

Interdyscyplinarne **Studia Doktoranckie**

RadFarm – Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej
molekularnie diagnostyki i terapii medycznej



radfarm@ncbj.gov.pl, www.ncbj.gov.pl/radfram

INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ

Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej

Pracownia Chemii Radiofarmaceutycznej

Rozprawa doktorska

Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera $^{193m,195m}\text{Pt}$ dla chemo- i radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego

Kamil Wawrowicz

Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz (IChTJ)

prof. dr hab. Paweł Krysiński (UW)

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Agnieszka Majkowska-Pilip, *prof. IChTJ*

Praca zrealizowana w ramach Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich

„RadFarm - Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii medycznej”

(POWR.03.02.00-00-I009/17-00)

Warszawa, 2023

STRESZCZENIE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zsyntetyzowanie oraz scharakteryzowanie w warunkach *in vitro* potencjalnych radiofarmaceutyków opartych na emiterach elektronów Augera oraz określenie możliwości ich zastosowania do chemo- i radioterapii raka wątrobowokomórkowego oraz HER2+ nowotworu piersi. Zaproponowana koncepcja zakładała wykorzystