również w formie kropeł lipidowych [113]. Krople lipidowe są mobilnymi organellami zbudowanymi ze złożonego z triacyloglicerydów i estrów sterylowych rdzenia otoczonego pojedynczą warstwą fosfolipidową [114]. Z kroplami tłuszczowymi związane są liczne białka, m.in. związane z metabolizmem tłuszczów białka z rodziny PAT (perylipiny, adipofiliny, białka TIP47) [114,115] czy białkowe regulatory transportu

membranowego Rab [116,117]. Do niedawna uważano, iż krople lipidowe są statycznymi strukturami wewnątrzkomórkowymi, biorącymi udział jedynie w magazynowaniu tłuszczów. Obecne badania wskazują jednak na udział kropeł lipidowych w różnorodnych procesach biochemicznych, takich jak ww. metabolizm tłuszczów, membranowy transport lipidów [118], magazynowanie [119], inaktywacja [120] oraz degradacja nieprawidłowo sfałdowanych białek [121], a także udział w procesach zapalnych i immunologicznych [122,123].

Związki lipidowe pełnią w komórkach również funkcje mniej oczywiste. Hofbauer i wsp. [124] zaproponowali udział kwasów fosfatydowych C16 i C18 w regulacji ekspresji genu *OPI1* poprzez preferencyjne wiązanie się represora genu z kwasami C16. Hüge i wsp. [125] zaobserwowali i opisali udział 1-oleoil-2-palmitoil fosfatydylocholina w lokalizacji komórkowej transportera dopaminy w komórkach nerwowych.

2.6.2 Lipidowe fazy ciekłokrystaliczne w komórkach

Błony lipidowe w komórkach, zarówno błony komórkowe jak i system błon wewnętrznych, wykazują najczęściej cechy dwuwarstwy lipidowej. Najnowsze badania wskazują jednak na obecność w błonach lipidowych komórek struktur o charakterze ciekłokrystalicznym, mogących pełnić szereg kluczowych funkcji, takich jak udział w transdukcji sygnałów mechanicznych [126], półprzepuszczalność [127] czy dokowanie białek membranowych w tzw. tratwach lipidowych [128].

Hipotezę o udziale faz ciekłokrystalicznych w funkcjonowaniu komórki wysnuł Luzzati [129]. Bazując na badaniach Landau i Rosenbusha, polegających na krystalizacji bakteriorodopsyny *in meso*, tzn. w układach lipidowych opartych na fazach ciekłokrystalicznych, Luzzati zaproponował podobne funkcjonowanie faz ciekłokrystalicznych *in cellulo*. Według Luzzati białka amfifilowe wymagające do utrzymania natywnej struktury zarówno obszarów polarnych i niepolarnych, mogłyby krystalizować w kubicznej fazie ciekłokrystalicznej.

Mahamid i wsp. [130] zaobserwowali obecność faz ciekłokrystalicznych w kroplach lipidowych w warunkach niedożywienia komórek HeLa. W stanie normalnym, krople lipidowe składają się z triacylogliceroli oraz estrów cholesterolu i przyjmują postać amorficznej kropli otoczonej pojedynczą warstwą fosfolipidową. Autorzy spekulują, że w sytuacji niedożywienia komórkowego, komórka korzysta z alternatywnego źródła energii w postaci triacylogliceroli, w wyniku czego kompozycja kropeł lipidowych zmienia się. Skutkuje to zwiększeniem się stosunku ilościowego estrów cholesterolu do triacyloglicerolów, czemu towarzyszy przejście fazowe. Obecność fazy ciekłokrystalicznej na powierzchni kropeł lipidowych utrudnia z kolei dostawanie się lipaz do triacylogliceroli wewnątrz kropeł, co przemawia za hipotezą, iż takie przejście fazowe stanowi mechanizm regulujący wykorzystanie lipidów do spalania komórkowego. Badania Rogersa i wsp. [131] wskazujące na remodelowanie proteomu kropeł lipidowych w wyniku przejść błon wewnątrzkomórkowych do fazy ciekłokrystalicznej, potwierdzają przedstawiony powyżej mechanizm.

2.6.3 Cytotoksyczność lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

Podstawowym zadaniem doświadczeń biologicznych w nanotechnologii jest opisanie mechanizmów cytotoksyczności nanocząstek oraz określenie dawek/stężeń cytotoksycznych *in vitro/in vivo*, których znajomość niezbędna jest do wprowadzenia nanomateriałów w fazę badań klinicznych

Nanomateriały mogą oddziaływać na komórki na wielu poziomach prowadząc do zaburzenia homeostazy, mutagenezy czy nawet apoptozy [132]. Jako główny mechanizm cytotoksyczności wyróżnia się indukowane przez nanocząstki generację wolnych rodników tlenowych. W warunkach niestresowych, w obrębie mitochondrium powstają reaktywne formy tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*), jednak ich produkcja kontrolowana jest przez enzymy redukcyjne, takie jak glutation [133]. Dla wielu nanomateriałów zaobserwowano jednak nadmierną indukcję syntezy reaktywnych form tlenu. Niekontrolowane reaktywne formy tlenu mogą utleniać DNA prowadząc do wystąpienia mutacji, utleniać białka, zaburzając ich konformację oraz funkcjonalność, a co za tym idzie, wpływać na kluczowe dla utrzymania homeostazy ścieżki enzymatyczne. W końcu, reaktywne formy tlenu mogą prowadzić do utleniania wewnątrzkomórkowych błon cytoplazmatycznych prowadząc do zaburzeń przepuszczalności czy przzerwania ich ciągłości [134–136].

Szczególnie istotnym mechanizmem mogącym mieć udział w cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, a wiążącym się również z niekontrolowaną generacją reaktywnych form tlenu, jest peroksydacja lipidowa. Peroksydacją lipidową nazywany jest ogół reakcji oksydantów, takich jak rodniki hydroksylowe i rodniki nadtlenkowe z lipidami [137]. W warunkach niestresowych, peroksydacja lipidów jest utrzymywana przez komórki na niskim poziomie m.in. poprzez stymulacje systemu antyoksydacyjnego. W warunkach zwiększonej aktywności peroksydacji lipidów, np. na skutek czynników stresowych, proces ten może przewyższyć aktywnością wydolność antyoksydacyjną komórki. W efekcie reaktywne formy tlenu mogą reagować z lipidami biorącymi udział w tworzeniu błon komórkowych i prowadzić do apoptozy komórek [138].

Podstawowy mechanizm cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych nie został do tej pory zidentyfikowany, zaś dotychczasowe doniesienia wskazują na wpływ LLCNPs w wielu obszarach komórek. Falchi i wsp. [139] analizowali cytotoksyczność dwóch rodzajów lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu, różniących się rodzajem surfaktantu z grupy Pluroników, wykazując większą produkcję mitochondrialnych reaktywnych form tlenu dla Pluroniku F108 niż dla Pluroniku F127. Otrzymane wyniki autorzy wyjaśnili różnym poziomem hydrofobowości wykorzystanych surfaktantów i różnym wpływem zastosowanych surfaktantów na potencjał membranowy mitochondriów. Zespoły Falchi i Rosa [139,140] przedstawiły znaczącą zmianę w profilu lipidowym i metabolizmie lipidów w komórkach HeLa, co może wskazywać na związek cytotoksyczności LLCNPs z mechanizmem opartym na peroksydacji lipidów i związaną z nimi zwiększoną ilością generowanych reaktywnych form tlenu. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oddziałują

również na błony komórkowe. Na silniejszy wpływ na integralność błony komórkowej nanocząstek opartych na PHT wskazują badania Hinton i wsp. [141], którzy zaobserwowali zwiększoną aktywność hemolityczną w erytrocytach inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT w stosunku do układów opartych o GMO. Z kolei Strachan i wsp. [142] wskazują na fakt, iż na cytotoksyczność LLCNPs nie wpływa struktura wewnętrzna nanocząstek, ani sposób ich wnikania do komórek.

2.7 Wytwarzanie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

2.7.1 Technika „bottom-up”

Do najpopularniejszych metod syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w skali laboratoryjnej należą metody bottom-up oraz top-down [143]. Pierwsza z metod została opisana przez Spicera i wsp. [144] w 2001 roku. Opiera się ona na nukleacji lipidu do fazy ciekłokrystalicznej po wstępnym rozpuszczeniu go w związku hydrotropowym, np. w etanolu, czy chloroformie [145]. W pierwszej kolejności, lipid należy rozpuścić w etanolu w stosunku 1:1. Następnie, poprzez dodawanie do układu wody z niewielką ilością surfaktantu (Pluronic F127) do ostatecznego stosunku wody:lipidu:etanolu:surfaktantu wynoszącego odpowiednio 89:5:5:1 i delikatne mieszanie, rozpuszczony lipid samoorganizuje się do fazy kubicznej. Niewielki dodatek Pluronicu F127 prowadzi do powstania stabilnego roztworu, nawet przez okres 6 miesięcy, zaś układ bez dodatku surfaktantu flokuje w czasie rzędu 2 sekund [144]. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne uzyskane metodą bottom-up charakteryzują się stosunkowo niskim współczynnikiem polidispersyjności, niższym niż w przypadku nanocząstek uzyskanych metodą „top-down” [98].

Dużą zaletą metody „bottom-up” jest uzyskanie stabilnego układu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych bez konieczności stosowania sił ścinających oraz wysokich temperatur w celu rozpuszczenia lipidów. W przypadku gdy ładunek LLCNPs mają stanowić np. białka, wysokie temperatury i siły ścinające mogą prowadzić do ich denaturacji i utraty aktywności biologicznej. Ponadto metoda nukleacji, w związku z brakiem potrzeby wykorzystywania wysokiego nakładu energii, może być potencjalnie wykorzystywana do syntezy LLCNPs w skali przemysłowej. Metoda syntezy bottom-up nie jest techniką wolną od wad. Podstawową wadą jest zastosowanie w trakcie syntezy potencjalnie toksycznych związków hydrotropowych, które mogą pozostawać w dyspersjach nanocząstek w śladowych ilościach i uniemożliwiać zastosowanie takiego układu w żywych organizmach. Dodatkowo czynniki dodawane do LLCNPs mogą reagować z związkami hydrotropowymi (np. poprzez denaturację białek w etanolu), co również może uniemożliwiać ich zastosowanie w dostarczaniu leków [23].

2.7.2 Technika „top-down”

Druga metoda syntezy lipidowych nanocząstek, top-down, opiera się na homogenizacji fazy ciągłej (*bulk*) ciekłokrystalicznego lipidu rozpuszczonego w wodzie do wymiarów nanometrycznych za pomocą dużych sił ścinających, np. za pomocą sonikacji. Tak powstała dyspersja jest stabilizowana za pomocą surfaktantu. W powyższej technice, lipid i surfaktant naważone zostają do jednego naczynia i inkubowane w temperaturze pozwalającej na

rozpuszczenie obu składników. Następnie do układu dodawany jest rozpuszczalnik, np. woda, w celu hydratacji układu i homogenizowany m.in. za pomocą sonikacji. Tak uzyskane dyspersje nanocząstek, w porównaniu do metody bottom-up wykazują się większą heterogenicznością, co charakteryzuje się zarówno szerokim rozkładem wielkości uzyskanych struktur jak różnorodnością powstałych struktur, m.in. micelle, lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne o wewnętrznej symetrii heksagonalnej i kubicznej. W celu wyeliminowania powstałych miceli, zastosować można inkubację w wysokiej temperaturze [146].

Zaletą metody „top-down” jest synteza stabilnych i powtarzalnych roztworów nanocząstek ciekłokrystalicznych bez wprowadzania dodatkowych, potencjalnie toksycznych czynników, takich jak chloroform czy etanol. Z drugiej strony, zastosowanie sonikacji prowadzi do wysokiego lokalnego wzrostu temperatury. Zwiększenie temperatury może wpływać i deaktywować czynniki biologicznie aktywne takie jak białka, kwasy nukleinowe, aptamery, czyli jednoniciowe DNA lub RNA zdolne do specyficznego rozpoznawania i wiązania antygenów [147] czy affimery, czyli niebędące przeciwciałami proteiny o wysokim powinowactwie do określonych antygenów [148,149]. Zastosowanie wysokich energii związanych z sonikacją, prowadzące do zwiększenia kosztów syntezy w większych skalach sprawia, iż zastosowanie metody „top-down” w przemyśle jest nieekonomiczne.

2.8 Metody charakteryzacji fizykochemicznej nanocząstek ciekłokrystalicznych

2.8.1 Dynamiczne rozpraszanie światła

Metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS, z ang. *dynamic light scattering*) jest techniką pozwalającą określić rozkład wielkości nanocząstek na podstawie analizy fluktuacji intensywności światła rozproszonego na nanocząstkach podlegających ruchom Browna. Ruchami Browna określa się losowe, chaotyczne ruchy cząstek na skutek ich interakcji z cząsteczkami ośrodka. Ruchy Browna są główną siłą napędzającą dyfuzję, tj. samorzutne rozprzestrzenianie się cząstek w ośrodku w gradiencie stężeń.

Pierwsze prawo Ficka opisuje szybkość dyfuzji strumienia cząstek:

$$j_D = -D\nabla\phi \quad (12)$$

gdzie $\nabla\phi$ jest gradientem stężenia ϕ cząstek w trzech wymiarach.

W stanie równowagi strumień dyfuzyjny j_D jest równoważony przez strumień j_V wynikający z istnienia potencjału termodynamicznego V i związanej z nim siłą $-\nabla V$:

$$j_V = -\phi\mu\nabla V \quad (13)$$

gdzie μ jest współczynnikiem mobilności, będącym stosunkiem prędkości granicznej cząstki i wywołującej jej ruch siły zewnętrznej.

W stanie równowagi wypadkowy przepływ nie istnieje ($j_D + j_V = 0$), zatem

$$\phi\mu\nabla V = -D\nabla\phi \quad (14)$$

W stanie równowagi stężenie cząstek opisuje statystyka Maxwella-Boltzmannna:

$$\phi \propto e^{\frac{-V}{k_B T}} \quad (15)$$

gdzie k_B jest stałą Boltzmannna, zaś T oznacza temperaturę bezwzględną. Podstawiając wyrażenie (15) do wyrażenia (14), otrzymujemy równanie Einsteina:

$$D = \mu k_B T \quad (16)$$

Dla cząstki sferycznej o promieniu a poruszającej się z ruchem translacyjnym w ośrodku o lepkości η , współczynnik mobilności podaje prawo Stokesa

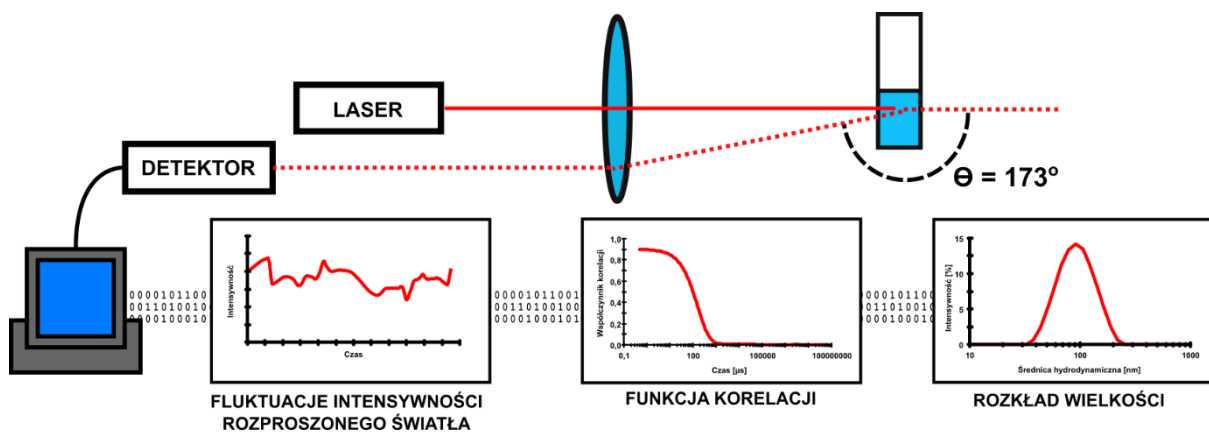
$$\mu = \frac{1}{6\pi\eta a} \quad (17)$$

Łącząc ze sobą równania (16) i (17) otrzymujemy równanie Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta a} \quad (18)$$

Jak wynika z równania (18), aby wyznaczyć rozmiar cząstek zawieszonych w ośrodku ciekłym, konieczna jest znajomość wartości współczynnika dyfuzji oraz lepkości ośrodka i jego temperatura. Wartość współczynnika dyfuzji zmierzyć można bezpośrednio metodą DLS.

W doświadczeniu DLS rejestrowana jest czasowa zmiana intensywności światła $I(t)$ rozproszonego na zawieszonych w cieczy cząstkach (Ryc. 16). Ze względu na dyfuzyjny charakter ruchu cząstek, natężenie światła rozproszonego podlega ciągłym fluktuacjom. Określenie właściwości dyfuzyjnych cząstek wymaga wyznaczenia funkcji autokorelacji fluktuacji natężenia światła rozproszonego. W tym celu rejestrowane w czasie wartości natężenia światła poddawane są procesowi cyfrowej autokorelacji, który porównuje sygnały w zmiennych odstępach czasu τ .



Ryc. 16 Schemat funkcjonowania doświadczenia dynamicznego rozpraszania światła.

Znormalizowana funkcja autokorelacji natężenia światła $g_2(\tau)$ wyznaczana jest zgodnie z zależnością:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (19)$$

Powyższą funkcję autokorelacji natężenia światła można również zapisać wykorzystując funkcję autokorelacji pola elektrycznego $g_1(\tau)$:

$$g_1(\tau) = B + \beta g_2(\tau)^2 \quad (20)$$

gdzie B jest linią bazową, zaś β jest współczynnikiem spójności, będącym stałą aparaturową

Ze względu na dyfuzyjny charakter ruchu cząstek w zawiesinie, korelacje między cząstkami stopniowo zanikają w czasie. W rezultacie funkcja autokorelacji pola elektrycznego zanika wykładniczo:

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (21)$$

gdzie Γ jest stałą zaniku zależną od współczynnika dyfuzji cząstek, D_τ :

$$\Gamma = -D_\tau q^2 \quad (22)$$

gdzie q jest wektorem falowym rozpraszania zdefiniowanym jako

$$q = \frac{4\pi n \sin(\theta)}{\lambda} \quad (23)$$

gdzie n jest współczynnikiem rozpraszania światła badanego roztworu, θ jest kątem rozpraszania a λ długością fali lasera.

Przyjmując, że linia bazowa B w równaniu (20) równa jest jedności podać można ostateczną postać równania opisującego funkcję korelacji natężenia światła rozproszonego na dyfundujących cząstkach:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta e^{-2D_\tau q^2 \tau} \quad (24)$$

Porównanie powyższej zależności z eksperymentalnie rejestrowaną funkcją korelacji pozwala wyznaczyć wartość współczynnika dyfuzji cząstek D_τ , a wykorzystując równanie Stokesa-Einsteina (18), również średnicę cząstek zawiesinie.

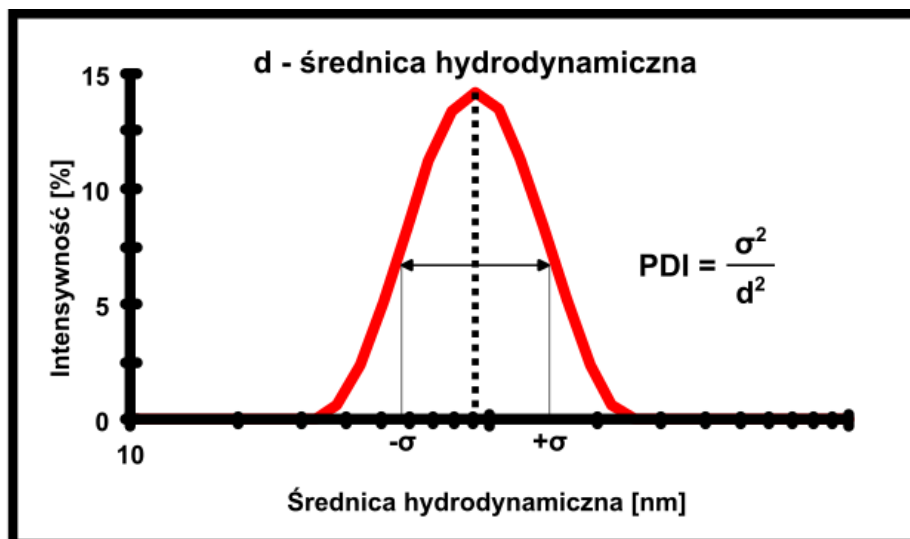
Jeżeli badaniu poddana jest zawiesina polidispersyjna wówczas, zgodnie z równaniem Stokesa-Einsteina, skończony rozkład wielkości cząsteczek objawi się w skończonym rozkładzie współczynników dyfuzji. W rezultacie, mierzona funkcja korelacji odbiegać będzie od prostej jednowykładniczej zależności danej równaniem (24). Jeżeli zawiesina składa się z cząstek o ciągłym rozkładzie wartości współczynników dyfuzji (wynikającym z rozkładu wielkości), wówczas równanie (24) uogólnić można do:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta \int N(D_t) e^{-D_t q^2 \tau} \quad (25)$$

gdzie $N(D_t)$ jest funkcją opisującą względną liczbę cząstek o współczynniku dyfuzji D_t .

Funkcję rozkładu $N(D_t)$ wyznacza się stosując numeryczne przekształcenia eksperymentalnie mierzonej funkcji autokorelacji [150]. Znając $N(D_t)$ oraz wykorzystując relację Stokesa-Einsteina, wyznaczyć można następnie funkcje rozkładu hydrodynamicznych średnic cząstek

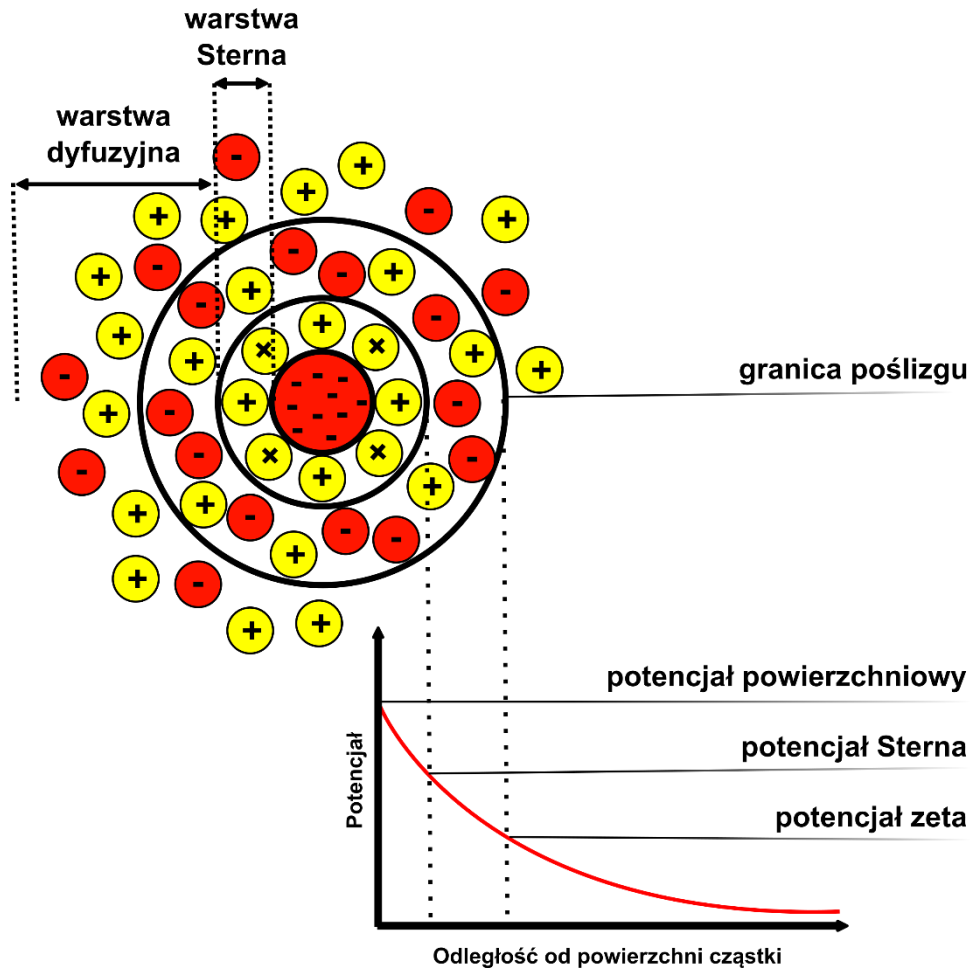
$N(d)$. Średnią wartość średnicy hydrodynamicznej, $\langle d \rangle$, definiuje się jako średnią z rozkładu $N(d)$, natomiast szerokość rozkładu jest miarą polidispersyjności, PDI, badanej zawiesiny, wyrażanej jako stosunek kwadratów odchylenia standardowego rozkładu $N(d)$ i średniej z rozkładu $N(d)$ (Ryc. 17).



Ryc. 17 Przedstawienie sposobu wyznaczania wartości średnicy hydrodynamicznej oraz współczynnika polidispersyjności PDI z rozkładu wielkości nanocząstek uzyskanego za pomocą DLS. σ – odchylenie standardowe rozkładu.

2.8.2 Elektroforetyczne rozpraszanie światła

W otoczeniu nanocząstki posiadającej pewien potencjał powierzchniowy, powstaje tzw. podwójna warstwa elektryczna, którą opisać można za pomocą modelu Gouy-Chapman-Sterna (Ryc. 18). Bezpośrednio w kontakcie z nanocząstką posiadającą ładunek pozostają jony o przeciwnym ładunku tworząc tzw. warstwę Sterna. Warstwa ta jest ściśle związana z nanocząstką, przez co w trakcie poruszania się nanocząstki w ośrodku jony w warstwie Sterna poruszają się razem z nią. Energię potencjalną na powierzchni tej warstwy nazywa się potencjałem Sterna. Kolejną warstwę stanowi warstwa dyfuzyjna, w której znajdują się zarówno kationy jak i aniony, gdzie energia potencjalna maleje wraz z zwiększaniem się odległości od nanocząstki. Warstwę dyfuzyjną można dodatkowo podzielić na dwie warstwy. Bliżej nanocząstki znajdują się jony, które w przypadku poruszania się nanocząstki w ośrodku wciąż poruszają się razem z nią podobnie jak w warstwie Sterna. Ostatnia warstwa pozostaje w kontakcie z roztworem elektrolitu, zaś jony tworzące tę warstwę podlegają ciągłej wymianie z ośrodkiem. Powierzchnię oddzielającą te dwie warstwy nazywa się powierzchnią poślizgu, zaś charakterystyczną dla niej energię potencjałem zeta.



Ryc. 18 Podwójna warstwa elektryczna wg. modelu Gouy-Chapman-Sterna.

Potencjał zeta określany jest za pomocą pomiaru elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS, z ang. *electrophoretic light scattering*). Nanocząstki posiadające ładunek powierzchniowy, w polu elektrycznym przemieszczają się w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku. Zjawisko to nazywane jest elektroforezą. Przemieszczanie się nanocząstek posiadających ładunek powierzchniowy w polu elektrycznym opisuje ruchliwość elektroforetyczna określana jako

$$\mu = \frac{u}{E} \quad (26)$$

gdzie u – prędkość elektroforetyczna, E – natężenie pola elektrycznego [151].

W rzeczywistych warunkach na ruchliwość elektroforetyczną nanocząstek wpływ mają również lepkość ośrodka, w którym zachodzi elektroforeza czy przenikalność elektryczna tegoż ośrodka. Uwzględniając ww. czynniki, zależność między ruchliwością elektroforetyczną a potencjałem zeta można przedstawić za pomocą równania Henry'ego

$$\mu = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa a) \quad (27)$$

gdzie ϵ – przenikalność elektryczna ośrodka, ζ – potencjał zeta, η – lepkość ośrodka, $f(\kappa a)$ – funkcja Henry’ego, która dla wody, według przybliżenia Smoluchowskiego przyjmuje wartość 1,5 [151,152].

Biorąc to pod uwagę przybliżenie Smoluchowskiego, wzór ten i ten można przekształcić następująco.

$$\mu = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} * 1,5 \quad (28)$$

$$\mu = \frac{3\epsilon\zeta}{3\eta}$$

$$\mu = \frac{\epsilon\zeta}{\eta}$$

W związku z powyższym

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon} \quad (29)$$

Fala elektromagnetyczna rozpraszana na poruszających się w polu elektrycznym nanocząstkach podlega efektowi Dopplera, tzn. zmianie częstotliwości fali rozproszonej względem fali pierwotnej. Zmiana ta zależy od szybkości obiektu, na którym fala jest rozpraszana, co opisuje wzór

$$\Delta\nu = \frac{2un \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (30)$$

gdzie $\Delta\nu$ – przesunięcie Dopplera, u – prędkość elektroforetyczna, n – współczynnik załamania światła ośrodka, θ – kąt rozpraszania światła, λ – długość fali elektromagnetycznej [151].

Znając współczynnik refrakcji, długość fali i kąt rozpraszania, mierząc przesunięcie Dopplera, możliwe jest wyznaczenie ruchliwości elektroforetycznej, dzięki której, wykorzystując wzór ten i ten, można wyznaczyć potencjał zeta.

2.8.3 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) to zaawansowana technika obrazowania, umożliwiająca badanie ultrastruktury próbek na poziomie atomowym. W przeciwieństwie do mikroskopii optycznej, gdzie wykorzystywane do obrazowania jest światło widzialne, w mikroskopii elektronowej korzysta się z wiązki elektronów. Wiązka elektronów generowana jest w dziale elektronowym mikroskopu elektronowego. Do najczęściej wykorzystywanych źródeł elektronów należą włókna wolframowe, emitery z sześcioborku lantanu oraz działa z emisją polową. W przypadku dwóch pierwszych źródeł, wiązka generowana jest na drodze termoemisji. Emitery nagrzewane są do temperatur rzędu 2000-3000 K w próżni rzędu 10^{-4} Pa, dzięki czemu do źródła dostarczana jest energia przewyższająca pracę wyjścia elektronów, tzn. energię potrzebną do wybicia elektronu do pasma przewodnictwa. W przypadku dział z emisją

polową, przyłożone pole elektryczne zmniejsza powierzchniową barierę potencjału źródła. Emitery oparte na wolframie czy LaB_6 charakteryzują się mniejszą koherencją przestrzenną elektronów, co wynika bezpośrednio z rozmiaru emitera, są jednak dużo tańsze i posiadają dłuższy czas życia.

Poniżej emitera znajduje się anoda, służąca do tworzenia potencjału anodowego w celu rozpędzenia wygenerowanych elektronów. Typowe napięcie przyspieszające generowane w transmisyjnej mikroskopii elektronowej mieści się w zakresie 100-200 kV, jednak najwyższe napięcia przyspieszające mogą wynosić nawet do 3 MV.

Wiązkę elektronów zgodnie z hipotezą de Broglie'a cechuje dualizm korpuskularno-falowy. Oznacza to, że wiązka elektronów może przejawiać własności zarówno cząsteczkowe jak i falowe. De Broglie postulował, iż każdej cząsteczce o określonej energii E i pędzie p towarzyszy fala o długości fali λ i częstotliwości ν . Energię takiej cząstki opisuje wzór:

$$E = h\nu \quad (31)$$

gdzie E – energia cząstki, h – stała Plancka, ν – częstotliwość fali towarzyszącej.

Z kolei długość fali towarzyszącej cząsteczce opisuje wzór:

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (32)$$

gdzie λ – długość fali towarzyszącej cząsteczce, h – stała Plancka, p – pęd cząstki.

Długość fali elektronów zależna jest od ich pędu, także wraz ze zwiększającą się prędkością elektronów, długość ich fali zmniejsza się, a co za tym idzie, zwiększa się zdolność rozdzielcza mikroskopu.

$$E_K = \frac{mV^2}{2} \quad (33)$$

gdzie E_K – energia kinetyczna, m – masa, V – prędkość.

$$2E_K = mV^2 \quad (34)$$

$$\frac{2E_K}{m} = V^2 \quad (35)$$

$$V = \sqrt{\frac{2E_K}{m}} \quad (36)$$

Powyższy wzór na prędkość można podstawić do wzoru na pęd:

$$p = mV \quad (37)$$

$$p = m \sqrt{\frac{2E_K}{m}} \quad (38)$$

Ostatecznie wyprowadzony wzór na pęd można podstawić do równania de Broglie'a:

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (39)$$

$$\lambda = \frac{h}{m \sqrt{\frac{2E_K}{m}}} \quad (40)$$

$$\lambda^2 = \frac{h^2}{\frac{2E_K m^2}{m}} \quad (41)$$

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2E_K m}} \quad (42)$$

Między energią wiązki elektronów, a napięciem przyspieszającym zachodzi zależność:

$$E = eU \quad (43)$$

gdzie E – energia relatywistyczna elektronu, e – ładunek elektronu, U – napięcie przyspieszające.

Wzór (42) i wzór (43) można przedstawić jako:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU}} \quad (44)$$

Po uwzględnieniu poprawki relatywistycznej wzór można przedstawić jako:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 eU \left(1 + \frac{eU}{2m_0 c^2}\right)}} \quad (45)$$

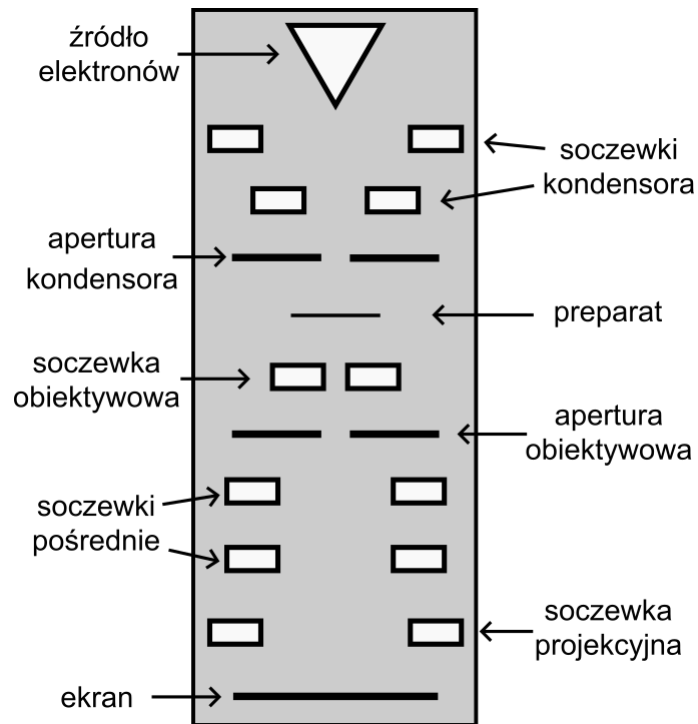
gdzie h – stała Plancka, m_0 – masa spoczynkowa elektronu, c – prędkość światła.

Powyższe obliczenia wykorzystać można do określenia teoretycznej rozdzielczości optycznej, definiowanej jako:

$$r = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (45)$$

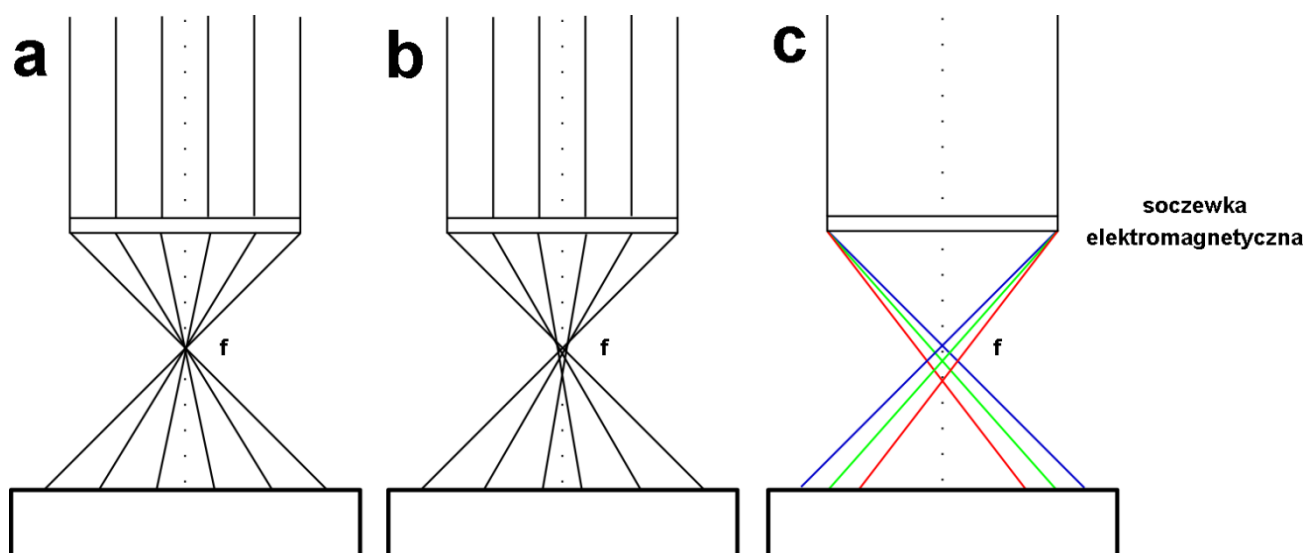
gdzie r – zdolność rozdzielcza definiowana jako minimalna odległość między dwoma rozróżnialnymi punktami, NA – apertura numeryczna obiektywu. Powyższy wzór wskazuje na fakt, iż dla stałej wartości apertury numerycznej obiektywu, metodą zwiększenia zdolności rozdzielczej mikroskopii jest zmniejszenie długości stosowanej fali. W przypadku mikroskopii optycznej, w której stosowane jest promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie długości fal od 380 nm do 780 nm. Podstawiając do wzoru (45) wartości m_0 , e oraz c , dla napięć przyspieszających mogących w transmisyjnych mikroskopach elektronowych wynosić 100 kV - 200 kV długość fali promienia elektronów wynosi 3,7 pm - 2,5 pm. Powyższe porównanie długości fali elektromagnetycznej stosowanej w mikroskopii świetlnej i w mikroskopii elektronowej wskazuje, iż zastosowanie promieniowania elektronowego, przy stałej wartości apertury numerycznej obiektywu, pozwala uzyskać 100000 razy większą zdolność rozdzielczą.

W przeciwieństwie do mikroskopii optycznej, gdzie elementy układu optycznego działają na zasadzie załamania światła w ośrodku o innym współczynniku załamania, w mikroskopii elektronowej do kształtowania wiązki elektronów i manipulowania nią wykorzystuje się soczewki elektromagnetyczne (Ryc. 19). Wyróżnia się soczewki kondensora, soczewki obiektywowe, soczewki pośrednie oraz projekcyjne. Soczewki kondensora mają na celu umożliwienie zmiany średnicy wiązki elektronów, jej jasność oraz skupienie na preparacie, zaś trzy ostatnie służą do powiększenia i stworzenia obrazu na znajdującym się poniżej ekranie fluorescencyjnym i systemie detekcyjnym.



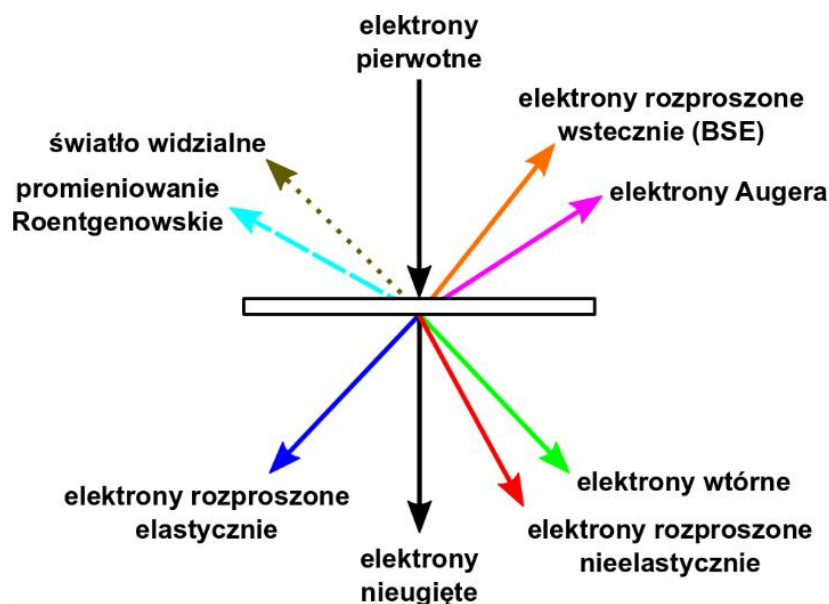
Ryc. 19 Schemat budowy transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

Soczewki elektromagnetyczne są źródłem trzech głównych defektów powstających w czasie obrazowania za pomocą mikroskopii elektronowej, tj. aberracji sferycznej, aberracji chromatycznej oraz astygmatyzmu. Aberracja sferyczna jest wynikiem różnego oddziaływania pola elektromagnetycznego na elektrony w zależności od odległości od centrum soczewki – elektrony przechodzące przez pole elektromagnetyczne soczewki bliżej cewki oddziałują z polem elektromagnetycznym silniej niż elektrony przechodzące przez środek (Ryc. 20). W efekcie ognisko wiązki jest rozciągnięte, a powstający obraz traci wysoką rozdzielczość. Aberracji sferycznej zapobiega się wykorzystując apertury wygaszające elektrony przebiegające najbliżej cewki, jednak skutkuje to wiązką o mniejszej intensywności. Aberracja chromatyczna wynika z faktu, że elektrony przebiegające przez soczewkę elektromagnetyczną mają różne prędkości. Elektrony o krótszych falach (większych prędkościach) słabiej oddziałują z polem elektromagnetycznym soczewki niż elektrony o dłuższych falach. Efektem tego, podobnie jak w przypadku aberracji sferycznej, ognisko wiązki jest rozciągnięte, co obniża zdolność rozdzielczą. Aby zapobiegać temu zjawisku stosowane są monochromatory ustawiane bezpośrednio za emitorem elektronów. Astygmatyzm spowodowany jest brakiem idealnej symetrii osiowej soczewek elektromagnetycznych, przez co w dwóch prostopadłych kierunkach, soczewka ma inne ogniskowe.



Ryc. 20 Schematyczne przedstawienie (a) idealnej soczewki elektromagnetycznej, skupiającej wiązki elektronową w jednym punkcie, (b) aberracji sferycznej, (c) aberracji chromatycznej.

Interakcje między elektronami a materią można podzielić na dwa typy. W przypadku oddziaływań elastycznych energia kinetyczna oraz pęd układu atom-elektron pozostają stałe. Jeżeli elektrony przechodzą przez materię bez zagięcia drogi, nazywane są elektronami nieugiętymi (Ryc. 21). Jeżeli ścieżka elektronów zostaje ugięta na skutek oddziaływań Coulumbowskich z dodatnim potencjałem wewnątrz chmury elektronowej generowanym przez jądro atomowe, powstają elektrony rozproszone elastycznie (gdy przechodzą przez materię) lub elektrony rozproszone wstecznie (gdy przez materię ostatecznie nie przechodzą). Elektrony będące skutkiem oddziaływań elastycznych są głównym źródłem informacji w transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz w elektronowych metodach dyfrakcyjnych. Drugim rodzajem oddziaływań między elektronami, a materią są oddziaływania nieelastyczne, to znaczy takie, w wyniku których część energii kinetycznej elektronów zostaje przekazana materii. W wyniku oddziaływań nieelastycznych generowane jest spektrum promieniowań elektromagnetycznych, m.in. promieniowanie Rentgena, światło widzialne, elektrony Augera oraz elektrony rozproszone nieelastycznie, które mogą być źródłem informacji o składzie próbki m.in. w spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego.



Ryc. 21 Rodzaje elektronów i promieniowań elektromagnetycznych emitowanych z preparatu na skutek interakcji z elektronami pierwotnymi.

Powstawanie obrazu w transmisyjnej mikroskopii elektronicznej jest wypadkową wytwarzanych różnego rodzaju kontrastów, m.in. kontrastu amplitudowego [153], kontrastu fazowego [154] czy kontrastu dyfrakcyjnego [155]. Elektron fali elektromagnetycznej w trakcie przechodzenia przez preparat ulega rozproszeniom elastycznym i nieelastycznym. W wyniku rozproszenia nieelastycznego elektron traci część energii, w wyniku czego długość fali elektronicznej wydłuża się i elektron wytraca prędkość. Poruszając się w obrębie pola magnetycznego wytwarzanego przez soczewkę obiektywową, elektrony o innej prędkości niż elektrony wiązki pierwotnej skupiane są poza płaszczyzną obrazowania. W efekcie do płaszczyzny obrazowania dociera mniej elektronów, co skutkuje powstaniem ciemniejszego punktu w stosunku do obszarów, gdzie elektrony nie uległy rozproszeniu. Ponadto w celu wzmocnienia kontrastu wykorzystywane są apertury eliminujące elektrony rozproszone pod dużymi kątami i filtry energii wykluczające z fali rozproszonej elektrony poniżej danej długości fali, jeszcze bardziej zmniejszając ilość elektronów docierających do płaszczyzny obrazowania. Kontrast taki nazywa się kontrastem amplitudowym, a powstający obraz, obrazem w jasnym polu. W celu wzmocnienia sygnału i otrzymania obrazu w ciemnym polu, stosowane są apertury eliminujące elektrony nieugięte i zbierające tylko elektrony rozproszone.

Kontrast fazowy zrozumieć można rozpatrując falową naturę elektronów. Wiązka elektroniczna zderzając się z materią ulega rozproszeniu (Ryc. 22 A). W wyniku rozproszenia fala może nie tylko stracić część energii, ale także może przesunąć się jej faza w stosunku do fali elektronów nieugiętych. Charakter i propagację fal opisać można za pomocą wektora fazowego (fazora), czyli liczby zespolonej, w której długość wektora opisuje amplitudę fali, zaś kąt między wektorem a osią odciętych opisuje fazę fali (Ryc. 22 B) [156].

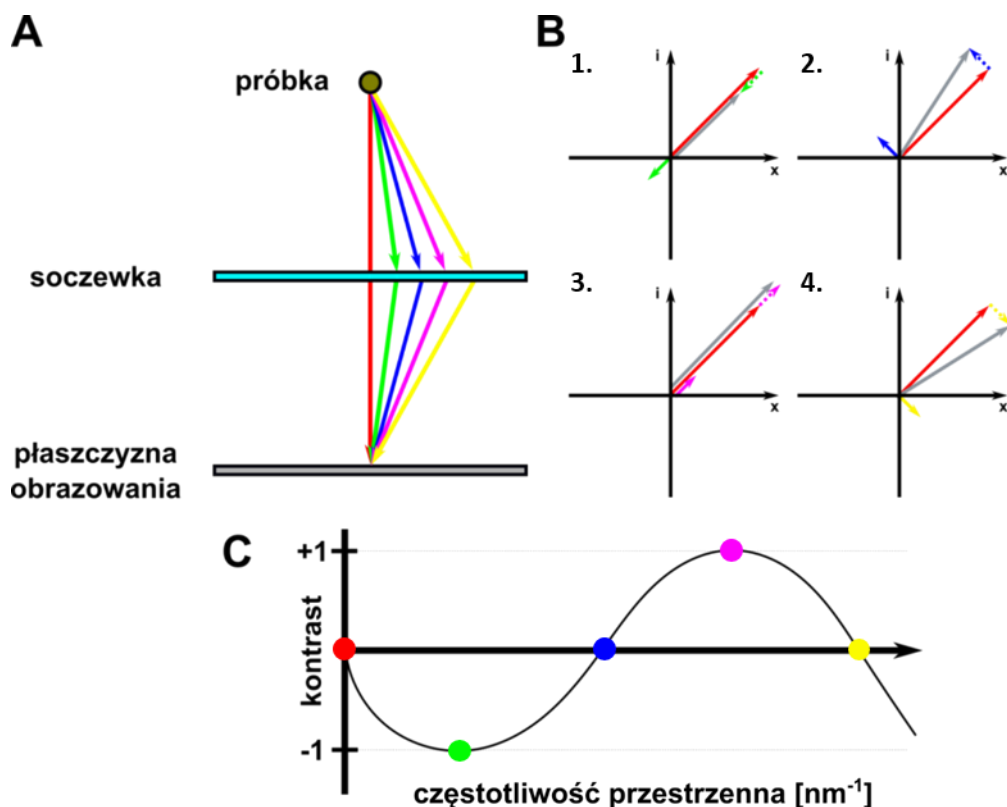
Rozpatrzmy 4 wyjątkowe przypadki. Czerwone strzałki na Ryc. 22 A i Ryc. 22 B niech wskazują falę pierwotną i nieugiętą o danym wektorze falowym. Zielona strzałka na Ryc. 22 A i Ryc. 22

B1 niech wskazują falę rozproszoną, której faza w wyniku rozproszenia przesuwa się o 90° . Różnica w długości drogi jaką przebędzie fala rozproszona w stosunku do fali nieugiętej niech wynosi $\Delta l = \frac{\lambda}{4}$, co odpowiada przesunięciu fazy o 90° . Sumaryczne przesunięcie fazy fali rozproszonej w stosunku do fazy fali nieugiętej wynosi więc 180° , co oznacza, że interferencja między dwoma falami jest destrukcyjna, a sumaryczny wektor falowy, przedstawiony na Ryc. 22 B1 kolorem szarym, jest najkrótszy. Sytuacja taką może przedstawić na wykresie zależności kontrastu od częstotliwości przestrzennej jako punkt o najmniejszym kontraście, co na Ryc. 22C oznaczono zielonym punktem. Ryc. 20 Niech niebieska strzałka na Ryc. 22 A i Ryc. 22 B2 wskazuje na falę rozproszoną, której faza w wyniku rozproszenia przesuwa się o 90° , zaś w wyniku różnej długości przebytej drogi w stosunku do wiązki nierozproszonej, dodatkowe przesunięcie fazowe wynosi 180° , zaś sumaryczne przesunięcie fazowe wynosi 270° . Jak można wywnioskować z wykresu Ryc. 22 B2, sumaryczny wektor falowy (szara strzałka) nie zmienia długości. W takim przypadku powstający kontrast nie różni się od kontrastu wytwarzanego przez falę nieugiętą, co na Ryc. 22 C oznaczono punktem niebieskim. Rozpatrując wszystkie różnice długości przebytej drogi i nanosząc wartości kontrastu na Ryc. 22 C otrzymujemy tzw. funkcję przenoszenia kontrastu, wskazującą z jaką wydajnością kontrast przenoszony jest z obrazu w funkcji częstotliwości przestrzennej. Matematycznie funkcję transferu kontrastu (CTF) przedstawia się jako:

$$CTF = \sin \left(-\pi z \lambda k^2 + \frac{C_s \lambda^3 k^4}{2} \right) \quad (46)$$

gdzie z – rozogniskowanie, λ – długość fali, k – częstotliwość przestrzenna, C_s – stałą związaną z aberracją sferyczną.

Powyższy wzór wskazuje nie tylko na fakt, że kontrast wynika z miejsca ogniskowania i aberracji sferycznej, ale również na to, że wraz z wzrastającą częstotliwością przestrzenną, wielkości kontrastu spadają do pewnego limitu informacyjnego.



Ryc. 22 A – schematyczne przedstawienie interakcji fali pierwotnej wiązki elektronowej i fal rozproszonych. B – wykresy Arganda przedstawiające sumaryczne przesunięcia fazowe fali pierwotnej w zależności od przesunięć fazowych fal rozproszonych. C – schematyczny wykres funkcji transferu kontrastu. Na panelu A strzałką czerwoną oznaczono falę nieugiętą, zaś strzałkami zieloną, niebieską i żółtą fale rozproszone. Kolory wektorów na panelach B 1-4 odpowiadają falam oznaczonym danymi kolorami na panelu A, zaś kolorem szarym oznaczone zostały wektory sumaryczne. Na panelu C danymi kolorami oznaczono poziomy kontrastu generowane przez falę nieugiętą i fale rozproszone oznaczone tymi samymi kolorami na panelach A i B.

Podczas standardowego obrazowania TEM, próbka umieszczana jest w kolumnie mikroskopu, której wnętrzu znajduje się w wysokiej próżni. Próba obrazowania preparatu zawierającego wodę, skutkowałaby natychmiastowym odparowaniem wody, zniszczeniem preparatu oraz osadzaniem się wody w kolumnie mikroskopu. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa jest szczególnym udoskonaleniem techniki TEM umożliwiającym obrazowanie materiałów, dla których woda jest integralną częścią struktury. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa opiera się na obrazowaniu preparatów poddanych wcześniej procesowi witrifikacji [157]. Witrifikacja jest procesem przejścia wody ze stanu ciekłego w stan szklisty, na skutek gwałtownej zmiany temperatury. Proces ten jest niezbędny w preparatyce cryo-TEM, ponieważ pozwala uniknąć powstawania kryształków lodu, które podczas wzrostu przy wolnym zamrażaniu, mogłyby niszczyć struktury preparatu, takie jak błony lipidowe. Witrifikacji dokonuje się poprzez gwałtowne zanurzenie siateczek z nałożonym preparatem w ciekłym etanie lub propanie [158–160]. Tak przygotowane próbki podczas całego procesu obrazowania, muszą być utrzymywane w niskiej temperaturze rzędu -173°C . Umożliwia to wykorzystanie specjalnie dostosowanych uchwytów cryo-TEM ze zbiornikami na ciekły azot.

Witrifikowane preparaty charakteryzują się niskim kontrastem w obrazowaniu TEM. Wynika to z faktu, iż materiał najczęściej wykorzystywany w preparatyce cryo-TEM jest materiałem

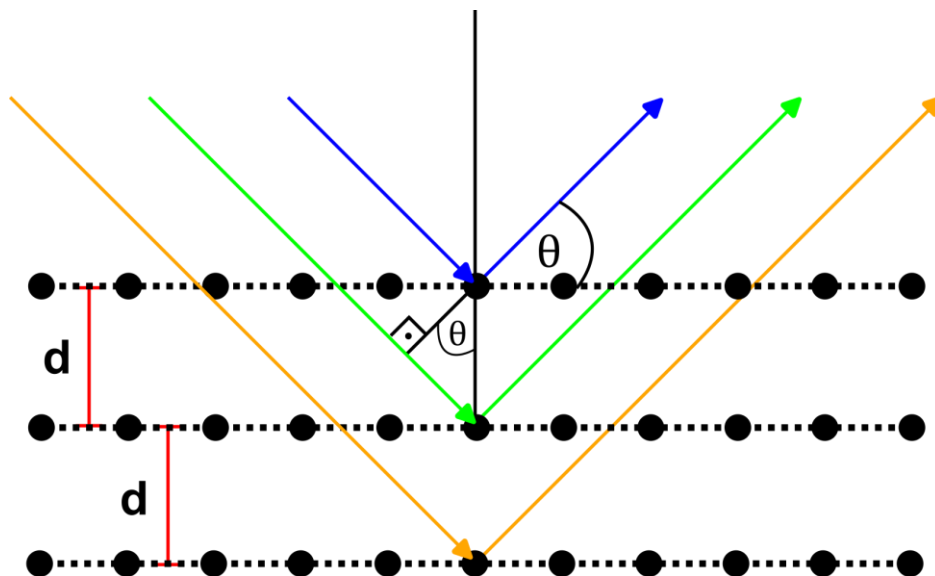
biologicznym, nieposiadającym w strukturze chemicznej atomów o wysokiej liczbie atomowej, wpływających na poziom rozproszenia fali elektronowej [161]. Opierając się na danym powyżej równaniu funkcji przenoszenia kontrastu (46) można jednak wywnioskować, że wyższy kontrast próbek cryo-TEM można uzyskać poprzez rozogniskowanie, tj. skupienie wiązki przez soczewkę obiektywową poza płaszczyznę próbki. W efekcie rozpraszane elektrony interferują i tworzą obraz o większym poziomie kontrastu, jednak kosztem zmniejszenia rozdzielczości.

2.8.4 Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)

Pomiar intensywności rozproszonego promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS z ang. *small angle X-ray scattering*) jest analityczną metodą pozwalającą na określanie właściwości strukturalnych nanocząstek [162].

Promieniowanie rentgenowskie w interakcji z materią może ulegać dwóm rodzajom rozpraszania. Nieelastyczne rozpraszanie Comptona zachodzi, gdy foton zderza się z elektronem, w wyniku czego traci część swojej energii. W efekcie długość fali rozproszonej wydłuża się w stosunku do długości fali pierwotnej. W analizie SAXS intensywność promieniowania rozproszonego nieelastyczne jest pomijalnie mała, także nie niesie informacji o materiale i skutkuje szumem tła. Drugim sposobem rozpraszania promieniowania rentgenowskiego jest rozpraszanie Thompsona [163]. W wyniku interakcji fotonu z atomem, całość energii fali elektromagnetycznej jest przekazywana elektronom, które na skutek tego zaczynają oscylować i emitować wypadkowe rozproszone promieniowanie elektromagnetyczne. Promieniowanie rozproszone w ten sposób jest koherentne, co oznacza, że fala rozproszona ma taką samą fazę i długość jak fala padająca.

W analizie SAXS obserwuje się obraz dyfrakcyjny będący wynikiem interferencji fal rozproszonych na różnych płaszczyznach struktury krystalicznej. Rozpatrzmy rycinę przedstawioną poniżej (Ryc. 23). W tym przykładzie promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali λ pada na strukturę krystaliczną pod kątem θ . W wyniku rozpraszania Thompsona, fala padająca rozpraszana jest przez atomy leżące na kolejnych płaszczyznach struktury krystalicznej. Promieniowanie rozproszone na kolejnych płaszczyznach struktury krystalicznej następnie interferują ze sobą prowadząc do wzmocnienia lub wygaszenia fali wypadkowej.



Ryc. 23 Rozpraszanie promieniowania elektromagnetycznego na strukturze krystalicznej. d – odległość międzypłaszczyznowa, θ – kąt padania/kąt odbicia.

Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego na strukturze krystalicznej opisuje prawo Bragga:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (47)$$

gdzie n – rząd ugięcia, λ – długość fali padającej, taka, że $\lambda \leq d$, d – odległość międzypłaszczyznowa, θ – kąt padania zdefiniowany jako kąt między falą elektromagnetyczną, a płaszczyzną kryształu.

Wzór Bragga wskazuje na fakt, że przy danej długości fali padania i odległości międzypłaszczyznowej istnieje taki kąt θ , dla którego fale rozproszone interferują ze sobą konstruktywnie.

Zjawisko to wykorzystywane jest do określania odległości międzypłaszczyznowych w różnych orientacjach badanego obiektu. Próbkę zostaje w pierwszej kolejności naświetlana promieniowaniem rentgenowskim o ściśle określonej długości fali. Promieniowanie rentgenowskie jest następnie rozpraszane elastycznie i emitowane z preparatu w szerokim zakresie kątów. W zależności od struktury krystalicznej, promieniowanie rozproszone może interferować ze sobą destrukcyjnie lub interferencyjnie tworząc charakterystyczny przestrzenny wzór dyfrakcyjny. W nowoczesnych dyfraktometrach SAXS, obraz dyfrakcyjny rejestrowany jest na cyfrowym dwuwymiarowym detektorze, którego rozmiar oraz odległość od preparatu definiuje zakres kątów rozpraszania. W standardowych pomiarach SAXS zakres ten to zazwyczaj $0,1^\circ$ do 10° . Obraz dyfrakcyjny najczęściej poddawany jest transformacji do jednowymiarowej krzywej rozpraszania promieniowania rentgenowskiego danej zależnością intensywności promieniowania rozproszonego od kąta rozpraszania θ , lub częściej ze względów praktycznych, od wektora falowego, q , definiowanego jako:

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (48)$$

Jeżeli w badanym preparacie występuje struktura o charakterystycznej częstotliwości przestrzennej (wektorze falowym), q , wówczas w eksperymentalnej krzywej rozpraszania, $I(q)$, pojawi się wyraźne maksimum. Rozmiar przestrzenny d struktury, na której nastąpiło rozpraszanie oszacować można z połączenia równań 47 i 48

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (48)$$

2.9 Metody wykorzystywane do opisu właściwości cytotoksycznych nanocząstek ciekłokrystalicznych

2.9.1 Spektrofotometria absorpcyjna UV-Vis

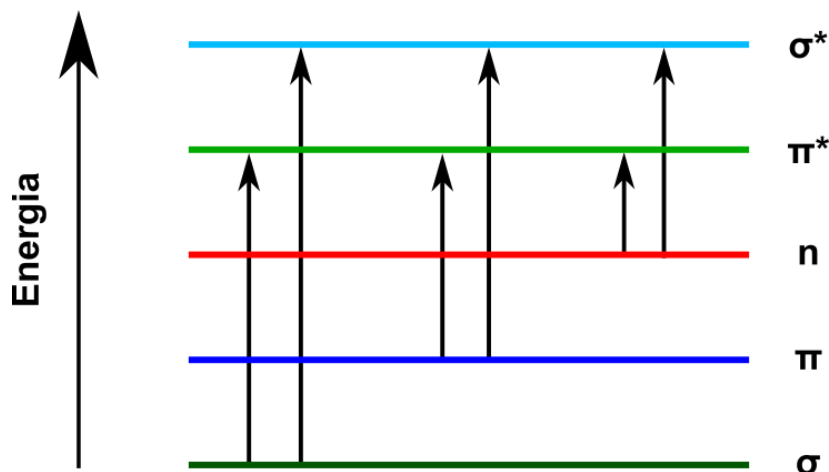
Metody spektrofotometryczne, w szczególności spektrofotometria absorpcyjna w zakresie światła widzialnego i nadfioletu (UV-Vis z ang. *ultraviolet - visible*), należą do najczęściej stosowanych metod jakościowych oraz ilościowych analiz biologicznych nanocząstek. Pozwalają one między innymi na

Fale elektromagnetyczne wykazują charakter korpuskularno falowy. Zależność między energią niesioną przez foton, a częstotliwością i długością fali elektromagnetycznej opisuje wzór:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (49)$$

gdzie h – stała Plancka, ν – częstotliwość fali elektromagnetycznej, c – prędkość światła, λ – długość fali elektromagnetycznej.

Kiedy energia fotonu jest równa energii niezbędnej do przejścia elektronu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego, zachodzi zjawisko absorpcji, czyli pochłonięcia kwantu fali elektromagnetycznej i towarzyszące mu przejście elektronowe. Fotony odpowiadające zakresowi fal spektrofotometrii UV-Vis (≈ 150 nm - ≈ 800 nm), oddziałują przede wszystkim z elektronami walencyjnymi. Na poniższym schemacie (Ryc. 24) przedstawione zostały możliwe przejścia elektronowe ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego.



Ryc. 24 Możliwe przejścia elektronowe ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego.

W spektrofotometrii absorpcyjnej UV-Vis najczęściej obserwowane są przejścia elektronowe $\pi \rightarrow \pi^*$, charakterystyczne dla wiązań podwójnych, potrójnych. Obserwowanie przejść elektronowych z orbitali σ do σ^* i π^* wymaga dostarczenia znacznie większej ilości energii niż w przypadku przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ (zakres długości fal od 120 nm do 200 nm). Przejścia takie są charakterystyczne m.in. dla nasyconych wiązań wodorowęglowych $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ i nie są często wykorzystywane w badaniach spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis.

W zjawisku absorpcji światła jego intensywność maleje w stosunku do intensywności fali elektromagnetycznej przed próbką. Stosunek powyższych intensywności opisuje parametr transmitancji:

$$T = \frac{I_0}{I} \quad (50)$$

gdzie I_0 – intensywność fali elektromagnetycznej przed próbką, I – intensywność fali elektromagnetycznej po przejściu przez próbkę.

Absorbancją nazywamy parametr opisujący ilość światła zaabsorbowaną przez próbkę:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log_{10} T \quad (51)$$

Dla każdego związku, dla którego występuje jedno z opisanych powyżej przejść elektronowych, można wyznaczyć charakterystyczne dla niego widmo absorpcji fal elektromagnetycznych z maksimum przy określonej długości fal. Prawo Lamberta-Beera opisuje liniową zależność między stężeniem takiego związku, a absorbancją przy fali o długości odpowiadającej maksimum absorpcji:

$$I = I_0 * e^{-kcl} \quad (52)$$

gdzie k – współczynnik absorpcji, c – stężenie substancji, l – grubość warstwy absorbującej.

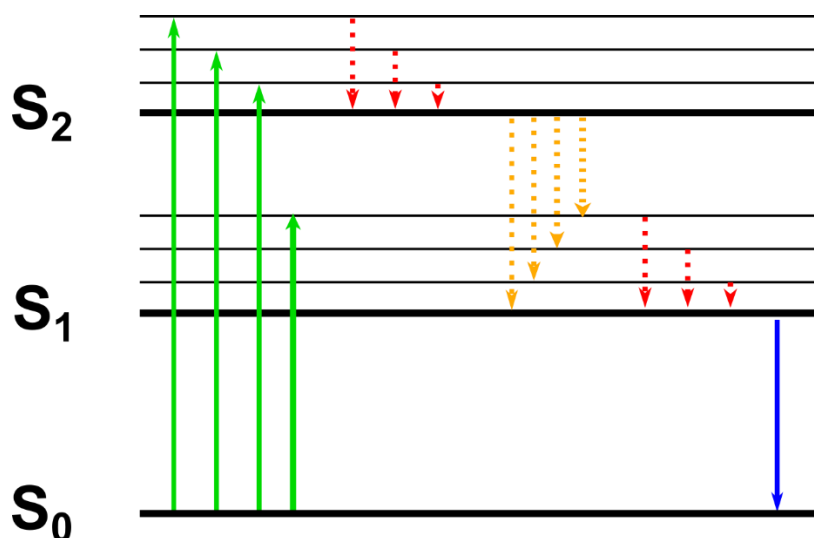
Testy biologiczne, wykorzystujące spektrofotometrię UV-Vis opierają się na pomiarze poziomu konwersji komórkowej substratu do produktu o różnych maksimach absorpcji. Testy takie jak WST-1, XTT czy MTT wykorzystują zjawisko redukcji bezbarwnych soli tetrazolowych do barwnego formazanu, którego maksimum absorpcji przypada na ≈ 450 nm. Reakcja redukcji jest katalizowana przez dehydrogenazy mitochondrialne, której aktywność jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Dzięki tej zależności, śledząc poziom redukcji soli tetrazolowych za pomocą technik spektroskopowych, możliwe jest wyznaczenie żywotności komórek. Określenie absorbancji światła przy fali długości 450 nm dla badanej próby w stosunku do tego samego parametru wyznaczonego dla kontroli negatywnej pozwala na otrzymanie względnej żywotności komórek.

2.9.2 Konfokalna skaningowa mikroskopia laserowa

Fluorescencja jest obecnie zjawiskiem powszechnie wykorzystywanym w różnych gałęziach biotechnologii, diagnostyce czy inżynierii materiałowej, która pozwoliła na zastąpienie niebezpiecznych radioaktywnych znaczników na rzecz nietoksycznych fluoroforów.

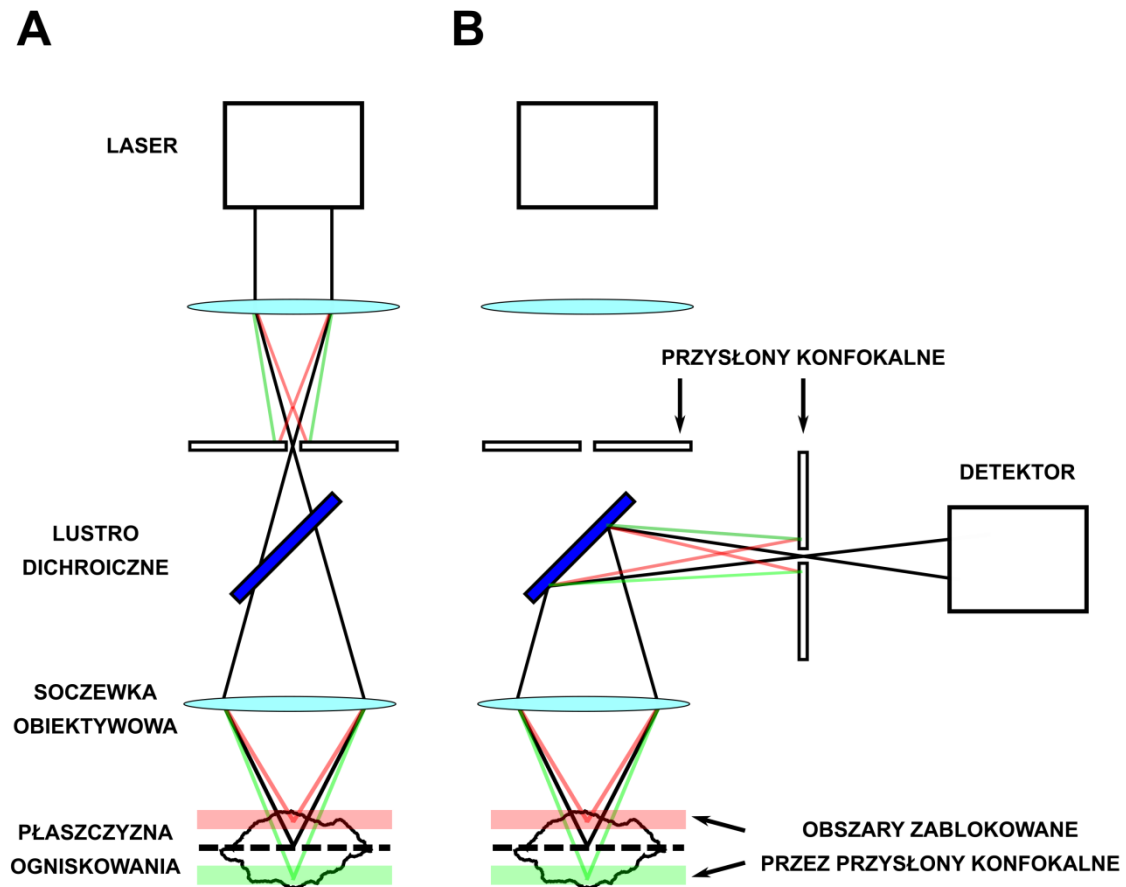
Procesy zachodzące między absorpcją światła, a emisją opisuje diagram Jabłońskiego [164,165]. Gdy substancja poddana jest działaniu fali elektromagnetycznej o odpowiedniej długości wzbudzenia charakterystycznej dla danego fluoroforu, wówczas elektrony takiej substancji mogą zostać wzbudzone z podstawowych do wyższych elektronowych i wibracyjnych poziomów energetycznych. W fluorescencji szczególnie istotne są poziomy singletowe, z których zachodzi relaksacja wibracyjna, tj. bezpromieniste przejście do najbliższego poziomu elektronowego (Ryc. 25).

Z diagramu Jabłońskiego wynika, że dla danej substancji, niezależnie od długości fali jaką została wzbudzona (a więc niezależnie od poziomu, do którego został wzbudzony elektron), długość fali promieniowania emitowanego na drodze fluorescencji pozostaje taka sama. Zjawisko to nazywa się regułą Kashy [166]. Energia fotonów fluorescencji jest zwykle niższa od energii fotonów, które wzbudziły daną substancję. Przesunięcie maksimum widma emisji w kierunku dłuższych fal w stosunku do maksimum widma absorpcji nazywa się przesunięciem Stokesa [167].



Ryc. 25 Diagram Jabłońskiego. Na zielono zaznaczona wzbudzenie elektronów w wyniku absorpcji. Na czerwono wskazano relaksację wibracyjną. Na pomarańczowo wskazano konwersję wewnętrzną. Na niebiesko wskazano fluorescencję.

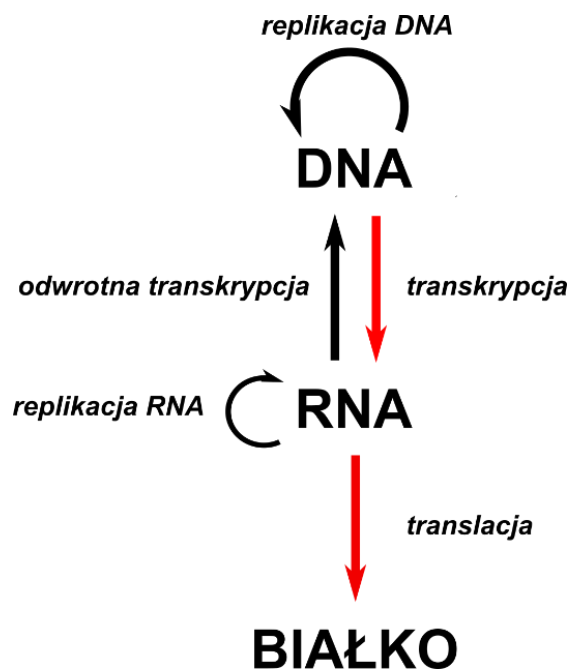
Związki wykazujące się fluorescencją (fluorofory) wykorzystywane są jako znaczniki w mikroskopii konfokalnej, umożliwiając obrazowanie określonych elementów lub struktur komórkowych [168]. Mikroskopia konfokalna jest wysokorozdzielczą metodą obrazowania, pozwalającą na uzyskanie wyraźnych, trójwymiarowych obrazów stosunkowo grubych preparatów. W standardowej mikroskopii fluorescencyjnej próbki oświetlane są jednorodnie na całej powierzchni przez źródło światła, który stanowią zazwyczaj łukowe lampy UV [169]. Sprawia to, że do detektora dociera zarówno światło z płaszczyzny ogniskowania jak i z obszarów nad i pod tą płaszczyzną, a w efekcie otrzymywany obraz wykazuje się niską rozdzielczością. Podstawową zasadą działania mikroskopii konfokalnej jest współogniskowanie optyki oświetlenia i detekcji za pomocą przysłon konfokalnych z małymi otworami. W pierwszej kolejności, światło lasera zostaje skupione na otworze pierwszej przysłony konfokalnej. Następnie przechodzi przez lustro dichroiczne, czyli filtry zdolne do przepuszczania fali elektromagnetycznej o określonej długości i odbijania fali elektromagnetycznej o innej długości, i zostaje skupione przez soczewkę obiektywową w jednym punkcie preparatu (Ryc. 26). Światło wyemitowane przez wzbudzone fluorofory w tym punkcie preparatu zostaje skupione na drugiej przysłonie konfokalnej pełniącej rolę filtra przestrzennego. Dzięki temu rozwiązaniu światło emitowane z płaszczyzn nad i pod płaszczyzną ogniskowania zostaje zablokowane, zaś do detektora trafia światło jedynie z punktu na płaszczyźnie ogniskowania. Dużą zaletą zastosowania współogniskowania i wzbudzania fluorochromów tylko z płaszczyzny ogniskowania, jest możliwość otrzymywania obrazów trójwymiarowych (x, y, z), obrazów czterowymiarowych (x, y, z, t) a nawet pięciowymiarowych (x, y, x, t, λ).



Ryc. 26 Schematyczne przedstawienie działania mikroskopii konfokalnej w czasie (A) oświetlania preparatu oraz (B) detekcji fluorescencji.

2.9.3 Analiza genotoksyczności

Przeptyw informacji genetycznej opisuje centralny dogmat biologii molekularnej [170]. W komórkach eukariotycznych informacja genetyczna przechowywana jest w jądrze komórkowym w postaci kwasu deoksyrybonukleinowego. Na drodze transkrypcji przeprowadzanej przez polimerazy RNA (z ang. *ribonucleic acid*, kwas rybonukleinowy) zależne od DNA (z ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy), informacja genetyczna przepisywana jest z DNA do pre-mRNA (z ang. *precursor messenger ribonucleic acid*, prekursorowy matrycowy kwas rybonukleinowy). Następnie pre-mRNA podlega dojrzewaniu. Z matrycy na drodze splicingu usuwane są części niekodujące, introny, zaś części kodujące, eksony, łączone są do jednej cząsteczki. Ponadto do mRNA przy końcu 5' przyłączany jest tzw. kap, zaś do końca 3' sekwencja poliadenylowej poli-A, mające na celu ochronę mRNA przed degradacją. Dojrzałe mRNA opuszcza jądro komórkowe do cytosolu, gdzie podlega translacji, tzn. tłumaczeniu informacji genetycznej do sekwencji proteinowej. Powyższy proces nazywany jest ekspresją genów.



Ryc. 27 Centralny dogmat biologii molekularnej przedstawiający przepływ informacji genetycznej w organizmach żywych. Nazwy procesów zostały zapisane kursywą. Czerwone strzałki przedstawiają ekspresję genów w komórkach eukariotycznych.

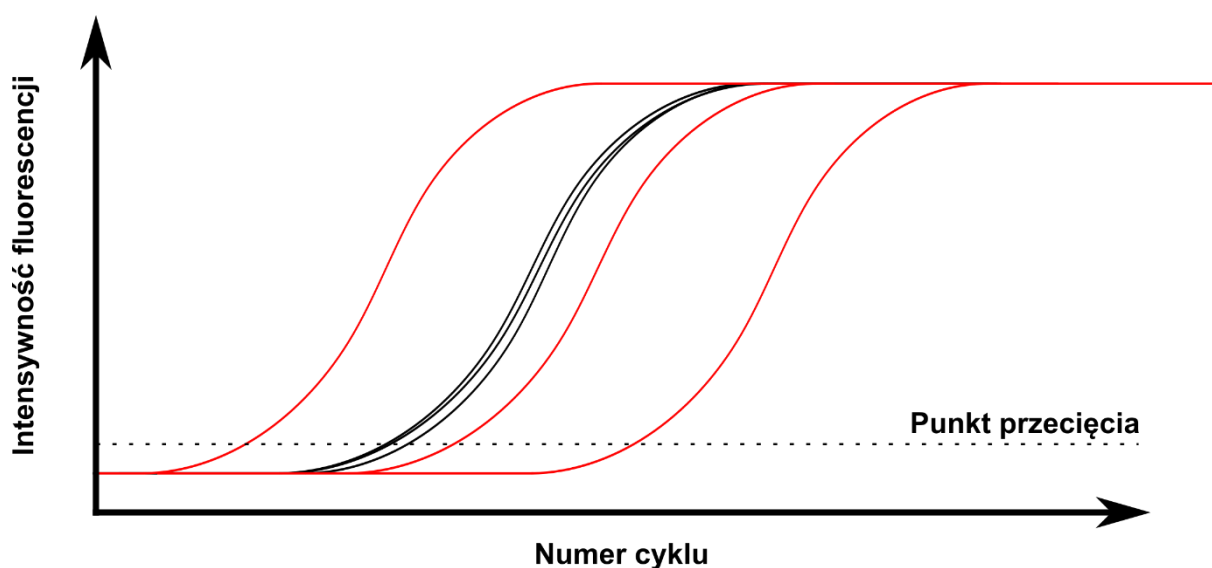
Genotoksycznością nazywa się niepożądany wpływ czynników zewnętrznych na ekspresję genów, prowadzący do zaburzenia homeostazy organizmu. Efekt genotoksyczny może wystąpić na każdym etapie ekspresji genów. Nanocząstki interkalujące, czyli wbudowujące się w strukturę DNA mogą uniemożliwiać poprawne działanie polimeraz RNA zależnych od DNA, prowadząc do zmniejszonej ilości produkowanego mRNA. Podobny efekt powstaje, kiedy nanocząstki wchodzi w interakcję z już zsyntetyzowanym mRNA prowadząc do jego degradacji [171,172]. Nieodpowiednia ilość matrycy dla procesu translacji skutkuje mniejszą wydajnością translacji, nieodpowiednią ilością syntetyzowanych białek, a co za tym idzie zaburzenia niezbędnych procesów komórkowych.

Zmiany w poziomie ekspresji genów na poziomie mRNA, tzn. zmiany liczby kopii mRNA w stosunku do kontroli, można analizować za pomocą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (qPCR z ang. *quantitative polymerase chain reaction*). W celu analizy, w pierwszym kroku z komórek izoluje się całkowite RNA. Następnie, konieczne jest wyizolowanie z całkowitego RNA frakcji mRNA. W tym celu wykorzystuje się właściwość opisaną powyżej, tzn. obecność ogona poliadenylowego w dojrzałej cząsteczce mRNA. Przykładową techniką izolacji mRNA z całkowitego RNA jest chromatografia przez złożo zawierające łańcuchy poli-T, które są komplementarne do łańcuchów poli-A i specyficznie się z nimi wiążą. Oczyszczone mRNA jest następnie poddawany reakcji odwrotnej transkrypcji, tzn. przepisaniu informacji z RNA do DNA za pomocą enzymu rewertyazy. W ten sposób otrzymywane jest kodujące cDNA (z ang. *coding deoxyribonucleic acid*) będący matrycą do właściwej reakcji qPCR.

Ilościowa reakcja PCR opiera się na pomiarze zmian fluorescencji w trakcie amplifikacji specyficznego regionu cDNA. W skład mieszaniny qPCR wchodzi matryca w postaci cDNA, startery, które pozwalają na amplifikację specyficznego regionu matrycy, polimeraza DNA

przeprowadzająca amplifikację, znaczniki/sondy fluorescencyjne, trifosforany deoksynukleotydów, będące budulcem amplifikowanych nici oraz jony Mg^{2+} umożliwiające prawidłowe działanie polimerazy DNA. W pierwszym etapie qPCR temperatura roztworu podnoszona jest do temperatury topnienia DNA, w której dwuniciowe DNA denaturuje do jednoniciowych cząsteczek. W kolejnym kroku temperatura jest obniżana, co umożliwia przyłączenie się specyficznych starterów do jednoniciowego DNA. Proces ten nazywany jest annealingu. Następnie następuje elongacja, tzn. synteza DNA na matrycy jednoniciowego DNA, do którego przyłączył się starter. Etapy annealingu i denaturacji są zapętlane do około 40 cykli. W czasie każdego cyklu po etapie elongacji mierzona jest również intensywność fluorescencji. Do najczęściej stosowanych znaczników wykorzystywanych w qPCR jest SYBR-Green – nietoksyczny znacznik, który w wolnej formie jest niefluorescencyjny, jednak w momencie interkalacji w dwuniciową strukturę DNA, wykazuje się silną, zieloną fluorescencją. Intensywność fluorescencji znacznika w qPCR zależy od stężenia syntetyzowanego DNA, a więc od początkowej ilości mRNA.

W celu ilościowej interpretacji otrzymanych wyników konieczne jest symultaniczne przeprowadzenie reakcji qPCR dla próbek zawierających znane początkowe ilości matrycy badanego genu. Wykonanie analizy qPCR dla takich próbek pozwala wyznaczyć krzywą standardową, która wykorzystywana jest następnie do określenia liczby matrycy w analizowanych próbkach.



Ryc. 28 Schematyczne przedstawienie wykresu zależności intensywności od numeru cyklu otrzymywanej w ramach analizy qPCR. Na czerwono zaznaczono krzywe wyznaczone dla standardów o znanej początkowej ilości matrycy.

2.10 Optymalizacja warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

Tworząc nowe układy nanocząstek istotne jest poznanie wpływu czynników kontrolowanych podczas ich syntezy na uzyskane parametry charakteryzujące końcowy układ. Znajomość wpływu czynników ustalanych podczas syntezy na pozyskiwane cechy nanocząstek (takie jak średnica hydrodynamiczna, współczynnik polidispersji, ładunek powierzchniowy czy

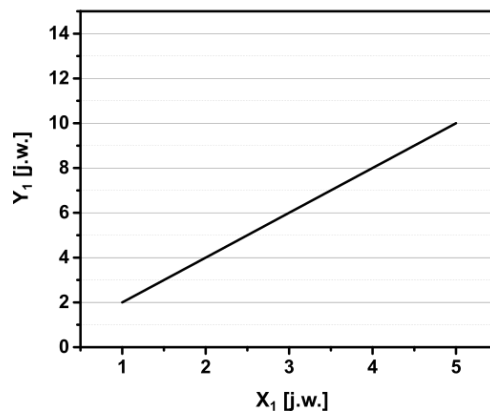
stabilność w czasie) pozwala projektować układy o pożądanych właściwościach, ale także odkrywać interakcje pomiędzy badanymi czynnikami, które podczas analizy wpływu pojedynczych czynników na badaną odpowiedź, mogą zostać niezauważone.

Projektowaniem doświadczeń nazywa się szereg metod oraz procedur statystycznych pozwalających uzyskać maksymalną ilość danych o badanym obiekcie przy jednoczesnej minimalizacji nakładu pracy oraz materiałów [173]. Do podstawowych celów projektowania doświadczeń zaliczyć można:

- badania przesiewowe mające na celu wyznaczenie czynników mających statystycznie istotny wpływ na badane odpowiedzi
- poznanie wpływu tych czynników na odpowiedzi
- odkrycie interakcji dwuczynnikowych, tzn. jak zmiana wielkości jednego czynnika oddziałuje na wpływ innego czynnika na badaną odpowiedź
- optymalizacja procesów, pozwalająca m.in. na uzyskanie układów o optymalnych, pożądanych parametrach

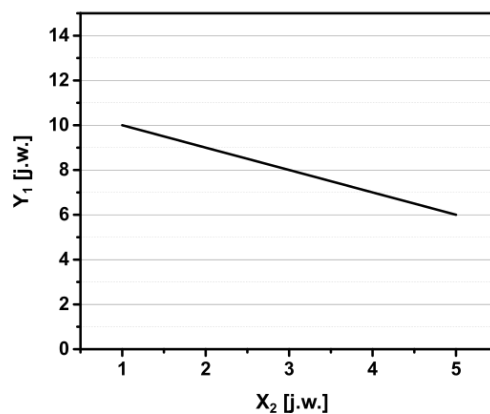
Najczęściej wykorzystywanym w nauce podejściem do analizy wpływu czynników na daną odpowiedź jest tzw. OFAT (z ang. *one factor at time*, jeden czynnik w danym momencie) [174,175]. Podejście takie, choć wydaje się prostsze i szybsze niż metody projektowania doświadczeń, w rzeczywistości prowadzi do zwielokrotnienia ilości zużytych materiałów oraz czasu niezbędnego do wykonania doświadczeń, prowadząc w tym samym czasie do utraty wielu informacji, które uzyskiwane są za pomocą metod opisywanych w dalszej części rozdziału.

Aby zademonstrować problemy wynikające z analizy wpływu pojedynczych czynników na badany parametr, rozważmy pewien układ, dla którego badany jest wpływ czynników X_1 i X_2 na odpowiedź Y_1 . W przedstawionym przykładzie celem jest takie dobranie wartości czynników X_1 i X_2 , aby wartość Y była najwyższa. Analiza taka zazwyczaj rozpoczyna się od wyznaczenia rosnących wartości czynnika X_1 nazywanych poziomami i pomiaru wielkości Y_1 dla każdego poziomu, przy stałej wartości czynnika X_2 . W efekcie otrzymać można następujący wykres zmiany wartości Y_1 (Ryc. 29).



Ryc. 29 Wykres zależności Y od X₁ dla X₂ = 1. Krzywa wyznaczona ze wzoru $Y_1 = 2 * X_1$.

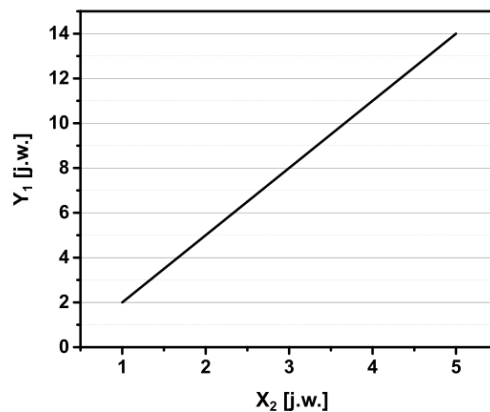
Jeśli uzyskanie najwyższej wartości Y jest celem badania, intuicyjnym wydaje się, aby wpływ czynnika X₂ analizować kolejno dla X₁ = 5. Wykonując kolejny szereg pomiarów Y₁ dla rosnących wartości (poziomów) X₂ i stałego X₁ = 5, wykres zmiany Y₁ prezentuje się następująco (Ryc. 30).



Ryc. 30 Wykres zależności Y₁ od X₂ dla X₁ = 5. Krzywa została wyznaczona ze wzoru $Y = X_2 + 10$.

Uzyskane wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem X₂, wartość Y₁ maleje. Ponownie naturalnym wnioskiem jest, iż maksymalna wartość Y₁ uzyskana została dla kombinacji czynników (X₁, X₂) = (5, 1). Warty podkreślenia jest fakt, iż uzyskanie tego wniosku wymagało wykonania 10 osobnych doświadczeń (biorąc pod uwagę, że każde było udane i nie wykonano żadnych powtórzeń), oraz proporcjonalną ilość materiałów.

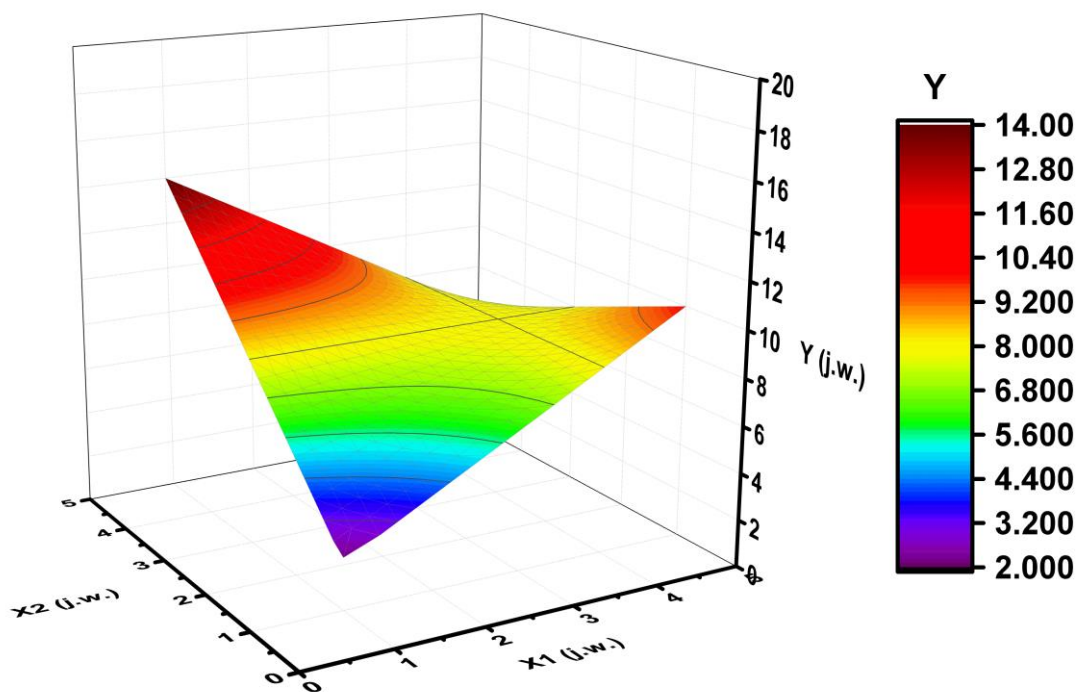
Wniosek z przeprowadzonych badań jest jednak błędny. W demonstrowanym przykładzie, analizując zależność Y₁ od X₂ dla X₁=1 uzyskane wyniki prezentują się następująco (Ryc. 31).



Ryc. 31 Wykres zależności Y_1 od X_2 dla $X_1 = 1$. Krzywa została wyznaczona ze wzoru $Y = 3 * X_2 + 1$.

Jak pokazuje powyższy przykład, dopiero jednoczesna analiza badanych czynników daje rzeczywisty pogląd na ich wpływ na badaną odpowiedź. Przykład ten demonstruje, że metodologia OFAT dostarcza zazwyczaj niepełne informacje nie oddając w pełni charakteru badanego obiektu. Ponadto, dla większej liczby czynników, analizy takie wymagają znacznego nakładu pracy i zużycia materiałów.

Na Ryc. 32, za pomocą powierzchni odpowiedzi przedstawiony został jednoczesny wpływ czynników X_1 i X_2 na odpowiedź Y_1 .



Ryc. 32 Powierzchnia odpowiedzi dla Y wyznaczona dla zakresu wartości czynników X_1 oraz X_2 .

Poszczególne cele wymienione na początku powyższego podrozdziału osiągnięte mogą być przy wykorzystaniu różnych metod i planów, takich jak ułamkowy plan czynnikowy, pełny dwupoziomowy plan czynnikowy, plan Box-Behnkena czy centralny plan kompozycyjny [176]. Wymienione plany nie są ściśle przypisane do uzyskiwania określonych celów i są często stosowane wymiennie. Przykładowo przy małej ilości badanych czynników, zarówno badania przesiewowe jak i określanie interakcji dwuczynnikowych można uzyskać za pomocą pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego, zaś ten może być następnie rozszerzony do centralnego planu kompozycyjnego bez utraty uzyskanych informacji.

W poniższej pracy, w celu optymalizacji warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO domieszkowanych GML zastosowany został pełny dwupoziomowy plan czynnikowy, rozszerzony następnie do centralnego planu kompozycyjnego. Pełny dwupoziomowy plan czynnikowy pozwala uzyskać informację na temat wpływu kontrolowanych czynników na mierzone wielkości oraz określić obecność ewentualnych interakcji zachodzących pomiędzy czynnikami. Istotą dwupoziomowego planu czynnikowego jest analiza odpowiedzi dla wszystkich możliwych kombinacji kontrolowanych czynników, które określone są na dwóch poziomach, oznaczanych jako „-1” i „+1”, co wskazywać ma na graniczny charakter wartości kontrolowanego czynnika. Właściwe wartości przypisane następnie do wartości kodowanych „-1” i „+1” określane są zazwyczaj na podstawie literatury lub badań wstępnych.

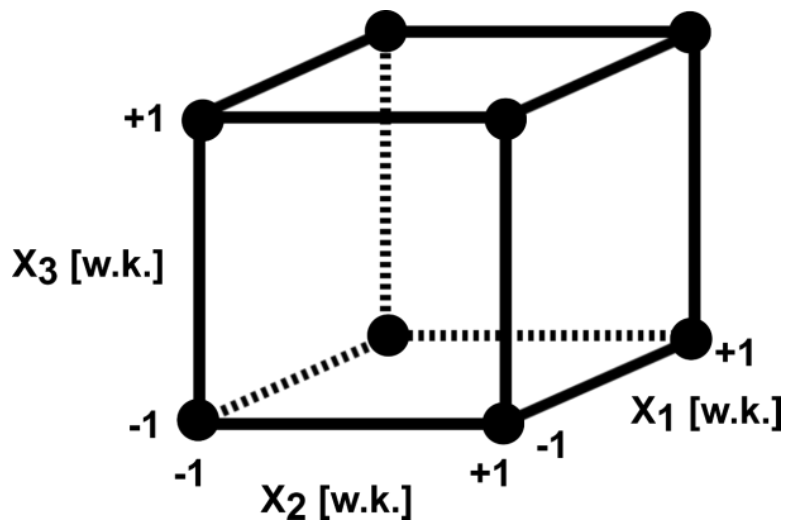
W celu przedstawienia działania dwupoziomowego planu czynnikowego, rozważmy trzy kontrolowane czynniki, X_1 , X_2 oraz X_3 , wpływające na mierzoną wielkość Y . Dla każdego czynnika wyznaczono dwie wartości oznaczane jako poziomy o wartościach kodowanych „-1” i „+1”. Wówczas wszystkie możliwe kombinacje wartości kodowanych czynników X_1 , X_2 oraz X_3 przedstawić można jak w Tab. 4.

Tab. 4 Możliwe kombinacje wartości kodowanych kontrolowanych czynników X_1 , X_2 oraz X_3 , których wartości kodowane

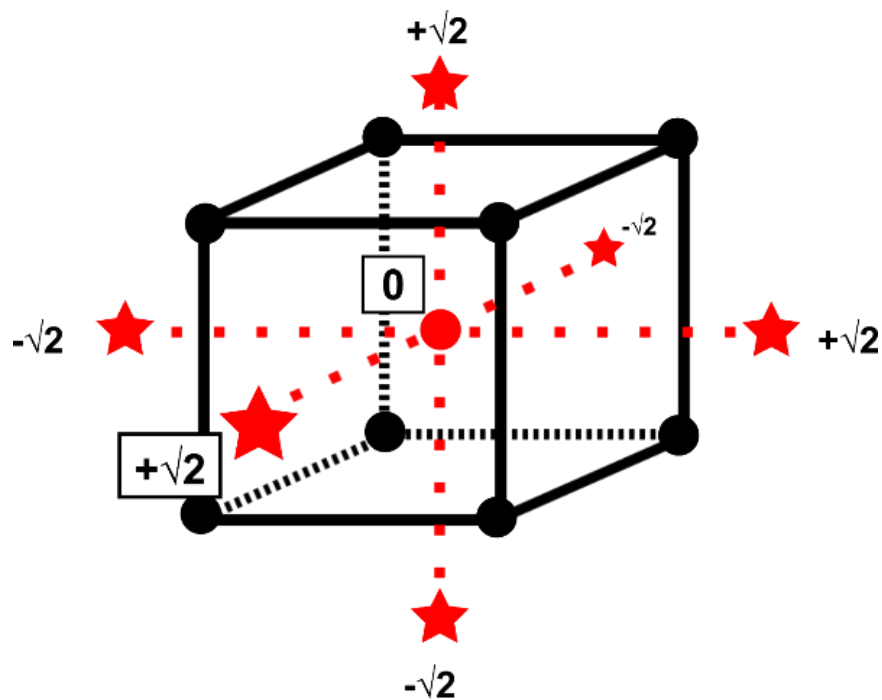
Lp.	Wartość kodowana czynnika kontrolowanego X_1	Wartość kodowana czynnika kontrolowanego X_2	Wartość kodowana czynnika kontrolowanego X_3	Kombinacja wartości kodowanych czynników (X_1 , X_2 , X_3)
1	+1	+1	+1	(+1, +1, +1)
2	+1	-1	+1	(+1, -1, +1)
3	+1	+1	-1	(+1, +1, -1)
4	+1	-1	-1	(+1, -1, -1)
5	-1	+1	+1	(-1, +1, +1)
6	-1	+1	-1	(-1, +1, -1)
7	-1	-1	+1	(-1, -1, +1)
8	-1	-1	-1	(-1, -1, -1)

Każda z tych kombinacji stanowi odrębne doświadczenie, dla którego zmierzona zostanie wielkość Y . Przedstawione w Tab. 4 kombinacje można przedstawić również graficznie w postaci sześcianu, gdzie każdy wierzchołek sześcianu stanowi inna kombinacja wartości

kontrolowanych czynników (Ryc. 33). Przestrzeń wyznaczoną w taki sposób nazywa się przestrzenią doświadczalną.



Ryc. 33 Przestrzeń doświadczalna pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego dla trzech czynników X_1 , X_2 i X_3 . Każda z osi prezentuje kodowane wartości czynnika. w.k. – wartość kodowana.



Ryc. 34 Przestrzeń doświadczalna pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego przedstawionego w Ryc. 33 rozszerzona do centralnego planu kompozycyjnego przez dodanie punktu centralnego „0” oraz oznaczonych gwiazdkami punktów osiowych w odległości $\pm\sqrt{2}$ od punktu centralnego.

3. Cele pracy

Pierwszym celem pracy było określenie użyteczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu oraz fitantriolu, stabilizowanych surfaktantem Pluronic F127 jako potencjalnych systemów do bioobrazowania i dostarczania leków. Pierwszy cel pracy został zrealizowany przez wykonanie zadań szczegółowych. Pierwszym zadaniem szczegółowym była synteza lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o monooleinian glicerolu i fitantriol za pomocą techniki „top-down”. Drugim zadaniem szczegółowym był opis właściwości fizykochemicznych otrzymanych dyspersji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych za pomocą metod takich jak dynamiczne rozpraszanie światła, elektroforetyczne rozpraszanie światła, rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami oraz kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa. Trzecim zadaniem szczegółowym był opis i porównanie wpływu otrzymanych dyspersji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na układy biologiczne, uwzględniając analizę aktywności proliferacyjnej, ocenę poziomu reaktywnych form tlenu, analizę integralności cytoszkieletu, badanie genotoksyczności oraz analizę dróg internalizacji wytworzonych nanocząstek w komórkach HeLa i MSU 1.1.

Drugim celem pracy było uzyskanie nowych stabilnych układów lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu domieszkowanego monolaurynianem glicerolu oraz określenie ich właściwości antybakteryjnych. Drugi cel pracy został zrealizowany przez wykonanie zadań szczegółowych. Pierwszym zadaniem szczegółowym było określenie optymalnego składu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu domieszkowanym monolaurynianem glicerolu wykorzystując dwupoziomowy plan czynnikowy i centralny plan kompozycyjny. Drugim zadaniem szczegółowym była analiza właściwości fizykochemicznych układu o zoptymalizowanych parametrach za pomocą dynamicznego rozpraszania światła, elektroforetycznego rozpraszania światła, rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami oraz kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Trzecim zadaniem szczegółowym była ocena właściwości cytotoksycznych na komórkach HeLa i MSU 1.1 za pomocą analizy aktywności proliferacyjnej. Czwartym celem szczegółowym była ocena właściwości antybakteryjnych układu o zoptymalizowanych parametrach na bakteriiach *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* za pomocą wyznaczenia krzywej wzrostu bakterii.

4. Synteza i analiza właściwości cytotoksycznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

4.1 Materiały

Monooleinian glicerolu (90%) zakupiony został w IOI Olea GmbH (Hamburg, Niemcy). Fitantriol zakupiony został w DSM (Heerlen, Holandia). Pluronic F-127 oraz barwnik Czerwień Nilu pozyskane zostały z Merck (Darmstadt, Niemcy). Etanol (99,8%) został pozyskany z Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Polska).

Komórki linii komórkowej wywodzącej się z komórek raka szyjki macicy (HeLa z ang. human cervical cancer cell line) pozyskano z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC z ang. American Type Culture Collection) (Wirginia, Stany Zjednoczone). Komórki linii komórkowej ludzkich fibroblastów MSU 1.1 otrzymano dzięki uprzejmości prof. C. Kieda (Centrum Biofizyki Molekularnej, CNRS, Orléans, Francja). Pełne medium komórkowe DMEM zakupiono od Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Płodową surowicę bydlęcą zakupiono od Biowest (Nuaille, Francja). Zestaw do analizy proliferacji komórkowej WST-1 pozyskano z Takara Bio INC. (Kusatsu, prefektura Shiga, Japonia). Bufor fosforanowy Diocyan – 2', 7' – dichlorofluorescyny zakupiono w Sigma Aldrich (Missouri, Stany Zjednoczone). Odczynnik CellRox® Green pozyskano z Life Technologies (Kalifornia, Stany Zjednoczone). Formaldehyd pozyskano z Polysciences (Pensylwania, Stany Zjednoczone). Triton X-100 zakupiono w Merck (Darmstadt, Niemcy). Falloidyne zakupiono z Invitrogen (Kalifornia, Stany Zjednoczone). Zestaw do izolacji RNA RNeasy Mini Kit pozyskano z Qiagen (Hilden, Niemcy). Zestaw do odwrotnej transkrypcji RevertAid RT Reverse Transcription Kit pozyskano z Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Zestaw do ilościowej reakcji qPCR SYBR® Green Master Mix pozyskano z Bio-Rad (Kalifornia, Stany Zjednoczone). Medium komórkowe Fluoro Bright DMEM pozyskano z Life Technologies, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

4.2 Wytwarzanie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

W celu wytworzenia lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych zastosowano metodę „top-down”. Do próbek naważono odpowiednie ilości lipidów GMO lub PHT i surfaktantu (Tab. 5). Mieszaniny lipidów z surfaktantem poddano następnie inkubacji w temperaturze 40°C do momentu ich roztopienia. Do mieszanin dodano wodę dejonizowaną w temperaturze 40°C, tak aby procent masowy lipidów w próbce wynosił 2% lub 20%. Próbkę krótko wymieszano i pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej w celu hydratacji. Aby otrzymać koloidalną dyspersję lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, próbki poddano homogenizacji za pomocą sondy ultradźwiękowej (Branson 250, Emerson Electric Co., Ferguson, Missouri, Stany Zjednoczone) przy wyjściowej mocy 60 W, w cyklach 2s/2s ON-OFF przez całkowity czas 15 min, do momentu otrzymania mlecznobiałego koloidu. Przed rozpoczęciem przewidzianych doświadczeń, lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej w celu ustabilizowania się koloidu.

Tab. 5 Skład masowy lipidów i surfaktantu Pluronic F127 próbek oznaczonych jako GMO 2%, GMO 20%, PHT 2% i PHT 20%

Nazwa próbki	Masa GMO/PHT [mg]	Masa F127 [mg]
GMO 2%	200	50
GMO 20%	1000	250
PHT 2%	200	50
PHT 20%	1000	250

Do analizy dróg internalizacji, lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne dodatkowo wybarwiono fluorescencyjnym barwnikiem Czerwieni Nilu. Roztwór barwnika w 99,8% etanolu (100 µl roztworu Czerwieni Nilu o stężeniu 1 mg/ml) dodano do roztopionej mieszaniny lipidów z surfaktantem. Otrzymany roztwór poddano suszeniu w próżni do momentu powstania warstwy lipidu na dnie naczynia. Kolejne kroki były tożsame z procedurą opisaną powyżej. Niezwiązany barwnik zostały usunięty za pomocą wirowania ultrafiltracyjnego (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, punkt odcięcia 10,000 MWCO, Merck, Darmstadt, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta. 250 µl roztworu wybarwionych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych nałożono na membranę filtracyjną i wirowano przez 30 minut przy względnej sile odśrodkowej 3000 x g. Nanocząstki oczyszczone z niezwiązanego barwnika odzyskano z filtrów i ponownie zawieszono w wodzie dejonizowanej.

W celu wyznaczenia optymalnych warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO domieszkowanych GML wykorzystano dwupoziomowy plan czynnikowy rozszerzony do centralnego planu kompozycyjnego. Optymalizowanymi czynnikami były masa surfaktantu F127 (minimalna wartość 1,5 mg, maksymalna wartość 3 mg), oraz masa domieszkowanego lipidu (minimalna wartość 3 mg, maksymalna wartość 6 mg). W pierwszej kolejności do próbek naważono wyznaczoną masę GML, następnie GMO do całkowitej masy lipidów wynoszącej 30 mg oraz wyznaczoną dla danej kombinacji masę surfaktantu F127. Próbkę następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze 69°C. W przypadku LLCNPs GMO/GML wykorzystano wyższą temperaturę inkubacji niż podczas syntezy LLCNPs opartych na czystym GMO i PHT. Wyboru tego dokonano ze względu na wyższą temperaturę topnienia GML. W niższych temperaturach niż 69°C mieszanina GMO/GML nie ulegała całkowitemu rozpuszczeniu. Po roztopieniu lipidów i surfaktantu, do próbek dodano wodę dejonizowaną w temperaturze 69°C do całkowitej masy próbki 1,5 g. Próbkę wymieszano intensywnie za pomocą worteksowania, inkubowano przez 90 minut w 69°C po czym zostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Kolejnego dnia próbki poddano homogenizacji za pomocą ultradźwięków przy mocy 52,5 W, w cyklach 2s/2s ON-OFF trwających łącznie 30 sekund. Po homogenizacji próbki pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej w celu ustabilizowania się układu.

Analizy DLS oraz OD₆₆₀, opisane w dalszych rozdziałach, wykonywane na rzecz dwupoziomowego planu czynnikowego oraz centralnego planu kompozycyjnego wykonywane były w kolejnym dniu po homogenizacji.

Analizowanymi odpowiedziami była średnica hydrodynamiczna, współczynnik polidispersji, potencjał zeta oraz gęstość optyczna OD₆₆₀. W celu określenia statystycznie istotnego wpływu masy GML oraz masy F127 na powyższe odpowiedzi, wyznaczenia ewentualnych interakcji między kontrolowanymi czynnikami zastosowano dwupoziomowy plan czynnikowy. Wykorzystując oprogramowanie DesignExpert v.13 zaprojektowano doświadczenia przedstawione w Tab. 6 i Tab. 12. Każda kombinacja optymalizowanych czynników została wykonana w trzech powtórzeniach.

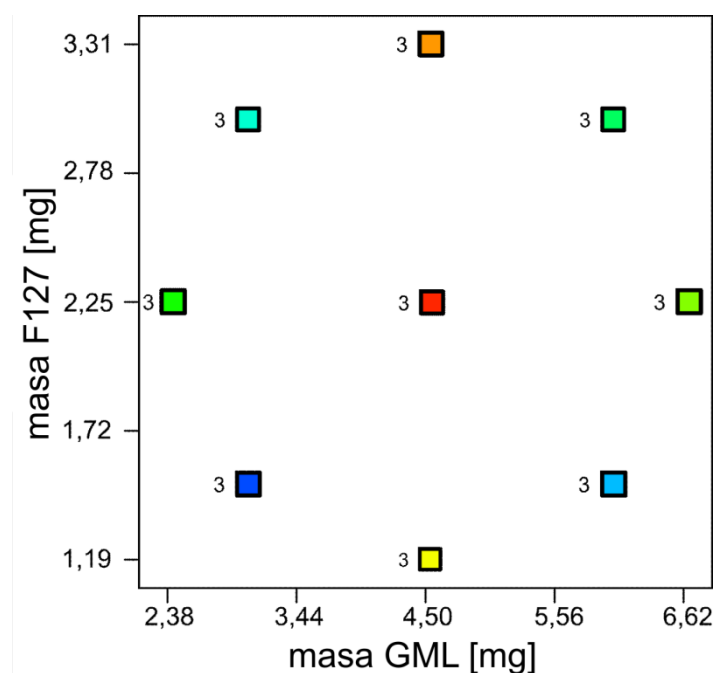
Tab. 6 Kombinacje optymalizowanych czynników w dwupoziomowym planie czynnikowym.

Lp.	Masa GML [mg]	Masa F127 [mg]
1-3	3	1,5
4-6	6	1,5
7-9	3	3
10-12	6	3

Po analizie wyników pełny dwupoziomowy plan czynnikowy rozszerzono do centralnego planu kompozycyjnego przez dodanie do przestrzeni doświadczalnej punktu centralnego oraz punktów osiowych w odległości ± 2 od punktu centralnego. Wartości optymalizowanych czynników dodanych punktów centralnych i osiowych oraz wartości zmierzonych odpowiedzi przedstawiono w Tab. 7 oraz Tab. 13. Przestrzeń doświadczalna łącząca dwupoziomowy plan czynnikowy i centralny plan kompozycyjny zostały przedstawione w Ryc. 35.

Tab. 7 Kombinacje optymalizowanych czynników dodane w centralnym planie kompozycyjnym

Lp.	Typ punktu	Masa GML [mg]	Masa F127 [mg]
13-15	Osiowy	2,38	2,25
16-18	Osiowy	6,62	2,25
19-21	Osiowy	4,50	1,19
22-24	Osiowy	4,50	3,31
25-27	Centralny	4,50	2,25



Ryc. 35 Przestrzeń doświadczalna przedstawiająca wszystkie układy wielkości wejściowych tj. masy GML i masy F127 wykorzystane w dwupoziomowym planie czynnikowym i centralnym planie kompozycyjnym.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczone zostały powierzchnie odpowiedzi, wykorzystane następnie do wyznaczenia optymalnych wartości czynników. W celu potwierdzenia prawidłowości otrzymanych modeli, zoptymalizowane nanocząstki wytworzono w trzech powtórzeniach po czym dla każdej próbki wyznaczono wartości odpowiednich właściwości fizykochemicznych i porównano z wartościami przewidywanymi.

4.3 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Rozkład wielkości lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, ich potencjał zeta oraz stabilność w czasie wyznaczono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical Ltd, Wielka Brytania). Intensywność rozproszonego światła mierzono za pomocą detektora ustawionego pod kątem 173° . Wartość współczynnika załamania światła badanego materiału ustalono na poziomie $RI = 1,590$. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne zawierzone były w wodzie, $RI = 1,330$, $\eta = 0,8872 \text{ mPa} \cdot \text{s}$. Pomiary wykonywane były w 25°C . Do analizy wykorzystano roztwory $5 \mu\text{l}$ LLCNPs w $995 \mu\text{l}$ wody dejonizowanej. Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe trzech pomiarów. Analizę stabilności dyspersji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych wykonano wykorzystując wyniki pomiarów rozkładu wielkości, współczynnika polidispersyjności oraz potencjału zeta przeprowadzane codziennie przez pierwsze 7 dni i następnie co tydzień, w sumie przez okres 30 dni.

4.4 Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (cryo-TEM)

W celu zobrazowania struktur ciekłokrystalicznych otrzymanych układów wykorzystano kriogeniczną transmisyjną mikroskopię elektronową (cryo-TEM, z ang. *cryogenic transmission electron microscopy*). Próbki przeznaczone do cryo-TEM przygotowano wykorzystując system

Cryoplunge 3 (Gatan, Kalifornia, Stany Zjednoczone). W pierwszej kolejności perforowane miedziane siateczki pokryte węglem (Lacey C only, Ted Pella Inc., Kalifornia, Stany Zjednoczone) sfunkcjonalizowano wykorzystując komorę plazmową w celu nadania im właściwości hydrofilowych. Tak przygotowane siateczki umieszczono w komorze systemu Cryoplunge 3 utrzymując wilgotność otoczenia na poziomie 95% i temperaturę pokojową. Na siateczki nałożono 4 μ l próbki i gwałtownie upuszczano do ciekłego etanu doprowadzając do witrifikacji próbek. Siateczki przeniesiono następnie na uchwyt przeznaczony do obrazowania cryo-TEM 626 Gatan Cryo-holder (Gatan, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Obserwacje prowadzono za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEOL Ltd., Tokio, Japonia) utrzymując temperaturę -175°C .

4.5 Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS)

W celu określenia obecności i charakteru struktur ciekłokrystalicznych w badanych układach wykorzystano pomiary rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami. Próbki przeznaczone do pomiarów SAXS umieszczono w kapilarach bromokrzemowych (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Niemcy). Pomiary wykonano za pomocą systemu SAXS/WAXS XEUSS 2.0 (Xenocs, Grenoble, Francja) wyposażonego w galowo-indowe źródło promieniowania rentgenowskiego MetalJet generujące promieniowanie o długości fali $\lambda = 0,134$ nm (Excillum AB, Kista, Szwecja). System wyposażony był w hybrydowy detektor zliczający fotony Pilatus 3R1M (Dectris AG, Baden, Szwajcaria). Odległość próbki od detektora wynosiła 2535 mm. Dla każdej próbki wykonano 4 pomiary. Dla układów składających się z mieszanin lipidów GMO:GML:F127 wykonano dodatkowe pomiary temperaturowe w zakresie od 20°C do 70°C z krokiem temperaturowym wynoszącym 5°C .

4.6 Analiza właściwości cytotoksycznych i antybakteryjnych

4.6.1 Hodowle komórkowe

Badania biologiczne wykonano na komórkach raka szyjki macicy HeLa, stanowiących modelową linię komórek nowotworowych oraz na komórkach prawidłowych ludzkich fibroblastów MSU 1.1. Komórki hodowano w pełnym medium komórkowym DMEM suplementowanym płodową surowicą bydlęcą do stężenia 10%, 100 U/ml penicyliną i 100 µg/ml streptomycyną. Komórki inkubowano w 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂. W celu utrzymania ciągłości hodowli, komórki poddawano pasażom przy konfluencji wynoszącej 70%.

Z wyhodowanych komórek HeLa utworzono trójwymiarowe sferoidy, konglomeraty komórkowe stanowią modele komórkowe zbliżone charakterystyką do modeli *in vivo* w wyższym stopniu niż dwuwymiarowe hodowle komórkowe [177]. Sferoidy charakteryzują się między innymi obecnością interakcji międzykomórkowych oraz interakcji komórka-macierz międzykomórkowa, które mogą w znacznym stopniu wpływać na cytotoksyczność nanomateriałów, poprzez modyfikację efektywności pobierania materiałów [178], gdyż sferoidy komórkowe lepiej symulują dyfuzję badanego układu w głąb guza [179]. Na różnych głębokościach sferoidu, w związku z zmianami w ekspresji genów, komórki prezentują różne fenotypy, mogące prowadzić do różnych odpowiedzi struktury na badany system [177]. W związku z powyższym sferoidy stanowią mikrośrodowisko imitujące strukturę nowotworu, tworząc strukturę, w której wyróżnić można warstwę komórek proliferujących, komórek uśpionych oraz nekrotyczny rdzeń [180].

W celu wyhodowania trójwymiarowych sferoidów z komórek HeLa przeznaczonych do analizy proliferacji WST-1 i obserwacji za pomocą konfokalnej skaningowej mikroskopii fluorescencyjnej, komórki HeLa w ilości 1500 komórek na dołek posiano na płytce GravityTRAP™ ULA (inSphero, Schlieren, Szwajcaria). Płytki wirowano przez 2 minuty przy względnej sile odśrodkowej 250 x g i hodowano przez 48 h do momentu uformowania się sferoidów.

4.6.2 Test proliferacji komórkowej WST-1

W celu określenia wpływu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na aktywność proliferacyjną komórek HeLa i MSU 1.1 wykorzystano test proliferacji komórkowej WST-1. Komórki HeLa i MSU 1.1 posiano na płytkach 96 dołkowych w ilości 6×10^3 komórek na dołek. Po 24 h hodowli na komórki nałożono LLCNPs w stężeniach wynoszących: dla GMO 1 µg/ml – 200 µg/ml, dla PHT 0,8125 µg/ml – 22 µg/ml. Po określonym czasie inkubacji (3 h, 24 h, 48 h, 72 h) na komórki podano odczynnik WST-1. Po 90 minutach inkubacji wykonano pomiary absorbancji wykorzystując czytnik płytek Anthos Zenyth 340rt (Biochrom, Cambridge, Wielka Brytania) przy fali długości $\lambda = 450$ nm i fali referencyjnej o długości $\lambda = 620$ nm. Względną żywotność komórek wyrażono jako procent absorbancji próbki do absorbancji zmierzonej dla kontroli negatywnej, czyli komórek hodowanych bez dodatku LLCNPs. i przedstawiono jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe trzech powtórzeń.

Analizę proliferacji komórkowej WST-1 wykonano również na sferoidach komórkowych komórek HeLa. Na uformowane sferoidy podano LLCNPs w zakresie stężeń 13 µg/ml – 200 µg/ml niezależnie od analizowanych nanocząstek. Sferoidy inkubowano z nanocząstkami przez 24 h. Następnie sferoidy przepłukano buforem fosforanowym PBS i przeniesiono na płytkę 96 dołkową w ilości 3 sferoidów na dołek. Do każdego dołka dodano odczynnik WST-1 i poddano 90 minutowej inkubacji. Podobnie jak powyżej, pomiary absorbancji wykonano przy fali długości $\lambda = 450$ nm i fali referencyjnej długości $\lambda = 620$ nm, zaś względną żywotność komórek wyrażono jako procent absorbancji próbki do kontroli negatywnej. Rezultaty przedstawiono jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe trzech powtórzeń.

4.6.3 Analiza wewnątrzkomórkowego wytwarzania reaktywnych form tlenu

W celu wyznaczenia poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi metodą ilościową wykorzystano test dioctanu – 2', 7' – dichlorofluorescyny (DCF-DA z ang. 2',7' - *dichlorofluorescein diacetate*). Stopień generowanych reaktywnych form tlenu jest pozytywnie skorelowany z konwersją DCF-DA przez wewnątrzkomórkowe esterazy do niefluorescencyjnej zredukowanej formy DCFH, która jest następnie utleniana przez wewnątrzkomórkowe reaktywne formy tlenu do fluorescencyjnego produktu 2', 7' – dichlorofluoresceiny (DCF z ang. 2',7'-*dichlorofluorescein*). Komórki posiano na 96 - dołkowych płytkach w ilości 6×10^3 komórek na dołek. Komórki hodowano przez 24 h, a następnie przemyto roztworem HBSS (z ang. *Hank's Balanced Salt Solution*). Komórki następnie inkubowano w 100 µM roztworze DCF-DA w buforze HBSS przez 30 min. Komórki ponownie przemyto roztworem HBSS i poddano 30 minutowej inkubacji w świeżym buforze. W kolejnym etapie na komórki nałożono roztwory lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w HBSS w stężeniach 8 µg/ml i 16 µg/ml dla PHT 2% i PHT 20% oraz w zakresie 8 µg/ml – 100 µg/ml dla GMO 2% i GMO 20%. Pozytywną kontrolę stanowiły komórki inkubowane w 1 mM roztworze H₂O₂ w HBSS. Poziom konwersji DCF-DA do DCFH w obecności ROS wyznaczono mierząc intensywność fluorescencji za pomocą czytnika płytek Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek, Winooski, Vermont, Stany Zjednoczone) przy falach ekscytacji/emisji wynoszących 485 nm/530 nm. Poziom produkcji reaktywnych form tlenu wyrażono jako stosunek intensywności fluorescencji próbek do kontroli negatywnej. Wyniki wyrażono jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe trzech powtórzeń.

W celu wyznaczenia produkcji wewnątrzkomórkowych form tlenu w sposób jakościowy, wykorzystano odczynnik CellRox® Green. Odczynnik ten w stanie zredukowanym wykazuje niską fluorescencję. W wyniku działania ROS, CellRox® Green zostaje utleniony i po związaniu z DNA znajdującym się w jądrach komórkowych, wykazuje silną zieloną fluorescencję.

Komórki HeLa i MSU 1.1 posiano na płytkach LabTek w ilości 1×10^4 komórek na dołek. Po 24 h hodowli na komórki nałożono roztwory lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w wybranych stężeniach i inkubowano przez 3 h. Pozytywną kontrolę stanowiły komórki inkubowane z 30 µM menadionem. Po 3 h inkubacji na komórki podano odczynnik CellRox® Green do stężenia końcowego 5 µM i inkubowano przez 30 min. Ostatecznie wybarwiono

jądra komórkowe barwnikiem Hoechst 33342 i obrazowano za pomocą konfokalnej skaningowej mikroskopii laserowej Olympus FV1000 (Olympus, Tokio, Japonia).

W związku z tym, że odczynnik CellRox® Green wykazuje zieloną fluorescencję jedynie w wyniku utlenienia przez ROS i po związaniu się z DNA w obrębieniu jądra komórkowego, poziom reaktywnych form tlenu określić można analizując obraz mikroskopowy pod kątem obecności silnego, zielonego sygnału w obszarach jądra komórkowego (charakteryzowanego fluorescencją w paśmie niebieskim).

4.6.4 Analiza integralności cytoszkieletu

W celu określenia integralności cytoszkieletu komórek inkubowanych z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi wykorzystano konfokalną skaningową mikroskopię laserową. Komórki HeLa i MSU 1.1 posiano na płytce LabTek w ilości 1×10^4 komórek na dołek. Komórki poddano 24 h inkubacji, a następnie podano na komórki roztwory lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w wybranych stężeniach. Komórki z roztworami nanocząstek inkubowano przez 24 h. Preparaty utrwalono 3,7 % roztworem formaldehydu oraz inkubowano w 0,1% roztworem Triton X-100. Kolejno, komórki inkubowano w 1% roztworze albuminy surowicy bydlęcej (BSA z ang. *bovine serum albumin*) przez 20 min. Następnie na komórki podano 0,025% roztwór odczynnika Phalloidin-Atto 488 w 1% BSA i inkubowano przez 20 min. Falloidyna jest organicznym związkiem posiadającym wysokie powinowactwo do filamentów aktynowych cytoszkieletu. W odczynniku Phalloidin-Atto 488 jest ona dodatkowo związana z fluorescencyjnym barwnikiem Atto 488, dzięki czemu odczynnik Phalloidin-Atto 488 wykorzystywany jest jako fluorescencyjny znacznik specyficzny dla filamentów aktynowych cytoszkieletu. Jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342. Wybarwione komórki obrazowano za pomocą konfokalnej skaningowej mikroskopii laserowej. Integralność cytoszkieletu oceniona została wizualnie poprzez porównanie obrazów uzyskanych dla komórek inkubowanych z LLCNPs do obrazów uzyskanych dla kontroli. O zniszczonej strukturze cytoszkieletu świadczyły m.in. ubytki w jego budowie czy obecność rozproszonych, punktowych sygnałów.

4.6.5 Analiza ekspresji genów

W celu wyznaczenia wpływu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na ekspresję genów *ACTB*, *CDK1*, *DHFR* i *GADD45A1* wykorzystano ilościową reakcję PCR. Komórki przeznaczone do analizy ekspresji genów posiano na płytce 6 dołkowe w ilości $1,8 \times 10^5$ komórek na dołek. Komórki inkubowano przez 24 h, podano roztwory LLCNPs w wybranych stężeniach i inkubowano przez kolejne 24 h. Z komórek poddanych działaniu LLCNPs wyizolowano RNA wykorzystując zestawu RNeasy Mini Kit zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Oczyszczone RNA zawieszono w wodzie wolnej od RNA i poddano analizie spektrofotometrycznej w spektrofotometrze NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w celu oznaczenia stężenia i czystości otrzymanego kwasu nukleinowego. cDNA zsyntetyzowano z oczyszczonego RNA na drodze reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR z ang. reverse transcription polymerase chain reaction). Wykorzystano

zestaw RevertAid RT Reverse Transcription Kit. Startery do analizowanych genów zaprojektowano za pomocą narzędzi bioinformatycznych Primer3Plus, BeaconDesigner, mFold, Primer-BLAST lub wybrano na podstawie wcześniejszych doniesień Atha i wsp. [181]. Sekwencje użytych starterów przedstawiono w Tab. 8. Sekwencje mRNA dla badanych genów pozyskano z bazy danych NCBI RefSeq. Gen *GADPH* został wybrany jako gen referencyjny w celu znormalizowania wartości ekspresji innych genów. Ilościową analizę wybranych genów wykonano za pomocą reakcji qPCR wykorzystując zestaw SYBR® Green Master Mix zgodnie z zaleceniami producenta na termocyklerze iCycler CFX98 (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Pomiar dla każdego genu i każdego stężenia lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych wykonano w trzech powtórzeniach. W celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej, dla każdego genu przy każdym pomiarze wykonywano doświadczenie qPCR dla wzorcowego cDNA o znanej ilości kopii od 10^4 do 10^9 kopii. Warunki reakcji qPCR przedstawiono w

Tab. 9. Liniję bazową oraz cykl progowy Ct wyznaczono automatycznie w oprogramowaniu Bio-Rad iQ Software 3.0 (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Wyniki zebrano i analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Chromo4™ System (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

Tab. 8 Sekwencje starterów analizowanych genów. Startery zostały przedstawione w orientacji 5' -> 3'

Analizowany gen	Sekwencje starterów <i>Forward</i> (F) i <i>Reverse</i> (R)
CDK1	F: CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC
	R: GGGTATGGTAGATCCCGGCT
DHFR	F: GCTGCTGTCATGGTTGGTTC
	R: GAGGTTGTGGTCATTCTCTGGA
ACTB	F: TCACCC AACTG TGCCCATCTACGA
	R: AGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
GADD45A1	F: AGCTGCTCAACGTAATCCACA
	R: TCATTCAGATGCCATCACCGT
GAPDH	F: AAGGTCGGAGTCAACGGATTT
	R: ACCAGAGTTAAAAGCAGCCCTG

Tab. 9 Warunki reakcji qPCR

Etap	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	10 min
Denaturacja	95°C	45 s
Wiązanie starterów	60°C	30 s
Synteza	72°C	40 s
Analiza krzywej topnienia	60°C – 95°C	10 s / 0,5°C

← x 40 cykli

4.6.6 Analiza ścieżek internalizacji

W celu wyznaczenia ścieżek internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych przez komórki HeLa i MSU 1.1 wykorzystano specyficzne inhibitory ścieżek internalizacji oraz konfokalną laserową mikroskopię skaningową.

W celu zablokowania energozależnych mechanizmów internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, komórki HeLa i MSU 1.1 inkubowano w temperaturze 4°C przez 1 h. Następnie komórki poddano inkubacji z 25 µg/ml roztworem LLCNPs wybarwionych Czerwienią Nilu w zimnym niesuplementowanym medium bez dodatku osocza przez 1 h w 4°C. Do analizy wykorzystano medium bez dodatku bydlęcej surowicy płodowej (FBS z ang. *fetal bovine serum*) by zapobiec absorpcji białek na powierzchni nanocząstek, które mogłyby wpłynąć na proces endocytozy. Po inkubacji komórki przemyto PBS i dodano medium komórkowe bez dodatku czerwieni fenolowej Fluoro Bright DMEM. Preparaty obrazowano za pomocą konfokalnej skaningowej mikroskopii laserowej.

Zbadano również wpływ różnych inhibitorów endocytozy na efektywność internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. W tym celu komórki inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C osobno z metyl-β-cyklodekstryną (2,5 mg/ml) jako inhibitor endocytozy zależnej od kaweoliny, chlorowodorkiem chlorpromazyny (5 µg/ml) jako inhibitor endocytozy zależnej od klatryn, wortmaniną (150 ng/ml) jako inhibitor makropinocytozy, nokodazolem (2,5 µg/ml) jako inhibitor polimeryzacji mikrotubul i cytochalazyną D (5 µg/ml) jako inhibitor polimeryzacji włókien F-aktyny. Następnie komórki inkubowano z roztworami 25 µg/ml lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych wybarwionych Czerwienią Nilu przez 1 h. Komórki obrazowano w identyczny sposób jak w analizie internalizacji nieenergozależnej.

W trakcie analizowania dróg internalizacji LLCNPs konfokalną skaningową mikroskopią laserową spodziewać się należy dwóch następujących sytuacji. W preparatach, w których zablokowany mechanizm internalizacji odpowiada za internalizację analizowanych LLCNPs, obraz komórki powinien przedstawiać jedynie niebieskie jądro komórkowe oraz brak lub słabsze w stosunku do kontroli sygnały czerwone i żółte pochodzące od Czerwieni Nilu. Z kolei

w preparatach, w których zablokowany przez inhibitor mechanizm internalizacji nie bierze udziału w internalizacji analizowanych LLCNPs, obraz mikroskopowy komórki powinien przedstawiać niebieskie jądro komórkowe oraz czerwone i żółte sygnały pochodzące od Czerwieni Nilu.

4.6.7 Hodowla komórek bakteryjnych

Analizę właściwości antybakteryjnych wykonano na bakterii pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* stanowiących modelowe bakterie Gram-ujemne oraz na bakterii gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* będących modelowymi bakteriami Gram-dodatnimi. W celu namnożenia bakterii, 10 ml świeżej pożywki bakteryjnej LB Broth (Lennox) zaszczepiano 5 μ l zawiesiny bakteryjnej. Tak przygotowane hodowle inkubowane były przez noc w 37°C na średnich obrotach. Przygotowane hodowle przechowywane były następnie w 4°C.

4.6.8 Wyznaczanie krzywych wzrostu bakterii

W celu określenia wpływu zoptymalizowanego układu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu domieszkowanym monolaurynianem glicerolu (GMO/GML) na bakterie *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* wyznaczono krzywe wzrostu bakterii poprzez pomiary absorbancji fali długości 620 nm, co oznaczane będzie jako gęstość optyczna OD₆₂₀. Bakterie posiano na płytki 96 dołkowe w ilości 1×10^5 bakterii po czym dodano LLCNPs w stężeniach od 5 μ g/ml do 200 μ g/ml. Ponadto na płytce przygotowano dołki zawierające pożywkę bakteryjną z nanocząstkami w odpowiednich stężeniach, które stanowiły tło. Bakterie hodowano w 37°C na płycie rotacyjnej przez 24 h. Zmianę ilości bakterii wyznaczano poprzez pomiar gęstości optycznej OD₆₂₀, która jest wprost proporcjonalna do ilości bakterii w roztworze. Pomiary wykonywano co godzinę przez 10 godzin, ostatni pomiar wykonano w 24 godzinie hodowli. Wyniki przedstawione jako krzywą opisaną na wyznaczonych punktach.

5. Wyniki i dyskusja

5.1 Synteza i opis właściwości fizykochemicznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

5.1.1 Synteza układów LLCNPs opartych na GMO i PHT

Pierwsza część pracy obejmowała syntezę lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na różnych początkowych stężeniach monooleinianu glicerolu i fitantriolu. Opierając się na wcześniejszych doniesieniach literaturowych, koloidalne dyspersje PHT 2%, PHT 20%, GMO 2% oraz GMO 20% zostały wytworzone metodą top-down, poprzez homogenizację mieszanin lipidów, surfaktantu i wody za pomocą ultradźwięków. Uzyskane dyspersje były mlecznobiałymi, nieprzezroczystymi cieczami. Wśród otrzymanych układów, właściwościami makroskopowymi odróżniał się GMO 20%, przyjmując postać agregatu o wysokiej lepkości. Nieprzezroczystość dyspersji nanoukładów lipidowych może wstępnie świadczyć o obecności struktur o wewnętrznej symetrii kubicznej [182,183]. Dyspersje liposomów są zazwyczaj roztworami transparentnymi, zaś w gdy w dyspersji obecne są struktur o złożonej budowie wewnętrznej, takie jak LLCNPs, światło przechodzące przez roztwór jest bardziej rozproszone, w wyniku czego zmniejsza się ich przezroczystość.

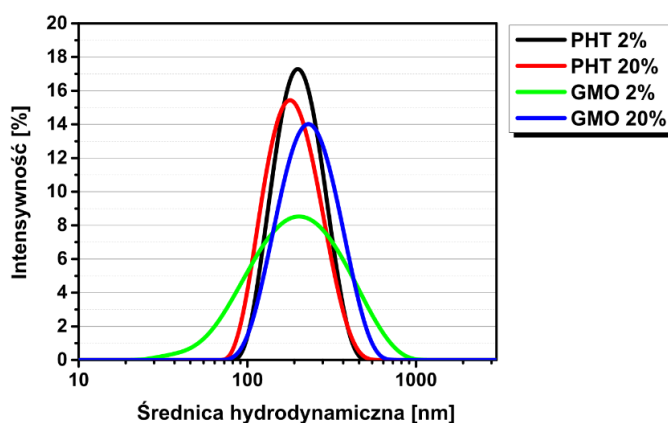
Podjęcie top-down jest szeroko stosowaną metodą do fabrykacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. Mathews i wsp. [184] badali właściwości wodnych dyspersji LLCNPs opartych na GMO przygotowanych na drodze rozpuszczenia lipidu z Pluronikiem F127 w chloroformie, wytworzenia lipidowego filmu przez liofilizację, rehydratację uzyskanej struktury i ostatecznie homogenizację za pomocą sonikacji, otrzymując kubiczne struktury o symetrii $Im3m$, symetrii heksagonalnej H_{II} oraz prekursorzy fazy kubicznej. Podobne podejście zastosowali Barriga i wsp. [185] dodając przed sonikacją etap homogenizacji poprzez cykliczne zamrażanie i roztapianie próbek w zakresie temperatur od $-196^{\circ}C$ do $60^{\circ}C$, również uzyskując lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne o wewnętrznej symetrii $Im3m$. Lai i wsp. [186] z kolei za pomocą podejścia top-down, poprzez homogenizację ultradźwiękami przygotowali lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na fitantriolu jako nośniki polimyksyny B otrzymując struktury kubiczne $Pn3m$ oraz $Ia3d$. Zastosowanie sonikacji do fabrykacji LLCNPs opartych na fitantriolu przedstawili także Chang i wsp. [187], otrzymując struktury o kubicznej symetrii $Pn3m$.

5.1.2 Stabilność układów lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

Średnica hydrodynamiczna otrzymanych nanocząstek, stabilność układów określoną jako stałość wartości średnicy hydrodynamicznej w czasie oraz potencjał zeta określone zostały za pomocą technik DLS/ELS. Nanocząstki w preparatach opartych na fitantriolu posiadały średnice $210,0 \pm 1,3$ nm i $196,6 \pm 1,0$ nm kolejno dla PHT 2% i PHT 20% (Ryc. 36). Otrzymane rozkłady wielkości nanocząstek oraz współczynniki polidispersyjności PDI świadczą o monomodalnym charakterze otrzymanych roztworów. Preparaty wykazywały się stabilnością w okresie 60 dni od syntezy, o czym świadczy nie ulegająca zmianie średnica hydrodynamiczna nanocząstek. Podobne rezultaty otrzymali Del Valle Bessone i wsp. [188], których lipidowe

nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na fitantriolu miały średnicę $215,3 \pm 6,6$ nm i wykazywały wysoką stabilność przez okres 30 dni. Z kolei badane przez Malheiros i wsp. [189] lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na fitantriolu osiągały dużo większe średnice hydrodynamiczne, wynoszące 411 ± 11 nm. Różnica ta może wynikać z wykorzystania podejścia bottom-up do syntezy dyspersji nanocząstek.

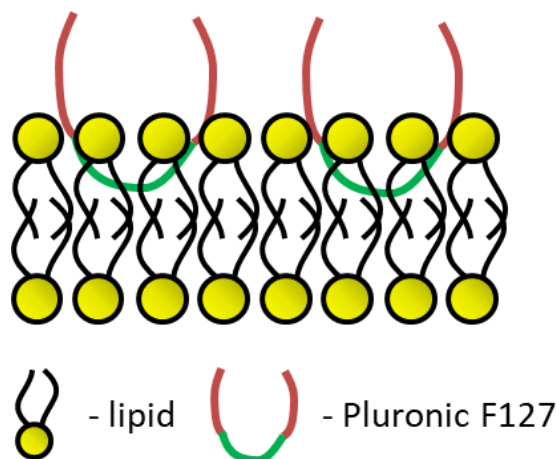
Podobnie jak w przypadku LLCNPs opartych na fitantriolu, w okresie 60 dni rozkład wielkości nanocząstek opartych na monooleinianie glicerolu nie uległ dużym zmianom, co świadczy o otrzymaniu stabilnych dyspersji. LLCNPs oparte na monooleinianie glicerolu były nieznacznie większe od tych opartych na fitantriolu, przyjmując średnice hydrodynamiczne $226,7 \pm 8,0$ nm oraz $243,1 \pm 9,9$ nm kolejno dla GMO 2% i GMO 20% (Ryc. 36). Większy rozmiar nanocząstek opartych na GMO może wynikać z efektów sterycznych. W związku z obecnością wiązania podwójnego w łańcuchu węglowym monooleinianu glicerolu, część hydrofobowa zajmuje większą przestrzeń niż w przypadku fitantriolu.



Ryc. 36 Rozkład wielkości lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO i PHT.

Jabłonowska i wsp. [190], również badający lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na monooleinianie glicerolu i fitantriolu, otrzymali z kolei rezultat odwrotny, uzyskując średnice hydrodynamiczne wynoszące 170,16 nm dla GMO i 215,00 nm dla PHT. Rozbieżność ta może wynikać z rodzaju zastosowanego surfaktantu, który w przypadku Jabłonowskiej i wsp. stanowił Pluronic F108.

Dla wszystkich zsyntetyzowanych nanocząstek ładunek powierzchniowy przyjmował wartości ujemne i mieścił się w zakresie $-15,2 \pm 0,5$ mV dla GMO 2% do $-24,3 \pm 1,0$ mV dla PHT 20%. Ujemny ładunek powierzchniowy lipidowych nanocząstek ciekłokrystaliczny jest efektem używanego surfaktantu powierzchniowego Pluronicu F127. Pluronic F127 jest triblokowym kopolimerem składającym się z dwóch bloków hydrofilowych flankujących blok hydrofobowy. W trakcie syntezy nanocząstek, część hydrofobowa zostaje zakotwiczona w hydrofobową część dwuwarstwy lipidowej, pozostawiając na powierzchni dwuwarstwy polarne części hydrofilowe, nadające ujemny ładunek powierzchniowy nanocząstek (Ryc. 37) [100].



Ryc. 37 Schematyczne przedstawienie zakotwiczenia Pluronicu F127 w dwuwarstwą lipidową. Czerwone części surfaktantu są blokami hydrofilowymi, zaś zielone hydrofobowymi.

Zbliżone wartości ładunku powierzchniowego otrzymali Fornasier i wsp. [191], otrzymując lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na fitantriolu i stabilizowane Pluronicem F217, których ładunek powierzchniowy wyniósł $-25,0 \pm 1,0$ mV. Wu i wsp. [192], którzy analizowali LLCNPs oparte na monooleinianie glicerolu stabilizowane Pluronicem F127 wykazali ładunek powierzchniowy otrzymanych nanocząstek na poziomie $-16,7 \pm 3,0$ mV. Wytworzone przez Caltagirone i wsp. [29] lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na monooleinianie glicerolu i stabilizowane Pluronicem F108 osiągały zeta potencjał wynoszący $-28,0 \pm 2,0$ mV.

5.1.3 Analiza strukturalna LLCNPs opartych o GMO i PHT

Za pomocą analiz SAXS wyznaczone zostały krzywe rozpraszania. Strukturę krystaliczną lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych można określić na podstawie krzywych rozpraszania SAXS. Każdą mezofazę charakteryzuje określony szereg odwrotności odległości międzyplaszczynowych, $1/d$, (Tab. 10), który znaleźć można analizując pozycje maksimum w widmach rozproszeniowych SAXS. Odległość międzyplaszczynowa definiowana jest jako:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (55)$$

gdzie d – odległość międzyplaszczynowa, q – wektor falowy odpowiadający maksimum w krzywej rozpraszania.

Tab. 10 Charakterystyczne szeregi odwrotności odległości międzypłaszczyznowych dla określonych faz krystalicznych w lipidowych nanocząstkach ciekłokrystalicznych.

Mezofaza	Szeregi wartości $\frac{1}{d}$ charakterystyczny dla określonej mezofazy
Lamelarna	$\frac{1}{d} = 1, 2, 3, \dots$
Kubiczna Pn3m	$\frac{1}{d} = \sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{6}, \dots$
Kubiczna Ia3d	$\frac{1}{d} = \sqrt{6}, \sqrt{8}, \sqrt{14}, \sqrt{16}, \dots$
Kubiczna Im3m	$\frac{1}{d} = \sqrt{2}, \sqrt{4}, \sqrt{6}, \sqrt{8}, \dots$
Kubiczna Pm3n	$\frac{1}{d} = \sqrt{2}, \sqrt{4}, \sqrt{5}, \sqrt{6}, \dots$
Heksagonalna H _{II}	$\frac{1}{d} = \frac{4}{3}, \frac{4\sqrt{3}}{3}, \frac{8}{3}, \frac{4\sqrt{6}}{3}, \dots$

Znając odległości międzypłaszczyznowe, d , oraz odpowiadające im wartości wektorów rozpraszania, q , możliwe jest wyznaczenie stałej sieci krystalicznej, a , korzystając ze wzoru:

$$q = \frac{a}{d} \quad (56)$$

Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne charakteryzuje obecność nieprzecinających się kanałów wodnych. Średnicę kanałów wodnych w LLCNPs definiowana jest jako [193]:

$$r_{kw} = a \left(-\frac{A_0}{-2\pi\chi} \right)^{\frac{1}{2}} - l \quad (57)$$

gdzie a – stała sieci krystalicznej, A_0 – charakterystyka Eulera-Poincarego, χ – stosunek pola powierzchni minimalnej do objętości komórki elementarnej podniesionej do potęgi $\frac{2}{3}$, l – długość łańcucha węglowego lipidu.

Dla fazy Pn3m $A_0 = -1,919$, zaś $\chi = -2$, zaś dla fazy Ia3d $A_0 = -1,919$, zaś $\chi = -8$. Wiele badań wykazało, że długość łańcucha l w fazach kubicznych jest zależna jedynie od temperatury. Wartość tę można wyznaczyć w przybliżeniu wykorzystując [15]:

$$l = 18,7e^{-0,0026T} \quad (58)$$

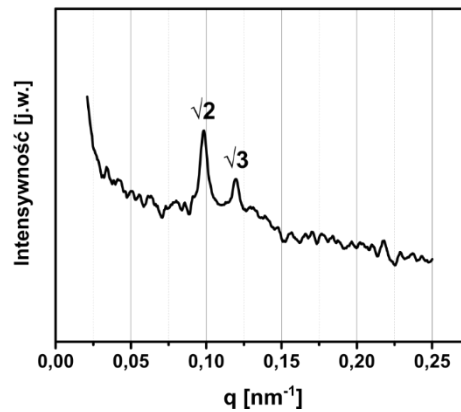
gdzie T – temperatura wyrażona w °C.

Z analizy SAXS możliwe jest również wyznaczenie ułamka objętościowego wody w LLCNPs za pomocą wzoru [15]:

$$\phi_w = 1 - \left(2A_0 \left(\frac{l}{a} \right) + \frac{4\pi\chi}{3} \left(\frac{l}{a} \right)^3 \right) \quad (59)$$

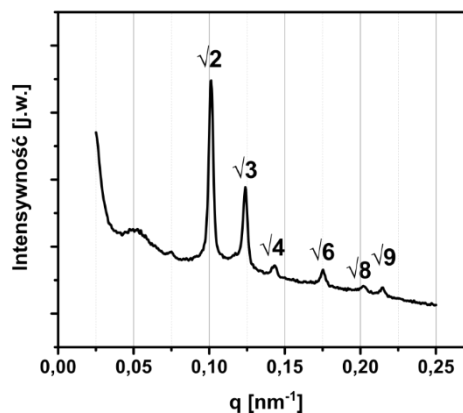
gdzie ϕ_w – ułamek objętościowy wody.

Stosunek refleksów zaobserwowanych dla układów GMO 2% świadczy o obecności struktury kubicznej Pn3m (Ryc. 38). Obliczona stała sieci krystalicznej dla badanego układu wynosi 9,07 nm. Średnica kanałów wodnych w obserwowanych strukturach wynosi 1,77 nm. Ułamek objętościowy wody wyniósł 0,31.



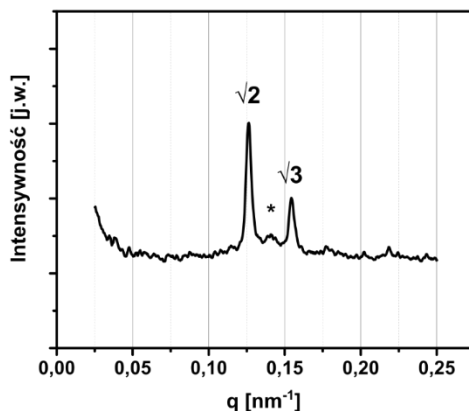
Ryc. 38 Krzywa rozpraszania SAXS dla GMO 2%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.

Dla GMO 20% również zaobserwowano strukturę kubiczną Pn3m z stałą krystaliczną o stałej sieci krystalicznej wynoszącej 8,72 nm i średnicy kanałów wodnych równej 1,66 nm (Ryc. 39). Ułamek objętościowy wody wyniósł 0,29.



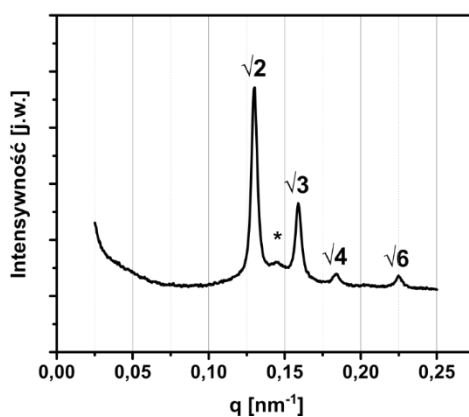
Ryc. 39 Krzywa rozpraszania SAXS dla GMO 20%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.

Analiza SAXS dla nanocząstek PHT 2% wykazała strukturę kubiczną o symetrii Pn3m (Ryc. 40). Stała sieci krystalicznej dla PHT 2% wyniosła 7,03 nm z średnicą kanałów wodnych wynoszącą 0,98 nm. Ułamek objętościowy wody dla preparatów PHT 2% wyniósł 0,16.



Ryc. 40 Krzywa rozpraszania SAXS dla PHT 2%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C. Refleks oznaczony * może być charakterystyczny dla liposomów.

Także dla PHT 20% zaobserwowano symetrię Pn3m z stałą sieci krystalicznej wynoszącą 6,88 nm i z kanałami wodnymi o średnicy 0,90 nm (Ryc. 41). Ułamek objętościowy wody dla PHT 20% został wyznaczony na 0,15. Ponadto w przypadku obu układów opartych o PHT zaobserwowano dodatkowy refleks przy $q = 0,15$ nm⁻¹, oznaczony na Ryc. 41 asteryskiem, który może świadczyć o obecności w układzie liposomów [194].



Ryc. 41 Krzywa rozpraszania SAXS dla PHT 20%. Pomiary wykonane w temperaturze 20°C.

Podsumowanie wszystkich rezultatów analizy strukturalnej SAXS przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 11).

Tab. 11 Podsumowanie analizy strukturalnej SAXS dla LLCNPs GMO 2%, GMO 20%, PHT 2% i PHT 20%.

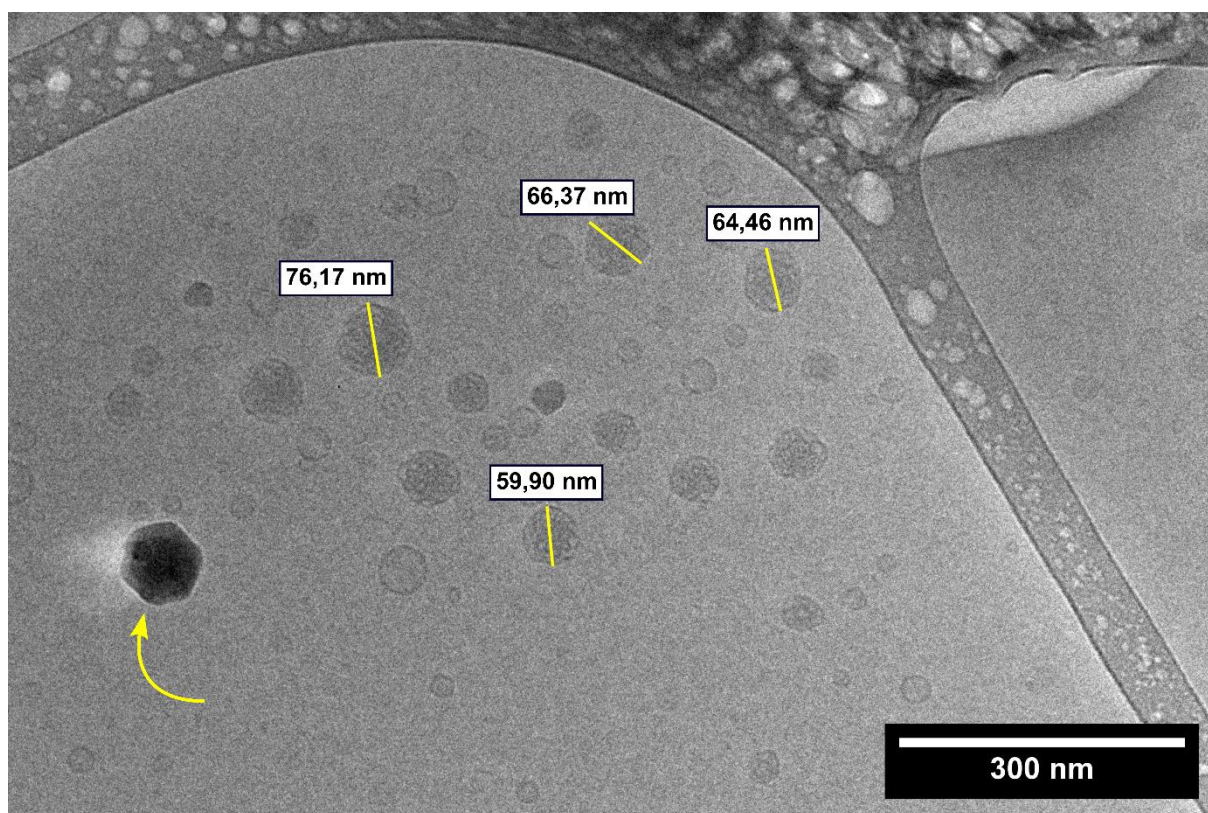
	Struktura krystaliczna	a [nm]	r_{kw} [nm]	ϕ_w
GMO 2%	Pn3m	9,07	1,77	0,31
GMO 20%	Pn3m	8,72	1,66	0,29
PHT 2%	Pn3m i lamelarna	7,03	0,98	0,16
PHT 20%	Pn3m i lamelarna	6,88	0,90	0,15

Uzyskane rezultaty są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami. Kluzek i wsp. [195] uzyskali LLCNPs oparte na GMO i stabilizowane Pluronikiem F127 o symetrii Ia3d, o stałej sieci krystalicznej 13,7 nm, średnicą kanałów wodnych wynoszącą 2,58 nm i ułamkiem objętościowym wody równym 0,45 w pH 5,5 i stałą sieci krystalicznej wynoszącą 13,9 nm, średnicą kanałów wodnych na poziomie 2,50 nm i ułamkiem objętościowym wody 0,43 w pH 7,5. Różnice między przedstawionymi rezultatami, a wynikami uzyskanymi przez Kluzeka i wsp. mogą wynikać z zastosowanej metody preparacji nanocząstek, którą w tym przypadku była metoda hydrotropowa bottom-up. Younus i wsp. [196] przedstawili LLCNPs oparte o fitantriol stabilizowane Pluronikiem F127. Uzyskane przez autorów nanocząstki wykazywały kubiczną symetrię Pn3m. Stała sieci krystalicznej w uzyskanych strukturach wynosiła 7,15 nm. Podstawiając zaobserwowaną przez autorów stałą sieci krystalicznej do przedstawionych wcześniej wzorów, wykazać można, że średnica kanałów wodnych w przedstawionych strukturach wyniosła 1,04 nm zaś ułamek objętościowy wody 0,18. Podobne rezultaty przedstawione zostały przez Donga i wsp. [197]. Przedstawione przez tych autorów lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte o PHT stabilizowane 0,7% masowymi Pluroniku F127 względem całkowitej masy lipidu wykazywały wewnętrzną kubiczną symetrię typu Pn3m. Stała sieci krystalicznej uzyskanych nanocząstek wynosiła 6,84 nm, stała sieci krystalicznej była równa 0,92 nm, zaś ułamek objętościowy wody 0,16. W tej samej pracy autorzy porównali również strukturę nanocząstek opartych na PHT z LLCNPs opartymi o GMO. Przedstawione przez autorów LLCNPs stabilizowane dodatkiem Pluroniku F127 (2% całkowitej masy lipidów) charakteryzowały się kubiczną symetrią typu Ia3d. Stała sieci krystalicznej w uzyskanych układach wynosiła 12,83 nm, średnica kanałów wodnych 1,43 nm, zaś ułamek objętościowy wody wyniósł 0,24. Powyższe wyniki jak i wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, iż lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na monooleinianie glicerolu są strukturami większymi w stosunku do nanocząstek opartych na fitantriolu. W konsekwencji nanocząstki oparte o GMO charakteryzują się większymi kanałami wodnymi i większą objętością wody zawartą w strukturach. Taki stan rzeczy może wynikać bezpośrednio ze struktury monooleinianu glicerolu i fitantriolu. W przypadku GMO, w łańcuchu węglowym obecne jest wiązanie podwójne sprawiające, iż część hydrofobowa lipidu zajmuje większą objętość niż w przypadku fitantriolu. W efekcie, w trakcie samoorganizacji, cząstki GMO są luźniej upakowane w strukturze lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, prowadząc do powstania międzycząsteczkowych obszarów o większym przekroju poprzecznym, a w efekcie do utworzenia większej przestrzeni dla cząstek wody, które znajdują się w kanałach. Na

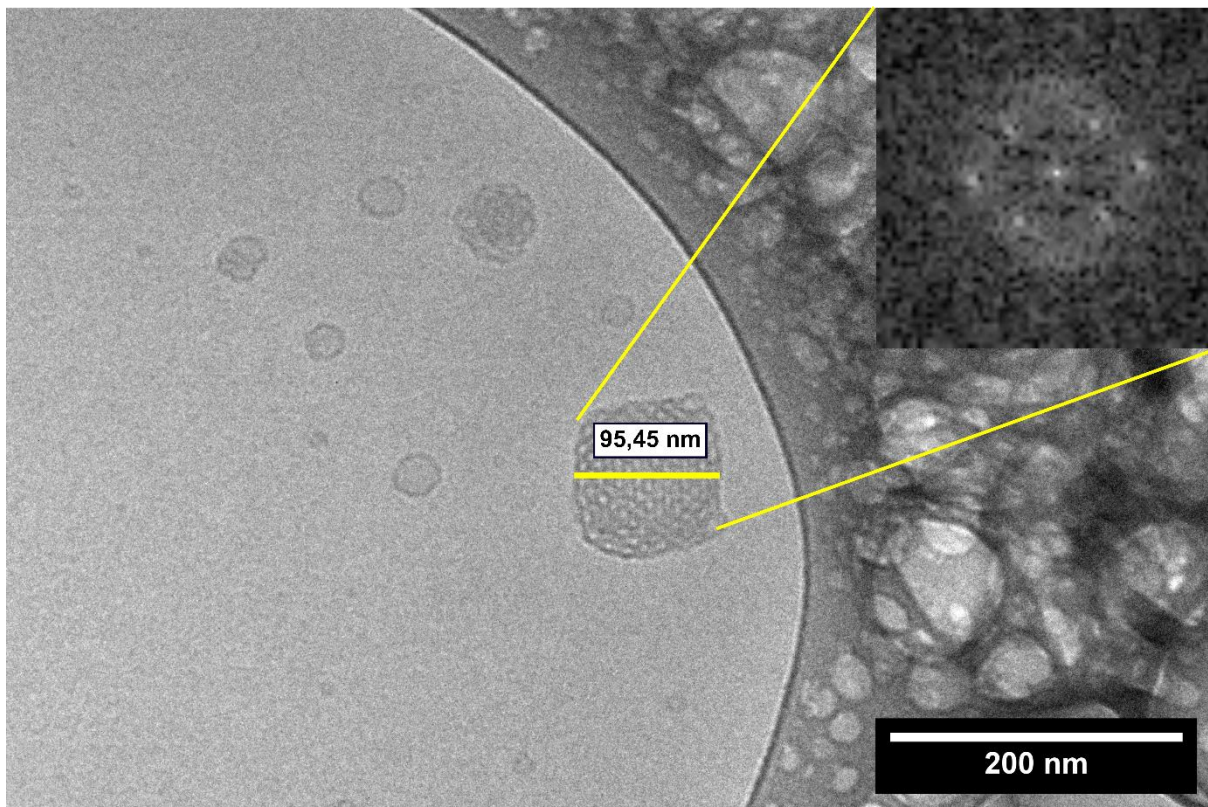
podstawie autorskich wyników oraz przeglądu literatury, można wysnuć wniosek, iż do zastosowań biomedycznych, lepszymi nośnikami leków i środków kontrastujących powinny być układy oparte na GMO, posiadające więcej wewnętrznej przestrzeni do inkorporacji pożądanych czynników.

5.1.4 Obrazowanie struktur ciekłokrystalicznych za pomocą kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej

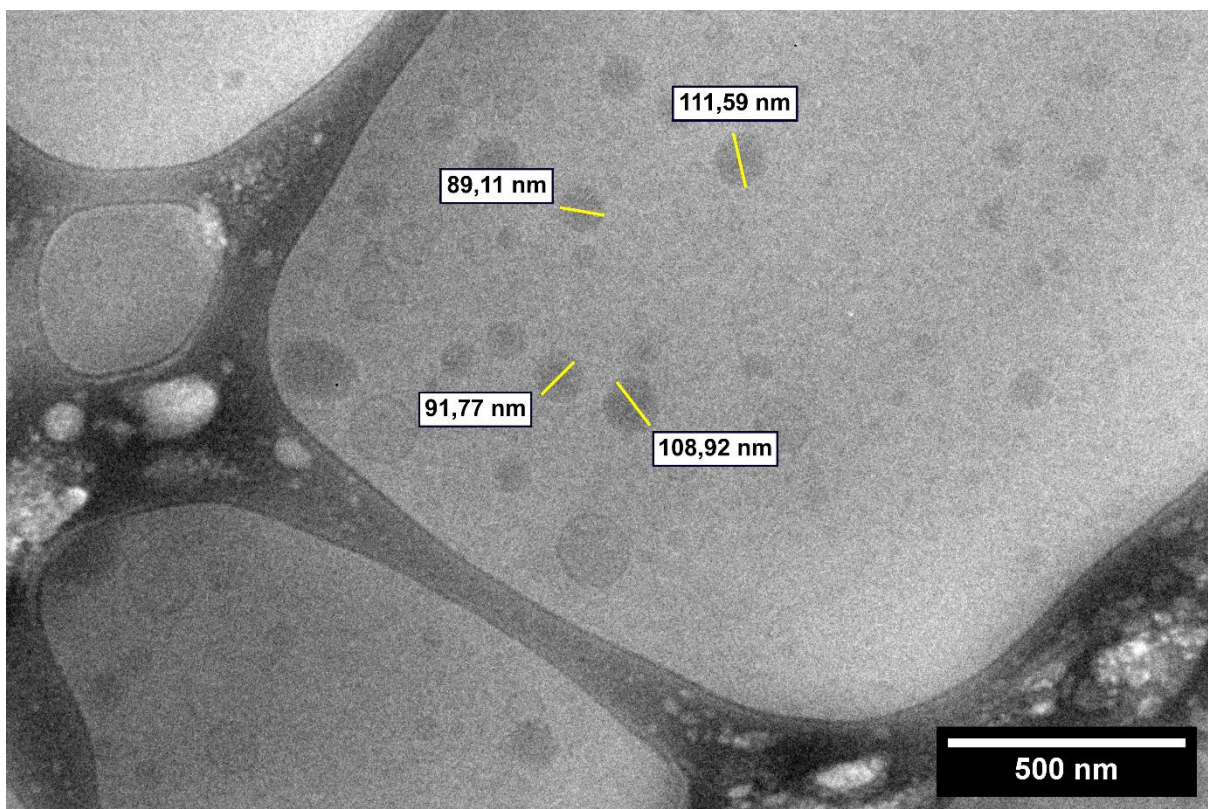
Wykazanie obecności struktur krystalicznych oraz określenie rozmiaru badanych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych dokonano za pomocą kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Ryc. 42 - Ryc. 46). W trakcie obrazowania TEM układów opartych na monooleinie glicerolu jak i na fitantriolu, poza kubicznymi i heksagonalnymi strukturami ciekłokrystalicznymi (Ryc. 43), zaobserwowano również liposomy (Ryc. 42 - Ryc. 44). Taka heterogenność faz w wytworzonych dyspersjach może wynikać ze stosowania dużych sił ścinających w trakcie syntezy top-down, które rozbijają struktury ciekłokrystaliczne do niestabilnych, małych pęcherzyków lipidowych mogących agregować do większych cząstek [198]. Homogenność nanocząstek oraz stabilność koloidów można zwiększyć poprzez stosowanie cyklicznego ogrzewania i chłodzenia próbek po syntezie [199]. Liposomy są termicznie mniej stabilne od struktur ciekłokrystalicznych, w związku z czym w trakcie zwiększania temperatury liposomy rozpadają się do monomerów, aby następnie w trakcie ochładzania samoorganizować się do struktur ciekłokrystalicznych [198].



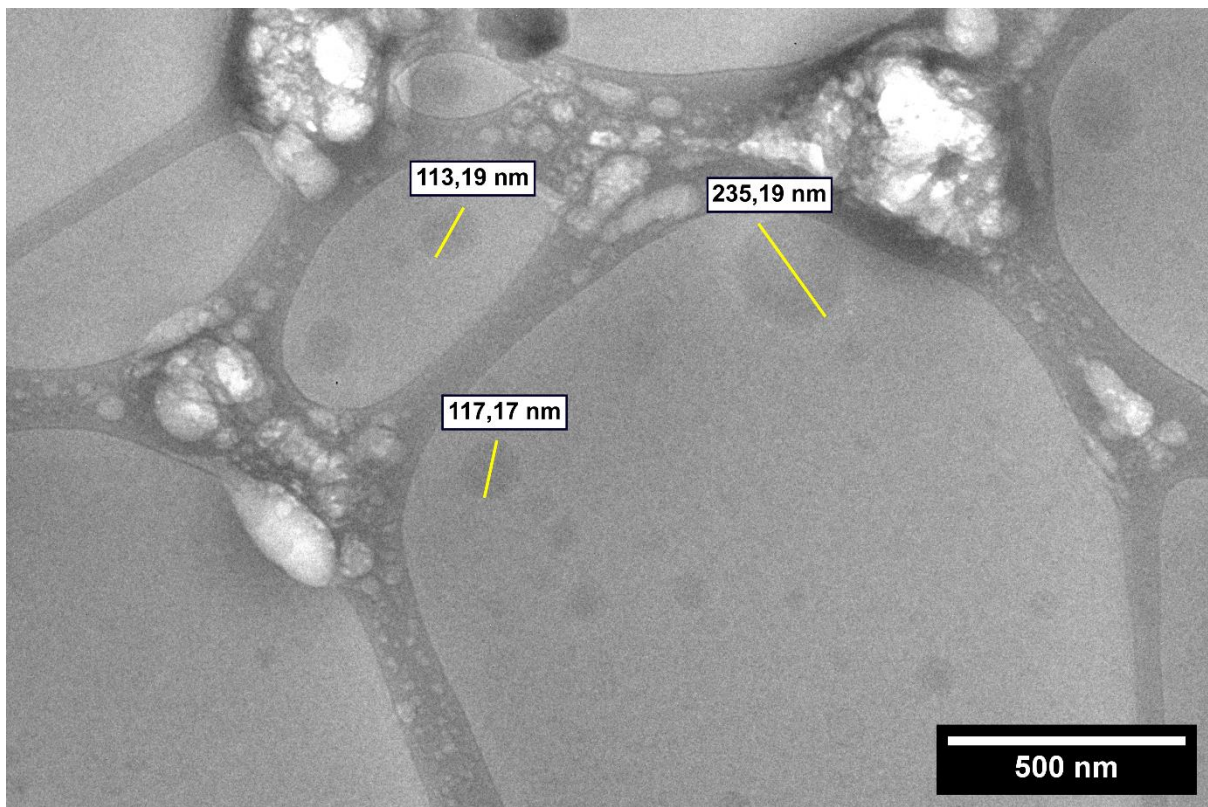
Ryc. 42 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% wykonany w celu oszacowania ich rozmiaru. Strzałką został wyróżniony kryształ lodu powstający w trakcie pomiaru w wyniku topienia się próbki i ponownego zamrażania.



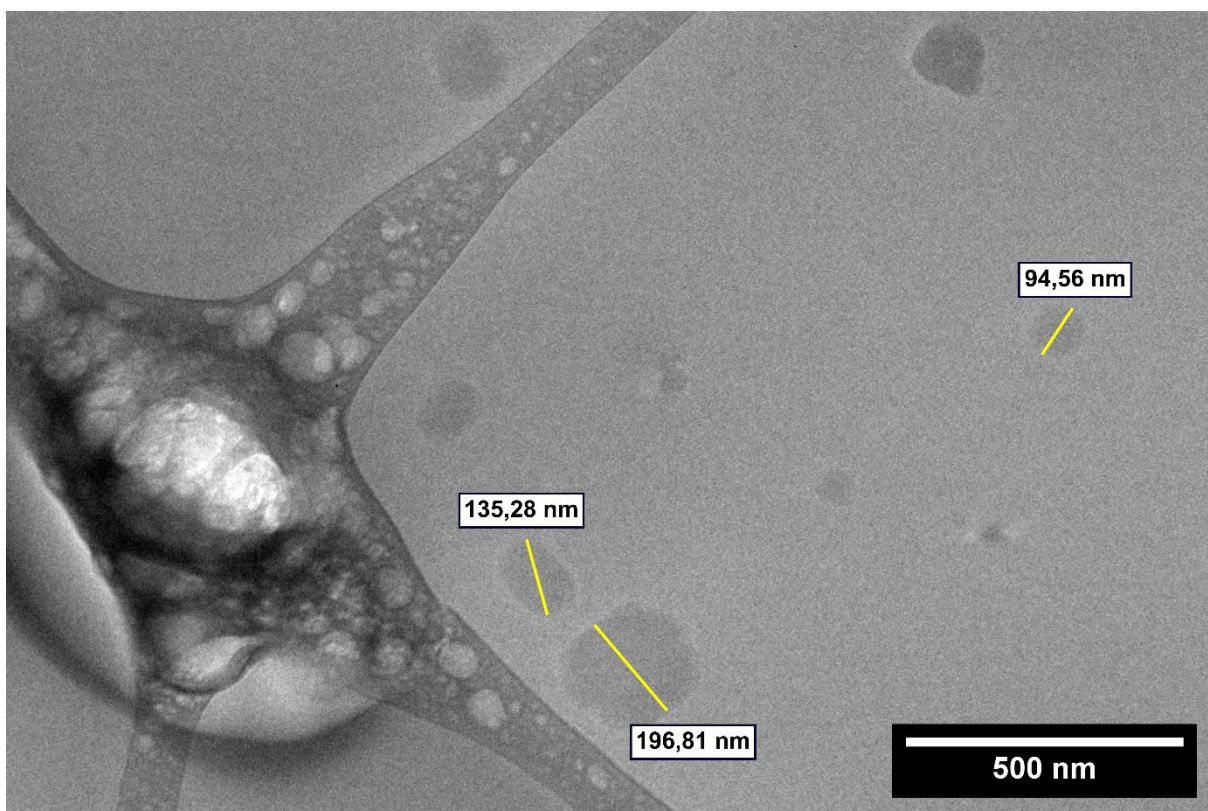
Ryc. 43 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% wykonany w celu określenia symetrii fazy ciekłokrystalicznej. W prawym górnym rogu przedstawiono wynik transformaty Fouriera, wskazujący na kubiczny charakter nanocząstki.



Ryc. 44 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 20%.



Ryc. 45 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 20%.



Ryc. 46 Mikrograf TEM lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych PHT 2%.

Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa jest szeroko stosowaną metodą obrazowania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, ponieważ pozwala na zachowanie krystalicznej struktury nanocząstek. Powyższa metoda została z powodzeniem wykorzystana m.in. przez Caltagirone i wsp. [29] do obrazowania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o GMO stabilizowanych Pluronikiem F108. Yang i wsp. [200] za pomocą cryo-TEM uzyskali mikrografie LLCNPs opartych o PHT stabilizowanych Pluronikiem F127. Obrazowanie cryo-TEM, dzięki zastosowaniu szybkiej transformacji Fouriera na uzyskanych obrazach pozwala określić również mezofazę obserwowanej struktury oraz wartość stałej sieci krystalicznej. Przykładowa szybka transformacja Fouriera została przedstawiona na Ryc. 43. Kluzek i wsp. [195] wskazali na zgodność wartości stałej sieci krystalicznej LLCNPs opartych na GMO określonych na podstawie analizy SAXS i szybkiej transformacji Fouriera obrazów cryo-TEM. Podobne wyniki uzyskano w przedstawionej pracy doktorskiej. Malheiros i wsp. [201] wskazali na podobną zgodność stałych sieci krystalicznej otrzymanych za pomocą analizy SAXS i zastosowaniu szybkiej transformacji Fouriera mikrografów cryo-TEM w LLCNPs opartych o PHT.

5.1.5 Optymalizacja warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO/GML

Kolejnym etapem badań wykonanych w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej była optymalizacja warunków syntezy nowych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o monooleinian glicerolu (GMO) domieszkowanych monolaurynianem glicerolu (GML). Bazując na przedstawionych wcześniej wynikach, świadczących o wysokiej stabilności i wykazujących wewnętrzną symetrię kubiczną układów opartych o GMO, podjęto próbę dodania do systemu monolaurynianu glicerolu, próbując zachować ciekłokrystaliczny charakter nanocząstek. Jednocześnie celem dodania do badanego systemu GML było nadanie mu właściwości antybakteryjnych, które przypisywane są ww. lipidowy.

W celu wyznaczenia optymalnych warunków syntezy, tj. maksymalnej masy GML (określanej w przedstawionych wzorach jako A) i minimalnej masy F127 (określanej w przedstawionych wzorach jako B) przy zachowaniu średnicy hydrodynamicznej w zakresie 117,0 – 154,2 nm, PDI w zakresie 0,135 – 0,168 oraz przy minimalnej wartości zeta potencjału i maksymalnej wartości OD_{660} lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu domieszkowanych monolaurynianem glicerolu i stabilizowanych Pluronikiem F127, zastosowano pełny dwupoziomowy plan czynnikowy rozszerzony do centralnego planu kompozycyjnego.

Wartości średnicy hydrodynamicznej nanocząstek, współczynnika polidispersji, potencjału powierzchniowego zeta oraz gęstości optycznej OD_{660} zmierzone w ramach pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego przedstawiono w Tab. 12.

Tab. 12 Wartości wyjściowe średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidispersji, potencjału powierzchniowego zeta oraz gęstości optycznej OD₆₆₀ zmierzone w ramach pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego.

Lp.	Średnica hydrodynamiczna [nm]	PDI	Potencjał zeta [mv]	OD ₆₆₀
1	137,2	0,138	-30,4	0,316
2	139,2	0,147	-27,3	0,368
3	141,2	0,137	-26,0	0,331
4	139,7	0,052	-27,5	0,234
5	143,7	0,077	-27,9	0,284
6	153,2	0,076	-24,8	0,343
7	126,3	0,157	-25,9	0,188
8	127,0	0,159	-25,4	0,189
9	134,7	0,155	-24,8	0,236
10	120,4	0,118	-29,5	0,148
11	124,2	0,155	-26,4	0,152
12	123,5	0,139	-23,3	0,140

Wartości wyjściowe dla wymienionych wyżej parametrów zmierzone w ramach centralnego planu kompozycyjnego przedstawiono w Tab. 13.

Tab. 13 Wartości wyjściowe średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidispersji, potencjału powierzchniowego zeta oraz gęstości optycznej OD₆₆₀ zmierzone w ramach centralnego planu kompozycyjnego.

Lp.	Średnica hydrodynamiczna [nm]	PDI	Potencjał zeta [mv]	OD ₆₆₀
13	127,5	0,165	-29,2	0,188
14	131,9	0,164	-30,3	0,246
15	140,0	0,162	-24,8	0,327
16	135,4	0,049	-28,7	0,180
17	127,6	0,063	-25,6	0,103
18	150,4	0,067	-25,1	0,255
19	137,6	0,106	-30,1	0,389
20	142,7	0,081	-28,2	0,321
21	154,2	0,110	-29,0	0,452
22	117,0	0,155	-25,7	0,132
23	120,2	0,168	-25,2	0,15
24	124,2	0,146	-26,4	0,177
25	129,4	0,142	-28,2	0,255
26	128,1	0,135	-29,3	0,228
27	128,3	0,126	-27,7	0,190

5.1.5.1 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na średnicę hydrodynamiczną LLCNPs GMO/GML

Uzyskane wyniki dla średnicy hydrodynamicznej układów GMO/GML poddane zostały analizie regresji liniowej w celu wyznaczenia statystycznie istotnych na zmianę średnicy hydrodynamicznej czynników oraz wyznaczenia wzoru opisującego zmianę średnicy hydrodynamicznej w funkcji wyznaczonych czynników. Analiza ANOVA (Tab. 14) wykazała, iż zmianę średnicy hydrodynamicznej w badanym zakresie wartości zmiennych zależnych opisuje wzór:

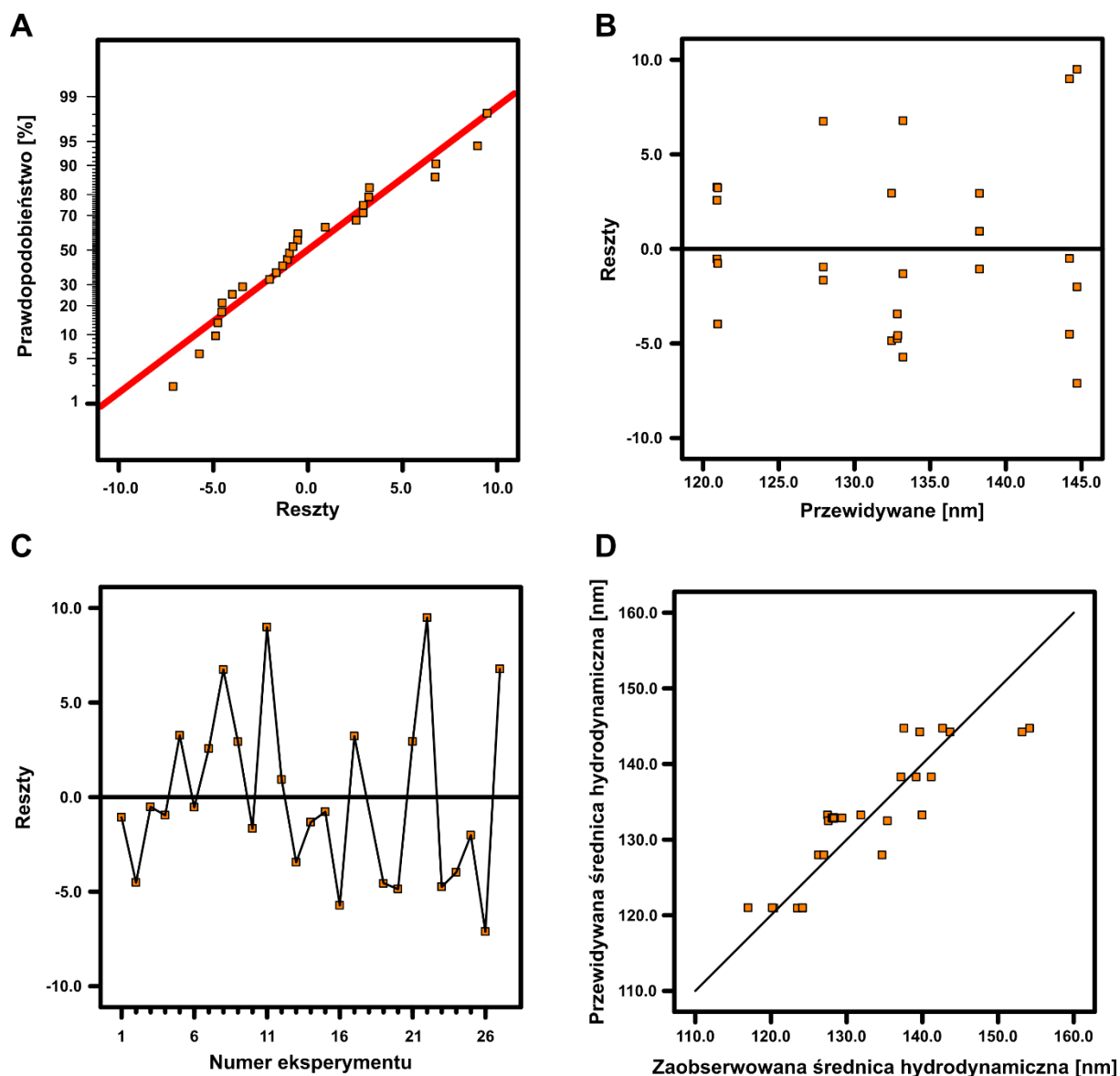
$$d = 129,67 + 6,30 * A + 1,77 * B - 2,88 * AB \quad (60)$$

gdzie d – średnica hydrodynamiczna nanocząstek, A – masa GML, B – masa F127.

Tab. 14 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.

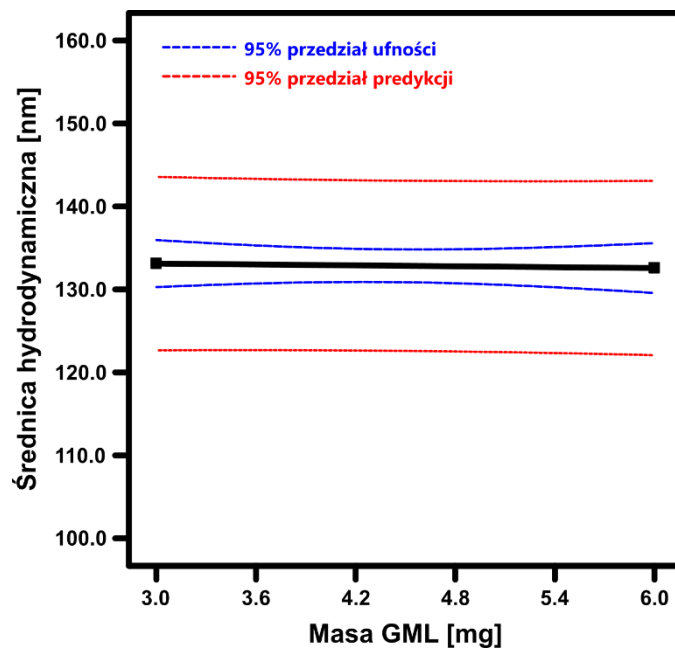
Źródło zmienności	Suma kwadratów	df	Średnia suma kwadratów	Wartość testu F	Poziom prawdopodobieństwa p	
Model	1819.07	3	606.36	25.76	< 0.0001	istotne statystycznie
A – masa GML	1.59	1	1.59	0.0675	0.7974	
B – masa F127	1691.38	1	1691.38	71.86	< 0.0001	
AB	126.1	1	126.1	5.36	0.0304	
Reszty	517.81	22	23.54			
Brak dopasowania	79.58	5	15.92	0.6174	0.6883	nieistotne statystycznie
Czysty błąd	438.23	17	25.78			
Całkowita	2336.88	25				

Poprawność wykonanych pomiarów średnicy hydrodynamicznej wykazano za pomocą szczegółowej diagnostyki. otrzymanych wyników. Ryc. 47 A potwierdza normalny rozkład wartości resztowych. Ryc. 47 B potwierdza niezmiennosc wariancji w uzyskanych wynikach. Losowy rozkład punktów w Ryc. 48 C świadczy o braku istotnego wpływu zmiennych zakłócających na uzyskane wyniki. Wykres Ryc. 48 D przedstawia zależność między wielkościami przewidywanymi przez równanie (60) a wielkościami zaobserwowanymi.

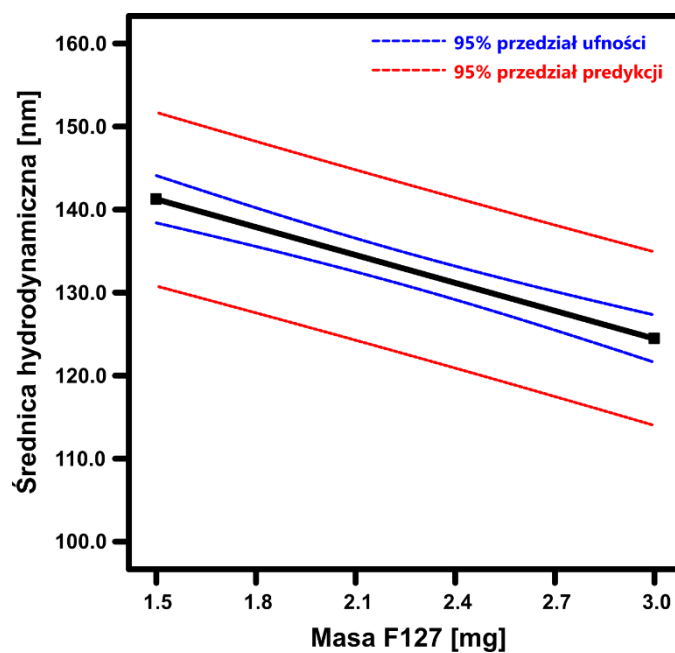


Ryc. 47 Diagnostyka modelu regresji liniowej średnicy hydrodynamicznej. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML C – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML od wartości zaobserwowanych.

Wartości przewidywane średnicy hydrodynamiczną LLCNPs w funkcji masy GML i masy F127 przedstawiono kolejno na wykresach Ryc. 48 oraz Ryc. 49.

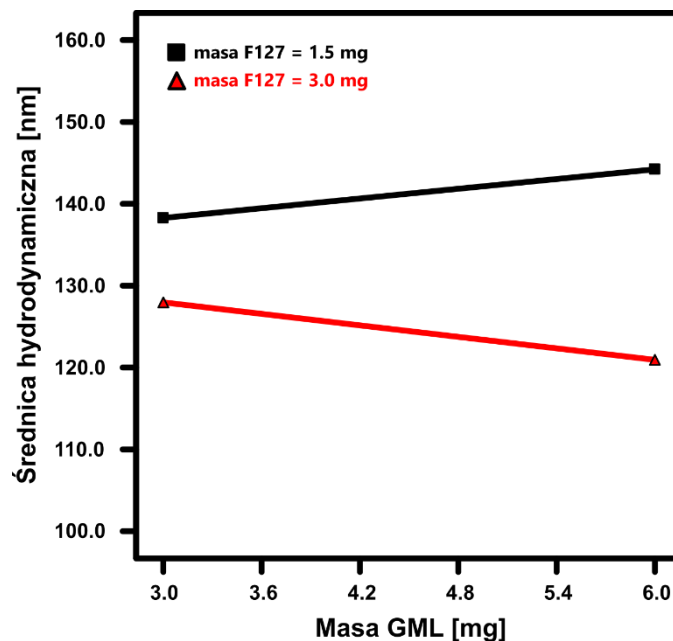


Ryc. 48 Wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML w funkcji masy GML dla masy F127 = 2,25 mg.



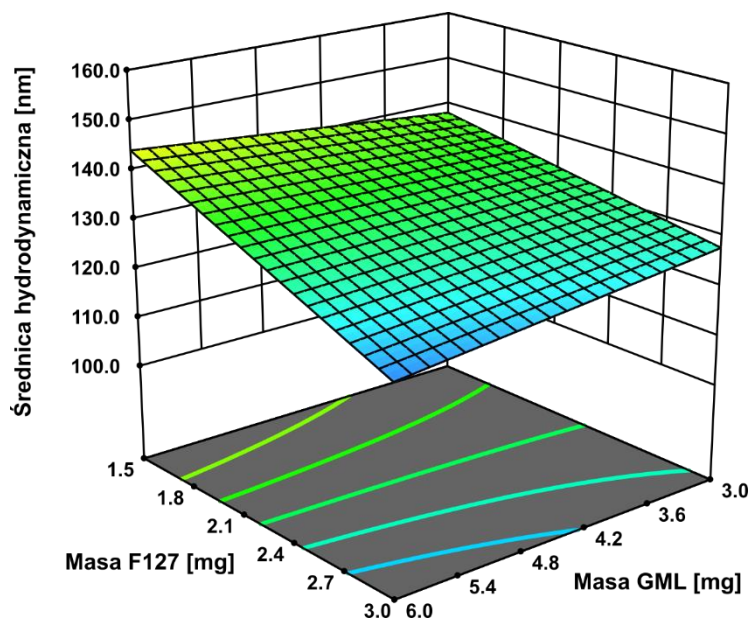
Ryc. 49 Wykres zależności przewidywanych wartości średnicy hydrodynamicznej LLCNPs GMO/GML w funkcji masy F127 dla masy GML = 4,5 mg.

Analiza regresji liniowej wykazała obecność interakcji pomiędzy analizowanymi zmiennymi niezależnymi, tzn. odmiennego wpływu jednego z kontrolowanych czynników na średnicę hydrodynamiczną w zależności od wielkości drugiego kontrolowanego czynnika (Ryc. 50).



Ryc. 50 Wykres interakcji pomiędzy masą GML i masą F127 oraz ich wpływ na przewidywaną średnicę hydrodynamiczną LLCNPs GMO/GML.

Wykazany wpływ masy GML i masy F127 na średnicę hydrodynamiczną LLCNPs GMO/GML przedstawiono ostatecznie za pomocą płaszczyzny odpowiedzi (Ryc. 51).



Ryc. 51 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę średnicy hydrodynamicznej LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.

5.1.5.2 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na PDI LLCNPs GMO/GML

W celu określenia, które z zmiennych zależnych (masa GML, masa F127) mają statystycznie istotny wpływ na zmianę współczynnika polidispersji, oraz w celu wyznaczenia równania opisującego zmianę współczynnika polidispersji w funkcji określonych wcześniej zmiennych, wykonano analizę regresji liniowej. Analiza regresji liniowej wraz z analizą wariancji ANOVA

dla współczynnika polidispersyjności (Tab. 15) wykazały, iż współczynnik polidispersji w badanym zakresie wartości zmiennych zależnych opisuje wzór:

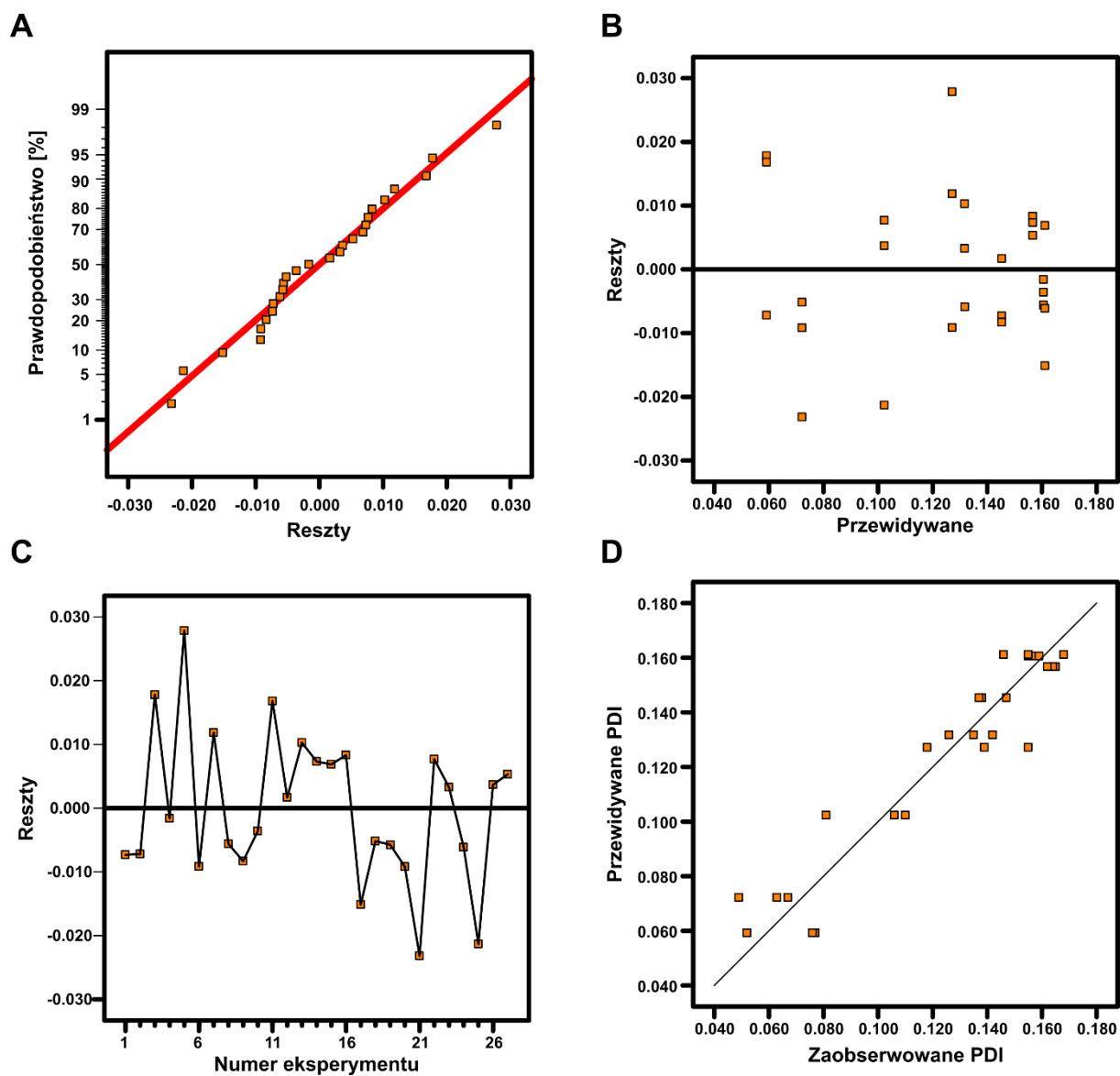
$$PDI = 0,200 - 0,012 * A - 0,025 * B + 0,012 * AB - 0,004 * A^2 \quad (61)$$

gdzie PDI – współczynnik polidispersji, A – masa GML, B – masa F127.

Tab. 15 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla współczynnika polidispersji PDI LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.

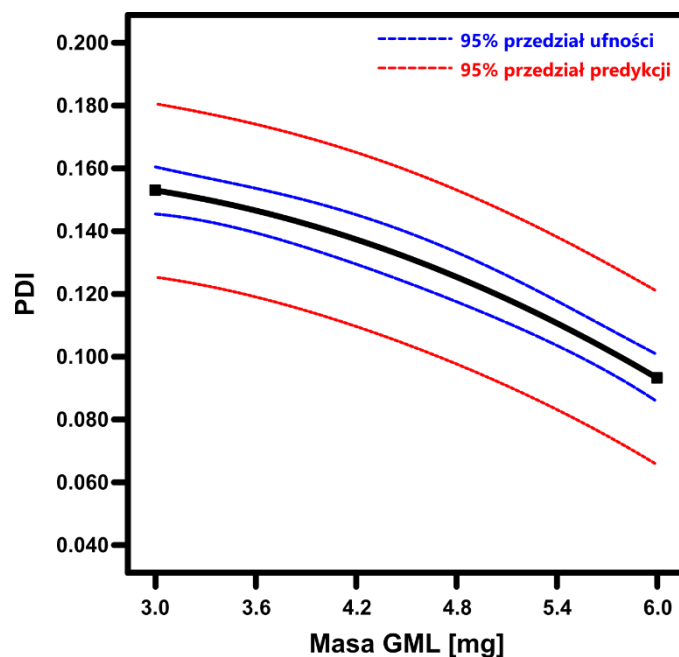
Źródło zmienności	Suma kwadratów	df	Średnia suma kwadratów	Wartość testu F	Poziom prawdopodobieństwa p	
Model	0.035	4	0.0087	53.27	< 0.0001	istotne statystycznie
A – masa GML	0.0214	1	0.0214	130.5	< 0.0001	
B – masa F127	0.0104	1	0.0104	63.24	< 0.0001	
AB	0.0021	1	0.0021	12.67	0.0018	
A ²	0.0011	1	0.0011	6.68	0.0169	
Reszty	0.0036	22	0.0002			
Brak dopasowania	0.0014	4	0.0004	2.86	0.0536	nieistotne statystycznie
Czysty błąd	0.0022	18	0.0001			
Całkowita	0.0386	26				

Podobnie jak w przypadku średnicy hydrodynamicznej, dla pomiarów współczynnika polidispersyjności przeprowadzono diagnostykę w celu potwierdzenia poprawności wykonanych pomiarów (Ryc. 52).

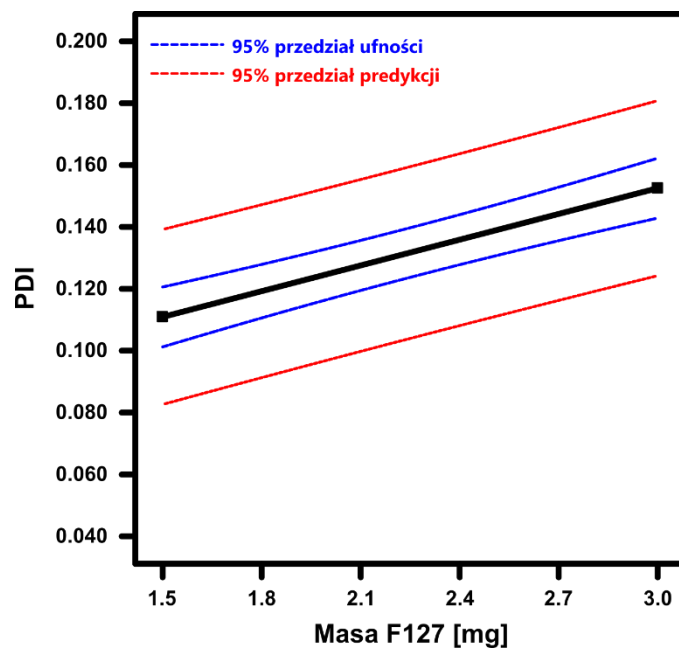


Ryc. 52 Diagnostyka modelu regresji liniowej średnicy hydrodynamicznej. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej wartości PDI C – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości PDI od wartości zaobserwowanych.

Wartości przewidywane współczynnika polidispersyjności LLCNPs w funkcji masy GML i masy F127 przedstawiono kolejno na wykresach Ryc. 53 oraz Ryc. 54.

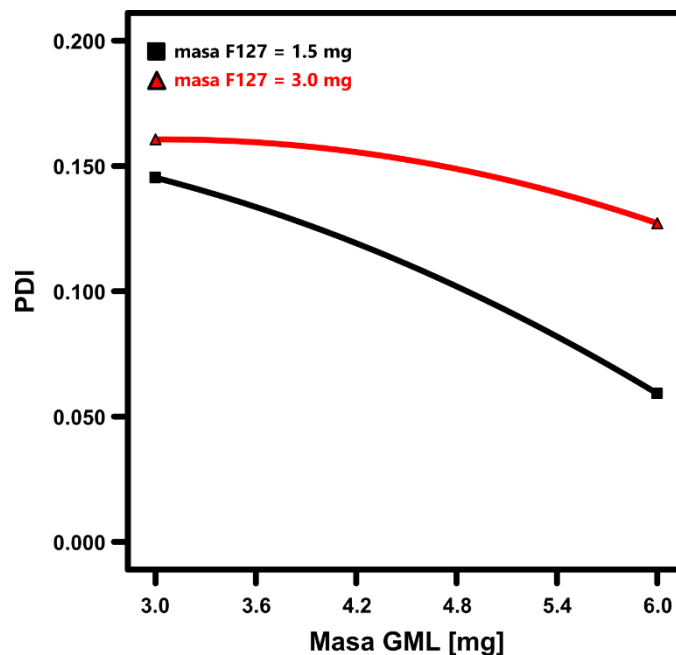


Ryc. 53 Wykres zależności przewidywanych wartości PDI w funkcji masy GML.



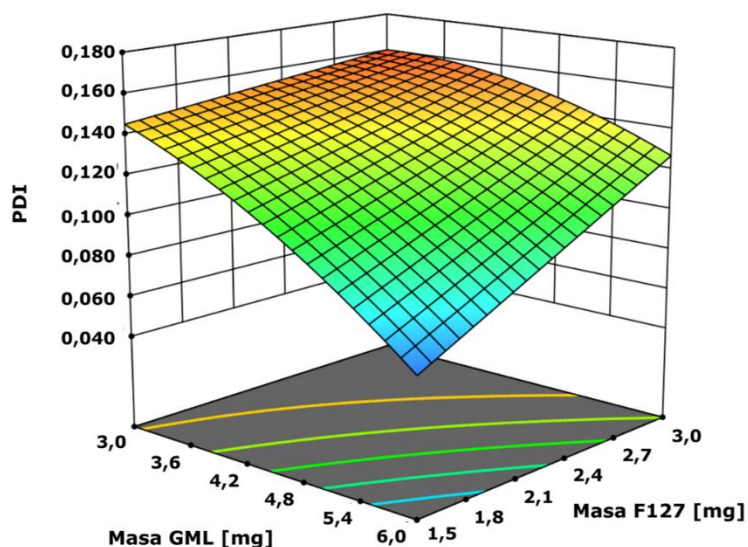
Ryc. 54 Wykres zależności przewidywanych PDI w funkcji masy F127.

Analiza regresji liniowej wykazała obecność interakcji pomiędzy analizowanymi zmiennymi niezależnymi (Ryc. 55).



Ryc. 55 Wykres interakcji pomiędzy masą GML i masą F127 oraz ich wpływ na przewidywaną wartość PDI.

Wykazany wpływ masy GML i masy F127 na współczynnik polidispersyjności LLCNPs GMO/GML przedstawiono ostatecznie za pomocą płaszczyzny odpowiedzi (Ryc. 56).

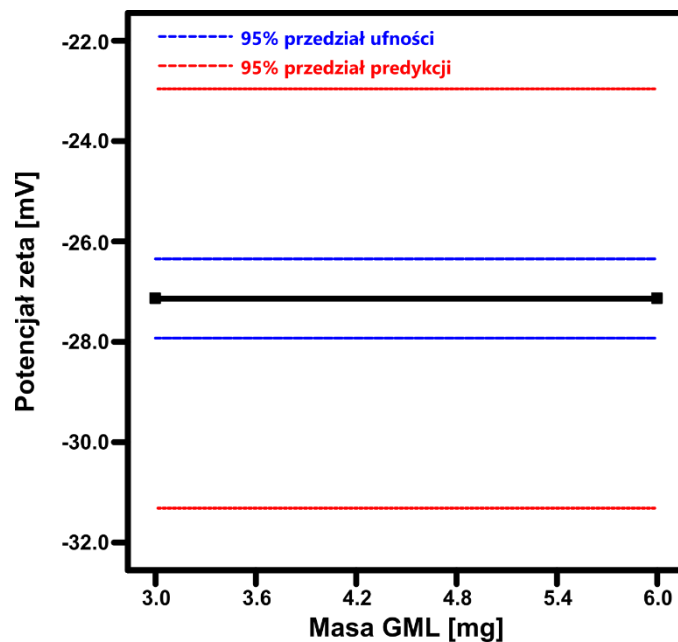


Ryc. 56 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę PDI LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.

5.1.5.3 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na potencjał zeta LLCNPs GMO/GML

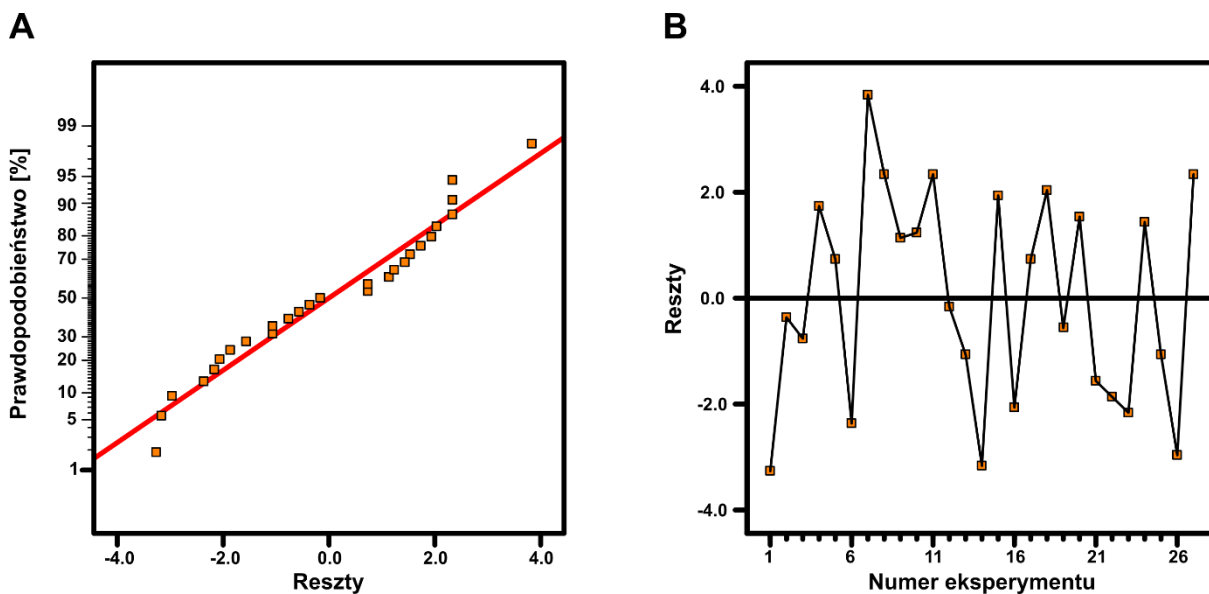
Analiza regresji liniowej wykazała, iż potencjał zeta można opisać za pomocą modelu liniowego, jednakże wyznaczony współczynnik determinacji R^2 na poziomie 0,20 sugerował, iż lepszym modelem opisującym potencjał zeta będzie model opisywany jako „średnia”,

oznaczający średnią wartość odpowiedzi niezależnie od wartości kontrolowanych czynników (Ryc. 57).



Ryc. 57 Wykres zależności przewidywanej wartości potencjału zeta w funkcji masy GML.

Poprawność wykonanych wymiarów potwierdzono za pomocą wykresów diagnostycznych (Ryc. 58).



Ryc. 58 Diagnostyka modelu regresji liniowej potencjału zeta. A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach.

5.1.5.4 Analiza wpływu masy GML i masy F127 na OD₆₆₀ LLCNPs GMO/GML

W celu wyznaczenia, który z optymalizowanych czynników posiada statystycznie istotny wpływ na gęstość optyczną OD₆₆₀ badanych układów, oraz w celu wyznaczenia równania opisującego zmianę OD₆₆₀ w funkcji tych zmiennych zależnych, przeprowadzono analizę regresji liniowej. Analiza regresji liniowej oraz analiza wariancji ANOVA (Tab. 16) dla gęstości optycznej OD₆₆₀ badanych układów LLCNPs wykazały, iż zmienną zależną w analizowanym zakresie wartości zmiennych zależnych opisuje wzór:

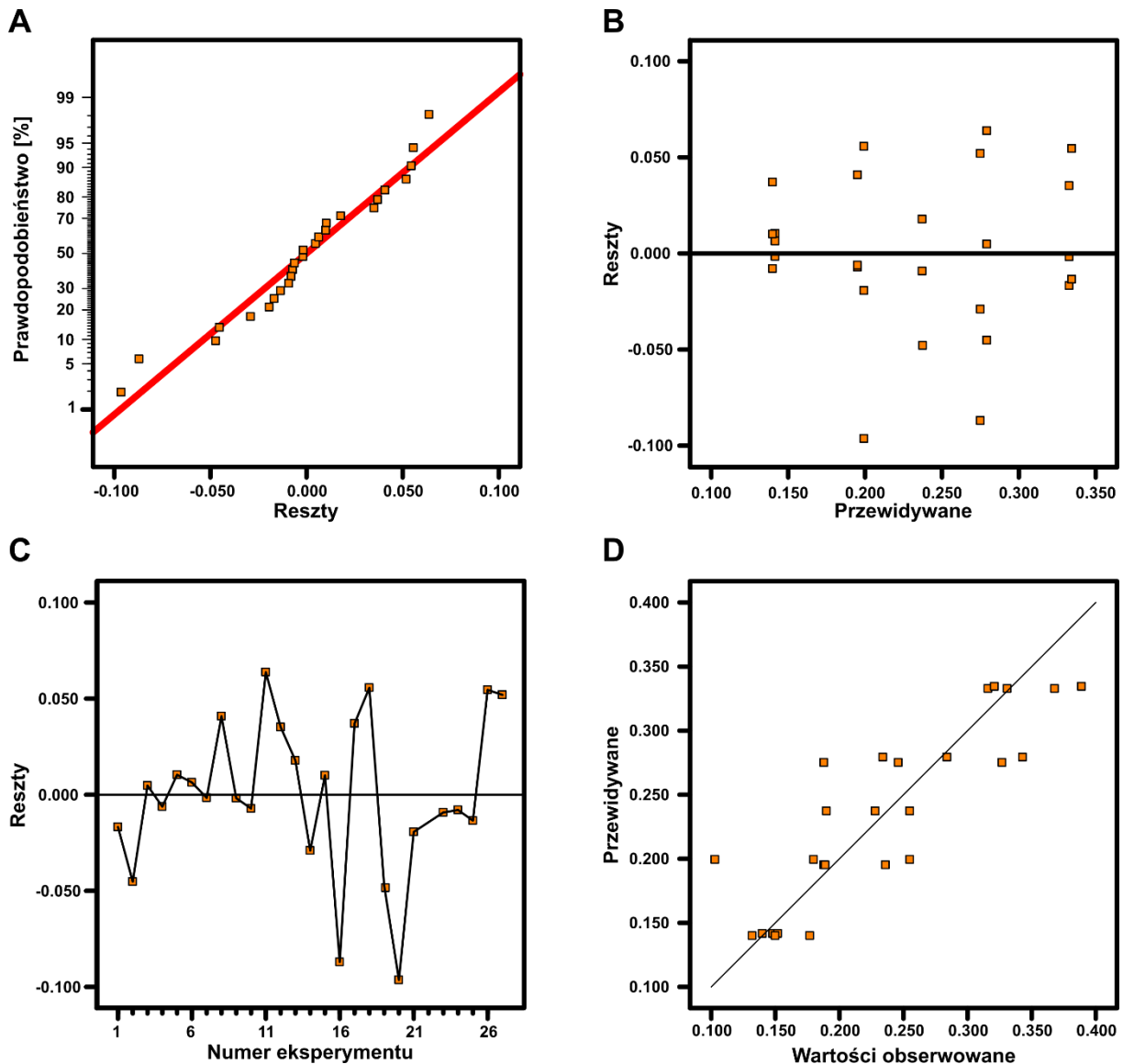
$$OD_{660} = 0,549 - 0,018 * A - 0,101 * B \quad (62)$$

gdzie OD₆₆₀ – gęstość optyczna przy fali długości 660 nm, A – masa GML, B – masa F127.

Tab. 16 Analiza wariancji ANOVA modelu regresji liniowej wyznaczonej dla gęstości optycznej OD₆₆₀ LLCNPs GMO/GML. df – liczba stopni swobody. Przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$.

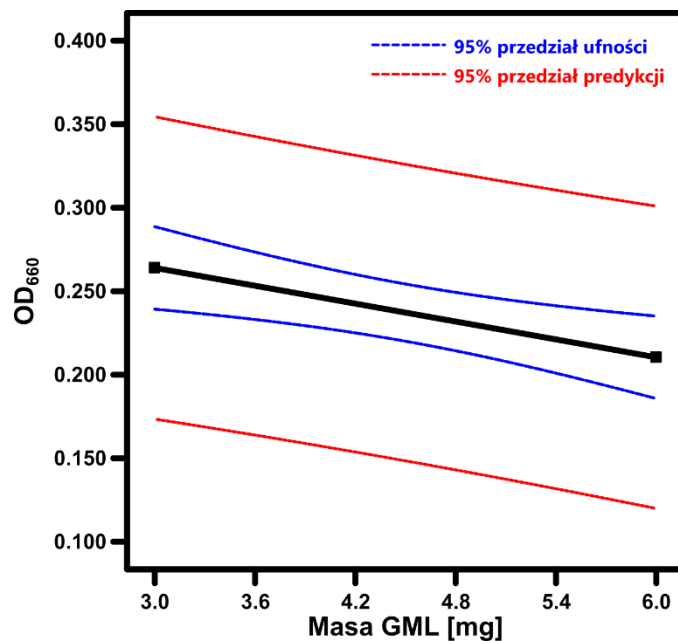
Źródło zmienności	Suma kwadratów	df	Średnia suma kwadratów	Wartość testu F	Poziom prawdopodobieństwa p	
Model	0.1209	2	0.0605	34.12	< 0.0001	istotne statystycznie
A - masa GML	0.0172	1	0.0172	9.7	0.0049	
B - masa F127	0.1037	1	0.1037	58.53	< 0.0001	
Reszta	0.0408	23	0.0018			
Brak dopasowania	0.005	6	0.0008	0.3986	0.8697	nieistotne statystycznie
Czysty błąd	0.0357	17	0.0021			
Całkowita	0.1617	25				

O poprawności przeprowadzonych pomiarów OD_{660} świadczy wykonana diagnostyka (Ryc. 59).

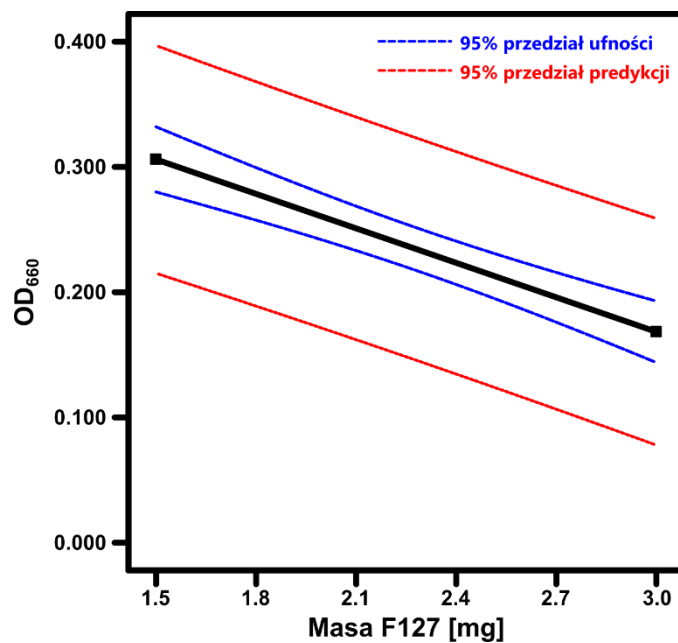


Ryc. 59 Diagnostyka modelu regresji OD_{660} . A – rozkład normalności wartości resztowych B – wykres zależności wartości resztowych od przewidywanej wartości OD_{660} C – wykres wartości resztowych w kolejnych eksperymentach D – wykres zależności przewidywanych wartości OD_{660} od wartości zaobserwowanych.

Wartości przewidywane OD_{660} badanych dyspersji LLCNPs w funkcji masy GML i masy F127 przedstawiono kolejno na wykresach Ryc. 60 oraz Ryc. 61.

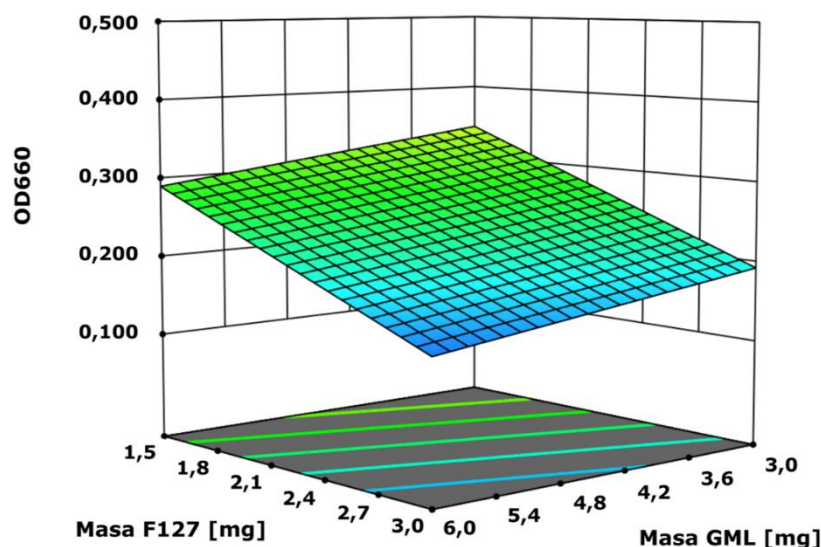


Ryc. 60 Wykres zależności przewidywanych wartości OD_{660} w funkcji masy GML.



Ryc. 61 Wykres zależności przewidywanych wartości OD_{660} w funkcji masy F127.

Sumaryczny wpływ masy GML i masy F127 na gęstość optyczną OD_{660} badanych dyspersji przedstawiono za pomocą płaszczyzny odpowiedzi (Ryc. 62).



Ryc. 62 Powierzchnia odpowiedzi opisująca zmianę OD_{660} LLCNPs opartych na mieszaninach lipidów.

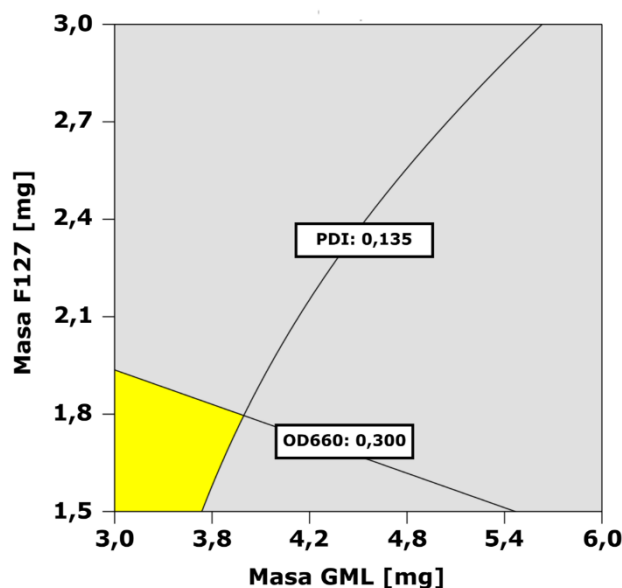
5.1.5.5 Wyznaczenie optymalnych wartości masy GML i masy F127 dla GMO/GML

Optymalne warunki syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na mieszaninach lipidów, tj. najwyższą masę GML i najniższą masę F127, przy zachowaniu określonych wartości odpowiedzi, wyznaczono za pomocą optymalizacji graficznej. W tym celu w pierwszym kroku określono oczekiwane zakresy wartości badanych odpowiedzi, przedstawione w Tab. 17.

Tab. 17 Oczekiwane zakresy wartości badanych odpowiedzi dla graficznej optymalizacji LLCNPs opartych na mieszaninie lipidów.

Odpowiedź	Zakres wartości
Średnica hydrodynamiczna [nm]	117,0 – 154,2
PDI	0,135 – 0,168
Potencjał zeta [mV]	-30,4 - - 23,3
OD_{660}	0,300 – 0,452

Określone zakresy odpowiedzi zostały następnie naniesione na uzyskane wcześniej powierzchnie odpowiedzi (Ryc. 51, Ryc. 56, Ryc. 62), które skonsolidowano do jednego wykresu konturowego (Ryc. 63), na którym kolorem żółtym zaznaczono obszar spełniający kryteria przedstawione w Tab. 17.



Ryc. 63 Wykres konturowy masy Pluronicu F127 i masy GML uwzględniający oczekiwane zakresy wartości badanych odpowiedzi. Żółtym polem oznaczono obszar spełniający zadane warunki.

Głównym celem optymalizacji była maksymalizacja masy domieszkowanego lipidu GML przy jednoczesnej minimalizacji masy F127 w optymalnym układzie w celu zredukowania wystąpienia możliwego efektu cytotoksycznego związanego z obecnością surfaktantu. Na podstawie Ryc. 63 wybrano wartości masy GML i masy F127 odpowiadające założonym celom, tak aby znajdowały się one w wyznaczonym żółtym polu. Jako optymalny stosunek masowy GMO:GML:F127 wyznaczono 26,5:3,5:1,5, nazywany dalej GMO/GML. W celu potwierdzenia prawidłowości otrzymanych modeli przygotowano trzy indywidualne układy o optymalnych proporcjach składników, dla których wykonano pomiary średnicy hydrodynamicznej, współczynnika polidispersyjności, potencjału zeta i gęstości optycznej OD_{660} i porównano z wartościami przewidywanymi przez uzyskane funkcje obiektu (Tab. 18).

Tab. 18 Porównanie przewidywanych na podstawie modeli odpowiedzi i odpowiedzi uzyskanych eksperymentalnie dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5.

Odpowiedź	Przewidywana Średnia	Przewidywany Błąd standardowy	Odchylenie Standardowe	Dolna granica 95% przedziału predykcyjnego	Średnia	Górna granica 95% przedziału predykcyjnego
Średnica hydrodynamiczna [nm]	141,9	3,9	6,1	133,8	136,4	150,0
PDI	0,136	0,009	0,013	0,117	0,136	0,154
Potencjał zeta [mV]	-27,1	1,2	2,0	-29,6	-27,0	-24,6
OD_{660}	0,335	0,031	0,047	0,272	0,340	0,399

Doniesienia naukowe potwierdzają skuteczność wykorzystania metodologii projektowania doświadczeń do optymalizacji warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. Badie i Abbas [202] wykorzystali pełny dwupoziomowy plan czynnikowy 2^3 do optymalizacji warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych

na GMO z reswaratrolem, jako układów o właściwościach neuroprotekcyjnych, przeciwstarzeniowych oraz przeciwnowotworowych. Elgindy i wsp. [203] za pomocą takiego samego podejścia określili optymalne warunki syntezy kubosomów załadowanych progesteronem, jako układów do przezskórnego dostarczania hormonu. Verma i Ahuja [204] wykorzystali z kolei centralny plan kompozycyjny do optymalizacji warunków syntezy lipidowych nanocząstek opartych na GMO związanych z chitozanem, stanowiących potencjalny układ do dostarczania koltrimazolu. Poza przedstawionymi powyżej metodami planowania, do optymalizacji warunków syntezy LLCNPs wykorzystywane są również inne plany, m.in. trzypoziomowy pełny plan czynnikowy [205,206], model Placketta-Burmana [207] czy projekt Boxa-Behnkena [208].

W trakcie prowadzenia badań zaobserwowano negatywny, liniowy wpływ ilości stosowanego surfaktantu na wielkość nanocząstek. Podobną zależność zaobserwowali Mahmood i wsp. [209], optymalizujący warunki syntezy LLCNPs opartych na GMO ładowanych lulikonazolem wykorzystując centralny plan kompozycyjny. Autorzy zmniejszając się średnicę hydrodynamiczną nanocząstek wraz ze wzrostem zastosowanego surfaktantu Pluronic F127 wyjaśniają zmniejszaniem się napięcia powierzchniowego fazy oleistej, co prowadzi do lepszego wysycenia interfazy surfaktantem, a co za tym idzie rozbiciem struktur do homogennej dyspersji. Badie i Abbas [202] również zaobserwowali silnie negatywny wpływ stosowanej masy F127 na średnicę hydrodynamiczną lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO, tłumacząc to również redukcją napięcia powierzchniowego i łatwiejszej dyspersji, prowadząc tym samym do zmniejszenia powstających struktur.

Przeprowadzenie analizy odpowiedzi PDI pozwoliła wykazać negatywny wpływ zarówno masy F127 jak i GML na wyznaczone wartości współczynnika polidispersji. Zmniejszający się współczynnik polidispersji wraz ze wzrostem masy surfaktantu może być wyjaśniony podobnie jak w poprzednim paragrafie. Jak zauważyli Mahmood i wsp. [209], Badie i Abbas [202] i Waghule i wsp. [208], zmniejszające się napięcie powierzchniowe wynikające z większej ilości surfaktantu ułatwia dyspersję fazy oleistej w wodzie co prowadzi do powstawania małych struktur o homogennym, monomodalnym rozkładzie wielkości. Zaobserwowano również interakcje pomiędzy wpływem masy F127 i masy GML na PDI. Dla masy F127 = 1,5 mg, spadek PDI wraz ze wzrostem masy GML jest gwałtowniejszy niż w przypadku masy F127 = 3 mg.

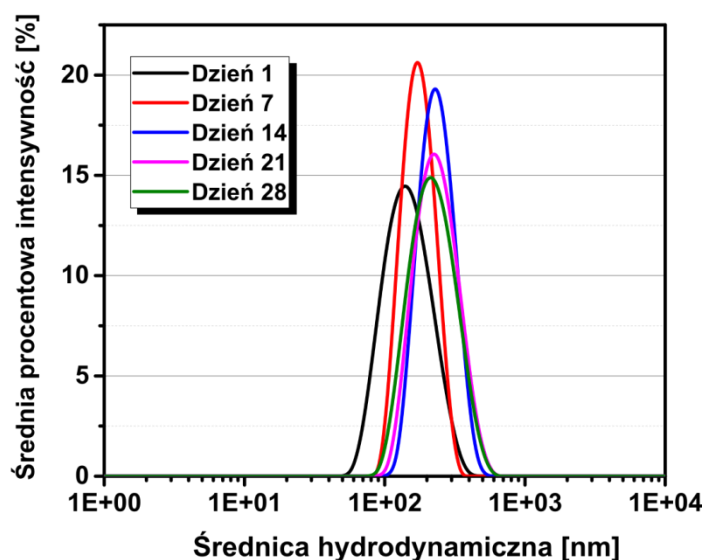
W przypadku pomiarów zeta potencjału nie zaobserwowano wpływu badanych czynników na zmianę odpowiedzi.

Analiza wpływu masy GML i masy F127 na gęstość optyczną OD_{660} badanych układów wskazuje, że zarówno wzrost masy GML i masy F127 prowadzi do powstawania bardziej transparentnych układów. OD_{660} może być pośrednią miarą, wskazującą na występowanie w dyspersji lipidów struktur o charakterze ciekłokrystalicznym. Gdy w roztworze znajdują się struktury o złożonej wewnętrznej strukturze, światło przechodzące przez taką próbkę z

większym prawdopodobieństwem ulega rozproszeniu, w porównaniu np. do dyspersji liposomów. Wzrost masy GML i masy F127 może prowadzić do rozbijania struktur ciekłokrystalicznych właśnie do struktur liposomalnych, prowadząc do zmniejszenia wartości OD_{660} .

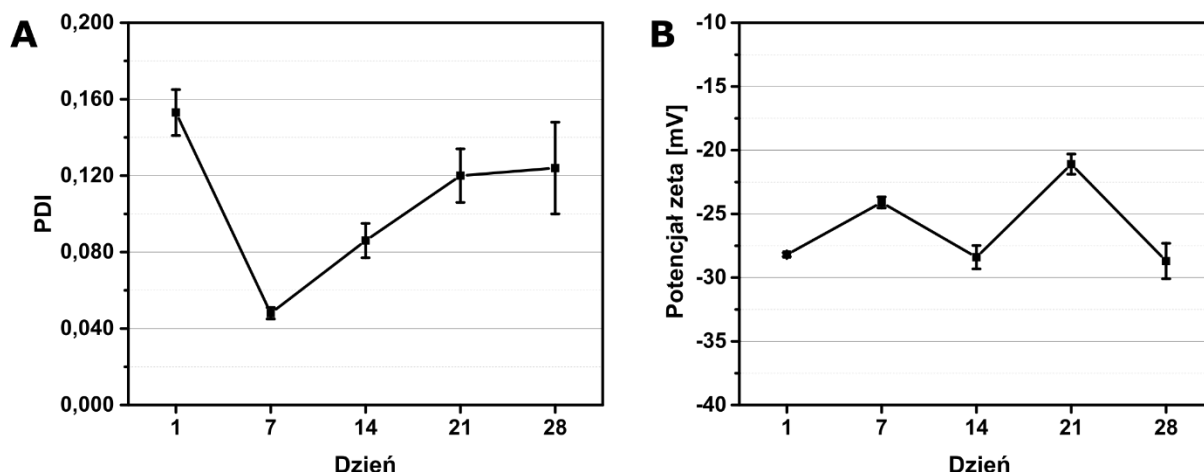
5.1.6 Analiza stabilności układu GMO/GML

Omówione w poprzednim rozdziale układy o zoptymalizowanej kompozycji zbadano za pomocą techniki DLS pod kątem ich stabilności w czasie. Dzień po syntezie układy charakteryzowały się monomodalnym rozkładem wielkości bez obecności agregatów, z średnicą wynoszącą 140,23 nm. Przez pierwsze 14 dni, próbki zachowały monomodalny rozkład z jednoczesnym zwiększeniem średnicy do 231,15 nm, która nie zmieniała się istotnie przez kolejne 14 dni (Ryc. 64).



Ryc. 64 Rozkład średnic optymalnych układów GMO/GML przez pierwsze 28 dni po fabrykacji.

Analizie stabilności przez okres 28 dni poddany zostały również współczynnik polidispersji oraz potencjał zeta. Wyniki wskazują na gwałtowny spadek wartości PDI w okolicy 7 dnia z ok. 0,150 do 0,050. W kolejnych dniach współczynnik polidispersji wzrastał do wartości 0,120 uzyskanej 28 dnia (Ryc. 65, A). Potencjał zeta, wykazywał niewielkie wahania i utrzymywał się średnio na stałym poziomie ok -27 mV przez cały okres pomiarów (Ryc. 65, B).

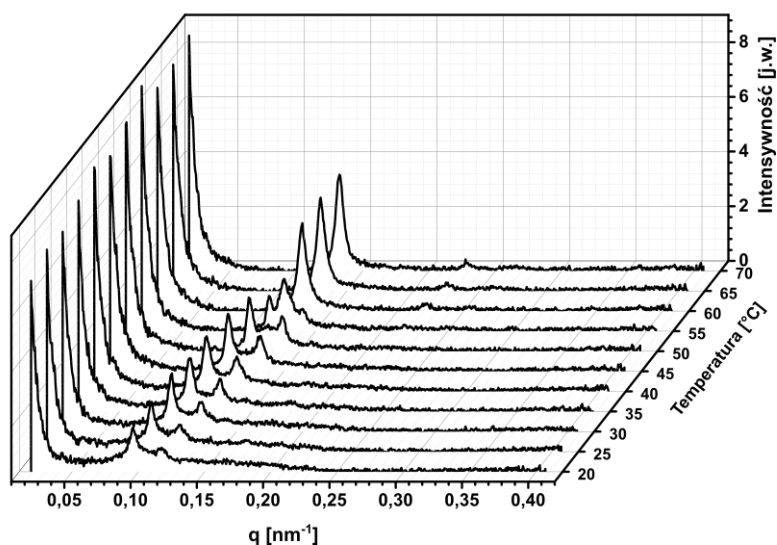


Ryc. 65 Czasowe zmiany współczynnika polidispersji oraz potencjału powierzchniowego wyznaczone dla optymalnych układów GMO/GML w okresie 28 dni od syntezy.

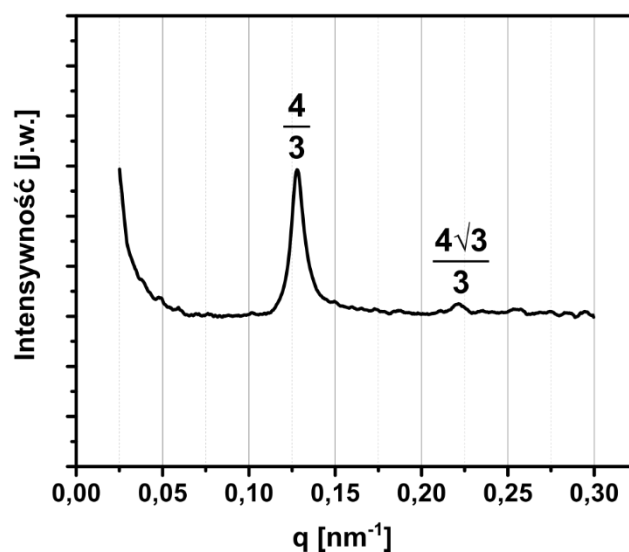
5.1.7 Analiza strukturalna układu GMO/GML

W celu określenia struktur ciekłokrystalicznych w optymalnym układzie GMO/GML (kompozycja wagowa GMO:GML:F127 = 26,5:3,5:1,5) wykorzystano małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego. Ponadto, aby zaobserwować zmiany w wewnętrznej strukturze LLCNPs GMO/GML w funkcji stosunku GMO:GML, analogiczne pomiary wykonano dla układów o kompozycjach 29:1:1,5, 28:2:1,5 oraz 27:3:1,5. Wszystkie pomiary wykonano w zakresie temperatur 20°C – 70°C z krokiem wynoszącym 5°C.

Dla układu o kompozycji 29:1:1,5 w 20°C zaobserwowano strukturę kubiczną Pn3m ze stałą sieci krystalicznej wynoszącą $a = 9,28$ nm (Ryc. 66). Wraz ze wzrostem temperatury do 45°C układ zachowuje symetrię Pn3m, zaś stała sieci krystalicznej spada do $a = 8,22$ nm. W temperaturach 50°C - 55°C zaobserwowano przejście fazowe z fazy kubicznej do fazy heksagonalnej H_{II} o stałej sieci krystalicznej $a = 6,53$ nm w temperaturze 60°C (Ryc. 68).

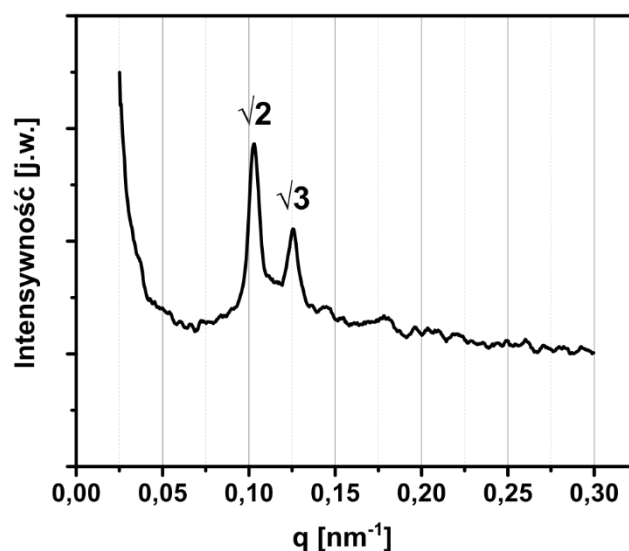


Ryc. 66 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.



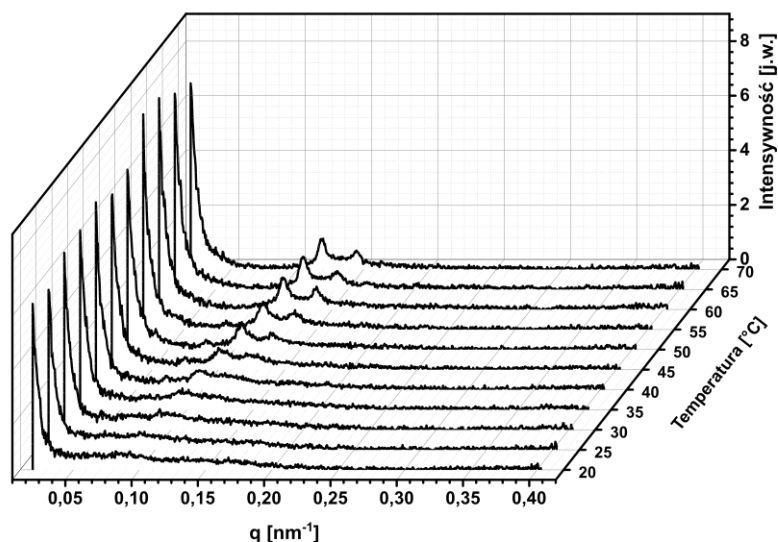
Ryc. 67 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w temperaturze 60°C.

Dla zastosowań biomedycznych, szczególnie istotna jest struktura badanego układu w temperaturze biologicznej. Analiza SAXS układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w temperaturze 35°C wykazała obecność struktury kubicznej typu Pn3m (Ryc. 68). Stała sieci krystalicznej dla badanej struktury wyniosła 8,74 nm, średnica kanałów wodnych 1,71 nm i ułamkiem objętościowym wody 0,31.



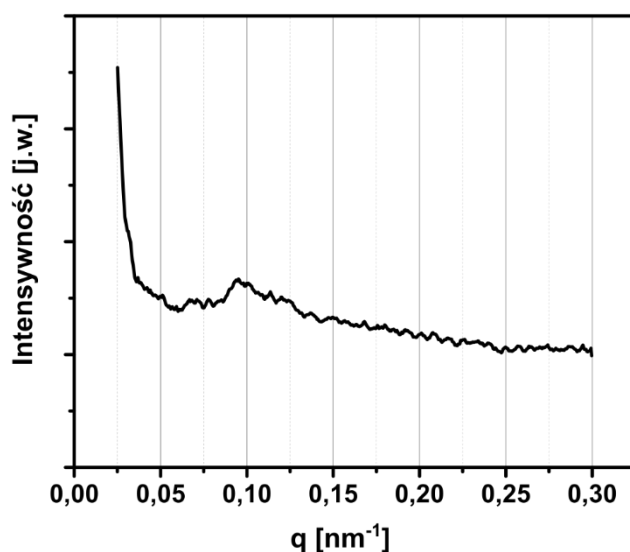
Ryc. 68 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 29:1:1,5 w temperaturze 35°C.

Dla układu 28:2:1,5 zaobserwowano różnice w stosunku do układu 29:1:1,5 (Ryc. 69). W niskich temperaturach (20°C - 45°C) nie zaobserwowano w widmach SAXS żadnych wyraźnych refleksów. W temperaturze 50°C ustabilizowała się symetria kubiczna Pn3m o stałej sieci krystalicznej $a = 8,45$ nm, utrzymująca się do temperatury 70°C, jednak ze stałą sieci krystalicznej zmniejszoną do $a = 7,49$ nm.



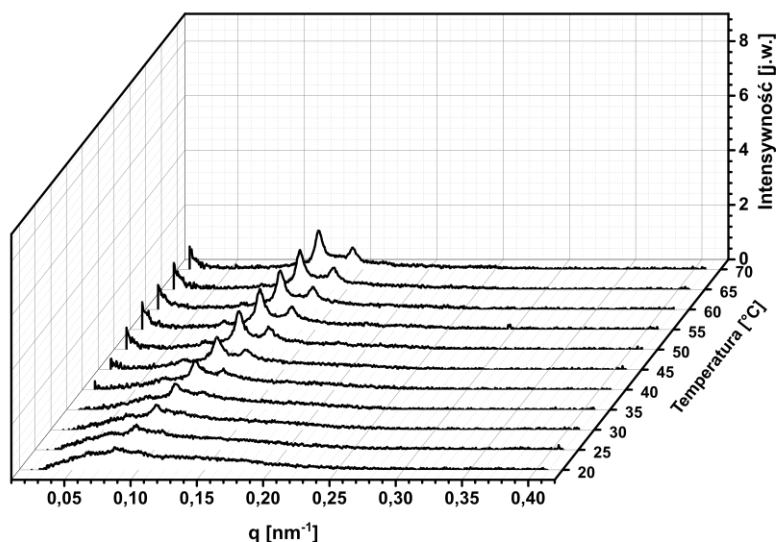
Ryc. 69 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.

W temperaturze 35°C analiza SAXS układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 nie wykazała obecności refleksów charakterystycznych dla którejkolwiek mezofazy (Ryc. 70). Jednak obecność szerokiego pasma świadczyć może o obecności w roztworze mikroemulsji i prekursorów kubicznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych.

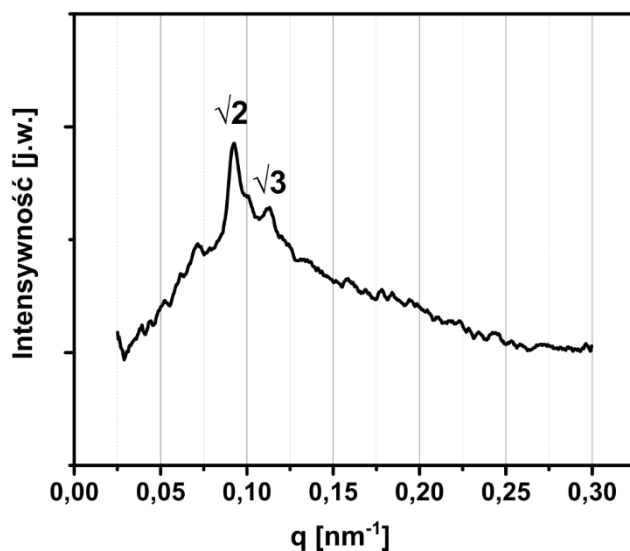


Ryc. 70 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 w temperaturze 35°C.

Zmniejszenie stosunku GMO:GML do poziomu 27:3:1,5 skutkowało brakiem obecności układów o symetrii heksagonalnej, które obserwowano w układzie 29:1:1,5 (Ryc. 71). W układzie 27:3:1,5 ustabilizowanie się układów o kubicznej symetrii Pn3m o stałej sieci krystalicznej $a = 9,36$ nm zaobserwowano w temperaturze 35°C (ryc. 56). W tych warunkach średnica kanałów wodnych wyniosła 1,97 nm zaś ułamek objętościowy wody 0,36. Wskazana struktura była zachowana w całym zakresie temperatur ze stałą sieci krystalicznej zmniejszającą się wraz ze wzrostem temperatury ($a = 7,63$ nm dla $T=70^\circ\text{C}$).

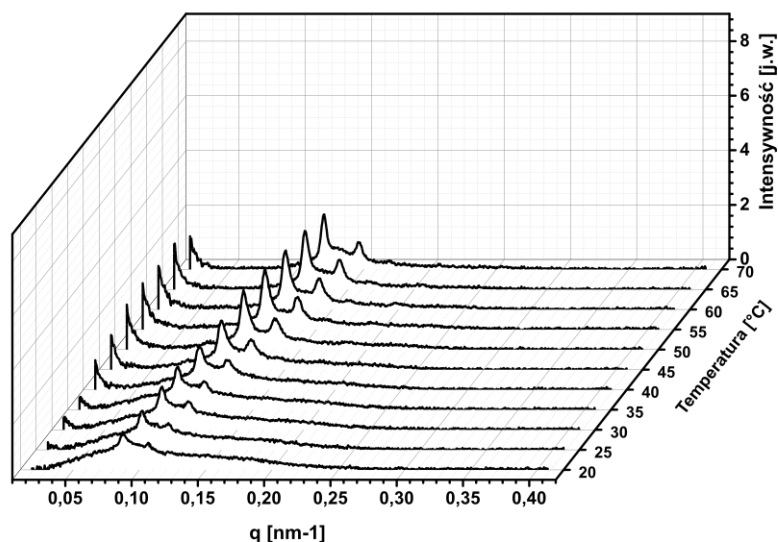


Ryc. 71 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 27:3:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.



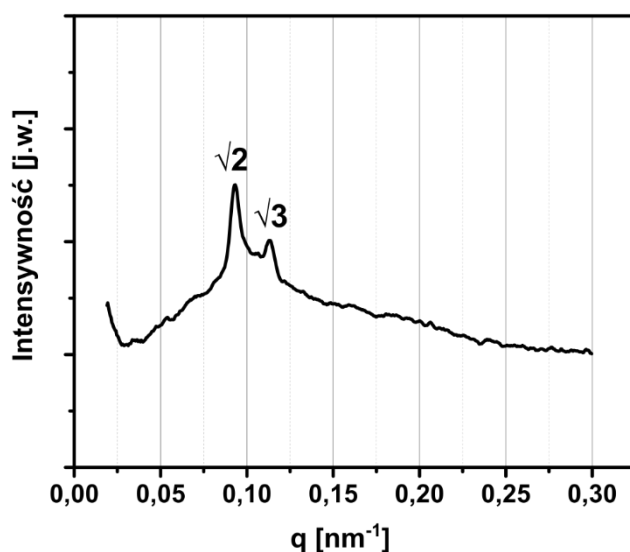
Ryc. 72 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 27:3:1,5 w temperaturze 35°C.

W optymalnych układach 26,5:3,5:1,5 zaobserwowano trend obecny w dwóch poprzednich dyspersjach. Ponownie w całym zakresie temperatur nie zaobserwowano układów o heksagonalnej symetrii. Wyraźne wydzielenie refleksów charakterystycznych dla kubicznej symetrii Pn3m zidentyfikowano w temperaturze 35°C (Ryc. 73). Faza ciekłokrystaliczna pozostała niezmienna w trakcie wzrostu temperatury pomiaru do 70°C, przyjmując ostatecznie wartość stałej sieci krystalicznej $a = 7,42$ nm.



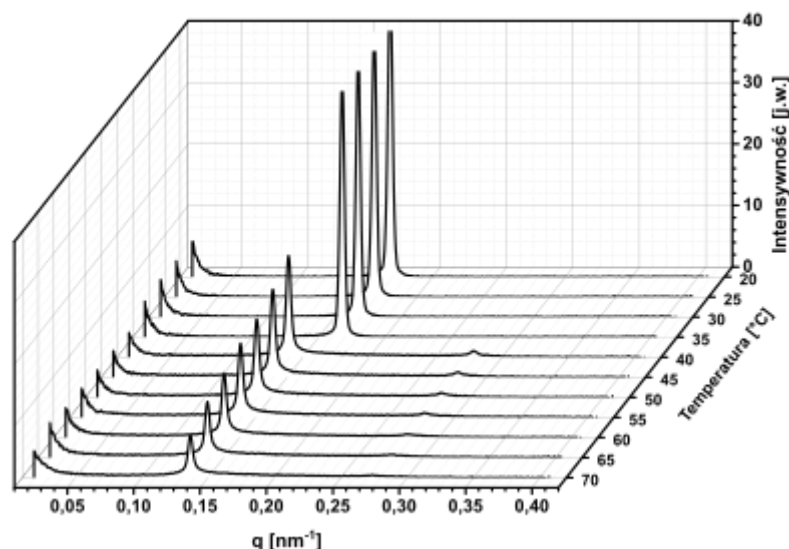
Ryc. 73 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5 w zakresie temperatur 20°C do 70°C.

Analiza SAXS optymalnego układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5 w temperaturze 35°C wykazała obecność struktur o symetrii Pn3m (Ryc. 74). Podobnie jak dla GMO:GML:F127 27:3:1,5 struktury charakteryzowały się stałą sieci krystalicznej wynoszącą 9,59 nm, średnica kanałów wodnych wyniosła 1,97 nm zaś ułamek objętościowy wody 0,36.



Ryc. 74 Krzywa rozpraszania SAXS dla układu GMO:GML:F127 26,5:3,5:1,5 w temperaturze 35°C.

Pomiary SAXS wykonano również dla 2% układu czystego GML stabilizowanego 5% masowymi F127 (1,5 mg) (Ryc. 75). W temperaturach do 35°C widoczny jest jeden wyraźny refleks. Pomiędzy temperaturami 35°C a 40°C zachodzi przemiana fazowa i układ organizuje się do fazy lamelarniej o stałej sieci krystalicznej $a = 4,51$ nm. Z dalszym wzrostem temperatury obserwowany jest zanik drugiego refleksu charakterystycznego dla fazy lamelarniej.



Ryc. 75 Krzywe rozpraszania SAXS dla układu GML 2% w zakresie temperatur 20°C do 70°C.

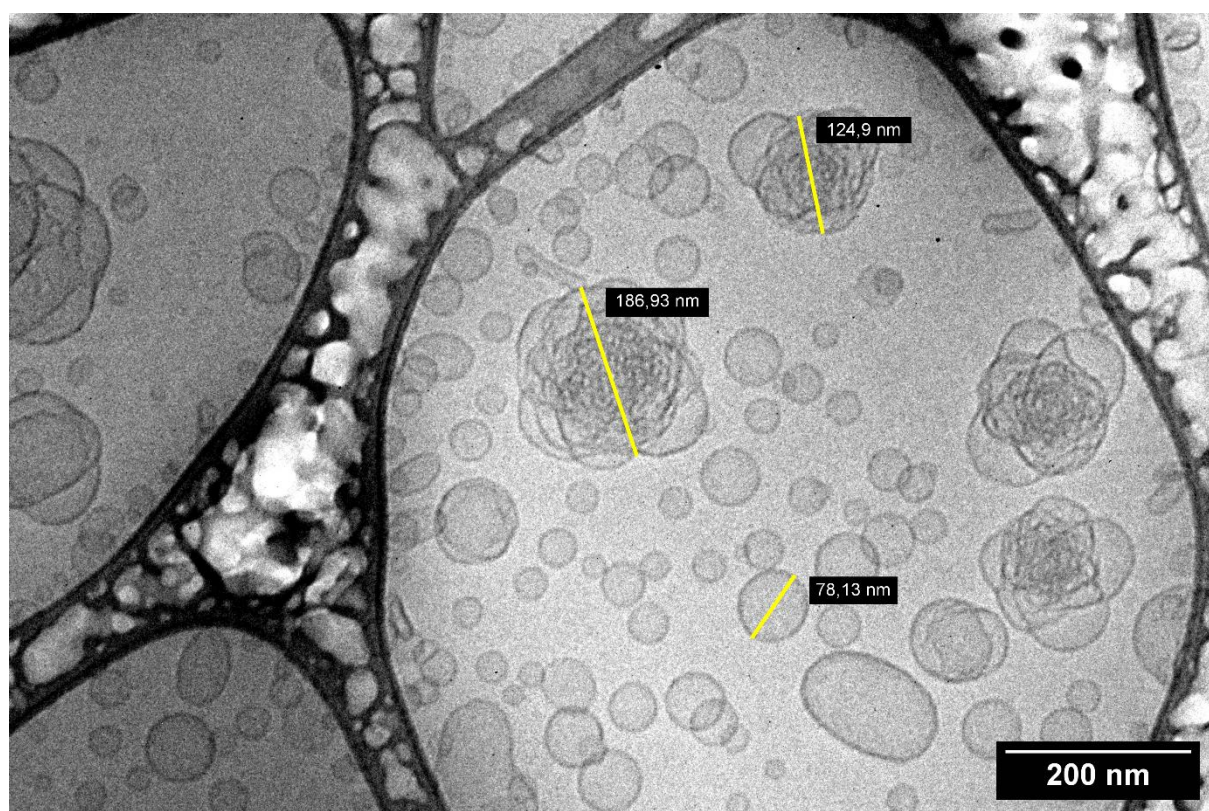
Powyższe wyniki otrzymane za pomocą małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego potwierdzają zachowanie wewnętrznej symetrii kubicznej Pn3m charakterystycznej dla lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o czyste GMO po dodaniu do układu GML. Krzywe rozpraszania SAXS wskazują na wbudowywanie się domieszkowanego lipidu w strukturę LLCNPs opartych o GMO, o czym świadczą zmiany w równowadze fazowej wraz z zwiększaniem ilości dodanego GML. Przy stosunku GMO:GML 28:2 obserwowana destabilizacja fazy krystalicznej Pn3m w niższych temperaturach. W wyższych temperaturach faza heksagonalna H_{II}, obserwowana w układzie GMO:GML 29:1 została zastąpiona fazą Pn3m, stabilną do temperatury 70°C. W układzie GMO:GML 27:3 oraz w zoptymalizowanym układzie 26,5:3,5 obserwowane jest przesunięcie równowagi faz względem układu 28:2. W układach tych, podobnie jak w układzie GMO:GML 29:1 obserwowana jest faza kubiczna typu Pn3m, jednakże refleksy charakterystyczne dla tej mezofazy są wyraźnie oddzielone. Wynik taki może świadczyć o obecności w układzie liposomów i tzw. prekursorów kubosomów. Porównując takie parametry jak stała sieci krystalicznej, średnica kanałów wodnych oraz ułamek objętościowy wody, między układami GMO:GML 29:1 i GMO:GML 26,5:3,5, zauważyć można ich wzrastającą tendencję. Jest to kolejny argument przemawiający za wnioskiem, iż GML wbudowuje się w strukturę nanocząstek GMO (Tab. 19). W przeciwnej sytuacji, gdyby GML tworzyło odrębne struktury lub pozostawało w postaci monomerycznej, analizowane wartości nie powinny ulec zmianie wraz z zwiększaniem udziału GML. Porównanie krzywych rozpraszania mieszanin GMO:GML:F127 z krzywymi rozpraszania uzyskanymi dla czystego GML 2% również mogą przemawiać za włączeniem cząsteczek GML w strukturę nanocząstek, o czym świadczy brak refleksów charakterystycznych dla czystego GML w układach stanowiących mieszaniny lipidów.

Tab. 19 Porównanie stałych sieci krystalicznej a , średnic kanałów wodnych r_{kw} oraz ułamków objętościowych wody ϕ_w w układach GMO:GML:F127 29:1:1,5, 27:3:1,5 i 26,5:3,5:1,5 w temp. 35°C. Szerokie pasmo krzywych rozpraszania SAXS w temp. 35°C wyznaczonych dla układu GMO:GML:F127 28:2:1,5 uniemożliwia wykonanie analogicznych obliczeń.

Preparat	a [nm]	r_{kw} [nm]	ϕ_w
29:1:1,5	8,74	1,71	0,31
27:3:1,5	9,36	1,97	0,36
26,5:3,5:1,5	9,59	1,97	0,36

5.1.8 Obrazowanie struktur ciekłokrystalicznych w układach GMO/GML

W celu potwierdzenia obecności struktur o złożonej wewnętrznej symetrii w zoptymalizowanym układzie GMO/GML oraz oszacowaniu rozmiaru zsyntetyzowanych nanocząstek wykonane zostało obrazowanie cryo-TEM. Zdjęcia cryo-TEM wskazuje na heterogenny charakter układu pod względem wielkości nanocząstek oraz obecnych faz ciekłokrystalicznych (Ryc. 76). Cząstki wykazujące złożoną wewnętrzną symetrię wykazywały większy rozmiar wynoszący około 130 nm w stosunku do liposomów, których wielkość nie przekraczała 100 nm.



Ryc. 76 Mikrograf cryo-TEM zoptymalizowanych układów GMO/GML.

Analiza cryo-TEM wykazała obecność lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych o niejasno zarysowanych granicach, charakteryzujących się przyłączonymi do ich powierzchni struktur liposomalnych. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o obecności tzw. prekursorów lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, które w analizie SAXS wykazywały obecność pojedynczego

szerokiego reflexu w temperaturze pokojowej (Ryc. 73) tj. w temperaturze preparacji próbek do obrazowania cryo-TEM.

5.2 Cytotoksyczność lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

Nanocytotoksykologia jest nauką zajmującą się badaniem negatywnego wpływu nanomateriałów na komórki [210]. Poznanie i zrozumienie mechanizmu oddziaływania nanomateriałów *in vitro* jest kluczową kwestią przy wprowadzaniu nanomateriałów do zastosowań biomedycznych. Każdy z parametrów opisujący charakter nanocząstek, takich jak rozmiar, kształt, porowatość czy skład chemiczny może mieć znaczący wpływ na cytotoksyczność badanego układu. Wraz ze zmniejszającą się wielkością nanocząstek, wzrasta stosunek ich powierzchni do objętości, co prowadzi do wzrostu znaczenia efektów powierzchniowych, a co za tym idzie większej reaktywności takich materiałów. Wielkość nanocząstek ma wpływ m.in. na miejsce depozycji w organizmie oraz na efektywność endocytozy. Kulkami i Feng [211] porównali m.in. wychwytywanie komórkowe nanocząstek polistyrenowych przez komórki linii komórkowej Caco-2, pokazując, że w zakresie 25 nm – 500 nm, nanocząstki o średnicy 100 nm były wychwytywane najefektywniej. Kaga i wsp. [212] porównując wpływ wielkości i kształtu nanocząstek polimerowych pokazali, iż małe nanocząstki (22 nm sferyczne nanocząstki PEG) mają większą tendencję do gromadzenia się w tkankach nowotworowych, w przeciwieństwie do cząstek większych (33 nm sferyczne nanocząstki PEG), które gromadziły się w większym stopniu w wątrobie i śledzionie. Baez i wsp. [213] wspominają z kolei, iż nanocząstki złota o wymiarach 2 nm do 10 nm są bardziej toksyczne od większych, sięgających 100 nm. Wspomniani powyżej autorzy zwracają również uwagę na wpływ składu nanocząstek na ich efekt cytotoksyczny, stwierdzając iż nanocząstki srebra, poprzez uwalnianie jonów srebra prowadzących do zmian biochemicznych, są bardziej cytotoksyczne od nanocząstek złota [213]. Biorąc pod uwagę skład lipidowych LLCNPs, Strachan i wsp. [142] pokazali m.in., iż wychwytywanie komórkowe lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych nie jest zależny od ich struktury wewnętrznej, lecz od lipidów z których były syntetyzowane.

5.2.1 Analiza aktywności proliferacyjnej

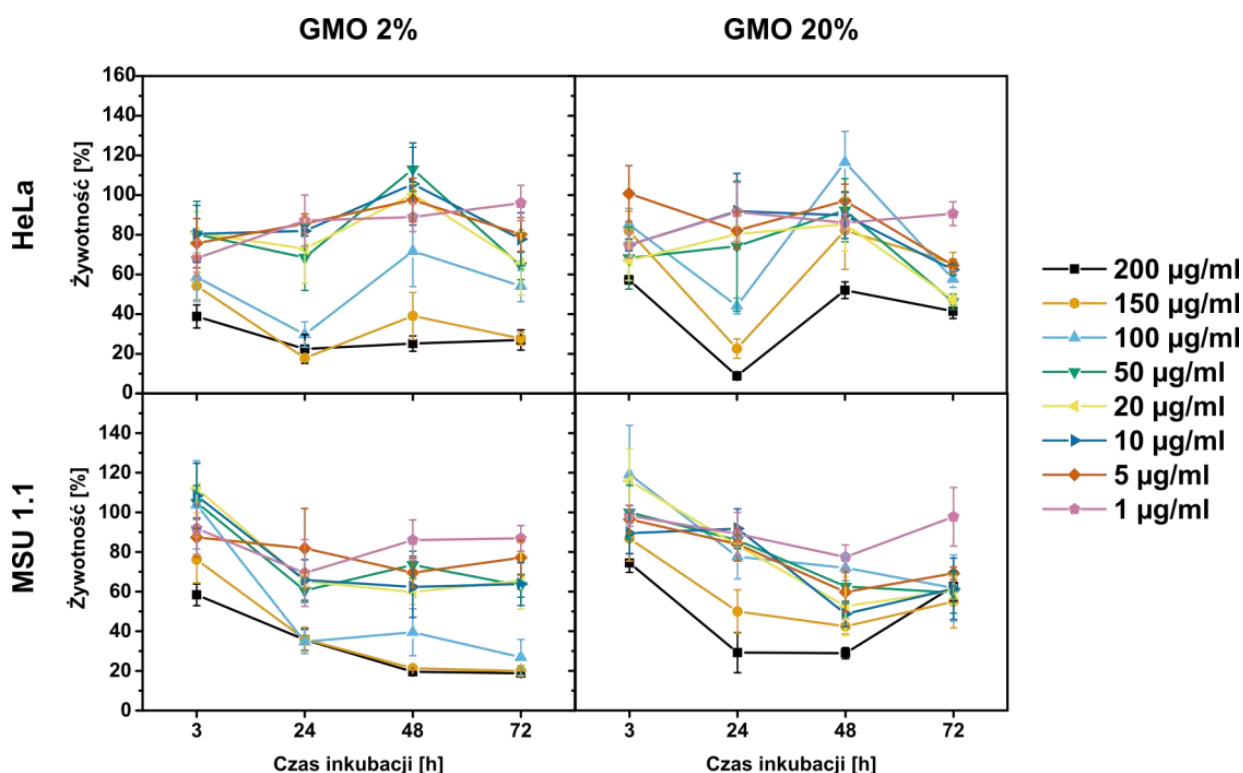
Test WST-1 jest kolorymetrycznym testem proliferacji komórkowej, opierającym się na zdolności żywych komórek do konwersji bezbarwnej soli tetrazolowej WST-1 do barwnego formazanu w zależności od aktywności proliferacyjnej, która jest skorelowana z żywotnością komórkową. Względna aktywność proliferacyjna określana jest za pomocą pomiaru natężenia światła absorbowanego przez formazan. Komórki nowotworowe HeLa i MSU 1.1 zostały poddane działaniu przygotowanych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w zakresie stężeń od 1 µg/ml do 200 µg/ml dla dyspersji GMO 2% i GMO 20%, oraz od 0,8125 µg/ml do 22 µg/ml dla dyspersji PHT 2% i PHT 20% przy czasach inkubacji 3h, 24 h, 48 h oraz 72 h.

W wyniku przeprowadzonych testów aktywności proliferacyjnej wykazano, że komórki HeLa inkubowane z LLCNPs GMO 2% wykazały żywotność na poziomie 80% dla stężeń od 1 µg/ml do 50 µg/ml dla dowolnego czasu inkubacji (Ryc. 77). Nanocząstki GMO 2% w stężeniach

wyższych niż 100 µg/ml miały charakter cytotoksyczny, który wyrażany jako powodujący spadek żywotności komórek poniżej 80%. Dla wyższych stężeń GMO 2% (150 µg/ml i 200 µg/ml), niezależnie od czasu inkubacji żywotność komórek HeLa pozostawała na poziomie około 30%. W przypadku komórek HeLa inkubowanych z GMO 2% 100 µg/ml przez 48 h, zaobserwowano żywotności na poziomie 60%.

Podobne rezultaty uzyskano dla komórek HeLa inkubowanych z GMO 20%. Podczas 24 h inkubacji z LLCNPs, żywotność komórek zmieniała się od poziomu 80% dla stężeń od 1 µg/ml do 50 µg/ml do 20% dla stężeń 150 µg/ml i 200 µg/ml. Żywotność komórek HeLa inkubowanych przez 48 h w ww. najwyższych stężeniach wzrosła do poziomu 50%.

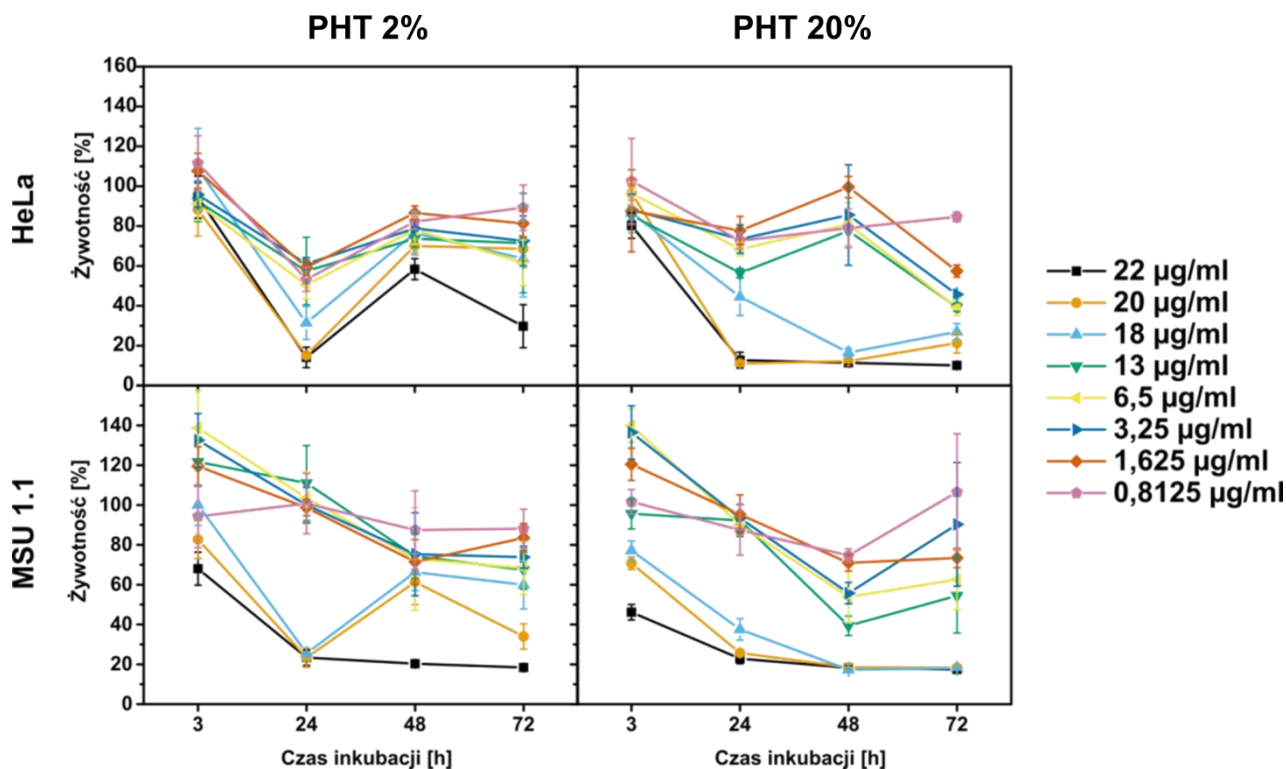
W przypadku komórek MSU 1.1 poddanych inkubacji z GMO 2% i GMO 20% również zaobserwowano wpływ LLCNPs na żywotność komórek. Dla stężeń poniżej 50 µg/ml żywotność komórek utrzymywała się na poziomie około 70% niezależnie od czasu inkubacji i niezależnie od rodzaju nanocząstek, zaś dla stężeń powyżej 100 µg/ml żywotność komórek spadała nawet do poziomu 20%.



Ryc. 77 Wyniki analizy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych GMO 2% i GMO 20% wobec linii komórkowych nowotworowych HeLa i prawidłowych MSU 1.1.

Analiza cytotoksyczności wykazała wyższą cytotoksyczność nanocząstek opartych na fitantriolu (PHT) w stosunku do nanocząstek opartych na monooleinianie glicerolu (GMO) Żywotność komórek HeLa inkubowanych przez 24 h z PHT 2% wyniosła od 60% (w stężeniu 0,8125 µg/ml) do 20% (w stężeniu 22 µg/ml) (Ryc. 78). Dwukrotne wydłużenie czasu inkubacji (48 h) w stężeniu 22 µg/ml skutkowało wzrostem żywotności komórek do poziomu 60%. W przypadku inkubacji z PHT 20%, żywotność komórek HeLa mieściła się w przedziale 80% (w

stężeniu 0,8125 $\mu\text{g/ml}$) do 20% (w stężeniach 20 $\mu\text{g/ml}$ i 22 $\mu\text{g/ml}$). Rezultaty otrzymane dla komórek MSU 1.1 były zbieżne z wynikami otrzymanymi dla komórek HeLa. Zarówno dla w przypadku inkubacji z PHT 2% i PHT 20%, żywotność utrzymywała się na poziomie około 80% w stężeniach poniżej 13 $\mu\text{g/ml}$, zaś dla wyższych stężeń żywotność komórek spadała do 20%.



Ryc. 78 Wyniki analizy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych PHT 2% i PHT 20% wobec linii komórkowych nowotworowych HeLa i prawidłowych MSU 1.1.

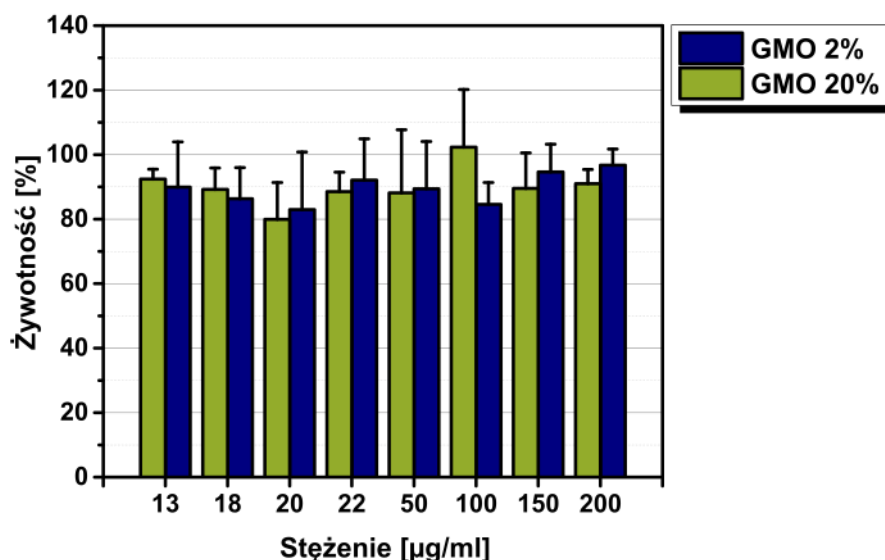
Szczegółowa analiza statystyczna przedstawionych powyżej wyników aktywności proliferacyjnej przedstawiona została w rozdziale 7. Aneks w Ryc. 106 - Ryc. 109.

Przedstawione wyniki analizy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o GMO i PHT są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi. Hinton i wsp. [214] porównali efekt cytotoksyczny lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO i PHT. Zarówno dla komórek jajnika chomika chińskiego CHO (z ang. *chinese hamster ovary*) jak i dla komórek gruczołakorka płuc A549, nanocząstki oparte na fitantriolu (PHT) wykazały efekt cytotoksyczny przy stężeniach powyżej 25 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku nanocząstek opartych na monooleinianie glicerolu (GMO) umieszczonych w komórkach A549 wykazano brak efektu cytotoksycznego dla stężeń poniżej 100 $\mu\text{g/ml}$. Te same nanocząstki umieszczone w komórkach CHO, w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, obniżały żywotność komórek do 60%. Większą cytotoksyczność nanocząstek opartych na PHT autorzy przypisują niszczeniu przez lipid błon komórkowych. Wyższe stężenie cytotoksyczne LLCNPs opartych o fitantriol zaobserwowane przez Hintona i wsp. w stosunku do wyników przedstawionych w poniższej pracy może wynikać z rodzaju linii komórkowych, na których przeprowadzane zostały analizy. Podobne rezultaty przedstawili Astolfi i wsp. [215]. Analizując cytotoksyczność LLCNPs

opartych o GMO i PHT na zarodkowych mysich fibroblastach STO, autorzy ci wykazali gwałtowny spadek żywotności komórek przy inkubacji z nanocząstkami PHT w stężeniu 50 µg/ml. W tym samym czasie obniżenie żywotności komórek STO inkubowanych z nanocząstkami GMO zaobserwowana została dopiero przy stężeniu 200 µg/ml. Wyniki te dowodzą, iż w przypadku lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych dominujący wpływ na cytotoksyczność ma zastosowany w LLCNPs lipid. Ponownie, podobne rezultaty uzyskano w poniżej pracy, udowadniając znacznie wyższą cytotoksyczność lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o PHT w stosunku do GMO, zaś różnice w wartościach stężeń cytotoksycznych mogą być wynikiem wykonania analiz na różnych liniach komórkowych, mogących wykazywać odmienną odporność na działanie tego typu układów. Zwiększoną reakcję cytotoksyczną na obecność nanocząstek opartych o PHT tłumaczyć można destabilizacją błony komórkowej wywołaną jej fuzją z nanocząstkami. Zhai i wsp. [216] przedstawili między innymi porównanie cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o PHT i GMO wobec androgenowrażliwych ludzkich komórek raka prostaty LNCaP i ludzkich komórek raka nerki. W przypadku komórek raka prostaty, nanocząstki oparte o PHT wykazywały efekt cytotoksyczny przy stężeniu 12,5 µg/ml, zaś wobec komórek raka nerki przy stężeniu 50 µg/ml. Analogiczna analiza dla LLCNPs opartych o GMO wykazała spadek żywotności komórek raka prostaty przy znacznie podwyższonym stężeniu nanocząstek, przekraczającym 100 µg/ml. Taki sam rezultat autorzy uzyskali dla komórek raka nerki. Autorzy pracy [216] zwracają uwagę, że cytotoksyczne działanie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych może zależeć od kompozycji błon komórkowych różnych linii komórkowych. Fornasier i wsp. [191] w pracy proponującej wykorzystanie w produkcji LLCNP analogu Pluroniku F127 (polifosfoestru) wykazali, iż tak powstałe nanocząstki oparte o GMO (i stabilizowane 9% masowymi Pluroniku F127), podczas 24h inkubacji ludzkich komórek zarodkowych HEK-293 (z ang. *human embryonic kidney*) generują efekt cytotoksyczny już przy stężeniu 75 µg/ml, co w porównaniu do przedstawionych wyżej doniesień literaturowych jest wartością istotnie niższą. Różnica pomiędzy otrzymanymi w niniejszej w pracy wynikami, a przedstawionymi przez Fornasiera i wsp. może wynikać z rodzaju zastosowanego testu cytotoksyczności. W przypadku Fornasiera i wsp. był to test kolorymetryczny bazujący na efekcie wiązania się barwnika do DNA komórki wskutek jej śmierci. Niemniej, autorzy dedukują, iż prócz składu lipidowego (monooleinian glicerolu lub fitantriol) również rodzaj surfaktantu zastosowany do stabilizacji LLCNPs może być źródłem cytotoksyczności.

Wcześniej przedstawione wyniki dotyczyły cytotoksycznego wpływu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu i fitantriolu na dwuwymiarowe hodowle komórkowe komórek HeLa i MSU 1.1. Dla potrzeb przyszłych zastosowań biomedycznych jako nośniki leków i środków kontrastujących istotna jest również ocena wpływu takich układów na rzeczywiste guzy czy tkanki. Dobrym modelem guzów litych *in vitro* do analiz cytotoksyczności są sferoidy, tzn. trójwymiarowe konglomeraty komórkowe [179].

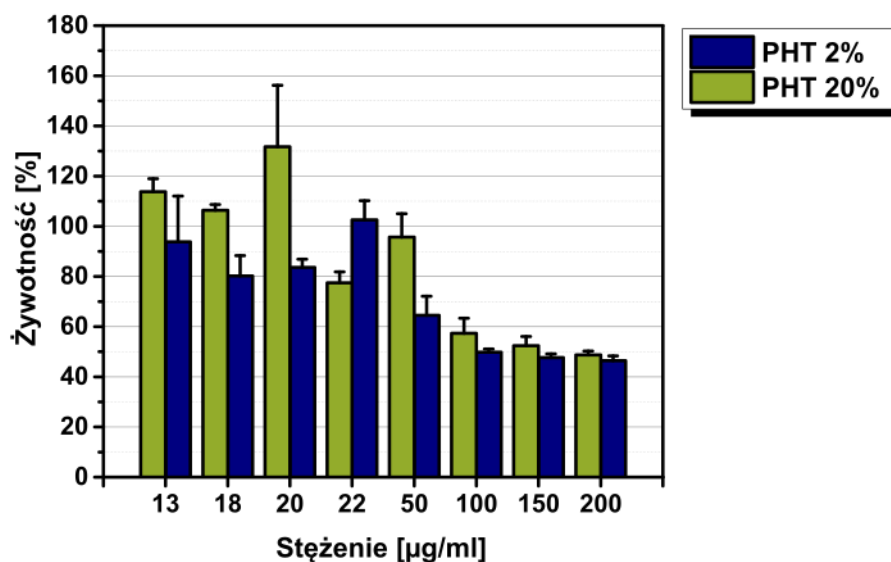
W celu rozszerzenia analizy cytotoksyczności, wykonano kolorymetryczny test WST-1 na trójwymiarowych sferoidach komórek HeLa (Ryc. 79). W przypadku nanocząstek opartych na GMO 2% i GMO 20% zaobserwowano wysoką żywotność komórek na poziomie 90% kontroli niezależnie od stężenia. Zaobserwowane wyniki wskazują na zdecydowanie niższą cytotoksyczność LLCNPs opartych na GMO 2% i GMO 20% na sferoidach komórek HeLa w stosunku do hodowli dwuwymiarowych, gdzie podczas 24 godzinnej inkubacji z GMO 2% i GMO 20% przy stężeniach powyżej 100 $\mu\text{g/ml}$ obserwowano spadek względnej żywotności do poziomu 20%. Jak zostało przedstawione wcześniej, efekt taki może być skutkiem struktury sferoidu, który lepiej odzwierciedla charakter struktur występujących w organizmach żywych i odznacza się wyższą tolerancją wobec układów potencjalnie cytotoksycznych.



Ryc. 79 Analiza cytotoksyczności LLCNPs GMO 2% i GMO 20% na sferoidach komórek HeLa.

W przypadku inkubacji sferoidów HeLa z nanocząstkami opartymi na fitantriolu (PHT) wysoką żywotność odnotowano jedynie dla stężeń lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych mniejszych niż 22 $\mu\text{g/ml}$ (Ryc. 80). Dla stężeń wyższych zaobserwowano spadek żywotności sferoidów. W szczególności, nanocząstki PHT 2% zmniejszały żywotność sferoidów do poziomu 50% przy stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$, zaś dla PHT 20% zbliżony poziom cytotoksyczności zaobserwowano dopiero przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Ponownie, w stosunku do analogicznej analizy cytotoksyczności wykonanej na hodowlach dwuwymiarowych komórek HeLa, badania aktywności proliferacyjnej wykazały istotnie niższą cytotoksyczność nanocząstek opartych

fitantriolu wyznaczonej dla sferoidów. Podobnie jak w przypadku LLCNPs opartych o monooleinian glicerolu, różnica w wartościach stężeń cytotoksycznych wynikać może z wyższej odporności sferoidów na cytotoksyczne działanie nanocząstek. Istotnym podkreśleniem jest jednak fakt, że analiza cytotoksyczności nanocząstek GMO i PHT wykazała podobny trend zarówno dla sferoidów i hodowli dwuwymiarowych, tj. istotnie wyższą cytotoksyczność układów opartych o fitantriol (PHT) w stosunku do monooleinianu glicerolu (GMO).



Ryc. 80 Analiza cytotoksyczności LLCNPs PHT 2% i PHT 20% na sferoidach komórek HeLa.

Analiza cytotoksyczności LLCNPs na sferoidach komórek HeLa wykazała słabszy wpływ badanych nanocząstek na żywotność sferoidów w porównaniu do wpływu LLCNPs na komórki w hodowlach dwuwymiarowych. Różnice te wynikają z początkowego działania LLCNPs tylko na komórki zewnętrzne, w związku z czym dyfuzja nanocząstek w głąb sferoidu jest utrudniona, co prowadzi do większej przeżywalności komórek. Powyższe wyniki wskazują, iż podczas badań modelowych na zwierzętach możliwe będzie zwiększenie stosowanej dawki nanocząstek w stosunku do ich stężeń wystarczających do wywołania reakcji cytotoksyczności w hodowlach dwuwymiarowych.

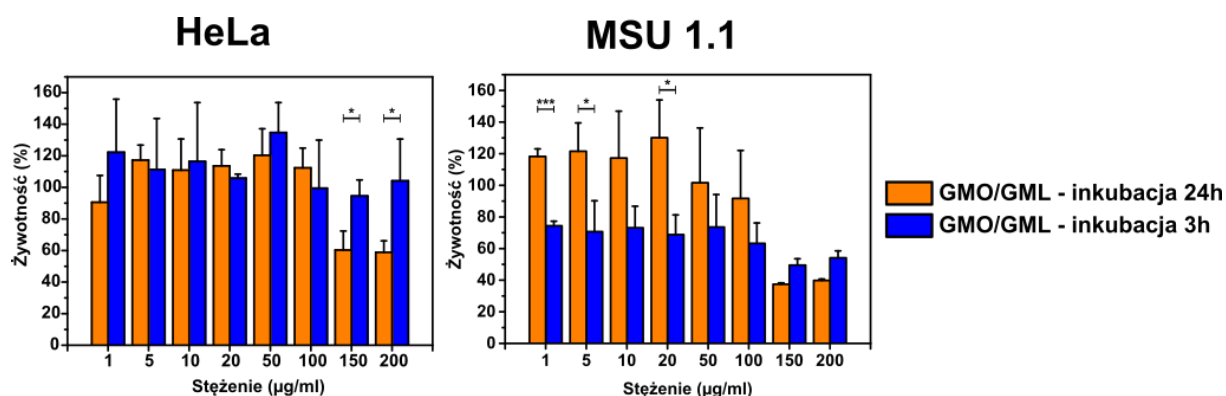
Sferoidy komórkowe są coraz częściej wykorzystywane w analizach cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, ale także w badaniach efektywności dyfuzji LLCNPs w głąb guzów. Pramanik i wsp. [217] badający lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte o GMO i sfunkcjonalizowane kwasem hialuronowym wykazali porównywalną efektywność celowanej terapii w komórkowych hodowlach dwuwymiarowych oraz w trójwymiarowych sferoidach. W innej pracy Pramanik i wsp. [149] badając wpływ LLCNPs opartych o GMO sfunkcjonalizowanych affimerami tj. małymi proteinami wykazującymi powinowactwo specyficznych antygenów, wykazali słabszy efekt cytotoksyczny badanych nanocząstek na sferoidy komórkowe w stosunku do hodowli dwuwymiarowych. Cytryniak i wsp. [218] w celu wykazania wpływu badanych przez siebie układów na sferoidy komórkowe

wykorzystali mikroskopię fluorescencyjną. Sferoidy poddane inkubacji z nanocząstkami wybarwili jodkiem propidyny (wybarwiającym komórki nekrotyczne i apoptyczne) oraz barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33258 (wybarwiającym jądra komórkowe w żywych komórkach). Dzięki takiemu podejściu autorzy byli w stanie obserwować zmiany w ilości żywych i apoptycznych/nekrotycznych komórek w obrębie całego sferoidu w trakcie ich inkubacji z nanocząstkami. Z kolei Zhai i wsp. [219] analizując wpływ LLCNPs opartych o GMO i F127 podkreślili, iż dotychczasowe wnioski na temat cytotoksyczności LLCNPs opartych na GMO są znacznie zawyżone, ponieważ były zazwyczaj wyciągane na podstawie analiz cytotoksyczności na hodowlach dwuwymiarowych. Do podobnych wniosków można dojść podczas analizy uzyskanych wyników w poniższej pracy, gdzie wykazano znacznie niższą cytotoksyczność LLCNPs opartych na GMO i PHT na sferoidach komórek HeLa w stosunku do cytotoksyczności wykazanej dla hodowli dwuwymiarowych. Powyższy wniosek ponownie wskazuje na konieczność przeprowadzania analiz cytotoksyczności zarówno na hodowlach dwuwymiarowych jak i trójwymiarowych dla uzyskania pełniejszego obrazu cytotoksycznego wpływu nanoukładów o potencjalnych zastosowaniach jako nośniki leków i środków kontrastujących.

Przedstawione powyżej wyniki dotyczyły cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o GMO i PHT. W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej wytworzone zostały również układy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o monooleinian glicerolu i monolaurynian glicerolu (GMO/GML). W celu oceny użyteczności takich układów jako potencjalnych nośników leków (np. antybiotyków), poddano je analogicznej analizie aktywności proliferacyjnej WST-1 na hodowlach dwuwymiarowych.

W pierwszej kolejności porównane zostały żywotności komórek HeLa i MSU 1.1 poddanych 3 godzinnej i 24 godzinnej inkubacji z nanocząstkami GMO/GML (Ryc. 81). Komórki HeLa inkubowane w 200 µg/ml i 150 µg/ml GMO/GML przez 3h odznaczały się żywotnością na poziomie 100%, która spadała do poziomu 60% przy inkubacji trwającej 24h. Dla GMO/GML o stężeniach poniżej 150 µg/ml nie zaobserwowano różnic w żywotności między 3 godzinną a 24 godzinną inkubacji.

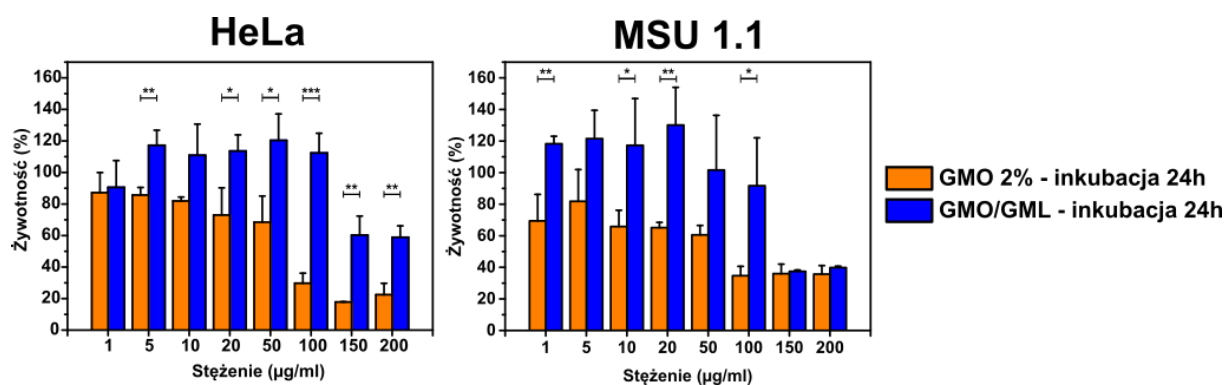
W przypadku komórek MSU 1.1 inkubowanych z GMO/GML, w stężeniach 200 µg/ml i 150 µg/ml nie zaobserwowano istotnych różnic w cytotoksyczności między inkubacją 3h i 24h, gdzie żywotność komórek wynosiła ok. 40%. W stężeniach 100 µg/ml i 50 µg/ml również nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami żywotności komórek MSU 1.1 poddanych 3h i 24h inkubacji, przy czym w przeciwieństwie dla wyższych stężeń, wartości żywotności dla tych stężeń plasowały się na poziomie 80%. Statystycznie istotne różnice w cytotoksyczności GMO/GML w zależności od czasu inkubacji zaobserwowano dla niższych stężeń nanocząstek (1 µg/ml - 20 µg/ml). Dla tych stężeń zaobserwowano istotnie niższą żywotność komórek MSU 1.1 poddanych 3h inkubacji, wynoszącą średnio 80% , w porównaniu do żywotności obserwowanej podczas 24h inkubacji wynoszącej średnio ponad 100%.



Ryc. 81 Porównanie żywotności komórek HeLa i MSU 1,1 poddanych 3 godzinnej i 24 godzinnej inkubacji z zoptymalizowanymi układami GMO/GML.

Aby lepiej zrozumieć cytotoksyczny efekt wprowadzenia do lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o monooleinian glicerolu (GMO) monolaurynianu glicerolu (GML), porównano cytotoksyczność układu GMO/GML w stosunku do zbadanego w pierwszej części pracy układu GMO 2% nie zawierającego domieszki monolaurynianu glicerolu (GML). W przypadku komórek HeLa zaobserwowano wyższą żywotność komórek poddanych inkubacji z GMO/GML w stosunku do GMO 2% w całym zakresie analizowanych stężeń. Istotny spadek żywotności w komórkach HeLa zaobserwowano dla GMO 2% 100 µg/ml, gdzie żywotność spadała do poziomu 20%, podczas gdy żywotność komórek HeLa inkubowanych z GMO/GML 100 µg/ml pozostawała na poziomie 100%. Żywotność komórek HeLa inkubowanych z GMO/GML spadała w stężeniach powyżej 150 µg/ml osiągając poziom około 60%, podczas gdy żywotność komórek HeLa inkubowanych w analogicznych stężeniach GMO 2% pozostawała na poziomie 20%.

Podobnie jak w przypadku komórek HeLa, żywotność komórek MSU 1.1 inkubowanych z GMO/GML była wyższa w porównaniu z żywotnością komórek inkubowanych GMO 2%. W zakresie stężeń od 1 µg/ml do 100 µg/ml, żywotność komórek MSU 1.1 inkubowanych z GMO/GML oscylowała w granicach 100 i spadała do poziomu 30% w stężeniach 150 µg/ml i 200 µg/ml. W przypadku inkubacji z GMO 2%, żywotność komórek MSU 1,1 fluktuowała wokół 70% dla stężeń 1 µg/ml do 50 µg/ml, spadając do poziomu 30% w wyższych stężeniach. Powyższe wyniki wskazują na niższą cytotoksyczność nowo zsyntetyzowanych układów GMO/GML, będących systemami o potencjalnym zastosowaniu jako nośnik leków, w stosunku do układów opartych jedynie na GMO.



Ryc. 82 Porównanie żywotności komórek HeLa i MSU 1.1 poddanych inkubacji z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi opartymi o czyste GMO oraz z zoptymalizowanymi układami GMO/GML.

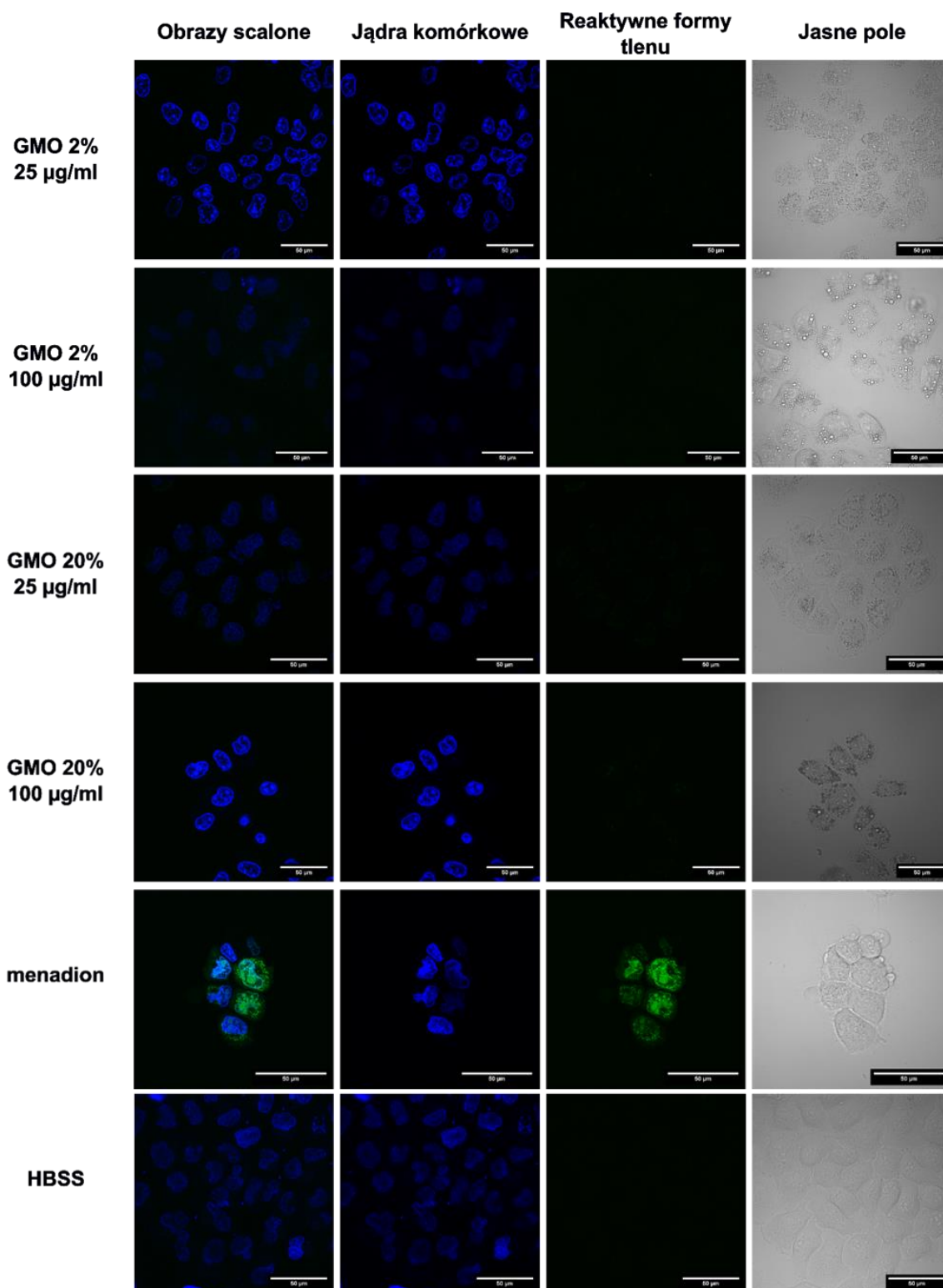
5.2.2 Analiza poziomu reaktywnych form tlenu

Przedstawione powyżej wyniki miały na celu wykazanie stężeń cytotoksycznych badanych układów opartych na GMO, PHT oraz GMO/GML. W celu określenia mechanizmów cytotoksyczności badanych układów wykonano analizę poziomu reaktywnych form tlenu. Jednym z głównych mechanizmów cytotoksyczności nanomateriałów jest zwiększenie w komórkach poziomu reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*) w wyniku zaburzenia szlaków metabolicznych [220,221]. Do głównych reaktywnych form tlenu w komórce należą nadtlenek O_2^- , wolne grupy hydroksylowe OH^- oraz produkty utleniania jak np. nadtlenek wodoru H_2O_2 , peroksyazotyn $ONOO^-$. W komórce utrzymującej homeostazę, balans między czynnikami utleniającymi i redukującymi pozostaje w równowadze. W sytuacji wystąpienia stresu i przy zaburzeniu procesu komórkowego oddychania tlenowego, ilość reaktywnych form tlenu wzrasta. W efekcie ROS utleniają niezbędne do przeżycia komórki białka i kwasy nukleinowe prowadząc do zaburzenia komórkowych szlaków metabolicznych oraz mutacji kodu genetycznego. Proces ten prowadzi ostatecznie do apoptozy komórki.

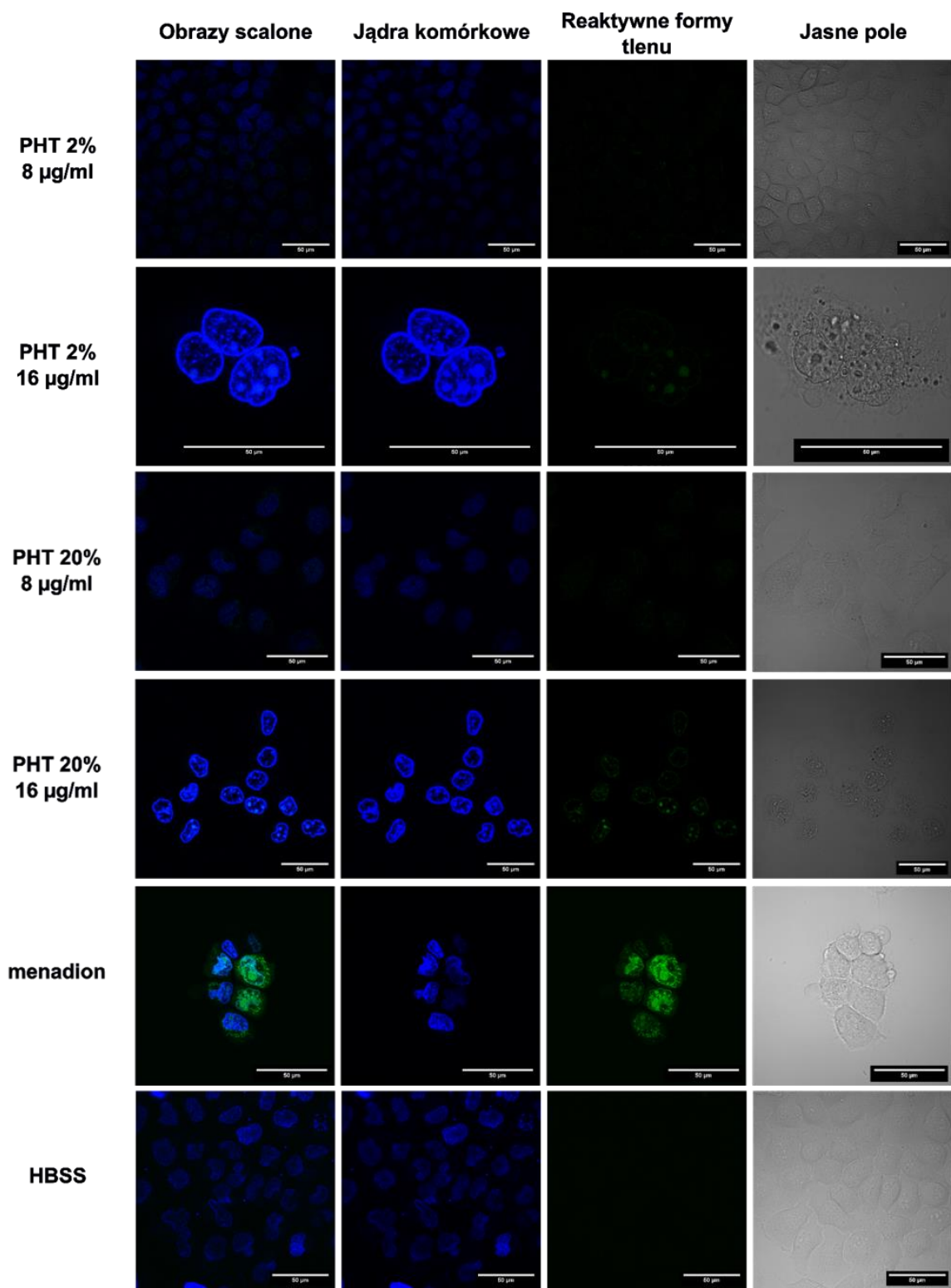
W celu zobrazowania poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach HeLa i MSU 1,1 inkubowanych z LLCNPs wykorzystano metodę konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej. W połączeniu z odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym, czułym na obecność reaktywnych form tlenu, metoda ta dostarcza informacji odnośnie przestrzennego rozkładu ROS w obrębie komórki. W prowadzonych badaniach wykorzystano barwnik CellRox® Green, który w stanie zredukowanym charakteryzuje się słabą fluorescencją. W obecności reaktywnych form tlenu barwnik zostaje utleniony i następnie po związaniu się z DNA komórki wykazuje silną zieloną fluorescencję, której intensywność jest proporcjonalna do poziomu ROS. Jako kontrolę pozytywną w badaniu wykorzystano komórki inkubowane z menadionem indukującym powstawanie reaktywnych form poprzez aktywowanie apoptozy komórkowej zależnej od ROS [222].

Jak wynika z Ryc. 83 obraz mikroskopowy pozyskany dla komórek HeLa poddanych inkubacji z układami GMO 2% i GMO 20% pozbawiony jest silnej zielonej fluorescencji spodziewanej dla podwyższonych poziomów ROS. Niepodwyższony poziom ROS w komórkach inkubowanych w stężeniach GMO 2% i GMO 20%, dla których analiza WST-1 wykazała efekt toksyczny, może

świadczyć o braku udziału ROS w cytotoksycznym wpływie tych nanocząstek na komórki HeLa. Brak różnic w poziomie ROS zaobserwowano również w przypadku komórek HeLa inkubowanych z 8 µg/ml PHT 2% i PHT 20% (Ryc. 84). Dla wyższych stężeń (16 µg/ml) zarówno dla PHT 2% i PHT 20% zaobserwowano słabą zieloną fluorescencję w obrębie jąder komórkowych (Ryc. 84), co wskazuje na podniesiony w stosunku do kontroli negatywnej poziom reaktywnych form tlenu. Wynik ten wskazuje na możliwy udział reaktywnych form tlenu w cytotoksycznym oddziaływaniu LLCNPs opartych na PHT. Poniższe wyniki są ponadto zgodne z wynikami uzyskanymi podczas analizy WST-1. Wyniki pozwalają wysnuć wniosek, iż mechanizmy cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych o GMO i PHT wykazują inny charakter i mają odmienne podłoże, przy czym jednym z mechanizmów cytotoksyczności LLCNPs opartych o PHT może być podwyższony poziom reaktywnych form tlenu.



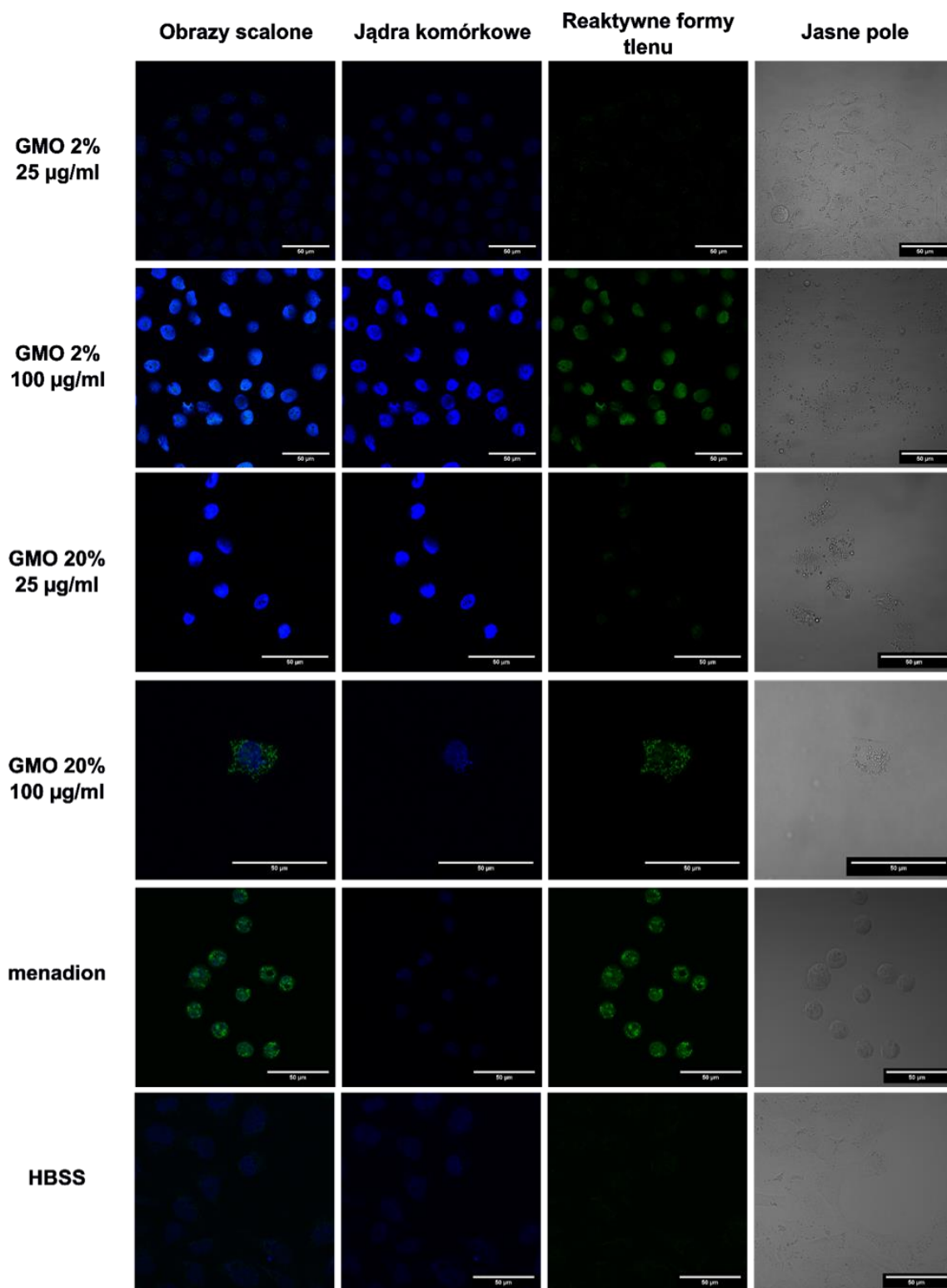
Ryc. 83 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach HeLa po inkubacji z LLCNPs opartymi na GMO. Skala 20 µm.



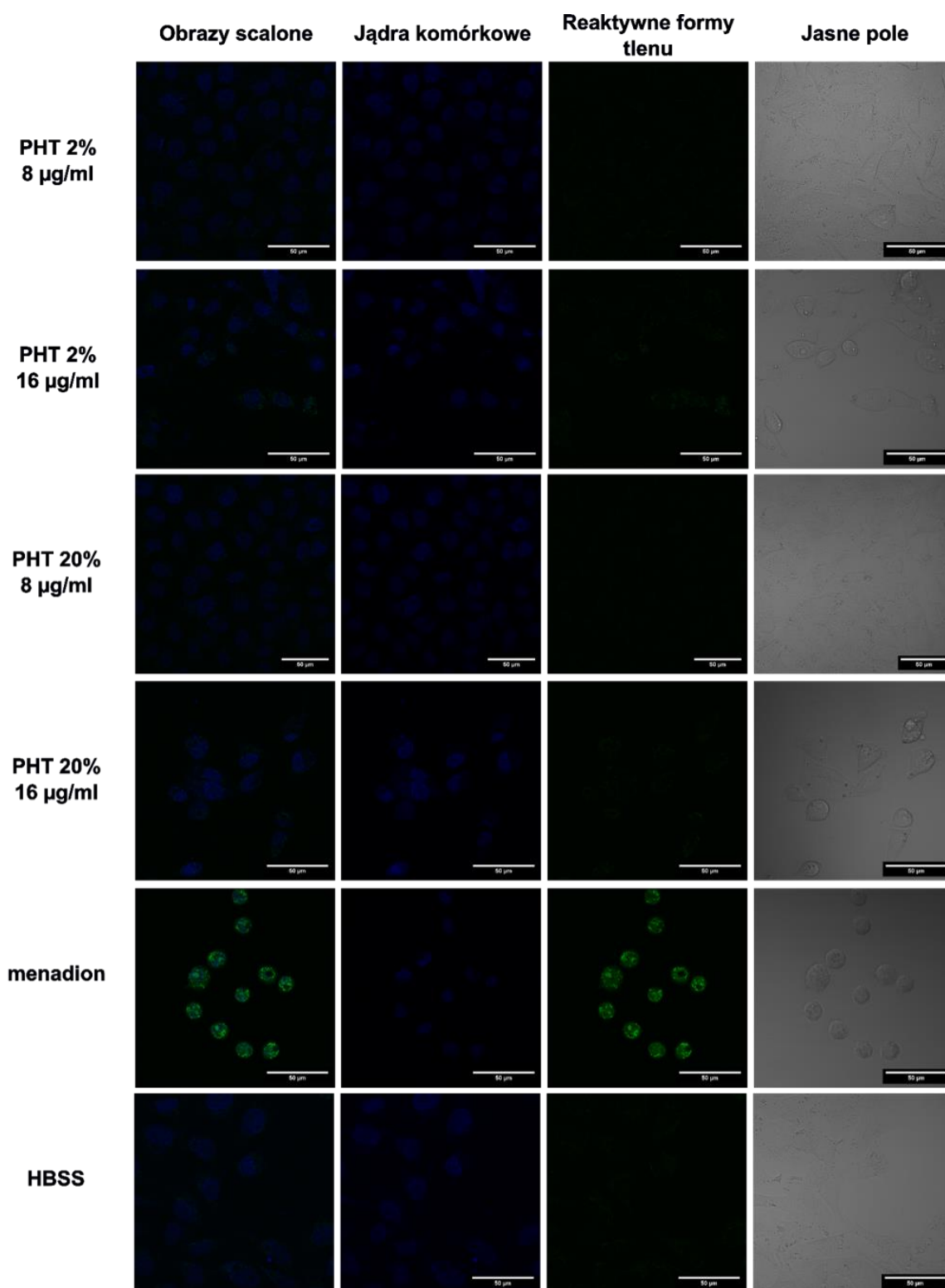
Ryc. 84 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach HeLa po inkubacji z LLCNPs opartymi na PHT. Skala 20 µm.

Odmienne wyniki, w stosunku do komórek HeLa uzyskano dla komórek MSU 1.1. W przypadku inkubacji komórek MSU 1.1 z 25 µg/ml GMO 2% i GMO 20% zaobserwowano słaby, porównywalny z kontrolą negatywną sygnał pochodzący od barwnika CellRox® Green, co wskazuje na brak podwyższonego poziomu ROS w tych komórkach (Ryc. 85). W komórkach MSU 1.1 inkubowanych z 100 µg/ml GMO 2% i GMO 20% zaobserwowano z kolei silną zieloną fluorescencję w obrębie jąder komórkowych pochodzącą od barwnika CellRox® Green (Ryc. 85). Wynik taki świadczy o mocnym zaburzeniu równowagi redukcyjnej w komórkach inkubowanych z 100 µg/ml GMO 2% i GMO 20% prowadzącą do podwyższonego poziomu ROS, co może być przyczyną cytotoksycznego efektu tego rodzaju nanocząstek na MSU 1.1. Uzyskane wyniki pokrywają się z wynikami uzyskanymi podczas analizy WST-1, dla której efekt cytotoksyczny układów GMO 2% i GMO 20% obserwowano dla stężeń 100 µg/ml.

Obrazowanie komórek MSU 1.1 inkubowanych z PHT 2% i PHT 20% wykazało nieznacznie podniesiony poziom reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych w wyższym stężeniu nanocząstek, tj. 16 µg/ml, zaś dla stężenia 8 µg/ml poziom fluorescencji pochodzącej od utlenionego przez ROS odczynnika CellRox® Green porównywalny był z kontrolą negatywną (Ryc. 86). Podobnie jak w przypadku komórek HeLa, wyniki zaobserwowane podczas mikroskopowej analizy ROS w komórkach MSU 1.1 poddanych inkubacji z LLCNPs PHT 2% i PHT 20% są analogiczne z wynikami uzyskanymi dla WST-1, gdzie efekt cytotoksyczny układów PHT 2% i PHT 20% zaobserwowano dla stężeń 16 µg/ml. Obserwacje świadczą o tym, iż jednym z głównych mechanizmów cytotoksyczności PHT 2% i PHT 20% na komórkach MSU 1.1 jest zwiększenie poziomu ROS, mogących prowadzić do utleniania kluczowych dla przeżycia komórek komponentów.



Ryc. 85 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach MSU 1.1 po inkubacji z LLCNPs opartymi na GMO. Skala 20 µm.



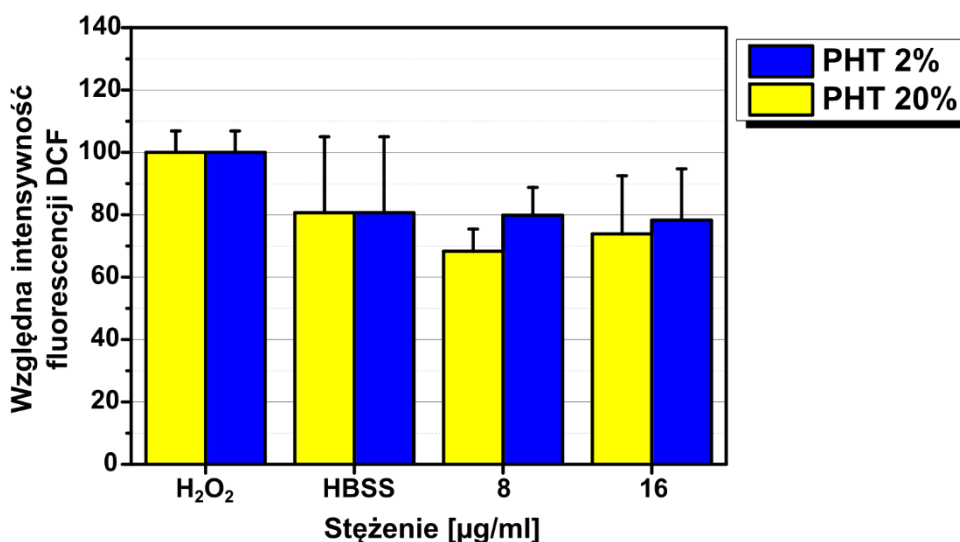
Ryc. 86 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej reaktywnych form tlenu w komórkach MSU 1.1 po inkubacji z LLCNPs opartymi na PHT. Skala 20 µm.

Przedstawiona powyżej analiza reaktywnych form tlenu jest metodą jakościową, pozwalającą jedynie obrazowe porównanie poziomu ROS między próbkami a kontrolami. W celu wyznaczenia i porównania poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych z LLCNPs w sposób ilościowy wykorzystano test DCFH-DA. W analizie DCFH-DA wykorzystywane

jest zjawisko utleniania niefluorescencyjnego diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA) do fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF, z ang. 2',7'-dichlorofluorescein) przez wewnątrzkomórkowe reaktywne formy tlenu, przede wszystkim przez rodniki hydroksylowe, węglanowe, azotowe i tylowe [223,224]. Stopień konwersji DCFH-DA do DCF, a co za tym idzie intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do poziomu reaktywnych form tlenu.

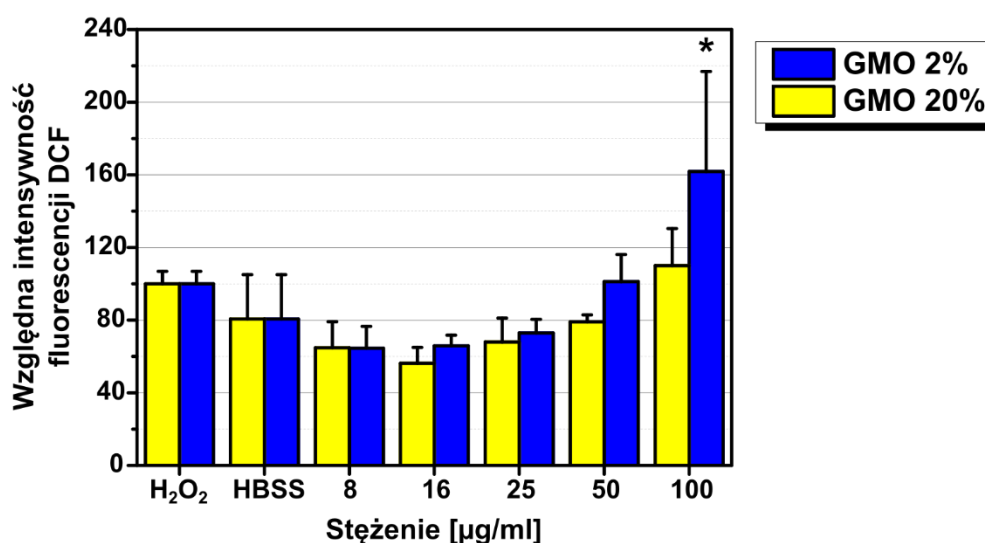
W analizie DCFH-DA w komórkach HeLa zaobserwowano (Ryc. 87, Ryc. 88) nieznaczną różnicę w poziomie reaktywnych form tlenu między kontrolą pozytywną, stanowiącą komórki inkubowane z H₂O₂ i kontrolą negatywną, stanowiącą komórki inkubowane w buforze HBSS. Wynik taki może być efektem stresu oksydacyjnego indukowanego niedoborem glukozy, wynikającym z zaburzenia równowagi pomiędzy procesami glikolizy i oddychania komórkowego w komórkach nowotworowych [225].

Oszacowany w trakcie analizy DCFH-DA poziom reaktywnych form tlenu wytwarzanych w komórkach HeLa podczas inkubacji z PHT 2% i PHT 20% okazał się być porównywalny z poziomem reaktywnych form tlenu wyznaczonych dla kontroli negatywnej (HBSS) i pozytywnej (H₂O₂) (Ryc. 87) zarówno w niskim (8 µg/ml) i wysokim (16 µg/ml) stężeniu nanocząstek. Przedstawione wyniki różnią się z wynikami uzyskanymi w trakcie analizy mikroskopowej z wykorzystaniem odczynnika CellRox® Green, dla których nieznacznie podniesiony poziom ROS zaobserwowano jedynie dla komórek HeLa inkubowanych w wyższych stężeniach PHT 2% i PHT 20%. Wynik taki może świadczyć o fakcie wykrywania szerszego spektrum ROS na drodze analizy DCFH-DA.



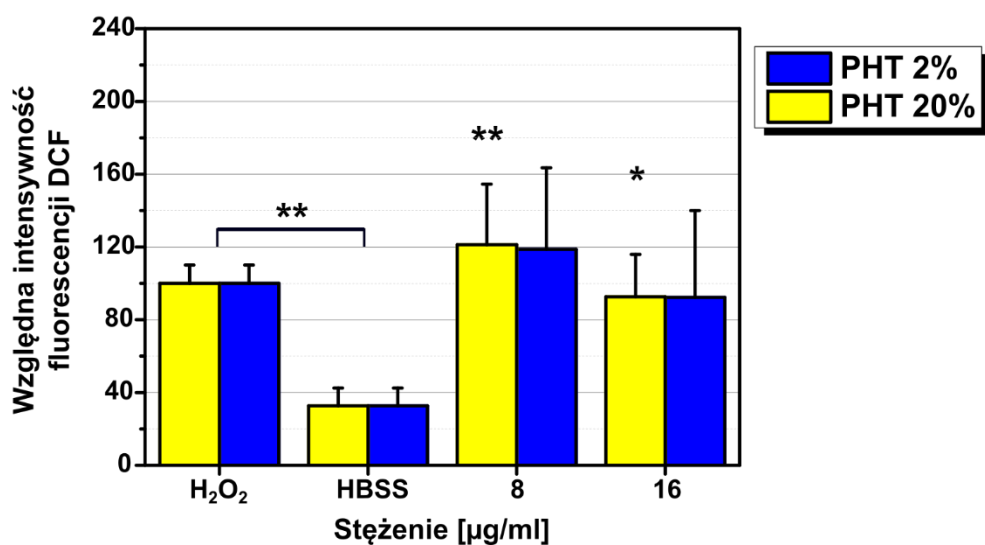
Ryc. 87 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT.

Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych z GMO 2% 100 µg/ml był istotnie wyższy w stosunku do kontroli, zaś dla niższych stężeń nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic (Ryc. 88).



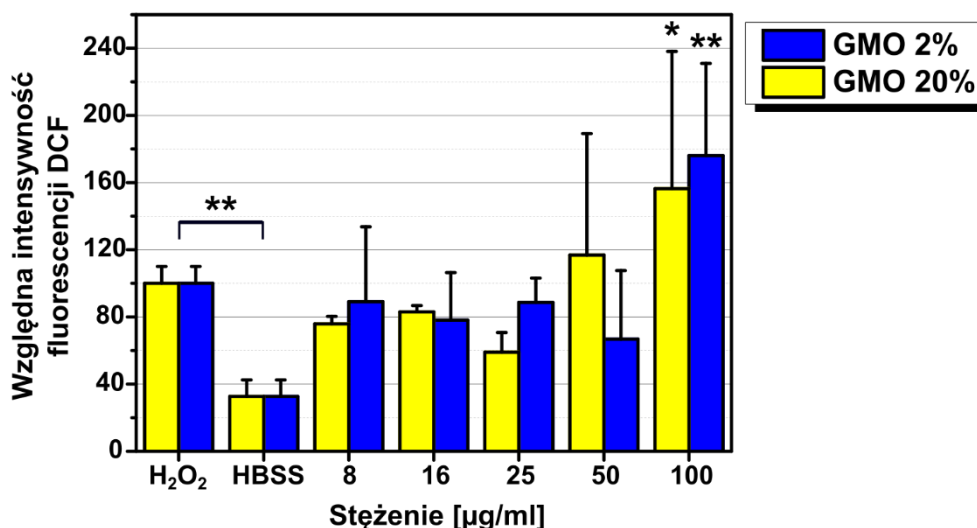
Ryc. 88 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi o GMO.

Podobnie jak w przypadku wyników otrzymanych dla komórek HeLa, również w przypadku komórek MSU 1.1 inkubowanych z PHT 20% zaobserwowany poziom reaktywnych form tlenu był porównywalny z kontrolą negatywną (Ryc. 89). W przypadku PHT 2%, Ryc. 89 sugerować może, iż poziom ROS był porównywalny z poziomem ROS w komórkach MSU 1.1 inkubowanymi z PHT 20%, jednak większy rozrzut wyników skutkował brakiem oznaczenia prób jako statystycznie istotnych. Podobnie jak w przypadku komórek HeLa inkubowanymi z PHT 2% i PHT 20%, poziom reaktywnych form tlenu w komórkach MSU 1.1 wyznaczony na drodze analizy DCFH-DA różni się od wyników uzyskanych na drodze analizy mikroskopowej CellRox® Green.



Ryc. 89 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT.

Rozważając inkubację komórek MSU 1.1 z dyspersjami GMO 2% i GMO 20%, wyniki prezentują się podobnie jak w przypadku komórek HeLa inkubowanych z analogicznymi roztworami nanocząstek (Ryc. 90). Statystycznie istotny wzrost poziomu ROS zaobserwowano dla obu rodzajów GMO dopiero przy stężeniu 100 µg/ml.



Ryc. 90 Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o GMO.

Uzyskane wyniki dowodzą, iż poziom generowanych reaktywnych form tlenu jest zależny od stężenia LLCNPs. Przyczyną podwyższonego poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi mogą być zaburzenia w obrębie złożonego mechanizmu wiążącego m.in. procesy metabolizmu lipidów, peroksydację lipidów i ferroptozę. Takie stwierdzenie uzasadniają wyniki wcześniejszych badań Falchi i wsp. [139], którzy zaobserwowali hiperpolaryzację błon mitochondrialnych w komórkach inkubowanych z LLCNPs, prowadzącą do wytwarzania mitochondrialnych reaktywnych form tlenu. Nieprawidłowości w polaryzacji błony mitochondrialnej w wyniku inkubacji z LLCNPs mogą wynikać z zaburzenia mitochondrialnej homeostazy Ca²⁺, jak podaje [226]. Zaburzenia gospodarki wapniowej w mitochondriach obserwowane są m.in. w lizosomalnych chorobach spichrzeniowych [227,228]. Dedukować można, iż w komórkach poddanych działaniu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, działanie lizosomów zostaje skupione w kierunku trawienia nagromadzonych lipidów. Skutkować to może osłabieniem działania lizosomów w innych procesach komórkowych, prowadząc do zaburzeń podobnych do tych występujących w chorobach spichrzeniowych, tj. zaburzając mitochondrialną gospodarkę wapniową, powodować hiperpolaryzację błon mitochondrialnych i ostatecznie prowadzić do wytwarzania reaktywnych form tlenu.

Inną, komplementarną przyczyną wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach poddanych inkubacji z LLCNPs może być podwyższona aktywność peroksydacji lipidów. Peroksydacja lipidów jest łańcuchową reakcją utleniania lipidów, której produktem końcowym są nadtlenki lipidów. W trakcie procesu peroksydacji lipidów powstaje wiele różnych

reaktywnych form tlenu, m.in. nadtlenki wodoru, ale też utlenione aldehydy będące stabilnymi frakcjami ROS, które w przypadku zwiększonej aktywności peroksydacji lipidów mogą oddziaływać na inne elementy komórki, prowadząc do ich utleniania i degradacji [229]. Ponadto, powstające w wyniku peroksydacji nadtlenki lipidów są sygnałem inicjującym ferroptozę – zależną od żelaza śmierć komórkową, będącą skutkiem nagromadzenia się lipidowych reaktywnych form tlenu [230].

Reasumując, wyniki sugerują, iż w efekcie działania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu i fitantriolu, w komórkach HeLa i MSU 1.1 wytwarzane są reaktywne formy tlenu. Porównując uzyskane wyniki poziomu reaktywnych form tlenu z analizą aktywności proliferacyjnej WST-1 można jednak wysnuć wniosek, iż mechanizm cytotoksyczności LLCNPs opartych na PHT w porównaniu do GMO jest odmienny. Analiza aktywności proliferacyjnej komórek inkubowanych z 8 µg/ml PHT 2% i PHT 20% wskazuje na brak zaburzeń w obrębie żywotności komórek HeLa i MSU 1.1, w czasie, kiedy analiza ROS wskazuje na wytwarzanie reaktywnych form tlenu przy tych stężeniach LLCNPs. Z kolei porównując te same wyniki uzyskane dla LLCNPs GMO 2% i GMO 20% zaobserwować można, iż podwyższony poziom reaktywnych form tlenu występuje w stężeniach nanocząstek, dla których zaobserwowano efekt cytotoksyczny w analizie WST-1.

5.2.3 Analiza integralności cytoszkieletu

Przedstawione w poprzednim rozdziale wyniki obrazowania mikroskopowego sugerują, iż jednym z mechanizmów cytotoksyczności LLCNPs opartych na GMO i PHT może być niepożądane działanie reaktywnych form tlenu, wytwarzanych w nadmiernych ilościach w wyniku obecności nanocząstek. Jedną ze struktur, na które oddziaływać mogą ROS jest cytoszkielet, białkowa struktura odpowiadająca m.in. za utrzymanie kształtu komórki, transport wewnątrzkomórkowy, mobilność komórki, rozpoznawanie i transport sygnałów mechanicznych, adhezję czy podziały komórkowe [231–235]. Mnogość funkcji cytoszkieletu sprawia, że jego integralność jest kluczowa dla utrzymania homeostazy zaś zmiany w jego strukturze wskutek utleniania przez ROS mogą prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórki i jej śmierci. Analiza integralności cytoszkieletu jest szczególnie istotna w kontekście analizy cytotoksyczności nanocząstek o potencjalnej funkcji jako nośniki leków, ponieważ zaburzenia struktury cytoszkieletu komórek nowotworowych może prowadzić do upośledzenia ich zdolności adhezyjnych, zwiększając ryzyko wystąpienia przerzutów podczas terapii chorób nowotworowych.

W celu zbadania potencjalnego wpływu zsyntetyzowanych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na integralności cytoszkieletu komórek HeLa i MSU 1.1, ponownie wykorzystano możliwości skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej. Tym razem, filamenty aktynowe badanych komórek wybarwiono falloidyną wykazującą powinowactwo do F-aktyny [236] skoniugowanej z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 488.

W przypadku komórek HeLa, LLCNPs oparte na monooleinianie glicerolu (GMO) wpłynęły negatywnie na integralność filamentów aktynowych zarówno w stężeniach 25 µg/ml i 100

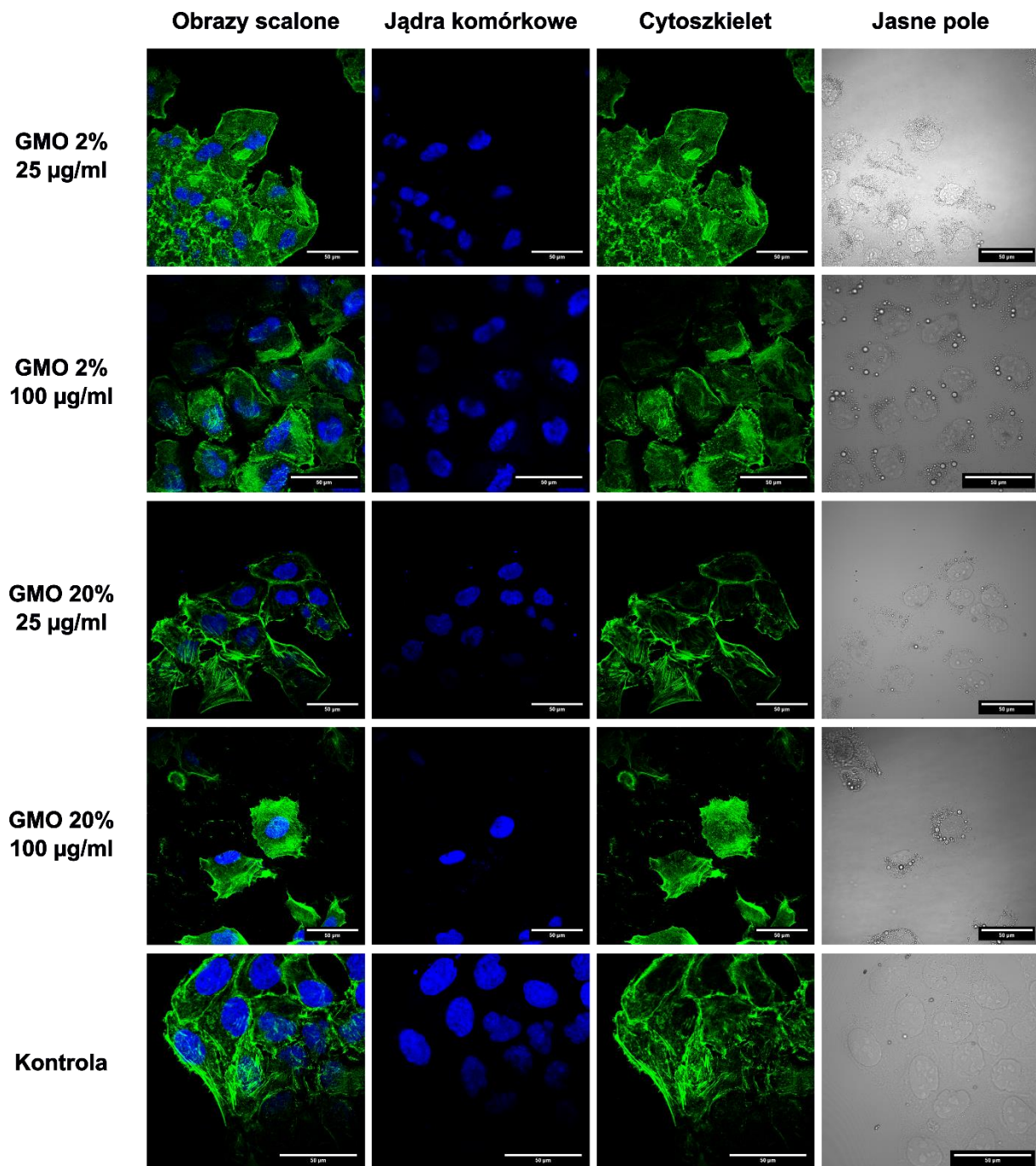
$\mu\text{g/ml}$, przy czym w wyższych stężeniach zaburzenia w obrębie struktury cytoszkieletu były większe (Ryc. 91). Układy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na fitantriolu (PTH) miały silniejszy wpływ na integralność filamentów aktynowych cytoszkieletu w porównaniu do układów opartych na GMO (Ryc. 92). Wpływ ten był szczególnie widoczny w przypadku nanocząstek PHT 20%, dla których zarówno dla stężeń $8 \mu\text{g/ml}$ oraz $16 \mu\text{g/ml}$ cytoszkielet został całkowicie zniszczony.

Komórki MSU 1.1 wydają się bardziej odporne na działanie lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. Dla nanocząstek opartych na GMO (zarówno dla GMO 2% jak i GMO 20%), przy stężeniach $25 \mu\text{g/ml}$, struktura cytoszkieletu porównywalna była do kontroli, zaś dla stężeń $100 \mu\text{g/ml}$ obserwowane było niewielkie zmniejszenie integralności cytoszkieletu, przejawiające się fragmentacją filamentów aktynowych (Ryc. 93). W przypadku układów opartych na PHT dla stężeń $8 \mu\text{g/ml}$, zarówno dla PHT 2% i PHT 20% filamety aktynowe cytoszkieletu komórek MSU 1.1 były nienaruszone i porównywalne do kontroli, zaś przy stężeniu $16 \mu\text{g/ml}$ zaobserwowano niewielkie zmiany w stosunku do kontroli (Ryc. 94), takie jak przerzedzenia w strukturze sieci włókien aktynowych czy odłączone od integralnej części cytoszkieletu fragmenty białek.

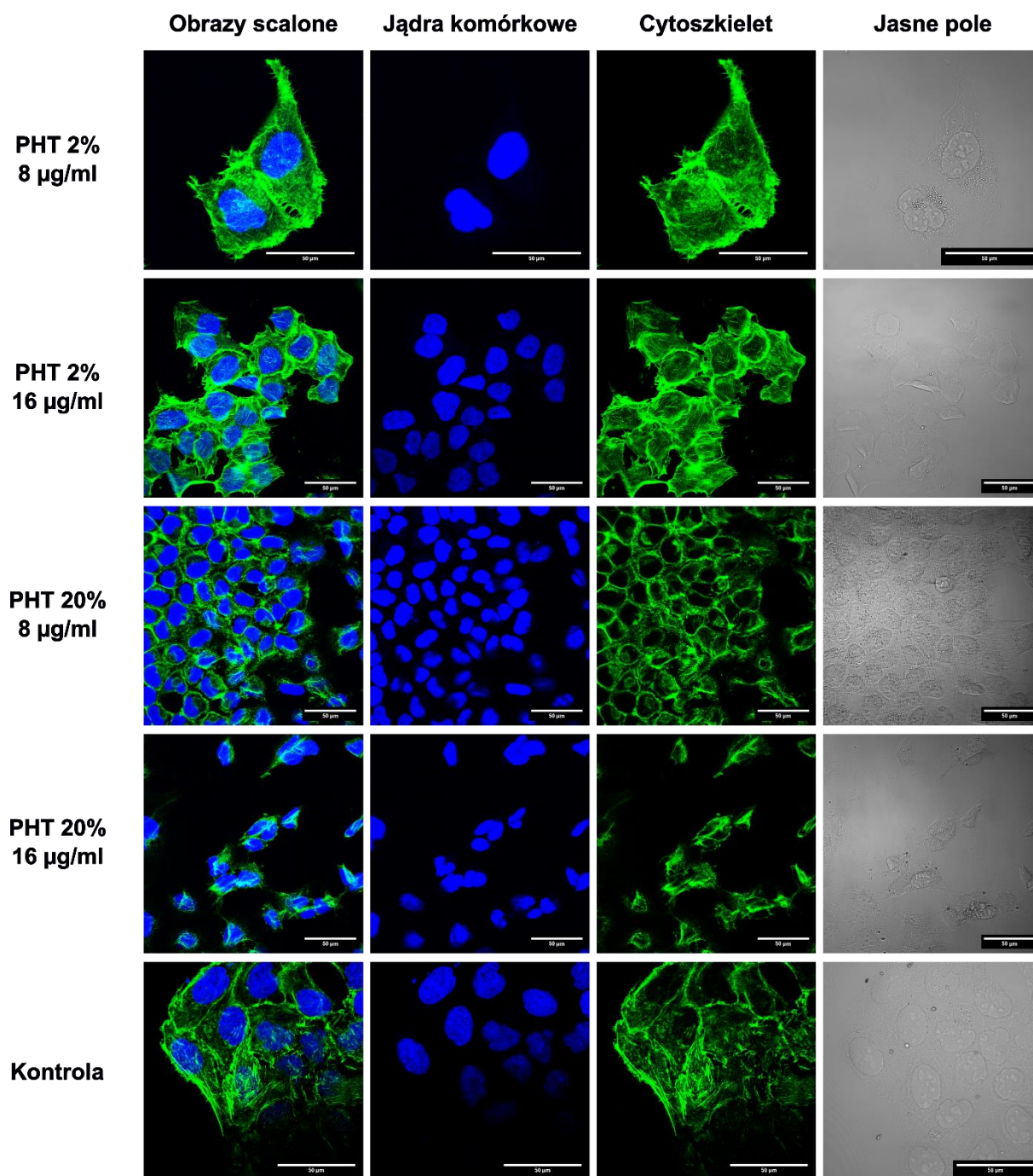
Wykazane zaburzenia w integralności cytoszkieletu mogą być wytłumaczone poprzez wpływ lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na płynność oraz organizację błony komórkowej, m.in. poprzez zwiększenie aktywności peroksydacji lipidów, co szerzej zostało wyjaśnione wcześniej w podrozdziale 5.2.2 Analiza poziomu reaktywnych form tlenu. Błona komórkowa jest integralną częścią cytoszkieletu, stanowiąc miejsce przyczepienia filamentów aktynowych [231,237]. W wyniku wzmożonej peroksydacji lipidów może dochodzić do zaburzeń płynności oraz interakcji lipid-lipid i lipid-białka w błonach komórkowych [238]. W efekcie, nieprawidłowości w strukturze włókien aktynowych cytoszkieletu, a błoną komórkową mogą prowadzić do zaburzeń w polimeryzacji włókien aktynowych, a w rezultacie do zaburzeń integralności cytoszkieletu prowadzącej do jego ostatecznej degradacji.

Analiza przeprowadzonych badań mikroskopowych sugeruje, iż LLCNPs oparte na GMO i PHT mają wpływ na integralność cytoszkieletu. Bardziej wrażliwe na działanie LLCNPs wydają się komórki HeLa, u których zmiany w obrębie struktury cytoszkieletu zaobserwowano po inkubacji z LLCNPs w stężeniach, które w na drodze analizy aktywności proliferacyjnej WST-1 oznaczone zostały jako nietoksyczne, tj. $25 \mu\text{g/ml}$ GMO 2% i $25 \mu\text{g/ml}$ GMO 20%, $8 \mu\text{g/ml}$ PHT 2% i $8 \mu\text{g/ml}$ PHT 20%. Wyniki pokrywają się z wynikami uzyskanymi podczas analizy ROS, co świadczyć może o wpływie LLCNPs w stężeniach, które na drodze analizy WST-1 oznaczono jako nietoksyczne, na podwyższenie poziomu ROS w komórkach HeLa, które następnie przez utlenianie prowadzą do zniszczenia struktury cytoszkieletu. Powyższa analiza wykazała również na większą odporność komórek MSU 1.1 na destrukcyjne działanie LLCNPs na cytoszkielet. Biorąc pod uwagę wnioski wysnute dla komórek HeLa, sądzić można, iż pomimo faktu, że LLCNPs prowadzą do podwyższonego poziomu ROS w komórkach MSU 1.1, niezaburzony metabolizm zdrowych komórek, w przeciwieństwie do komórek

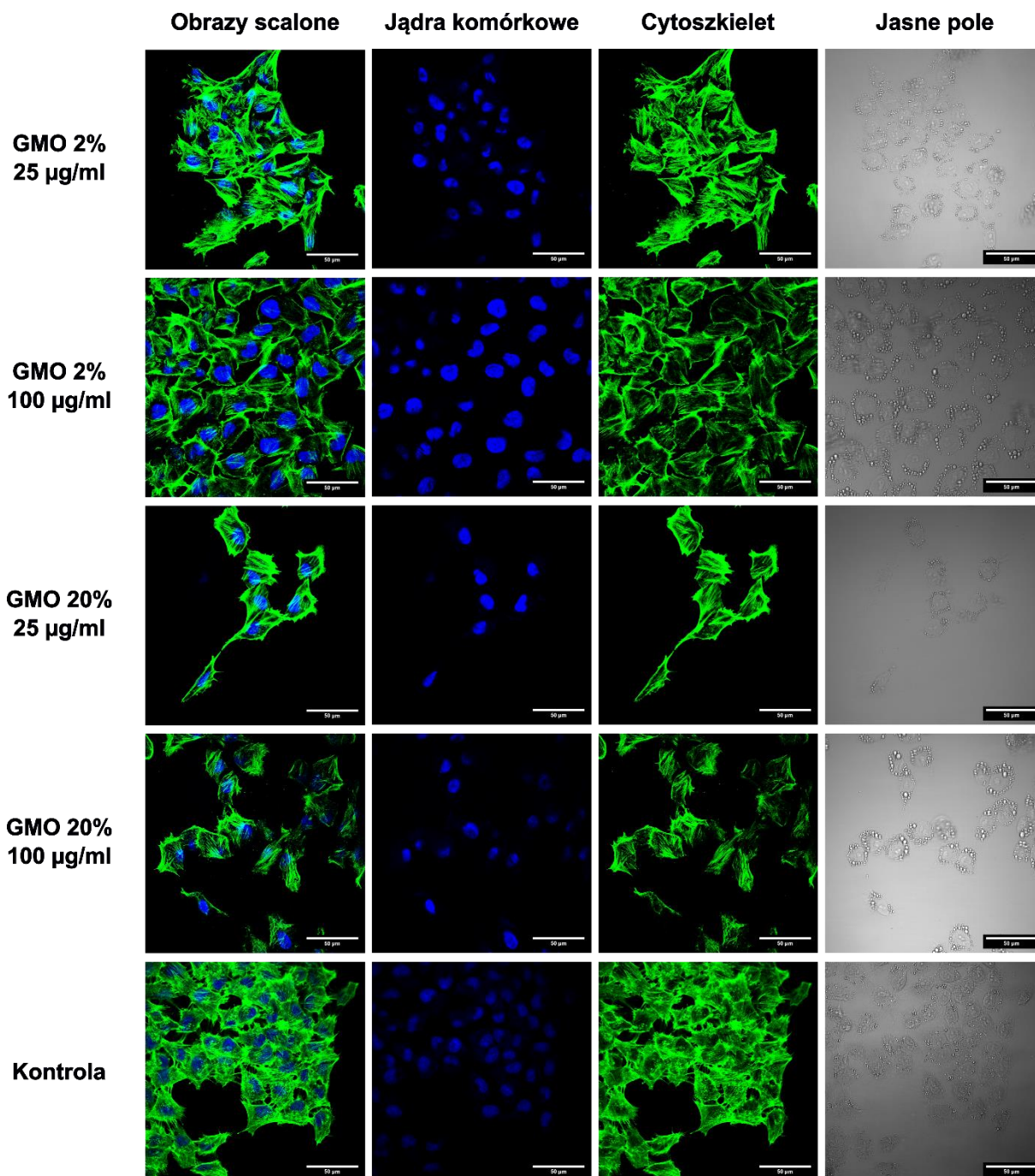
nowotworowych, jest w stanie redukować nadmierne ROS, tym samym chroniąc strukturę cytoszkieletu.



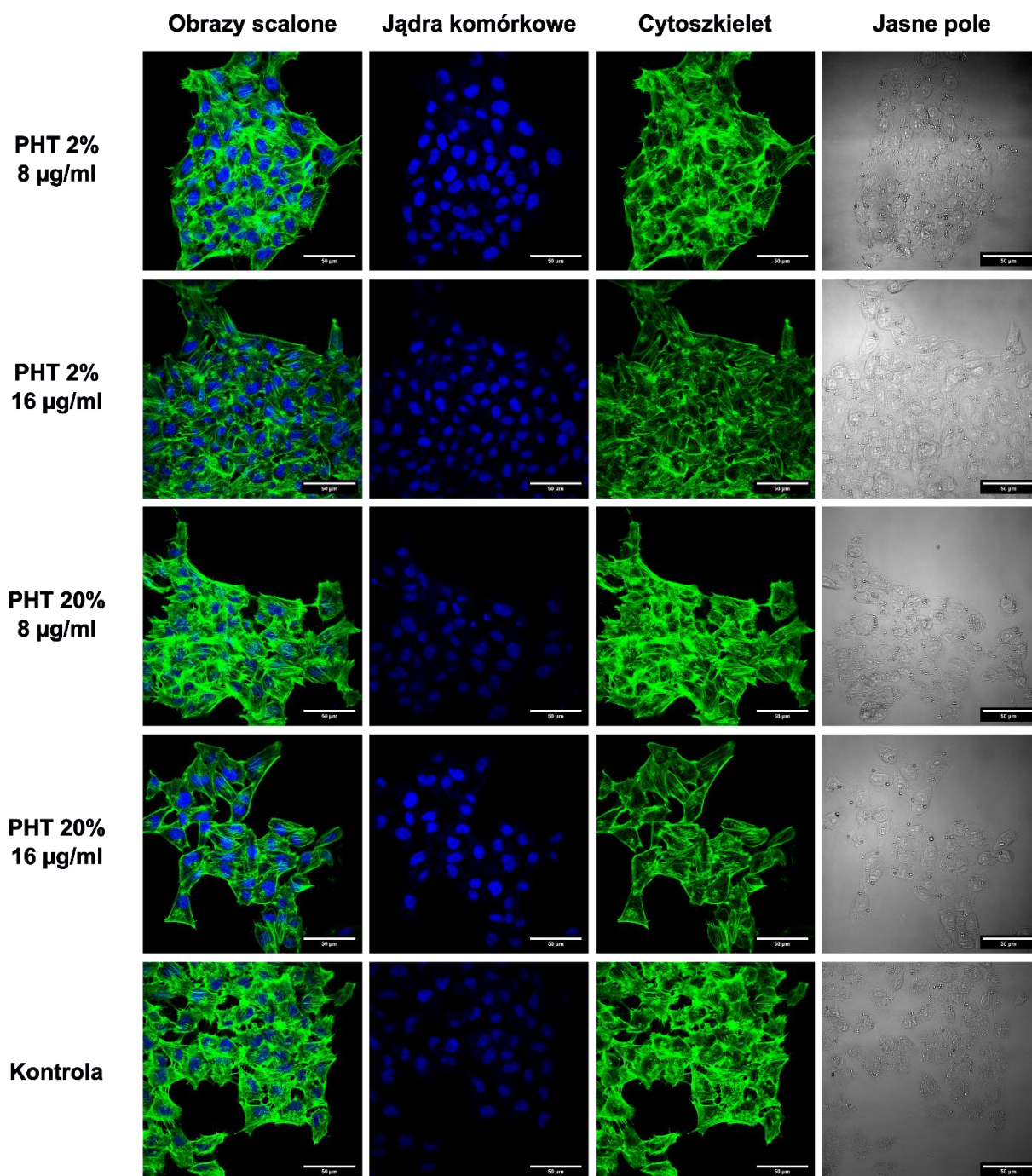
Ryc. 91 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO. Skala – 50 µm.



Ryc. 92 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach HeLa inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT. Skala – 50 µm.



Ryc. 93 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO. Skala – 50 µm.



Ryc. 94 Analiza mikroskopowa integralności cytoszkieletu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT. Skala – 50 µm.

5.2.4 Analiza ekspresji genów

Ocena integralności cytoszkieletu wykazała, iż inkubacja komórek HeLa i MSU 1.1 z różnymi kompozycjami lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na GMO i PHT prowadzić może do zaburzenia struktury cytoszkieletu. Wyniki wykazały jednak, iż wpływ LLCNPs na integralność cytoszkieletu nie był identyczny we wszystkich przypadkach. Aby spróbować wyjaśnić te różnice, przeprowadzono analizę ekspresji genów.

Analiza ekspresji genów za pomocą techniki ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy pozwala na określenie wpływu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na zmiany w ekspresji genów na poziomie transkrypcji. W poniższej pracy do analizy ekspresji genów wybrano geny *ACTB*, *CDK1*, *DHFR*, *GADD45A1*. Gen referencyjny stanowił gen *GAPDH*.

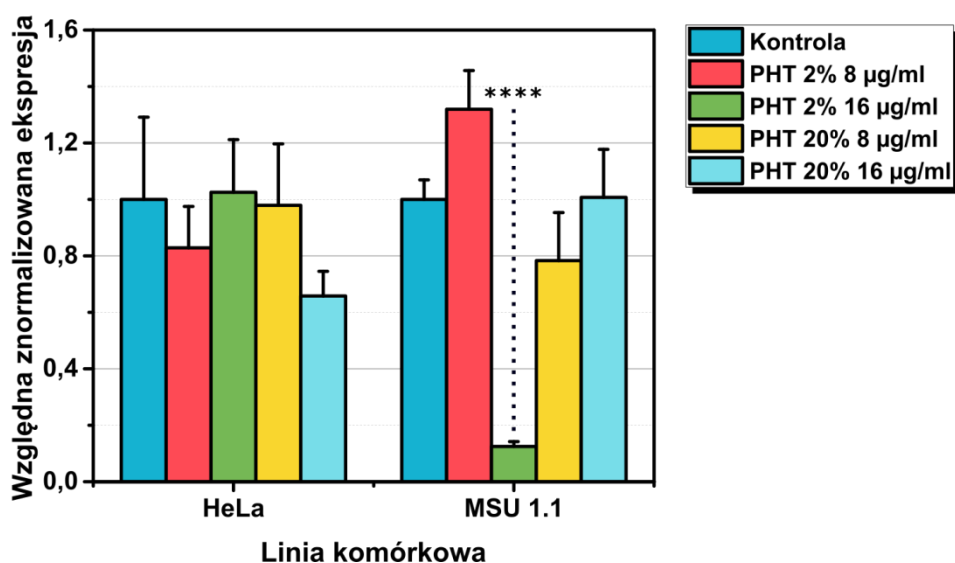
ACTB (z ang. *actin beta*), gen kodujący beta aktynę, bierze udział w regulacji funkcji cytoszkieletu, odpowiada za integralność komórkową oraz przesyłania sygnałów wewnątrzkomórkowych [239]. Beta aktyna bierze również udział w kontroli wzrostu komórkowego oraz w migracji komórkowej [240]. W analizach genotoksyczności nanocząstek, gen beta aktyny jest zazwyczaj wybierany jako gen kontrolny [241–244]. W niniejszej pracy, biorąc przedstawione już wyniki analizy integralności cytoszkieletu, gen *ACTB* został również wytypowany jako gen poddawany analizie.

CDK1 (z ang. *cyclin-dependent kinase 1*) jest genem kodującym kinazę 1 zależną od cyklin. *CDK1* odgrywa kluczową rolę w podziałach komórkowych, zapewniając jednokierunkowy przebieg procesu [245,246]. Gen *CDK1* bierze również udział w procesach morfogenezy, segregacji chromosomów oraz w pozycjonowaniu wrzeciona podziałowego [247].

DHFR (*Dihydrofolate reductase*), gen kodujący reduktazę dihydrofolianową, bierze udział w regulacji metabolizmu kwasu foliowego, wzroście komórek, proliferacji oraz w syntezie *de novo* puryn oraz aminokwasów [248–250].

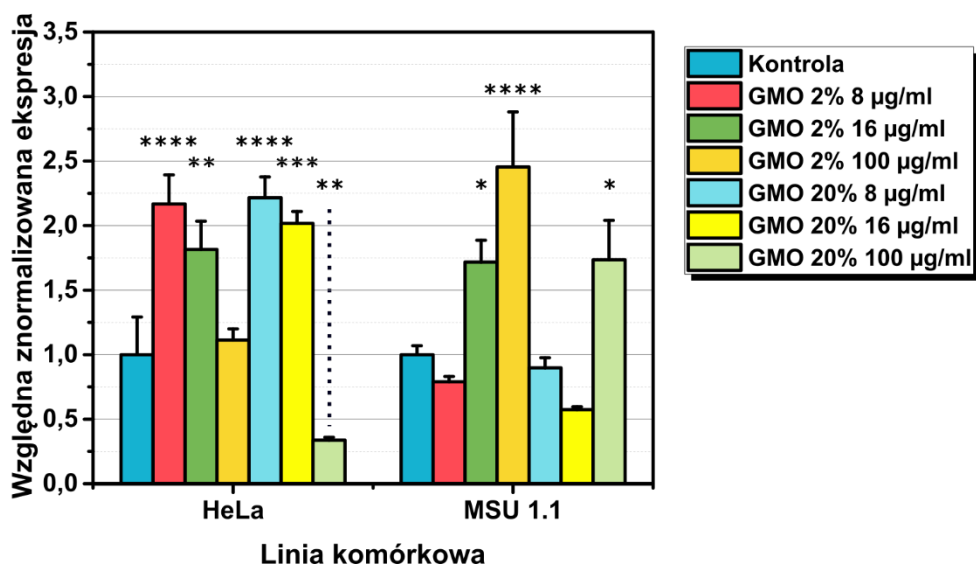
GADD45A1 (*Growth Arrest And DNA Damage-Inducible Protein GADD45 Alpha*) koduje białko będące markerem uszkodzeń DNA w jądrze komórkowym, który ulega ekspresji w wyniku zwiększonego zapotrzebowania na mechanizmy naprawcze DNA [251]. *GADD45A* jest również genem biorącym udział w transdukcją sygnałów stresowych oraz jest wykorzystywany do synchronizacji cykli komórkowych w hodowli [252].

Zaobserwowane zmiany w ekspresji genu beta aktyny były niezależne od stężenia LLCNPs. W komórkach linii komórkowych HeLa inkubowanych z PHT 2% i PHT 20%, ekspresja genu *ACTB* pozostawała na poziomie porównywalnym z kontrolą, niezależnie od stężenia LLCNPs (Ryc. 95). W przypadku komórek MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT zaobserwowane znaczne obniżenie ekspresji genu w komórkach inkubowanych z PHT 2%, 16 µg/ml.



Ryc. 95 Względna znormalizowana ekspresja genu *ACTB* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.

Analiza ekspresji genu *ACTB* w komórkach HeLa inkubowanych z nanocząstkami GMO 2% i GMO 20% wykazała podwyższony poziom ekspresji genu przy niskich stężeniach nanocząstek – dla GMO 2% przy stężeniu 8 µg/ml zaś dla GMO 20% przy stężeniach 16 µg/ml i 8 µg/ml (Ryc. 96). Rozpatrując ekspresję genu *ACTB* w komórkach linii komórkowej MSU 1.1, zaobserwowano obniżoną ekspresję genu w komórkach inkubowanych z PHT 2% w stężeniu 16 µg/ml oraz podwyższoną ekspresję w przypadku inkubacji z GMO 2% w stężeniu 100 µg/ml.

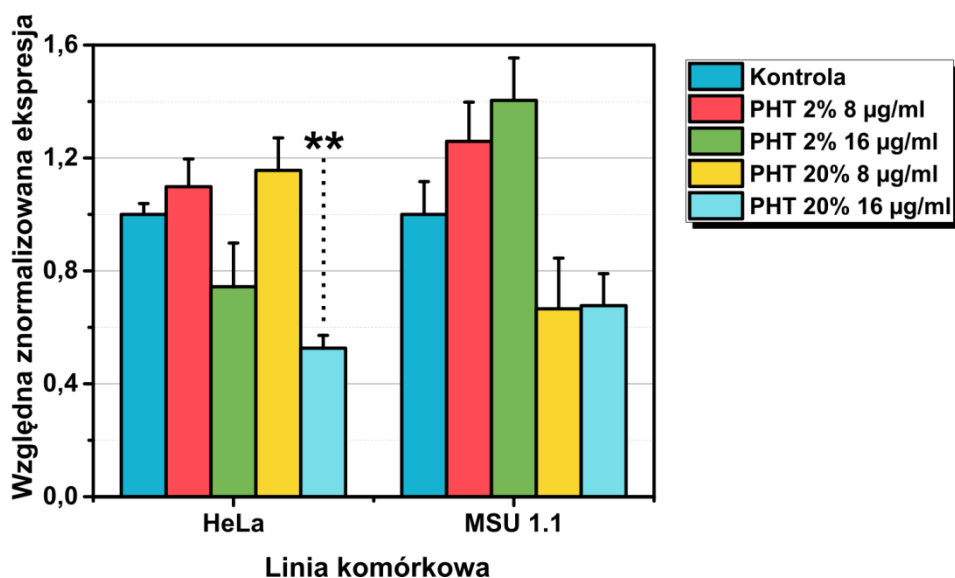


Ryc. 96 Względna znormalizowana ekspresja genu *ACTB* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.

ACTB jest genem biorącym udział przede wszystkim w zachowaniu integralności cytoszkieletu, zaś zaburzenia w obrębie jego ekspresji mogą świadczyć o nieprawidłowościach w obrębie

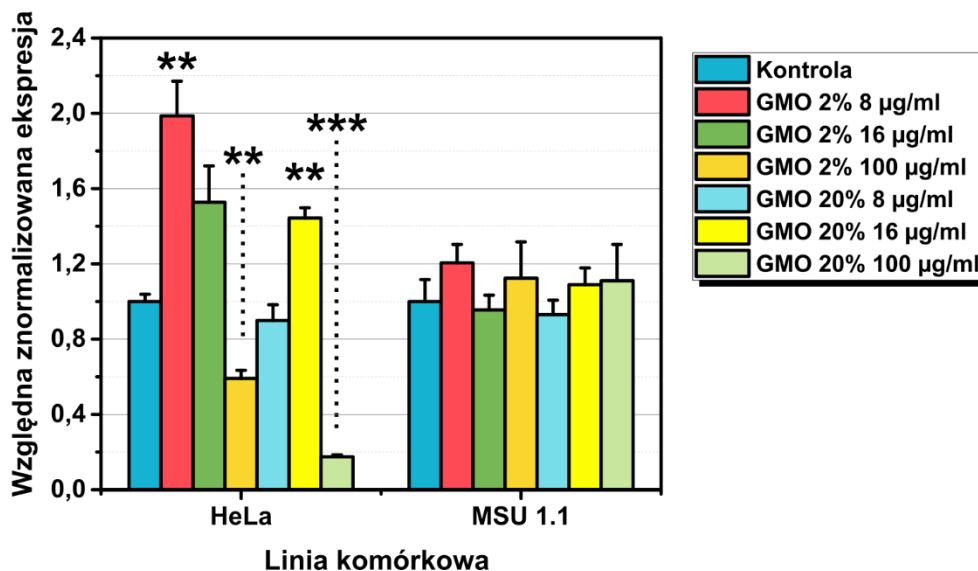
ww. cytoszkieletu. Li i wsp. [253] wykazali związek między przerzutami komórek nowotworowych a podwyższonym poziomem ekspresji *ACTB*. Wynik taki może świadczyć, iż podwyższony poziom ekspresji beta aktyny wpływa negatywnie na miejsca adhezji komórek ściśle związane z cytoszkieletem, prowadząc do ich łatwiejszego odrywania i transportu w krwioobieg. Podobny rezultat był obserwowany w obecnej pracy, gdzie liczba komórek w hodowlach po inkubacji z nanocząstkami ulegała znacznemu obniżeniu na skutek wypłukiwania komórek. Nieprawidłowości w ekspresji *ACTB* obserwowane są przy takich chorobach jak dystonia [254] i chorobie Baraistera-Wintera [255], których przejawem na poziomie komórkowym są również zaburzenia w obrębie struktury cytoszkieletu. Wpływ nanocząstek na ekspresję genu *ACTB*, a w szczególności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych jest bardzo słabo poznany, jako że gen beta aktyny jest uważany za gen wysoce konserwatywny i wykorzystywany jako normalizacja. Przedstawione wyniki ekspresji genu *ACTB* nie pokrywają się z wynikami przedstawionymi w mikroskopowej analizie integralności cytoszkieletu przedstawionej wcześniej. Może to wynikać z faktu, że proces ekspresji genów jest wieloetapowy i jest regulowany przez komórkę na każdym etapie indywidualnie. Podwyższenie poziomu ekspresji *ACTB* na poziomie mRNA w wyniku zaburzenia procesu transkrypcji nie jest jednoznaczne z zwiększeniem ilości tego białka w komórce. Dzieje się tak ponieważ ekspresja jest regulowana również na poziomie translacji, czyli przepisywania informacji genetycznej z mRNA do białka. Po wytworzeniu białka na drodze translacji, proces może ulegać kolejnym czynnikom regulacyjnym, mającym na celu doprowadzenie poziomu białka do optymalnego poziomu. Niemniej, powyższe wyniki wskazują, iż analiza ekspresji *ACTB* może być koniecznym krokiem do prawidłowego zrozumienia wpływu nanocząstek na funkcjonowanie komórki.

Poziom ekspresji genu *CDK1* uległ zmianie jedynie w komórkach linii komórkowej HeLa, zaś w komórkach MSU 1.1 nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w ekspresji genu w porównaniu do kontroli negatywnej. W komórkach raka szyjki macicy inkubowanych z LLCNPs PHT 20% w stężeniu 16 µg/ml zaobserwowano znaczący spadek ekspresji badanego genu (Ryc. 97). Wynik ten pokrywa się między innymi z wynikami uzyskanymi w trakcie analizy aktywności proliferacyjnej WST-1, podczas której stwierdzono, iż LLCNPs PHT 20% w stężeniu 16 µg/ml są cytotoksyczne.



Ryc. 97 Względna znormalizowana ekspresja genu *CDK1* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.

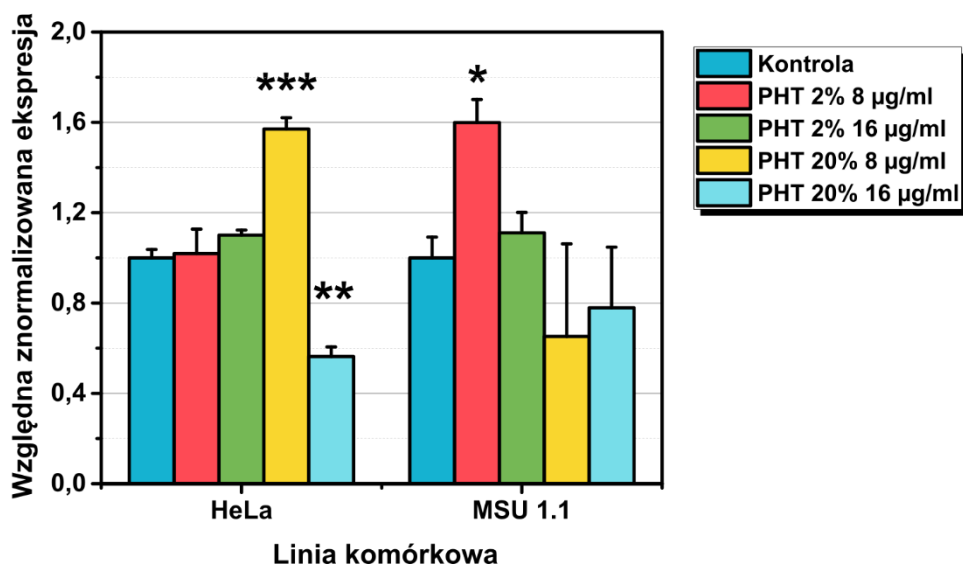
Analiza ekspresji genu *CDK1* w komórkach inkubowanych z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi opartymi o GMO wykazały zmianę w ekspresji genu tylko w komórkach HeLa (Ryc. 98). Rozpatrując GMO 2%, dla stężenia 8 µg/ml zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji genu, zaś dla stężenia 100 µg/ml ekspresję genu *CDK1* określono jako istotnie niższą w stosunku do kontroli. Zmiany ekspresji genu zaobserwowano również w komórkach HeLa inkubowanych z GMO 20%. Dla stężenia 16 µg/ml analiza ekspresji genów wykazała wyższą względną znormalizowaną ekspresję *CDK1* w stosunku do kontroli, zaś dla stężenia 100 µg/ml zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji. W przypadku komórek MSU 1.1 nie zaobserwowano żadnych zmian (Ryc. 97, Ryc. 98). Otrzymane rezultaty mogą świadczyć o wpływie ww. nanocząstek na ekspresję genu *CDK1* w komórkach HeLa, który przez nadmierną ekspresję białka, może prowadzić do zaburzeń w cyklu życiowym komórek. Z drugiej strony, jak zostało wspomniane wcześniej, podczas dyskusji odn. Zmian ekspresji genu *ACTB*, wytwarzanie białek w komórkach jest kontrolowane na wielu etapach, w związku z czym podwyższona ekspresja genu na poziomie mRNA, może zostać skompensowana przez inne procesy regulacyjne na kolejnych etapach ekspresji. Istotny wydaje się brak zaobserwowanych różnic w ekspresji genu *CDK1* w komórkach MSU 1.1 poddanych inkubacji z LLCNPs opartymi o GMO i PHT, co z kolei może świadczyć, iż badane nanocząstki w rzeczywistości nie wpływają na ekspresję *CDK1*, zaś zmiany w obrębie komórek HeLa mogą wynikać z zaburzonego mechanizmu ekspresji białek, charakterystycznego dla komórek nowotworowych.



Ryc. 98 Względna znormalizowana ekspresja genu *CDK1* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.

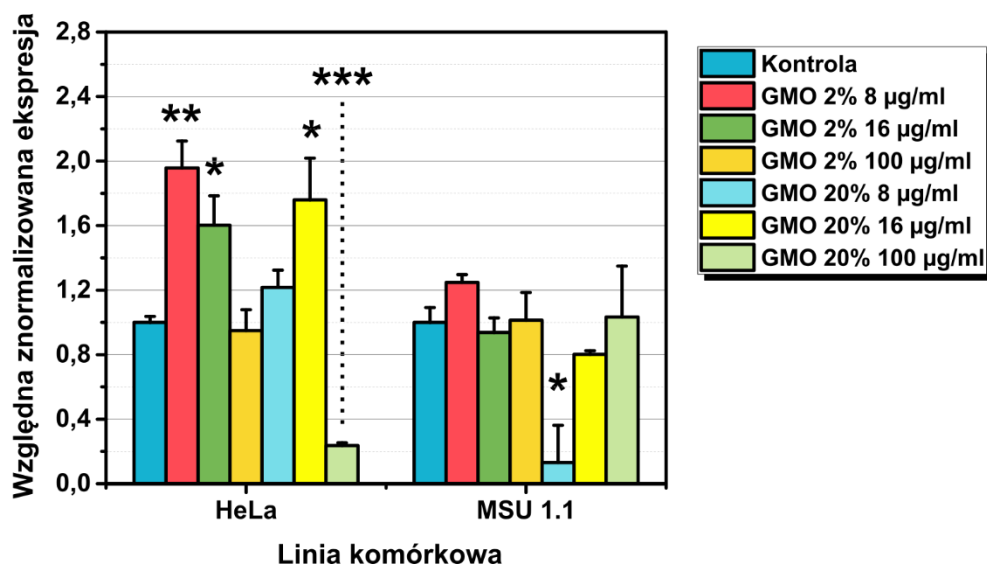
Ren i wsp. [256] zaobserwowali iż podwyższony poziom ekspresji genu *CDK1* był związany ze zwiększonym wzrostem komórek SW-13 zarówno w hodowlach dwuwymiarowych, w Matrigel 3D oraz jako guz w zwierzętach modelowych, zaś obniżona ekspresja tego genu miała odwrotny efekt. Przedstawione wyniki wskazują również na udział tego genu w procesach adhezyjnych i w proliferacji komórek, co może sugerować, że zmiany w obrębie ekspresji genu *CDK1* mogą być przejawem właściwości cytotoksycznych LLCNPs. Jak wspomniano wcześniej, gen *CDK1* jest związany z funkcjonowaniem mikrotubul i pozycjonowaniem wrzeciona podziałowego [247]. Zależność taka może sugerować, że szkodliwy wpływ lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na strukturę cytoszkieletu, może indukować zmiany w obrębie ekspresji genu *CDK1*. Doniesienia literaturowe [256–258] sugeruje również, iż w komórkach nowotworowych poziom ekspresji *CDK1* może być odchyłony od normy, co przejawiać się może również w wynikach przedstawionych w powyższej pracy doktorskiej, gdzie zmiany w obrębie ekspresji genu obserwowane były przede wszystkim w komórkach nowotworowych HeLa.

Rozpatrując ekspresję genu *DHFR*, w przypadku inkubacji komórek z LLCNPs opartymi o PHT, w komórkach HeLa zaobserwowano wzrost ekspresji genu dla PHT 20% 8 µg/ml oraz spadek ekspresji dla PHT 20% 16 µg/ml (Ryc. 99). Analiza ekspresji genu *DHFR* w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi o PHT wykazała nieznaczne podwyższenie ekspresji genu w komórkach inkubowanych z PHT 2%, 8 µg/ml.



Ryc. 99 Względna znormalizowana ekspresja genu DHFR w komórkach HeLa i MSU 1,1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT,

W przypadku komórek HeLa inkubowanych z GMO 2% w stężeniach 8 µg/ml i 16 µg/ml analiza ekspresji DHFR wykazała podwyższoną ekspresję genu w stosunku do kontroli (Ryc. 100). Inkubacja komórek HeLa z układami GMO 20% skutkowało z kolei podwyższoną ekspresją DHFR w komórkach inkubowanych z GMO 20%16 µg/ml i znacznie obniżoną w komórkach GMO 20% 100 µg/ml.

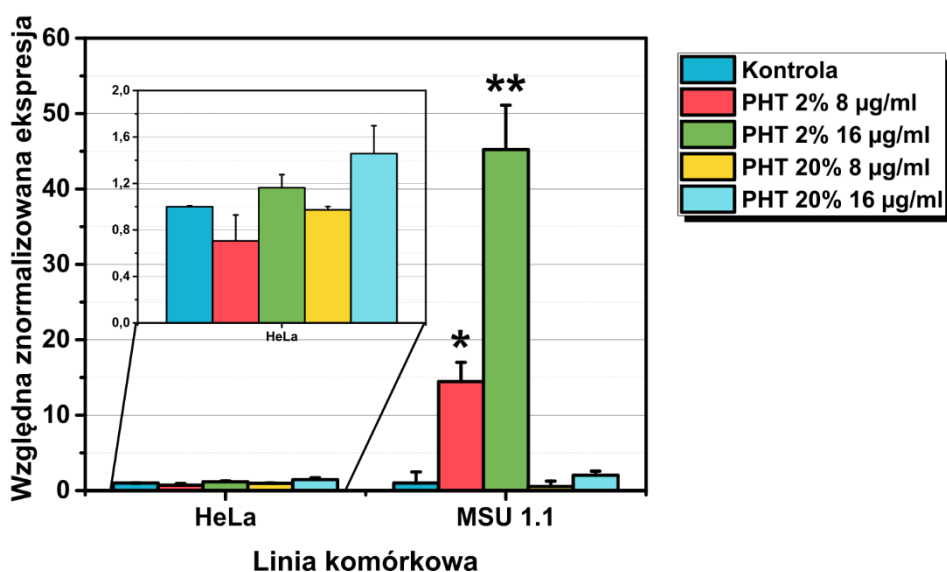


Ryc. 100 Względna znormalizowana ekspresja genu DHFR w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.

Poznanie funkcjonowania oraz metabolizmu kwasu foliowego w komórkach nowotworowych jest szczególnie istotne w trakcie badania nowych nanoukładów o potencjalnym zastosowaniu jako nośniki leków i środków kontrastujących wykorzystywanych w obrazowaniu MRI. Pieroth

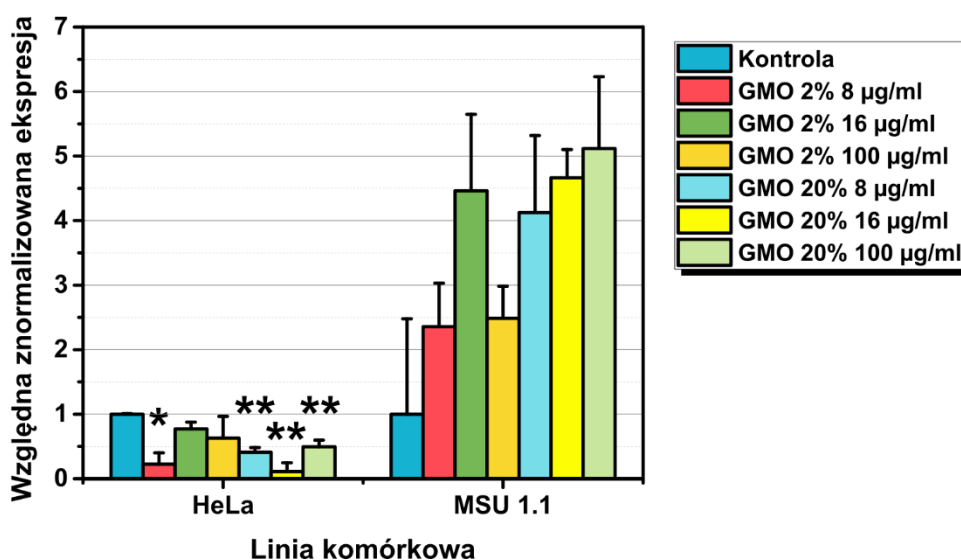
i wsp. [259] pokazali, iż obniżony poziom ekspresji *DHFR* może być związany z podwyższonym ryzykiem zachorowania na nowotwór. Z kolei Fawal i wsp. [249] w swojej pracy przedstawili podwyższony poziom ekspresji genu *DHFR* w komórkach nowotworowych nowotworów mózgu. Podobną zależność w komórkach HeLa zaobserwowali Chen i wsp. [260]. Wysoka ekspresja genu *DHFR* w tych komórkach związana jest z odpornością przeciwko antagonistom kwasu foliowego, np. metotreksatu. W związku z tym duże obniżenie ekspresji *DHFR* w komórkach HeLa inkubowanych z 100 µg/ml GMO 20%, 16 µg/ml PHT 20% może wskazywać na użyteczność tych układów w zwiększeniu efektywności terapii antagonistami kwasu foliowego. Przedstawione wyniki nie świadczą jednoznacznie o wpływie LLCNPs opartych na GMO i PHT na ekspresję genu *DHFR*.

Komórki HeLa inkubowane z LLCNPs PHT 2% i PHT 20% nie wykazały zmian w poziomie ekspresji genu *GADD45A1* (Ryc. 101). W przypadku komórek MSU 1.1 inkubowanych z tymi samymi rodzajami nanocząstek, zaobserwowano podniesiony poziom ekspresji genu *GADD45A1* w komórkach inkubowanych z PHT 2% w obu badanych stężeniach. Powyższe wyniki wskazywać mogą na zahamowanie mechanizmów naprawy DNA w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z PHT 2%.



Ryc. 101 Względna znormalizowana ekspresja genu *GADD45A1* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na PHT.

Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte o GMO, zarówno GMO 2% i GMO 20% w pełnym zakresie stężeń nie miały statystycznie istotnego wpływu na ekspresję genu *GADD45A1* w komórkach MSU 1.1 (Ryc. 102). W przypadku komórek HeLa zaobserwowano spadek ekspresji badanego genu w komórkach inkubowanych z GMO 2%, 8 µg/ml i wszystkich stężeniach GMO 20% (Ryc. 102).



Ryc. 102 Względna znormalizowana ekspresja genu *GADD45A* w komórkach HeLa i MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs opartymi na GMO.

Liu i wsp. [219] wykazali, że komórki A375 inkubowane z cisplatyną charakteryzowały się podwyższoną ekspresją genu *GADD45A*. W wyniku zniszczenia DNA przez chemioterapeutyk istniało większe zapotrzebowanie na działanie mechanizmów reperujących kwas deoksyrybonukleinowy. Yang i wsp. [262] przedstawili zaś, iż podwyższony poziom *GADD45A* jest związany z aktywnością apoptyczną limfocytów, co również może być przyczyną podwyższonego poziomu ekspresji tego genu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z PHT 2%. Brak podobnych efektów w przypadku komórek MSU 1.1 inkubowanych z PHT 20% może wynikać z innego losu wewnątrzkomórkowego tych nanocząstek, nie prowadzących ostatecznie do tak znacznego zniszczenia DNA. Podobny związek między poziomem apoptozy komórkowej, a podwyższonym poziomem ekspresji *GADD45A1* wykazali Wang i wsp. [263]. Higgs i wsp. [264] wykazali, że w wyniku działania wirusa HCV w komórkach Huh7.5 obniżeniu ekspresji ulegała jednostka beta białka *GADD45* prowadząc do nieprawidłowości w obrębie przebiegu cyklu komórkowego. Do podobnego efektu może prowadzić obniżenie ekspresji jednostki alfa powyższego białka, co można zaobserwować w przypadku komórek HeLa inkubowanych z GMO 2% i 20%. Ostatecznie może być to jedną z przyczyn cytotoksyczności tych nanocząstek. Liu i wsp. [261] zauważają z kolei, że obniżenie ekspresji *GADD45* może mieć pozytywny wpływ przy stosowaniu chemioterapeutyków opierających się o niszczenie DNA, ponieważ w wyniku mniejszej aktywności mechanizmów naprawczych, takie leki jak cisplatyna mogą stać się skuteczniejsze. Bardzo duże zwiększenie ekspresji genu *GADD45A1* w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z LLCNPs PHT 2% może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów reperujących DNA, zniszczonego na skutek działania nanocząstek. Wynik taki koreluje z wynikami analizy DCFH-DA, gdzie zaobserwowano wysoki poziom ROS w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z takimi samymi nanocząstkami. Reaktywne formy tlenu wytwarzane w komórkach MSU 1.1 na skutek działania LLCNPs PHT 2% może prowadzić do utleniania nici DNA, przez co konieczne staje się uruchomienie mechanizmów naprawczych, czego objawem

może być podwyższona ekspresja genu *GADD45A1*. Z drugiej strony, nie zaobserwowano podwyższonej ekspresji tego genu w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z PHT 20%, dla których analiza DCFH-DA również wykazała podwyższony poziom ROS zarówno dla stężeń 8 µg/ml i 16 µg/ml.

Reasumując, przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują na to, że zsyntetyzowane w ramach pracy doktorskiej lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na GMO i PHT wpływają na ekspresję genów *ACTB*, *CDK1*, *DHFR* oraz *GADD45A1*. Koniecznym podkreśleniem jest fakt, iż większe zaburzenia w obrębie wymienionych powyżej genów zaobserwowano dla komórek HeLa, co może być rezultatem globalnych nieprawidłowości w procesach transkrypcyjnych komórek nowotworowych.

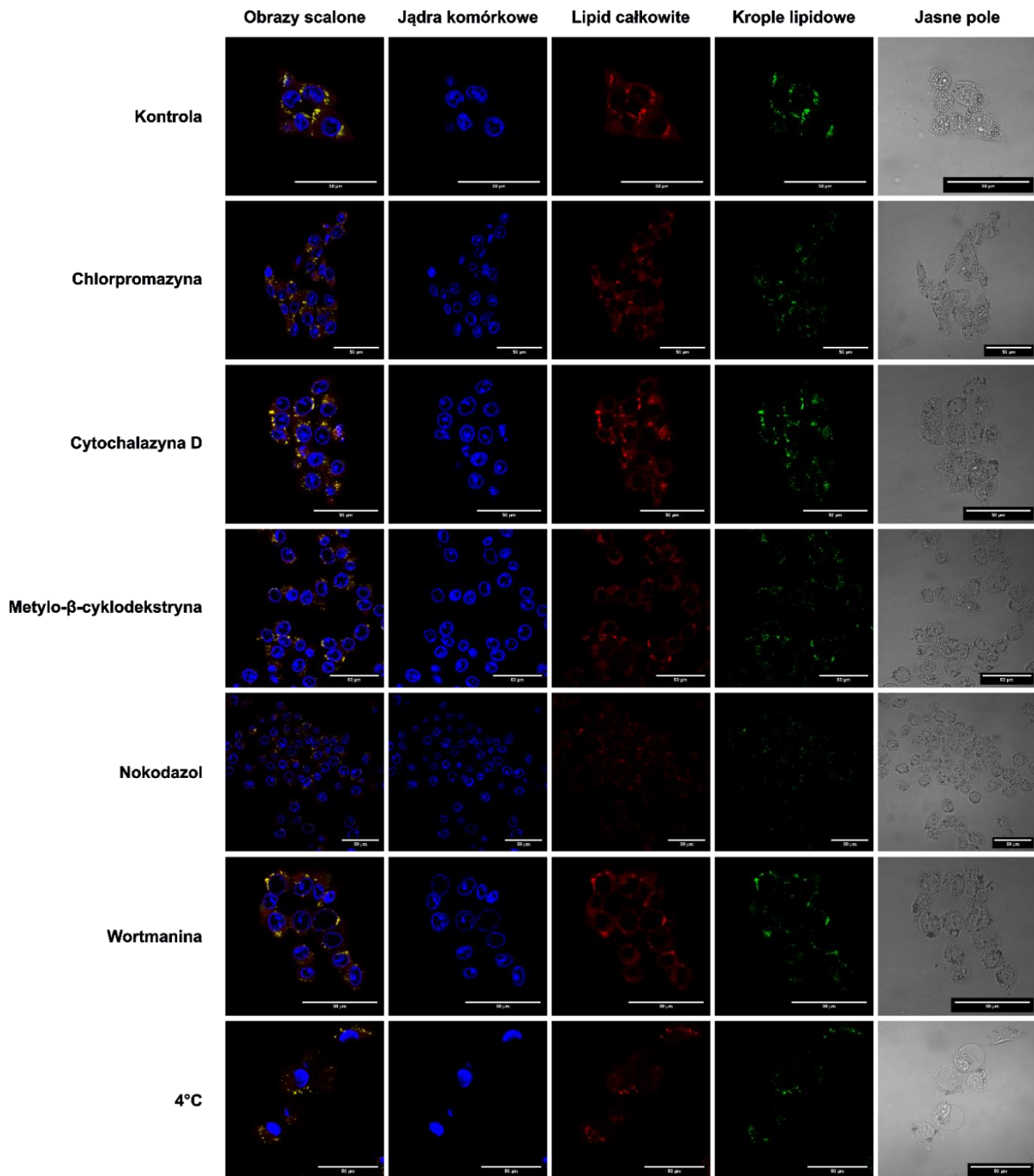
5.2.5 Analiza dróg internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych

Bazując na wcześniejszych wynikach cytotoksyczności i genotoksyczności wytworzonych nanocząstek lipidowych postanowiono przeprowadzić badania mające na celu ustalenie mechanizmów wnikania nanocząstek do wnętrza komórki. W tym celu ponownie wykorzystano metodę skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej. Do analizy internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w komórkach MSU 1.1 oraz HeLa wykorzystano LLCNPs GMO 2% w stężeniu 25 µg/ml wybarwione Czerwienią Nilu. Czerwień Nilu po związaniu z lipidami charakteryzuje się silną czerwoną fluorescencją (maksimum absorpcji 550 nm; maksimum emisji 640 nm), co umożliwia łatwą lokalizację LLCNPs w obrazach mikroskopowych wnętrza komórki. Ponadto, możliwe było również zlokalizowanie wewnątrzkomórkowych kropelek lipidowych wykorzystując zieloną fluorescencję emitowaną przez Czerwień Nilu po związaniu z kroplami lipidowymi [139]. Do zablokowania poszczególnych mechanizmów internalizacji wykorzystano: metyl-β-cyklodekstrynę jako inhibitor endocytozy zależnej od kaweoliny, chlorowodorek chlorpromazyny jako inhibitor endocytozy zależnej od klatryn, wortmaninę jako inhibitor makropinocytozy, nokodazol jako inhibitor polimeryzacji mikrotubul i cytochalazynę D jako inhibitor polimeryzacji włókien F-aktyny

Niezależnie od rodzaju komórek podczas hamowania energozależnych mechanizmów internalizacji (poprzez inkubację w temperaturze 4°C) nie zaobserwowano inhibicji internalizacji nanocząstek (Ryc. 103). Powyższy wynik sugeruje pasywny proces pochłaniania materiału przez komórki związany z dyfuzją nanocząstek przez błonę komórkową.

W przypadku inhibicji endocytozy zależnej od klatryn przez w obrazach mikroskopowych komórek HeLa i MSU 1.1 zaobserwowano zahamowanie internalizacji LLCNPs (Ryc. 103). Wynik ten wskazuje na udział cholesterolu w procesie internalizacji LLCNPs, co również może świadczyć o udziale raftów lipidowych w internalizacji lipidowych nanocząstek [105,265]. Inhibicję internalizacji nanocząstek zaobserwowano również w komórkach MSU 1.1 inkubowanych z inhibitorem polimeryzacji włókien aktynowych, cytochalazynem D oraz z inhibitorem makropinocytozy, wortmaniną, co wskazuje na udział powyższych mechanizmów w internalizacji LLCNPs przez ludzkie komórki fibroblastów (Ryc. 103). Brak podobnej inhibicji

internalizacji w przypadku komórek HeLa inkubowanych z tymi samymi inhibitorami internalizacji wskazywać może na brak udziału powyższych mechanizmów w internalizacji LLCNPs przez komórki HeLa lub o uaktywnieniu się innych mechanizmów kompensujących zablokowane drogi. W przypadku inkubacji z inhibitorami endocytozy zależnej od kaweolin, chlorpromazyny i inhibitorami polimeryzacji mikrotubul, nokodazolu zarówno dla komórek HeLa i MSU 1.1 inhibicja internalizacji nanocząstek nie została zaobserwowana, co ponownie może świadczyć o nie udziale wspomnianych mechanizmów w pobieraniu ze środowiska LLCNPs, lub o uaktywnieniu się mechanizmów zastępczych (Ryc. 103).



Ryc. 103 Obrazy laserowej skaningowej mikroskopii konfokalnej komórek linii komórkowych MSU 1.1 inkubowanych z inhibitorami transportu komórkowego oraz z lipidowymi nanocząstkami ciekłokrystalicznymi barwionymi Czerwienią Nilu, Skala - 50 μm .

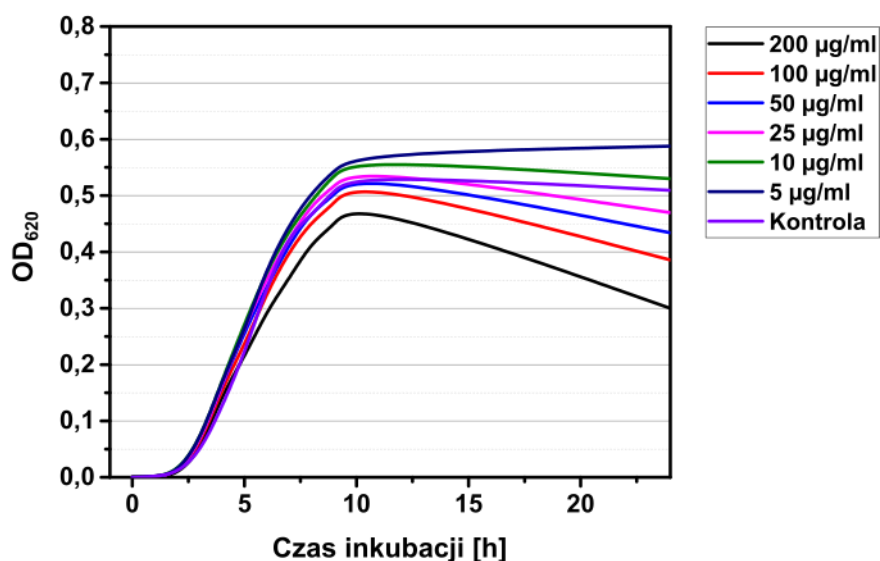
Wyróżnia się 4 podstawowe drogi internalizacji nanocząstek, wśród których trzy są ścieżkami energozależnymi. Internalizacja zależna od klatryn, będąca podstawowym typem internalizacji w komórkach zwierzęcych, jest rodzajem aktywnej endocytozy, której nazwa pochodzi od głównego białka biorącego udział w tworzeniu pęcherzyka endocytarnego – klatryny [266]. Internalizacja zależna od kaweolin jest wykorzystywana przez komórki zwierzęce między innymi do internalizacji komponentów błon komórkowych, pozakomórkowych ligandów, toksyn bakteryjnych i niektórych wirusów [267]. Makropinocytoza, trzeci rodzaj aktywnej internalizacji komórkowej, jest nieselektywnym, zależnym od aktywności procesem pobierania ze środowiska pozakomórkowego związków odżywczych i antygenów, opierającym się na wyłapywaniu ww. czynników w duże wakuole [268]. Wspomniane trzy drogi internalizacji nanocząstek wykorzystywane są przez komórki zwierzęce do internalizacji czynników, których rozmiar mieści się w zakresie 0,2 μm – 0,5 μm . Ponadto, na drodze specyficznej energozależnej fagocytozy, komórki są w stanie internalizować czynniki, których wielkość przekracza 500 nm [269].

Przedstawione wyniki sugerują, iż nie istnieje jeden charakterystyczny rodzaj internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, Wniosek ten jest zgodny z dotychczasowymi doniesieniami. Yang i wsp. [270] wykazali, iż badane przez nich lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte o GMO i stabilizowane Pluronikiem F127 były internalizowane przez komórki ludzkiego gruczołka okrężnicy Caco-2 głównie na drodze endocytozy zależnej od klatryn i od kaweolin. Podobne rezultaty uzyskane zostały przez Deshpande i Singha [271], którzy wykazali, że LLCNPs oparte na GMO i stabilizowane Pluronikiem F127 były internalizowane przez komórki HeLa, NIH 3T3 i MDA-MB231 na drodze procesów energozależnych. Na kinetykę oraz typ internalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych wpływ mogą mieć również właściwości mechaniczne nanocząstek, w szczególności ich sztywność. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne o wewnętrznej heksagonalnej symetrii i wewnętrznej kubicznej symetrii różnią się właściwościami reologicznymi [272,273], co wpływa na rodzaj internalizacji, której podlegają, przy czym heksosomy częściej internalizowane są na drodze makropinocytozy, zaś kubosomy na drodze endocytozy zależnej od klatryn oraz endocytozy zależnej od kaweolin. Powyższe doniesienia tłumaczyć mogą, dlaczego przedstawione w pracy heterogenne dyspersje lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych zawierające zarówno struktury heksagonalne jak i kubiczne nie charakteryzują się jedną drogą internalizacji komórkowej.

5.2.6 Analiza właściwości antybakteryjnych układów GMO/GML

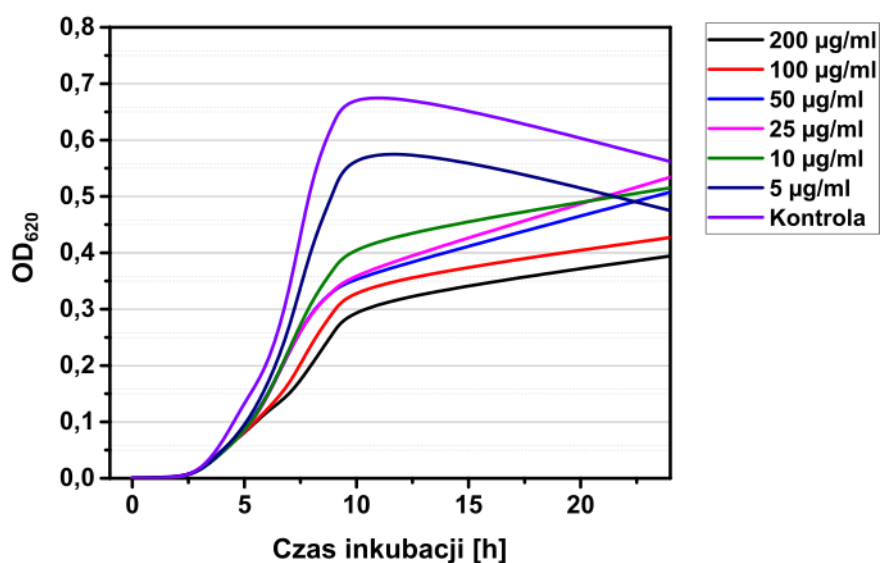
W przedstawionych powyżej badaniach przedstawiono wpływ zoptymalizowanych układów GMO/GML na aktywność proliferacyjną komórek zwierzęcych HeLa i MSU 1.1. Kolejnym etapem było wykazanie właściwości antybakteryjnych układów GMO/GML, na bakteriach Gram-ujemnych *Escherichia coli* oraz Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*. Pomiar przyrostu liczby bakterii w zawieszynie nanocząstek wykonano wykorzystując metodę spektrofotometryczną, wyznaczając czasowe zmiany gęstości optycznej OD₆₂₀.

W przypadku bakterii *E. coli*, przez pierwsze 5 godzin inkubacji z GMO/GML nie zaobserwowano różnic we wzroście bakterii (Ryc. 104). W trakcie fazy wykładniczego wzrostu, po 5 godzinie inkubacji, zaobserwować można wolniejszy wzrost bakterii *E. coli* inkubowanych z GMO/GML w stężeniu 200 µg/ml co przejawia się jako niższymi wartościami OD₆₂₀. Po osiągnięciu fazy stacjonarnej, po 10 godzinach inkubacji z nanocząstkami GMO/GML, zaobserwowano różnice między wartościami OD₆₂₀ korelującymi z liczbą bakterii. Najniższe wartości OD₆₂₀ zaobserwowano kolejno dla stężeń 200 µg/ml, 100 µg/ml oraz 50 µg/ml. Ponadto, dalsza inkubacja w tych stężeniach spowodowała spadek OD₆₂₀ w czasie, podczas gdy dla kontroli oraz stężeń 5 - 25 µg/ml obserwowano stałą wartość OD₆₂₀.



Ryc. 104 Krzywa wzrostu bakterii *E. coli* inkubowanych w różnych stężeniach LLCNPs GMO/GML.

W przypadku bakterii *S. aureus*, podobnie jak dla bakterii *E. coli* w pierwszej fazie wzrostu różnice w OD₆₂₀ były nieobserwowalne (Ryc. 105). Po 5 godzinach inkubacji, w fazie wykładniczego wzrostu, zaobserwowano duże różnice w liczbie bakterii zależnej od stężenia nanocząstek. Wzrost bakterii w kontroli ujemnej oraz bakterii inkubowanych z 5 µg/ml GMO/GML był wyższy i gwałtowniejszy niż w przypadku wyższych stężeń nanocząstek. Największą inhibicję wzrostu bakterii *S. aureus* zaobserwowano dla najwyższych stężeń GMO/GML tj. 200 µg/ml i 100 µg/ml. Przy dalszej inkubacji bakterii, dla kontroli ujemnej i GMO/GML 5 µg/ml zaobserwowano spadek wartości OD₆₂₀, zaś bakterie poddane inkubacji przy wyższym stężeniu nanocząstek ciekłokrystalicznymi GMO/GML kontynuowały wzrost z trendem zbliżonym do liniowego.



Ryc. 105 Krzywa wzrostu bakterii *S. aureus* inkubowanych w różnych stężeniach LLCNPs GMO/GML,

Powyższe wyniki dowodzą antybakteryjnych właściwości wytworzonych nanocząstek lipidowych. Wynikają one głównie z obecności monolaurynianu glicerolu i jego wpływu na błonę bakteryjną. Tokarsky i wsp. [274] wykazali, iż w trakcie inkubacji bakterii z monolaurynianem glicerolu, ilość tego lipidu w błonie bakteryjnej zwiększa się. Obecność GML w błonie bakteryjnej prowadzi do zmian w płynności błony, zaburza transdukcję i ostatecznie prowadzi do zniszczenia błony bakteryjnej [275]. Badania wskazują, iż monolaurynian glicerolu wykazuje silne właściwości antybakteryjne przeciw bakteriom Gram-dodatnim [276]. Tłumaczy się to tym, że bakterie Gram-dodatnie charakteryzują się obecnością grubej ściany bakteryjnej zbudowanej z peptydoglikanów, pod którą znajduje się błona bakteryjna. W przypadku bakterii Gram-ujemnych cienka ściana bakteryjna z peptydoglikanów otoczona jest dwoma błonami bakteryjnymi. Zewnętrzna błona bakteryjna u bakterii Gram-ujemnych jest jednym z głównych powodów występowania antybiotykooporności [277]. Większość antybiotyków aby wykazać właściwości bakteriostatyczne lub bakteriobójcze musi zostać przetransportowana do wnętrza bakterii [278]. W przypadku bakterii Gram-ujemnych wszystkie czynniki bakteriobójcze są usuwane z bakterii na drodze transportu aktywnego, nie dopuszczając ich do przestrzeni wewnątrz bakteryjnej. Słabsze działanie antybakteryjne monolaurynianu glicerolu przeciw bakteriom Gram-ujemnych wytłumaczyć można koniecznością doprowadzenia do zniszczenia zarówno błony bakteryjnej zewnętrznej jak i wewnętrznej, zaś w przypadku bakterii Gram-dodatnich, tylko jednej. Warty wskazania jest fakt, że monolaurynian glicerolu nie może być w sposób aktywny usuwany przez bakterię, a więc niemożliwe jest wytworzenie przeciw niemu oporności. Doniesienia literaturowe wskazują również na synergistyczne działanie antybakteryjne monolaurynianu glicerolu i szeroko stosowanych antybiotyków [275,279,280], co jest przesłanką do zastosowania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych zawierających GML jako nośników antybiotyków do multimodalnej terapii antybakteryjnej. Działanie takich układów miałyby opierać się w

pierwszym kroku na niszczeniu zewnętrznej błony bakteryjnej przez GML, umożliwiając w drugim kroku swobodne dostanie się antybiotyku do wnętrza bakterii.

Zaprezentowane wyniki są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami. Nitbani i wsp. [281] wykazali właściwości antybakteryjne czystego lipidu, monolaurynianu glicerolu na bakteriach *E. coli* i *S. aureus* wykorzystując metodę dyfuzyjno-krażkową, polegającą na umieszczeniu krążka celulozowego nasączonego substancją antybakteryjną na hodowli bakteryjnej i pomiarze średnicy obszaru inhibicji wzrostu bakterii. Przedstawione przez Nitbani i wsp. wyniki wskazując na stężenie 500 µg/ml GML jako powodujące inhibicję wzrostu zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Warto zauważyć, że zaprojektowane w ramach pracy nanocząstki wykazujące właściwości antybakteryjne przy dużo niższych stężeniach (Ryc. 104, Ryc. 105). Wynikać to może ze zwiększenia biodostępności oraz efektywności doprowadzania GML do bakterii przez włączenie się w strukturę lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych. Krislee i wsp. [282] wykazali z kolei, iż monolaurynian glicerolu wykazuje właściwości spowalniające wzrost bakterii *Staphylococcus epidermidis*, których kolonie tworzą rodzaj biofilmu, w przeciwieństwie do bakterii zawieszonych w wodzie, tzw. bakterii planktonowych. Doniesienie to sugeruje, że organizacja przestrzenna bakterii podczas wzrostu może mieć kluczowe znaczenie w doborze środka antybakteryjnego. Powyższy wniosek jest analogiczny z zjawiskami obserwowanymi w trakcie analiz sferoidów komórek zwierzęcych, gdzie przestrzenna struktura sferoidów komórek zwierzęcych istotnie wpływa na dyfuzję czynników cytotoksycznych wewnątrz sferoidu, wpływając tym samym na uzyskiwane wyniki właściwości cytotoksycznych w stosunku do wyników uzyskiwanych dla hodowli dwuwymiarowych. Biofilmy bakteryjne są szczególnie dużym wyzwaniem w momencie, kiedy rosną np. na stentach czy cewnikach [283]. Biofilmy bakteryjne wykazują wysoką odporność na działanie antybiotyków, ponieważ czynnik bakteriobójczy działa jedynie na wierzchnie warstwy bakterii, nie docierając do niższych warstw [284]. W efekcie biofilm szybko ulega odtworzeniu prowadząc do przewlekłych infekcji bakteryjnych. Badania Krislee i wsp. sugerują, iż monolaurynian glicerolu może być dobrym czynnikiem do zwalczania takich bakteryjnych biofilmów.

Przedstawione rezultaty wskazują na konieczność rozszerzenia badań o poznanie mechanizmu działania nanocząstek GMO/GML na bakterie, próbę wytworzenia analogicznych nanocząstek GMO/GML z wykorzystaniem innych metod fabrykacji, dzięki czemu udział GML w nanocząstkach uległby zwiększeniu. Przyszłe badania powinny zostać nakierowane na dalsze optymalizowanie układów GMO/GML pod kątem wykorzystania ich jako nośników antybiotyków. Podejście to pozwoliłoby na uzyskanie synergistycznego działania antybakteryjnego takich systemów.

6. Wnioski

Pierwszym celem rozprawy doktorskiej było określenie użyteczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu oraz fitantriolu, stabilizowanych surfaktantem Pluronic F127 jako potencjalnych systemów do bioobrazowania i dostarczania leków. Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne dzięki obecności w strukturze obszarów polarnych i niepolarnych, dużej powierzchni właściwej oraz dzięki wykorzystaniu biokompatybilnych lipidów klasyfikowane są jako potencjalne układy do bioobrazowania i dostarczania leków. Przed wykorzystaniem takich systemów w medycynie, przed przystąpieniem do badań klinicznych, a wcześniej do badań na zwierzętach modelowych, konieczna jest szczegółowa analiza badanych systemów pod kątem negatywnego wpływu systemu na hodowle *in vitro*. W tej perspektywie niezwykle istotne staje się określenie wpływu projektowanych nanoskopowych układów ciekłokrystalicznych na żywotność komórek. Niestety w dotychczasowych doniesieniach literaturowych brakuje szerokiej analizy porównawczej cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych składających się z monooleinianu glicerolu oraz fitantriolu względem zdrowych i nowotworowych komórek ludzkich. Brak dokładnego poznania mechanizmów negatywnego wpływu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych w komórkach skutecznie uniemożliwia przeprowadzenie badań klinicznych i podjęcie decyzji o wprowadzeniu układów do praktyki medycznej.

Cel osiągnięto poprzez syntezę czterech układów zawierających 2 i 20% masowych lipidu w dyspersji oraz poprzez obszerną analizę porównawczą cytotoksyczności LLCNPs na komórkach HeLa i MSU 1.1 uwzględniając m.in. analizę proliferacji komórkowej, analizę poziomu reaktywnych form tlenu, integralności cytoszkieletu, genotoksyczności i analizę dróg internalizacji nanocząstek.

Przedstawione badania wskazują przede wszystkim na znacznie wyższą cytotoksyczność lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na fitantriolu (PHT) względem tych opartych na monooleinianie glicerolu (GMO). Efekt cytotoksyczny w przypadku LLCNPs zaobserwowano już przy stężeniu wynoszącym 16 $\mu\text{g/ml}$ masowego lipidu. Przeprowadzone badania wskazują, iż szkodliwy efekt LLCNPs opartych na fitantriolu wynikać może z destabilizacji równowagi błony komórkowej, mogącej prowadzić do nieprawidłowości w samoorganizacji cytoszkieletu odpowiadającego za kluczowe funkcje komórkowe. Zniszczeniu struktury cytoszkieletu przez LLCNPs oparte na fitantriolu towarzyszyło również powstawanie dużych ilości reaktywnych form tlenu, mogących prowadzić do utleniania kwasów nukleinowych i białek. Podobne efekty inkubacji z hodowlami dwuwymiarowymi komórek HeLa i MSU 1.1 zaobserwowano dla LLCNPs opartych na monooleinianie glicerolu, jednak przy stężeniach nanocząstek o rząd wielkości większych, sięgających 150 $\mu\text{g/ml}$ masy lipidu. Literatura naukowa wskazuje jednak, iż toksyczność LLCNPs opartych na GMO może objawiać się w postaci hemolizy krwi, tj. negatywnego wpływu na błony komórkowe czerwonych krwinek, prowadzącego do ich rozpadu. Wskazuje to na konieczność przeprowadzenia podobnych, wieloaspektowych analiz cytotoksyczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu w hodowlach *in vitro* pełnej krwi

obwodowej. Porównując wyniki otrzymane dla nanoukładów ciekłokrystalicznych opartych o PHT z tymi wytworzonymi na bazie GMO, stwierdzić można, iż te ostatnie są lepszymi układami lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych do zastosowań biomedycznych.

W trakcie prowadzonych badań podjęto również próbę stworzenia nowego układu LLCNPs opartego na monooleinianie glicerolu (GMO) domieszkowanego lipidem o podobnej strukturze chemicznej i przestrzennej, dodatkowo posiadających potencjalnie interesujące właściwości biologiczne. W tym celu wykorzystano monolaurynian glicerolu (GML), któremu przypisuje się właściwości antybakteryjne, przeciwwirusowe oraz immunomodulujące. W trakcie optymalizacji warunków syntezy nowych układów nanocząstek istotne jest poznanie wpływu czynników na obserwowane właściwości fizykochemiczne, co pozwala na uzyskanie systemu o oczekiwanych parametrach. Określenie optymalnych warunków syntezy nowego układu lipidowych nanocząstek (opartych na monooleinianie glicerolu z dodatkiem monolaurynianu glicerolu stabilizowanego surfaktantem Pluronic F127), było drugim głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej. Zsyntetyzowany układ poddano szczegółowej analizie pod kątem cytotoksyczności wobec komórek HeLa i MSU 1.1 oraz właściwości antybakteryjnych przeciw szczepom *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Pierwszy etap badań został osiągnięty wykorzystując statystyczne narzędzia planowania doświadczeń, tj. pełnego dwupoziomowego planu czynnikowego oraz centralnego planu kompozycyjnego. Drugą część celu osiągnięto za pomocą analizy proliferacji komórek oraz analizy krzywych wzrostu bakterii poddanych inkubacji z wytworzonym układem.

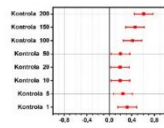
Przeprowadzone badania udowadniają, iż pełny dwupoziomowy plan czynnikowy i centralny plan kompozycyjny mogą z powodzeniem zostać wykorzystane do optymalizacji warunków syntezy lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych domieszkowanych nowymi lipidami. W ramach optymalizacji stworzone zostały nowe układy LLCNPs opartych na monooleinianie glicerolu, zawierające dodatek 3,5% całkowitej masy lipidów monolaurynianu glicerolu. Analiza właściwości fizykochemicznych udowodniła obecność wewnętrznej kubicznej symetrii Pn3m w zoptymalizowanych układach, co świadczy o zachowaniu struktury ciekłokrystalicznej, charakterystycznej dla LLCNPs GMO. Przeprowadzone następnie analizy proliferacji komórkowej nie wykazały istotnych różnic w cytotoksyczności między LLCNPs opartymi na samym monooleinianie glicerolu a układami dwulipidowymi, opartymi na monooleinianie glicerolu z dodatkiem monolaurynianu glicerolu. Ostatecznie, analiza właściwości antybakteryjnych zoptymalizowanego układu wskazuje na antybakteryjne działanie systemu przeciwko bakteriom *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Uzyskany efekt antybakteryjny jest jednak znacząco niższy w porównaniu do działania antybiotyków, czy nawet samego monolaurynianu glicerolu. Kolejne kroki badań układów LLCNPs GMO/GML jako układów o potencjalnych zastosowaniach antybakteryjnych, może stanowić próba inkorporacji powszechnie znanych antybiotyków do struktur ciekłokrystalicznych oraz próba funkcjonalizacji nanocząstek, która pozwoliłaby na celowanie układów bezpośrednio do bakterii.

W ramach rozprawy doktorskiej pt.: „Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy do bioobrazowania i dostarczania leków” wykonano szczegółową analizę właściwości fizykochemicznych i biologicznych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu i fitantriolu. W pracy przedstawiono sposób syntezy stabilnych zawiesin nanocząstek ciekłokrystalicznych o rozmiarach i składzie właściwym dla inkorporacji do wnętrza komórek. Zaprezentowane wyniki stanowią szczegółowy opis i porównanie wywoływanego przez badane nanoukłady efektu cytotoksycznego, który, dla zachowania biokompatybilności powinien być minimalizowany. Przedstawione rezultaty dają nadzieję, na możliwość wykorzystania badanych układów jako potencjalnych nośników leków i środków kontrastujących. Przyszłe badania powinny skupiać się na realizacji wspomnianego potencjału poprzez próbę włączenia w strukturę lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych leków oraz środków kontrastujących.

7. Aneks

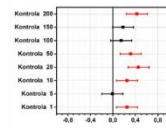
A

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,21133	0,27642	33,42647	4,64861E-12
Wewnątrz grup	27	0,22327	0,00827		
Całkowita	35	2,4346			



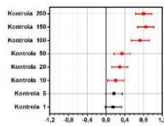
E

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0,86263	0,10783	6,53065	9,6055E-5
Wewnątrz grup	27	0,4458	0,01651		
Całkowita	35	1,30844			



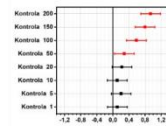
B

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,26894	0,28362	27,83299	2,68096E-8
Wewnątrz grup	17	0,17323	0,01019		
Całkowita	25	2,44217			



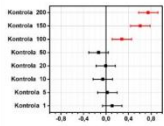
F

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,64777	0,33097	16,2293	9,13854E-7
Wewnątrz grup	18	0,36708	0,02039		
Całkowita	26	3,01486			



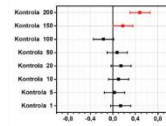
C

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	3,05939	0,38242	27,02845	5,77058E-11
Wewnątrz grup	27	0,38202	0,01415		
Całkowita	35	3,44141			



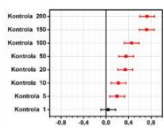
G

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0,95754	0,11969	7,92508	1,91666E-5
Wewnątrz grup	27	0,40778	0,0151		
Całkowita	35	1,36532			



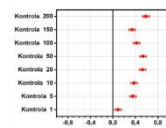
D

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,21133	0,27642	33,42647	4,64861E-12
Wewnątrz grup	27	0,22327	0,00827		
Całkowita	35	2,4346			



H

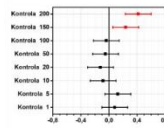
	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1,2601	0,15751	100,67238	0
Wewnątrz grup	27	0,04224	0,00156		
Całkowita	35	1,30235			



Ryc. 106 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek HeLa poddanych inkubacji z A – GMO 2% przez 3 h, B – GMO 2% przez 24 h, C – GMO 2% przez 48 h, D – GMO 2% przez 72 h, E – GMO 20% przez 3 h, F – GMO 20% przez 24 h, G – GMO 20% przez 48 h, H – GMO 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.

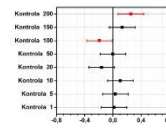
A

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0,97045	0,12131	7,57718	2,81796E-5
Wewnątrz grup	27	0,43225	0,01601		
Całkowita	35	1,4027			



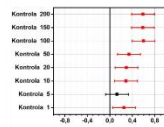
E

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0,97045	0,12131	7,57718	2,81796E-5
Wewnątrz grup	27	0,43225	0,01601		
Całkowita	35	1,4027			



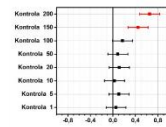
B

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1,08906	0,13613	9,74122	3,64624E-5
Wewnątrz grup	18	0,25155	0,01397		
Całkowita	26	1,34061			



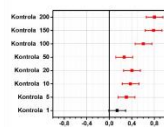
F

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1,08906	0,13613	9,74122	3,64624E-5
Wewnątrz grup	18	0,25155	0,01397		
Całkowita	26	1,34061			



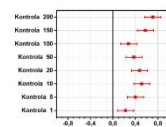
C

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,43896	0,30487	28,89946	2,62874E-11
Wewnątrz grup	27	0,28483	0,01055		
Całkowita	35	2,72379			



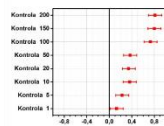
G

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,43896	0,30487	28,89946	2,62874E-11
Wewnątrz grup	27	0,28483	0,01055		
Całkowita	35	2,72379			



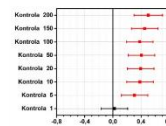
D

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,81357	0,3517	54,871	1,04361E-14
Wewnątrz grup	27	0,17306	0,00641		
Całkowita	35	2,98662			



H

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2,81357	0,3517	54,871	1,04361E-14
Wewnątrz grup	27	0,17306	0,00641		
Całkowita	35	2,98662			



Ryc. 107 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek MSU 1.1 poddanych inkubacji z A – GMO 2% przez 3 h, B – GMO 2% przez 24 h, C – GMO 2% przez 48 h, D – GMO 2% przez 72 h, E – GMO 20% przez 3 h, F – GMO 20% przez 24 h, G – GMO 20% przez 48 h, H – GMO 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.

A

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0.23207	0.02901	2.15802	0.06466
Wewnątrz grup	27	0.36294	0.01344		
Całkowita	35	0.59501			

B

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0.41793	0.05224	21.19956	1.15675E-7
Wewnątrz grup	18	0.162	0.009		
Całkowita	26	1.68835			

C

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0.41793	0.05224	10.88804	1.04025E-6
Wewnątrz grup	27	0.12955	0.0048		
Całkowita	35	0.54748			

D

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1.25217	0.15652	8.60785	9.26255E-6
Wewnątrz grup	27	0.49095	0.01818		
Całkowita	35	1.74312			

E

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	0.18159	0.0227	1.75355	0.13081
Wewnątrz grup	27	0.3491	0.01293		
Całkowita	35	0.53069			

F

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2.01688	0.25211	40.66454	5.69746E-10
Wewnątrz grup	18	0.1116	0.0062		
Całkowita	26	2.12847			

G

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	4.5551	0.56939	45.99169	9.45091E-14
Wewnątrz grup	27	0.33427	0.01238		
Całkowita	35	4.88937			

H

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2.7504	0.3438	288.97666	0
Wewnątrz grup	27	0.03212	0.00119		
Całkowita	35	2.78252			

Ryc. 108 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek HeLa poddanych inkubacji z A – PHT 2% przez 3 h, B – PHT 2% przez 24 h, C – PHT 2% przez 48 h, D – PHT 2% przez 72 h, E – PHT 20% przez 3 h, F – PHT 20% przez 24 h, G – PHT 20% przez 48 h, H – PHT 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera. Dla A i E analiza post-hoc nie została wykonana, ponieważ analiza ANOVA nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami.

A

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1.16011	0.22001	13.97245	8.57019E-8
Wewnątrz grup	27	0.42515	0.01575		
Całkowita	35	2.18526			

B

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	4.93997	0.6175	57.19315	6.21725E-15
Wewnątrz grup	27	0.29151	0.0108		
Całkowita	35	5.23148			

C

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	1.528	0.191	8.45162	1.09036E-5
Wewnątrz grup	27	0.61018	0.0226		
Całkowita	35	2.13817			

D

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2.13887	0.26736	35.75415	2.06513E-12
Wewnątrz grup	27	0.2019	0.00748		
Całkowita	35	2.34077			

E

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	3.04581	0.38073	58.49083	4.66294E-15
Wewnątrz grup	27	0.17575	0.00651		
Całkowita	35	3.22155			

F

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	3.34419	0.41802	79.14844	3.33067E-16
Wewnątrz grup	26	0.11732	0.00528		
Całkowita	34	3.46151			

G

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2.71228	0.33903	90.20326	0
Wewnątrz grup	27	0.10148	0.00376		
Całkowita	35	2.81376			

H

	Df	Suma kwadratów	Średnia suma kwadratów	Wartość F	Wartość p
Pomiędzy grupami	8	2.13887	0.26736	35.75415	2.06513E-12
Wewnątrz grup	27	0.2019	0.00748		
Całkowita	35	2.34077			

Ryc. 109 Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz wykresy porównania średnich żywotności komórek MSU 1.1 poddanych inkubacji z A – PHT 2% przez 3 h, B – PHT 2% przez 24 h, C – PHT 2% przez 48 h, D – PHT 2% przez 72 h, E – PHT 20% przez 3 h, F – PHT 20% przez 24 h, G – PHT 20% przez 48 h, H – PHT 20% przez 72 h uzyskane za pomocą analizy post-hoc Fishera.

8. Bibliografia

1. Kwok P, Chan H-K. Nanotechnology Versus other Techniques in Improving Drug Dissolution. *Curr Pharm Des.* 2014;20:474–82.
2. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2018;16:71.
3. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20:101–24.
4. Xue Y, Gao Y, Meng F, Luo L. Recent progress of nanotechnology-based theranostic systems in cancer treatments. *Cancer Biol Med.* 2021;18:336–51.
5. You W, Henneberg M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. *Evol Appl.* 2018;11:140–52.
6. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021;9:205031212110343.
7. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:215–23.
8. Friedman A, Claypool S, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr Pharm Des.* 2013;19:6315–29.
9. AlSawaftah NM, Awad NS, Pitt WG, Hussein GA. pH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy. *Polymers.* 2022;14:936.
10. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med.* 2021;11:771.
11. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci.* 2015;125:75–84.
12. Peng X, Wen X, Pan X, Wang R, Chen B, Wu C. Design and In Vitro Evaluation of Capsaicin Transdermal Controlled Release Cubic Phase Gels. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11:1405–10.
13. Barauskas J, Landh T. Phase Behavior of the Phytantriol/Water System. *Langmuir.* 2003;19:9562–5.
14. Lutton ES. Phase behavior of aqueous systems of monoglycerides. *J Am Oil Chem Soc.* 1965;42:1068–70.
15. Qiu H, Caffrey M. Lyotropic and Thermotropic Phase Behavior of Hydrated Monoacylglycerols: Structure Characterization of Monovaccenin. *J Phys Chem B.* 1998;102:4819–29.
16. Koynova R, Tenchov B. Phase Transitions and Phase Behavior of Lipids. In: Roberts GCK, editor. *Encycl Biophys* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2023 Jul 4]. p. 1841–54. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16712-6_542

17. Elazazy MS, Issa AA, Al-Mashreky M, Al-Sulaiti M, Al-Saad K. Application of fractional factorial design for green synthesis of cyano-modified silica nanoparticles: Chemometrics and multifarious response optimization. *Adv Powder Technol.* 2018;29:1204–15.
18. Hegazy D, Tag R, Habib BA. Statistical Sequential Experimentation: Preliminary Mixed Factorial Design, I-Optimal Mixture Design Then Finally Novel Design Space Expansion for Optimization of Tazarotene Cubosomes. *Int J Nanomedicine.* 2022;Volume 17:1069–86.
19. Ni H, Xu S, Gu P, Wusiman A, Zhang Y, Qiu T, et al. Optimization of preparation conditions for CTAB-modified *Polygonatum sibiricum* polysaccharide cubosomes using the response surface methodology and their effects on splenic lymphocytes. *Int J Pharm.* 2019;559:410–9.
20. Dierking I, Martins Figueiredo Neto A. Novel Trends in Lyotropic Liquid Crystals. *Crystals.* 2020;10:604.
21. Andrienko D. Introduction to liquid crystals. *J Mol Liq.* 2018;267:520–41.
22. Barriga HMG, Holme MN, Stevens MM. Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? *Angew Chem Int Ed.* 2019;58:2958–78.
23. Karami Z, Hamidi M. Cubosomes: remarkable drug delivery potential. *Drug Discov Today.* 2016;21:789–801.
24. Yaghmur A, Mu H. Recent advances in drug delivery applications of cubosomes, hexosomes, and solid lipid nanoparticles. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11:871–85.
25. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J Controlled Release.* 2016;238:176–85.
26. Pourjavadi A, Amin SS, Hosseini SH. Delivery of Hydrophobic Anticancer Drugs by Hydrophobically Modified Alginate Based Magnetic Nanocarrier. *Ind Eng Chem Res.* 2018;57:822–32.
27. Gaballa S, El Garhy O, Abdelkader H. Cubosomes: composition, preparation, and drug delivery applications. *J Adv Biomed Pharm Sci.* 2019;0:0–0.
28. Aleandri S, Bandera D, Mezzenga R, Landau EM. Biotinylated Cubosomes: A Versatile Tool for Active Targeting and Codelivery of Paclitaxel and a Fluorescein-Based Lipid Dye. *Langmuir.* 2015;31:12770–6.
29. Caltagirone C, Falchi AM, Lampis S, Lippolis V, Meli V, Monduzzi M, et al. Cancer-Cell-Targeted Theranostic Cubosomes. *Langmuir.* 2014;30:6228–36.
30. Yu L, Reutzel-Edens SM. CRYSTALLIZATION | Basic Principles. *Encycl Food Sci Nutr* [Internet]. Elsevier; 2003 [cited 2022 Feb 1]. p. 1697–702. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X003138>
31. Gaudin T, Rotureau P, Pezron I, Fayet G. Investigating the impact of sugar-based surfactants structure on surface tension at critical micelle concentration with structure-property relationships. *J Colloid Interface Sci.* 2018;516:162–71.
32. Szutkowski K, Kołodziejka Ż, Pietralik Z, Zhukov I, Skrzypczak A, Materna K, et al. Clear distinction between CAC and CMC revealed by high-resolution NMR diffusometry for a series of bis-imidazolium gemini surfactants in aqueous solutions. *RSC Adv.* 2018;8:38470–82.

33. Karthika S, Radhakrishnan TK, Kalaichelvi P. A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories. *Cryst Growth Des.* 2016;16:6663–81.
34. Wu W, Nancollas GH. A New Understanding of the Relationship Between Solubility and Particle Size. *J Solut Chem.* 1998;27:521–31.
35. Erdemir D, Lee AY, Myerson AS. Crystal Nucleation. In: Myerson AS, Erdemir D, Lee AY, editors. *Handb Ind Cryst* [Internet]. 3rd ed. Cambridge University Press; 2019 [cited 2022 Feb 1]. p. 76–114. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781139026949%23CN-bp-3/type/book_part
36. Fletcher NH. Size Effect in Heterogeneous Nucleation. *J Chem Phys.* 1958;29:572–6.
37. Myers D. *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications.* New York, N.Y: VCH Publishers; 1991.
38. Ozbolt GP. A COMPREHENSIVE OVERVIEW OF MINIMAL-SURFACE THEORY, WITH A THOROUGH MATHEMATICAL TREATMENT OF BERNSTEIN'S THEOREM, THE WEIERSTRASS-ENNEPER REPRESENTATIONS, AND PROPERTIES OF THE GAUSS MAP. University of Houston; 2014.
39. Hyde S, Ninham BW, Andersson S, Larsson K, Landh T, Blum Z, et al. The Mathematics of Curvature. *Lang Shape* [Internet]. Elsevier; 1997 [cited 2021 Nov 5]. p. 1–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444815385500022>
40. Douglas J. Solution of the problem of Plateau. *Trans Am Math Soc.* 1931;33:263–263.
41. Radó T. On the Problem of Plateau [Internet]. 1993 [cited 2021 Nov 5]. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-99118-9>
42. Schwarz HA. *Gesammelte Mathematische Abhandlungen: Erster Band* [Internet]. 1890 [cited 2021 Nov 5]. Available from: <http://link.springer.com/openurl?genre=book&isbn=978-3-642-50356-6>
43. Shoen AH. Infinite periodic minimal surfaces without self-intersections [Internet]. NASA Electronics Research Center Cambridge, MA, United States; 1970 [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://ntrs.nasa.gov/citations/19700020472>
44. Håkansson P, Persson L, Westlund P-O. Itô diffusions on hypersurfaces with application to the Schwarz-P surface and nuclear magnetic resonance theory. *J Chem Phys.* 2002;117:8634–43.
45. Muna N, Patterson AE. Simple 3-D Visualization of Some Common Mathematical Minimal Surfaces using MATLAB [Internet]. Available from: <http://hdl.handle.net/2142/101899>
46. Khalil RA, Zarari AA. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Appl Surf Sci.* 2014;318:85–9.
47. Nagarajan R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir.* 2002;18:31–8.
48. Barón M, Stepto RFT. Definitions of basic terms relating to polymer liquid crystals (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem.* 2002;74:493–509.

49. Gold V, editor. The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book [Internet]. 4th ed. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); 2019 [cited 2022 Jan 18]. Available from: <https://goldbook.iupac.org/>
50. Garidel P, Kaconis Y, Heinbockel L, Wulf M, Gerber S, Munk A, et al. Self-Organisation, Thermotropic and Lyotropic Properties of Glycolipids Related to their Biological Implications. *Open Biochem J.* 2015;9:49–72.
51. Garti N, Somasundaran P, Mezzenga R, editors. Self-Assembled Supramolecular Architectures: Lyotropic Liquid Crystals [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [cited 2021 Nov 5]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118336632>
52. Barón M. Definitions of basic terms relating to low-molar-mass and polymer liquid crystals (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem.* 2001;73:845–95.
53. Krimm S. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 pp. price: \$18.50. *J Polym Sci Polym Lett Ed.* 1980;18:687–687.
54. Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces. 3rd ed. Burlington, MA: Academic Press; 2011.
55. Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1977;470:185–201.
56. Hawley GG, editor. The Condensed chemical dictionary. 9th ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co; 1977.
57. Furia TE, Chemical Rubber Company, editors. CRC handbook of food additives. 2d ed. Cleveland: CRC Press; 1972.
58. Weast RC. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Florida: CRC Press; 1980.
59. 21 CFR 184.1323 – Glycerol monooleate. [Internet]. [cited 2022 Jan 23]. Available from: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-184/subpart-B/section-184.1323>
60. Milak S, Zimmer A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2015;478:569–87.
61. Startek J, Boonen B, Talavera K, Meseguer V. TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *Int J Mol Sci.* 2019;20:371.
62. Zhen G, Hinton TM, Muir BW, Shi S, Tizard M, McLean KM, et al. Glycerol Monooleate-Based Nanocarriers for siRNA Delivery in Vitro. *Mol Pharm.* 2012;9:2450–7.
63. Angelova A, Angelov B, Mutafchieva R, Lesieur S, Couvreur P. Self-Assembled Multicompartment Liquid Crystalline Lipid Carriers for Protein, Peptide, and Nucleic Acid Drug Delivery. *Acc Chem Res.* 2011;44:147–56.
64. Shi X, Peng T, Huang Y, Mei L, Gu Y, Huang J, et al. Comparative studies on glycerol monooleate- and phytantriol-based cubosomes containing oridonin *in vitro* and *in vivo*. *Pharm Dev Technol.* 2017;22:322–9.

65. Pereira GR, Collett JH, Garcia SB, Thomazini JA, Bentley MVLB. Glycerol monooleate/solvents systems for progesterone transdermal delivery: In vitro permeation and microscopic studies. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2002;38:55–62.
66. Peng X, Zhou Y, Han K, Qin L, Dian L, Li G, et al. Characterization of cubosomes as a targeted and sustained transdermal delivery system for capsaicin. *Drug Des Devel Ther.* 2015;4209.
67. Cohen-Avrahami M, Shames AI, Ottaviani MF, Aserin A, Garti N. HIV-TAT Enhances the Transdermal Delivery of NSAID Drugs from Liquid Crystalline Mesophases. *J Phys Chem B.* 2014;118:6277–87.
68. Gupta A, Stait-Gardner T, de Campo L, Waddington LJ, Kirby N, Price WS, et al. Nanoassemblies of Gd–DTPA–monooleyl and glycerol monooleate amphiphiles as potential MRI contrast agents. *J Mater Chem B.* 2014;2:1225.
69. Gupta A. Highly Ordered Supramolecular Nanoassemblies of Paramagnetic Amphiphilic Chelates as Potential MRI Contrast Agents. *Aust J Chem.* 2018;71:195.
70. Meli V, Caltagirone C, Falchi AM, Hyde ST, Lippolis V, Monduzzi M, et al. Docetaxel-Loaded Fluorescent Liquid-Crystalline Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Langmuir.* 2015;31:9566–75.
71. Phytantriol; SDS No. 0429082. DSM Nutritional Products Ltd; 2018.
72. Phytantriol - general information [Internet]. European Chemicals Agency; [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/77472>
73. Final Report on the Safety Assessment of Phytantriol1. *Int J Toxicol.* 2007;26:107–14.
74. Dong Y-D, Dong AW, Larson I, Rappolt M, Amenitsch H, Hanley T, et al. Impurities in Commercial Phytantriol Significantly Alter Its Lyotropic Liquid-Crystalline Phase Behavior. *Langmuir.* 2008;24:6998–7003.
75. Qin L, Mei L, Shan Z, Huang Y, Pan X, Li G, et al. Phytantriol based liquid crystal provide sustained release of anticancer drug as a novel embolic agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42:307–16.
76. Ali MA, Noguchi S, Iwao Y, Oka T, Itai S. Preparation and Characterization of SN-38-Encapsulated Phytantriol Cubosomes Containing α -Monoglyceride Additives. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2016;64:577–84.
77. Sun X, Du JD, Hawley A, Tan A, Boyd BJ. Magnetically-stimulated transformations in the nanostructure of PEGylated phytantriol-based nanoparticles for on-demand drug release. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;207:112005.
78. Wan J, Wang S, Gui Z, Yang Z, Shan Q, Chu X, et al. Phytantriol-based lyotropic liquid crystal as a transdermal delivery system. *Eur J Pharm Sci.* 2018;125:93–101.
79. Monolaurin; SDS No. G0081. TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD; 2018.
80. Monolaurin - general information [Internet]. European Chemicals Agency; [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/58961>

81. Lawrence ASC. Lyotropic Mesomorphism in Lipid-Water Systems. *Mol Cryst*. 1969;7:1–57.
82. Rewadikar R, Watson H. II-THE PREPARATION AND PHYSICAL PROPERTIES OF α -MONOGLYCERIDES. *Journal of the Indian Institute of Science*. 1930;13:128.
83. Malkin T, Shurbagy MRE. An X-ray and thermal examination of the glycerides. Part II. The α -monoglycerides. *J Chem Soc*. 1936;0:1628–34.
84. Crauste-Manciet S, Larquet E, Khawand K, Bessodes M, Chabot GG, Brossard D, et al. Lipidic spherulites: Formulation optimisation by paired optical and cryoelectron microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85:1088–94.
85. Wang A, Chen C, Liao L, Qian J, Yuan F-G, Zhang N. Enhanced β -Phase in Direct Ink Writing PVDF Thin Films by Intercalation of Graphene. *J Inorg Organomet Polym Mater*. 2020;30:1497–502.
86. Shimada H, Tyler VE, McLaughlin JL. Biologically Active Acylglycerides from the Berries of Saw-Palmetto (*Serenoa repens*). *J Nat Prod*. 1997;60:417–8.
87. Petschow BW, Batema RP, Ford LL. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:302–6.
88. Kabara JJ, Vrable R, Lie Ken Jie MSF. Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids*. 1977;12:753–9.
89. Schlievert PM, Deringer JR, Kim MH, Projan SJ, Novick RP. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:626–31.
90. Projan SJ, Brown-Skrobot S, Schlievert PM, Vandenesch F, Novick RP. Glycerol monolaurate inhibits the production of beta-lactamase, toxic shock toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *J Bacteriol*. 1994;176:4204–9.
91. Joshi S, Kaushik V, Gode V, Mhaskar S. Coconut Oil and Immunity: What do we really know about it so far? *J Assoc Physicians India*. 2020;68:67–72.
92. Subroto E, Indiarito R. Bioactive monolaurin as an antimicrobial and its potential to improve the immune system and against COVID-19: a review. *Food Res*. 2020;4:2355–65.
93. Ramesh SV. Coconut oil as a virucidal agent: prospects and challenges in COVID-19 [Internet]. Preprints; 2020 May. Available from: <https://www.authorea.com/users/319363/articles/449084-coconut-oil-as-a-virucidal-agent-prospects-and-challenges-in-covid-19?commit=36370398b62ef7e204a68b7618ffb380aef351e9>
94. Barberis E, Amede E, Tavecchia M, Marengo E, Cittone MG, Rizzi E, et al. Understanding protection from SARS-CoV-2 using metabolomics. *Sci Rep*. 2021;11:13796.
95. Ma W-D, Xu H, Wang C, Nie S-F, Pan W-S. Pluronic F127-g-poly(acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm*. 2008;350:247–56.
96. Kant V, Gopal A, Kumar D, Gopalkrishnan A, Pathak NN, Kurade NP, et al. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem*. 2014;116:5–13.

97. Akkari ACS, Papini JZB, Garcia GK, Franco MKKD, Cavalcanti LP, Gasperini A, et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Mater Sci Eng C*. 2016;68:299–307.
98. Akhlaghi SP, Ribeiro IR, Boyd BJ, Loh W. Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriol-Pluronic® F127 cubosomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;145:845–53.
99. Rarokar NR, Saoji SD, Raut NA, Taksande JB, Khedekar PB, Dave VS. Nanostructured Cubosomes in a Thermoresponsive Depot System: An Alternative Approach for the Controlled Delivery of Docetaxel. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17:436–45.
100. Tilley AJ, Drummond CJ, Boyd BJ. Disposition and association of the steric stabilizer Pluronic® F127 in lyotropic liquid crystalline nanostructured particle dispersions. *J Colloid Interface Sci*. 2013;392:288–96.
101. Shaikhullina M, Khaliullina A, Gimatdinov R, Butakov A, Chernov V, Filippov A. NMR relaxation and self-diffusion in aqueous micellar gels of pluronic F-127. *J Mol Liq*. 2020;306:112898.
102. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2011;1811:637–47.
103. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:112–24.
104. Cooper GM. *The cell: a molecular approach*. 2. ed. Washington, DC: ASM Press [u.a.]; 2000.
105. Kraft ML. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. Bement W, editor. *Mol Biol Cell*. 2013;24:2765–8.
106. *The principles of nerve cell communication*. Alcohol Health Res World. 1997;21:107–8.
107. Martinez-Seara Monne H, Danne R, Róg T, Ilpo V, Gurtovenko A. Structure of Glycocalyx. *Biophys J*. 2013;104:251a.
108. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485–92.
109. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2002;3:944–50.
110. Lynes EM, Simmen T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): How diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813:1893–905.
111. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:79–94.
112. English AR, Voeltz GK. Endoplasmic Reticulum Structure and Interconnections with Other Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a013227–a013227.
113. Jarc E, Petan T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J Biol Med*. 2019;92:435–52.

114. Goodman JM. Understanding the Lipid Droplet Proteome and Protein Targeting. *Dev Cell*. 2018;44:1–2.
115. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2009;1791:419–40.
116. Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG. Regulated Localization of Rab18 to Lipid Droplets. *J Biol Chem*. 2005;280:42325–35.
117. Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying Y, Zhu M, Serrero G, et al. Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2007;1773:784–93.
118. Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RGW, Liu P. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *PROTEOMICS*. 2009;9:914–21.
119. Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA. The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. *Curr Biol*. 2006;16:1783–95.
120. Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T. Cytoplasmic Lipid Droplets Are Sites of Convergence of Proteasomal and Autophagic Degradation of Apolipoprotein B. Brodsky J, editor. *Mol Biol Cell*. 2006;17:2674–83.
121. Roberts MA, Olzmann JA. Protein Quality Control and Lipid Droplet Metabolism. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2020;36:115–39.
122. Bozza PT, Viola JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids PLEFA*. 2010;82:243–50.
123. Pereira-Dutra FS, Bozza PT. Lipid droplets diversity and functions in inflammation and immune response. *Expert Rev Proteomics*. 2021;18:809–25.
124. Hofbauer HF, Gecht M, Fischer SC, Seybert A, Frangakis AS, Stelzer EHK, et al. The molecular recognition of phosphatidic acid by an amphipathic helix in Opi1. *J Cell Biol*. 2018;217:3109–26.
125. Kuge H, Akahori K, Yagyu K-I, Honke K. Functional compartmentalization of the plasma membrane of neurons by a unique acyl chain composition of phospholipids. *J Biol Chem*. 2014;289:26783–93.
126. Petrov AG. Mechanosensitivity of cell membranes: role of liquid crystalline lipid matrix. In: Tykarska M, Dabrowski RS, Zielinski J, editors. Zakopane, Poland; 1998 [cited 2023 Jun 11]. p. 306–18. Available from: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=939175>
127. De Almeida RFM, Joly E. Crystallization around solid-like nanosized docks can explain the specificity, diversity, and stability of membrane microdomains. *Front Plant Sci* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 11];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00072/abstract>
128. Munro S. Lipid Rafts. *Cell*. 2003;115:377–88.
129. Luzzati V. Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr Opin Struct Biol*. 1997;7:661–8.

130. Mahamid J, Tegunov D, Maiser A, Arnold J, Leonhardt H, Pitzko JM, et al. Liquid-crystalline phase transitions in lipid droplets are related to cellular states and specific organelle association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:16866–71.
131. Rogers S, Gui L, Kovalenko A, Reetz E, Nicastro D, Henne WM. Liquid-crystalline lipid phase transitions in lipid droplets selectively remodel the LD proteome [Internet]. *Cell Biology*; 2021 Aug. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.08.30.458229>
132. Buchman JT, Hudson-Smith NV, Landy KM, Haynes CL. Understanding Nanoparticle Toxicity Mechanisms To Inform Redesign Strategies To Reduce Environmental Impact. *Acc Chem Res*. 2019;52:1632–42.
133. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1343–74.
134. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Res*. 2009;66:121–7.
135. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2019;25:101084.
136. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2016;1863:2977–92.
137. Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem Rev*. 2011;111:5944–72.
138. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
139. Falchi AM, Rosa A, Atzeri A, Incani A, Lampis S, Meli V, et al. Effects of monoolein-based cubosome formulations on lipid droplets and mitochondria of HeLa cells. *Toxicol Res*. 2015;4:1025–36.
140. Rosa A, Murgia S, Putzu D, Meli V, Falchi AM. Monoolein-based cubosomes affect lipid profile in HeLa cells. *Chem Phys Lipids*. 2015;191:96–105.
141. Hinton TM, Grusche F, Acharya D, Shukla R, Bansal V, Waddington LJ, et al. Bicontinuous cubic phase nanoparticle lipid chemistry affects toxicity in cultured cells. *Toxicol Res*. 2014;3:11–22.
142. Strachan JB, Dyett BP, Nasa Z, Valery C, Conn CE. Toxicity and cellular uptake of lipid nanoparticles of different structure and composition. *J Colloid Interface Sci*. 2020;576:241–51.
143. Kaur SD, Singh G, Singh G, Singhal K, Kant S, Bedi N. Cubosomes as Potential Nanocarrier for Drug Delivery: A Comprehensive Review. *J Pharm Res Int*. 2021;118–35.
144. Spicer PT, Hayden KL, Lynch ML, Ofori-Boateng A, Burns JL. Novel Process for Producing Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles (Cubosomes). *Langmuir*. 2001;17:5748–56.
145. Chong JYT, Mulet X, Boyd BJ, Drummond CJ. Steric Stabilizers for Cubic Phase Lyotropic Liquid Crystal Nanodispersions (Cubosomes). *Adv Planar Lipid Bilayers Liposomes* [Internet]. Elsevier; 2015

[cited 2021 Nov 8]. p. 131–87. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1554451614000027>

146. Nanjwade B, Hundekar Y, Kamble M, Srichana T. Development of Cuboidal Nanomedicine by Nanotechnology. *Dev Cuboidal Nanomedicine Nanotechnol.* 2014;2:1–8.

147. Srivastava S, Abraham PR, Mukhopadhyay S. Aptamers: An Emerging Tool for Diagnosis and Therapeutics in Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:656421.

148. Tiede C, Bedford R, Heseltine SJ, Smith G, Wijetunga I, Ross R, et al. Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents. *eLife.* 2017;6:e24903.

149. Pramanik A, Xu Z, Shamsuddin SH, Khaled YS, Ingram N, Maisey T, et al. Affimer Tagged Cubosomes: Targeting of Carcinoembryonic Antigen Expressing Colorectal Cancer Cells Using *In Vitro* and *In Vivo* Models. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14:11078–91.

150. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016;8:409–27.

151. Scarlett B, editor. Electrophoretic Light Scattering. Part Charact Light Scatt Methods [Internet]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2002 [cited 2023 Jun 11]. p. 289–343. Available from: http://link.springer.com/10.1007/0-306-47124-8_6

152. Matusiak J, Grządka E. Stability of colloidal systems - a review of the stability measurements methods. *Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska Sect AA – Chem.* 2017;72:33.

153. Williams DB, Carter CB. Amplitude Contrast. *Transm Electron Microsc* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2009 [cited 2023 Jun 11]. p. 371–88. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-76501-3_22

154. Nagayama K, Danev R. Phase contrast electron microscopy: development of thin-film phase plates and biological applications. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2008;363:2153–62.

155. Diffraction Contrast in TEM Images. *Transm Electron Microsc Diffraction Mater* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cited 2023 Jun 11]. p. 337–421. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-73886-2_7

156. de Oliveira HM, Nunes FD. About the Phasor Pathways in Analogical Amplitude Modulation. 2015 [cited 2023 Jun 11]; Available from: <https://arxiv.org/abs/1502.02947>

157. Sigworth FJ. Principles of cryo-EM single-particle image processing. *Microscopy.* 2016;65:57–67.

158. Benjin X, Ling L. Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy. *Protein Sci.* 2020;29:872–82.

159. Carroni M, Saibil HR. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods.* 2016;95:78–85.

160. Milne JLS, Borgnia MJ, Bartesaghi A, Tran EEH, Earl LA, Schauder DM, et al. Cryo-electron microscopy - a primer for the non-microscopist. *FEBS J.* 2013;280:28–45.

161. Al-Amoudi A, Norlen LPO, Dubochet J. Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J Struct Biol.* 2004;148:131–5.

162. Mishra RK, Cherusseri J, Allahyari E, Thomas S, Kalarikkal N. Small-Angle Light and X-ray Scattering in Nanosciences and Nanotechnology. *Therm Rheol Meas Tech Nanomater Charact* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2022 Jan 16]. p. 233–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323461399000104>
163. Putnam CD, Hammel M, Hura GL, Tainer JA. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys.* 2007;40:191–285.
164. Jablonski A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature.* 1933;131:839–40.
165. Atkins PW, De Paula J. *Atkins' Physical chemistry.* New York: W.H. Freeman; 2006.
166. Kasha M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss Faraday Soc.* 1950;9:14.
167. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy.* 3rd ed. New York: Springer; 2006.
168. He Y, Li Y. Fluorescent Markers. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, Yokota H, editors. *Encycl Syst Biol* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2013 [cited 2022 Feb 8]. p. 746–8. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9863-7_192
169. Pawley JB, editor. *Handbook of biological confocal microscopy.* 3rd ed. New York, NY: Springer; 2006.
170. Gabryelska M, Szymanski M. DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. *Nauka.* 2009;2/2009:111–34.
171. Schmid G. The relevance of shape and size of Au55 clusters. *Chem Soc Rev.* 2008;37:1909.
172. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro J-M, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today.* 2011;6:446–65.
173. Mee R. *A Comprehensive Guide to Factorial Two-Level Experimentation* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/b105081>
174. Benedetti B, Caponigro V, Ardini F. *Experimental Design Step by Step: A Practical Guide for Beginners.* *Crit Rev Anal Chem.* 2022;52:1015–28.
175. Yuangyai C, Nembhard HB. *Design of experiments.* *Emerg Nanotechnologies Manuf* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2023 Mar 9]. p. 230–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323289900000087>
176. Bonaccorso A, Russo G, Pappalardo F, Carbone C, Puglisi G, Pignatello R, et al. Quality by design tools reducing the gap from bench to bedside for nanomedicine. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;169:144–55.
177. Trigub MM, Filatova NV, Areshidze DA, Sen' VD, Terentiev AA. Comparison of the Effect of Platinum (IV) Complexes on Spheroids and Monolayer Culture of HeLa Cells. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168:583–8.

178. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6225.
179. Theumer A, Gräfe C, Bähring F, Bergemann C, Hochhaus A, Clement JH. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles exert different cytotoxic effects on cells grown in monolayer cell culture versus as multicellular spheroids. *J Magn Magn Mater.* 2015;380:27–33.
180. Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008;3:1172–84.
181. Atha DH, Nagy A, Steinbrück A, Dennis AM, Hollingsworth JA, Dua V, et al. Quantifying engineered nanomaterial toxicity: comparison of common cytotoxicity and gene expression measurements. *J Nanobiotechnology.* 2017;15:79.
182. Newnham RE. *Properties of materials: anisotropy, symmetry, structure.* Oxford ; New York: Oxford University Press; 2005.
183. Hur K, Francescato Y, Giannini V, Maier SA, Hennig RG, Wiesner U. Three-Dimensionally Isotropic Negative Refractive Index Materials from Block Copolymer Self-Assembled Chiral Gyroid Networks. *Angew Chem Int Ed.* 2011;50:11985–9.
184. Mathews PD, Mertins O, Angelov B, Angelova A. Cubosomal lipid nanoassemblies with pH-sensitive shells created by biopolymer complexes: A synchrotron SAXS study. *J Colloid Interface Sci.* 2022;607:440–50.
185. Barriga HMG, Ces O, Law RV, Seddon JM, Brooks NJ. Engineering Swollen Cubosomes Using Cholesterol and Anionic Lipids. *Langmuir.* 2019;35:16521–7.
186. Lai X, Han M-L, Ding Y, Chow SH, Le Brun AP, Wu C-M, et al. A polytherapy based approach to combat antimicrobial resistance using cubosomes. *Nat Commun.* 2022;13:343.
187. Chang C, Meikle TG, Drummond CJ, Yang Y, Conn CE. Comparison of cubosomes and liposomes for the encapsulation and delivery of curcumin. *Soft Matter.* 2021;17:3306–13.
188. Bessone CDV, Akhlaghi SP, Tártara LI, Quinteros DA, Loh W, Allemandi DA. Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma. *Eur J Pharm Sci.* 2021;160:105748.
189. Malheiros B, de Castro RD, Lotierzo MC, Casadei BR, Mariani P, Barbosa LRS. Influence of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in phytantriol-based cubosomes: A structural investigation. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2022;632:127720.
190. Jabłonowska E, Matyszewska D, Nazaruk E, Godlewska M, Gawęł D, Bilewicz R. Lipid membranes exposed to dispersions of phytantriol and monoolein cubosomes: Langmuir monolayer and HeLa cell membrane studies. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2021;1865:129738.
191. Fornasier M, Biffi S, Bortot B, Macor P, Manhart A, Wurm FR, et al. Cubosomes stabilized by a polyphosphoester-analog of Pluronic F127 with reduced cytotoxicity. *J Colloid Interface Sci.* 2020;580:286–97.
192. Wu H, Li J, Zhang Q, Yan X, Guo L, Gao X, et al. A novel small Odorranalectin-bearing cubosomes: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on amyloid- β 25–35-treated rats following intranasal administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80:368–78.

193. Zatloukalová M, Nazaruk E, Novák D, Vacek J, Bilewicz R. Lipidic liquid crystalline cubic phases for preparation of ATP-hydrolysing enzyme electrodes. *Biosens Bioelectron.* 2018;100:437–44.
194. Driever CD, Mulet X, Johnston APR, Waddington LJ, Thissen H, Caruso F, et al. Converging layer-by-layer polyelectrolyte microcapsule and cubic lyotropic liquid crystalline nanoparticle approaches for molecular encapsulation. *Soft Matter.* 2011;7:4257.
195. Kluzek M, Tyler All, Wang S, Chen R, Marques CM, Thalmann F, et al. Influence of a pH-sensitive polymer on the structure of monoolein cubosomes. *Soft Matter.* 2017;13:7571–7.
196. Younus M, Prentice RN, Clarkson AN, Boyd BJ, Rizwan SB. Incorporation of an Endogenous Neuromodulatory Lipid, Oleoylethanolamide, into Cubosomes: Nanostructural Characterization. *Langmuir.* 2016;32:8942–50.
197. Dong Y-D, Larson I, Hanley T, Boyd BJ. Bulk and Dispersed Aqueous Phase Behavior of Phytantriol: Effect of Vitamin E Acetate and F127 Polymer on Liquid Crystal Nanostructure. *Langmuir.* 2006;22:9512–8.
198. Barauskas J, Johnsson M, Joabsson F, Tiberg F. Cubic Phase Nanoparticles (Cubosome): Principles for Controlling Size, Structure, and Stability. *Langmuir.* 2005;21:2569–77.
199. Wörle G, Bunjes H, Tiberg F, Siekmann B, Johnsson M, Barauskas J. Method for improving the properties of amphiphile particles (WO2005014162A1).
200. Yang Z, Tan Y, Chen M, Dian L, Shan Z, Peng X, et al. Development of Amphotericin B-Loaded Cubosomes Through the SolEmuls Technology for Enhancing the Oral Bioavailability. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13:1483–91.
201. Malheiros B, Dias de Castro R, Lotierzo MCG, Casadei BR, Barbosa LRS. Design and manufacturing of monodisperse and malleable phytantriol-based cubosomes for drug delivery applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;61:102149.
202. Badie H, Abbas H. Novel Small Self-Assembled Resveratrol-Bearing Cubosomes and Hexosomes: Preparation, Characterization, and *ex Vivo* Permeation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2018;44:2013–25.
203. Elgindy NA, Mehanna MM, Mohyeldin SM. Self-assembled nano-architecture liquid crystalline particles as a promising carrier for progesterone transdermal delivery. *Int J Pharm.* 2016;501:167–79.
204. Verma P, Ahuja M. Optimization, characterization and evaluation of chitosan-tailored cubic nanoparticles of clotrimazole. *Int J Biol Macromol.* 2015;73:138–45.
205. Rapalli VK, Waghule T, Hans N, Mahmood A, Gorantla S, Dubey SK, et al. Insights of lyotropic liquid crystals in topical drug delivery for targeting various skin disorders. *J Mol Liq.* 2020;315:113771.
206. Patil S, Kadam C, Pokharkar V. QbD based approach for optimization of Tenofovir disoproxil fumarate loaded liquid crystal precursor with improved permeability. *J Adv Res.* 2017;8:607–16.
207. Javed MN, Kohli K, Amin S. Risk Assessment Integrated QbD Approach for Development of Optimized Bicontinuous Mucoadhesive Limicubes for Oral Delivery of Rosuvastatin. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19:1377–91.

208. Waghule T, Patil S, Rapalli VK, Girdhar V, Gorantla S, Kumar Dubey S, et al. Improved skin-permeated diclofenac-loaded lyotropic liquid crystal nanoparticles: QbD-driven industrial feasible process and assessment of skin deposition. *Liq Cryst.* 2021;48:991–1009.
209. Mahmood A, Rapalli VK, Waghule T, Gorantla S, Singhvi G. Luliconazole loaded lyotropic liquid crystalline nanoparticles for topical delivery: QbD driven optimization, in-vitro characterization and dermatokinetic assessment. *Chem Phys Lipids.* 2021;234:105028.
210. Akçan R, Aydoğan HC, Yildirim MŞ, Taştekin B, Sağlam N. Nanotoxicity: a challenge for future medicine. *Turk J Med Sci.* 2020;50:1180–96.
211. Kulkarni SA, Feng S-S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharm Res.* 2013;30:2512–22.
212. Kaga S, Truong NP, Esser L, Senyschyn D, Sanyal A, Sanyal R, et al. Influence of Size and Shape on the Biodistribution of Nanoparticles Prepared by Polymerization-Induced Self-Assembly. *Biomacromolecules.* 2017;18:3963–70.
213. Báez DF, Gallardo-Toledo E, Oyarzún MP, Araya E, Kogan MJ. The Influence of Size and Chemical Composition of Silver and Gold Nanoparticles on in vivo Toxicity with Potential Applications to Central Nervous System Diseases. *Int J Nanomedicine.* 2021;Volume 16:2187–201.
214. Hinton TM, Grusche F, Acharya D, Shukla R, Bansal V, Waddington LJ, et al. Bicontinuous cubic phase nanoparticle lipid chemistry affects toxicity in cultured cells. *Toxicol Res.* 2014;3:11–22.
215. Astolfi P, Giorgini E, Gambini V, Rossi B, Vaccari L, Vita F, et al. Lyotropic Liquid-Crystalline Nanosystems as Drug Delivery Agents for 5-Fluorouracil: Structure and Cytotoxicity. *Langmuir.* 2017;33:12369–78.
216. Zhai J, Suryadinata R, Luan B, Tran N, Hinton TM, Ratcliffe J, et al. Amphiphilic brush polymers produced using the RAFT polymerisation method stabilise and reduce the cell cytotoxicity of lipid lyotropic liquid crystalline nanoparticles. *Faraday Discuss.* 2016;191:545–63.
217. Pramanik A, Xu Z, Ingram N, Coletta PL, Millner PA, Tyler All, et al. Hyaluronic-Acid-Tagged Cubosomes Deliver Cytotoxics Specifically to CD44-Positive Cancer Cells. *Mol Pharm.* 2022;19:4601–11.
218. Cytryniak A, Żelechowska-Matysiak K, Nazaruk E, Bilewicz R, Walczak R, Majka E, et al. Cubosomal Lipid Formulation for Combination Cancer Treatment: Delivery of a Chemotherapeutic Agent and Complexed α -Particle Emitter ^{213}Bi . *Mol Pharm.* 2022;19:2818–31.
219. Zhai J, Tan FH, Luwor RB, Srinivasa Reddy T, Ahmed N, Drummond CJ, et al. *In Vitro* and *In Vivo* Toxicity and Biodistribution of Paclitaxel-Loaded Cubosomes as a Drug Delivery Nanocarrier: A Case Study Using an A431 Skin Cancer Xenograft Model. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3:4198–207.
220. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018;122:877–902.
221. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2253–e2253.

222. Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1925–36.
223. Ng N, Ooi L. A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. *BIO-Protoc* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 12];11. Available from: <https://bio-protocol.org/e3877>
224. Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med*. 2015;78:233–5.
225. Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose Deprivation-Induced Oxidative Stress in Human Tumor Cells: A Fundamental Defect in Metabolism? *Ann N Y Acad Sci*. 2006;899:349–62.
226. Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ, Jastroch M, Vitelli C, Nicholls DG, et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria: Absolute mitochondrial membrane potential in cultured cells. *J Physiol*. 2012;590:2845–71.
227. Kiselyov K, Muallem S. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in lysosomal storage diseases. *Cell Calcium*. 2008;44:103–11.
228. Xie Y, Li J, Kang R, Tang D. Interplay Between Lipid Metabolism and Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:431.
229. Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–3.
230. Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020;11:88.
231. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485–92.
232. Mills JW. The cytoskeleton and epithelial function. In: Wills NK, Reuss L, Lewis SA, editors. *Epithel Transp* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1996 [cited 2021 Nov 30]. p. 275–305. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-009-1495-7_13
233. Kim S, Coulombe PA. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:75–81.
234. Feldmann G. The cytoskeleton of the hepatocyte. *J Hepatol*. 1989;8:380–6.
235. Žagar G, Onck PR, Van der Giessen E. Elasticity of Rigidly Cross-Linked Networks of Athermal Filaments. *Macromolecules*. 2011;44:7026–33.
236. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987;105:1473–8.
237. Weihing RR. The cytoskeleton and plasma membrane. *Methods Achiev Exp Pathol*. 1979;8:42–109.

238. Catalá A, Díaz M. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Front Physiol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 8];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00423/abstract>
239. Gu Y, Tang S, Wang Z, Cai L, Lian H, Shen Y, et al. A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*. 2021;12:6166–85.
240. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Forscher P*, editor. *Mol Biol Cell*. 2011;22:4047–58.
241. He C, Jiang S, Jin H, Chen S, Lin G, Yao H, et al. Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer-specific cytotoxicity. *Biomaterials*. 2016;83:102–14.
242. Cohignac V, Landry MJ, Ridoux A, Pinault M, Annangi B, Gerdil A, et al. Carbon nanotubes, but not spherical nanoparticles, block autophagy by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages. *Autophagy*. 2018;14:1323–34.
243. Yin R, Tian F, Frankenberger B, de Angelis MH, Stoeger T. Selection and evaluation of stable housekeeping genes for gene expression normalization in carbon nanoparticle-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399:531–6.
244. Huber M. Gold nanoparticle probe-based gene expression analysis with unamplified total human RNA. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:e137–e137.
245. Wang C, Li M-Y, Shen X-H, Wang S-J, Wang W-Q, Liu Y-F. [Effect of CDK1 Interferes with the Regulation of PLK1, Aurora B and TRF1 on the Proliferation of Leukemia Cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2021;29:1129–35.
246. Wang K, Du H, Zhuang Q, Lu H, Xu R, Xue D. Cyclin-dependent kinase 1 shows to be a potential genetic target for chemical cystitis. *Immun Inflamm Dis*. 2021;9:950–8.
247. Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div*. 2010;5:11.
248. Costa-Lima MA, Barboza HN, Aprigio J, de Melo Moura C, Quirico-Santos TF, Ribeiro MG, et al. Dihydrofolate Reductase (DHFR) del19bp Polymorphism and Down Syndrome Offspring. *J Mol Neurosci MN*. 2020;70:1410–4.
249. Fawal M-A, Jungas T, Davy A. Inhibition of DHFR targets the self-renewing potential of brain tumor initiating cells. *Cancer Lett*. 2021;503:129–37.
250. Hernández-Preciado MR, Morán-Moguel MC, Dávalos-Rodríguez IP, Enríquez-Barajas CM, Valdovinos-Maravilla JP, Díaz-Pérez AL, et al. miRNA-24 Gene Sequence, DHFR -829C-T Genotypes, and Methotrexate Response in Mexican Patients with Rheumatoid Arthritis. *Genet Test Mol Biomark*. 2019;23:223–7.
251. Kim YJ, Kim H-J, Kim HL, Kim HJ, Kim HS, Lee TR, et al. A Protective Mechanism of Visible Red Light in Normal Human Dermal Fibroblasts: Enhancement of GADD45A-Mediated DNA Repair Activity. *J Invest Dermatol*. 2017;137:466–74.
252. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ. Gadd45 in Stress Signaling, Cell Cycle Control, and Apoptosis. In: Liebermann DA, Hoffman B, editors. *Gadd45 Stress Sens Genes* [Internet]. New York,

NY: Springer New York; 2013 [cited 2023 Apr 16]. p. 1–19. Available from:
https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-8289-5_1

253. Li G, Samuel S, Ul Haq SE, Mubarak AS, Studenik CR, Islam A, et al. Characterizing the oncogenic importance and exploring gene-immune cells correlation of ACTB in human cancers. *Am J Cancer Res.* 2023;13:758–77.

254. Straccia G, Reale C, Castellani M, Colangelo I, Orunesu E, Meoni S, et al. ACTB gene mutation in combined Dystonia-Deafness syndrome with parkinsonism: Expanding the phenotype and highlighting the long-term GPI DBS outcome. *Parkinsonism Relat Disord.* 2022;104:3–6.

255. Di Donato N, Rump A, Koenig R, Der Kaloustian VM, Halal F, Sonntag K, et al. Severe forms of Baraitser–Winter syndrome are caused by ACTB mutations rather than ACTG1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:179–83.

256. Ren L, Yang Y, Li W, Zheng X, Liu J, Li S, et al. CDK1 serves as a therapeutic target of adrenocortical carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition, G2/M phase transition, and PANoptosis. *J Transl Med.* 2022;20:444.

257. Zhang H-J, Chen G, Chen S-W, Fu Z-W, Zhou H-F, Feng Z-B, et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase 1 in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *FEBS Open Bio.* 2021;11:3126–41.

258. Pérez de Castro I, de Cárcer G, Malumbres M. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis.* 2007;28:899–912.

259. Pieroth R, Paver S, Day S, Lammersfeld C. Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep.* 2018;7:70–84.

260. Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Cline A, Humphries RK, Maizel J, et al. The functional human dihydrofolate reductase gene. *J Biol Chem.* 1984;259:3933–43.

261. Liu J, Jiang G, Mao P, Zhang J, Zhang L, Liu L, et al. Down-regulation of GADD45A enhances chemosensitivity in melanoma. *Sci Rep.* 2018;8:4111.

262. Yang P, Wen H, Zhong T, Hu H, Zhu B, Xia K, et al. GADD45 α is involved in the apoptosis of lymphocytes induced by riboflavin and ultraviolet light: GADD45 α PROMOTES RF-PRT-INDUCED LYMPHOCYTE APOPTOSIS. *Transfusion (Paris).* 2017;57:646–56.

263. Wang H-H, Chang T-Y, Lin W-C, Wei K-C, Shin J-W. GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells. *Sci Rep.* 2017;7:8814.

264. Higgs MR, Lerat H, Pawlowsky J-M. Downregulation of Gadd45beta expression by hepatitis C virus leads to defective cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2010;70:4901–11.

265. Sarnataro D, Caputo A, Casanova P, Puri C, Paladino S, Tivodar SS, et al. Lipid Rafts and Clathrin Cooperate in the Internalization of PrPC in Epithelial FRT Cells. *Bassham D, editor. PLoS ONE.* 2009;4:e5829.

266. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:313–26.

267. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis Via Caveolae: **Endocytosis via Caveolae**. *Traffic*. 2002;3:311–20.
268. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*. 2011;89:836–43.
269. Park JH, Oh N. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;51.
270. Yang Z, Chen M, Yang M, Chen J, Fang W, Xu P. Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:327–36.
271. Deshpande S, Singh N. Influence of Cubosome Surface Architecture on Its Cellular Uptake Mechanism. *Langmuir*. 2017;33:3509–16.
272. Mezzenga R, Schurtenberger P, Burbidge A, Michel M. Understanding foods as soft materials. *Nat Mater*. 2005;4:729–40.
273. Pitzalis P, Monduzzi M, Krog N, Larsson H, Ljusberg-Wahren H, Nylander T. Characterization of the Liquid–Crystalline Phases in the Glycerol Monooleate/Diglycerol Monooleate/Water System. *Langmuir*. 2000;16:6358–65.
274. Tokarskyy O, Marshall DL. Mechanism of Synergistic Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth by Lactic Acid, Monolaurin, and Nisin. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:7126–9.
275. Umerska A, Cassisa V, Bastiat G, Matougui N, Nehme H, Manero F, et al. Synergistic interactions between antimicrobial peptides derived from plectasin and lipid nanocapsules containing monolaurin as a cosurfactant against *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2017;Volume 12:5687–99.
276. Preuss HG, Echard B, Enig M, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem*. 2005;272:29–34.
277. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2009;1794:808–16.
278. Ghai I, Ghai S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist*. 2018;Volume 11:523–30.
279. Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2010;140:164–8.
280. Rozenbaum RT, Su L, Umerska A, Eveillard M, Håkansson J, Mahlapuu M, et al. Antimicrobial synergy of monolaurin lipid nanocapsules with adsorbed antimicrobial peptides against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro is absent in vivo. *J Controlled Release*. 2019;293:73–83.
281. Odel Nitbani F, Jumina J, Siswanta D, Nurwening Sholikhah E, Fitriastuti D. Synthesis and Antibacterial Activity 1-Monolaurin. *Orient J Chem*. 2018;34:863–7.
282. Krislee A, Fadly C, Nugrahaningsih DAA, Nuryastuti T, Nitbani FO, Jumina, et al. The 1-monolaurin inhibit growth and eradicate the biofilm formed by clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Proc*. 2019;13:19.

283. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011;3:55–65.
284. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:76.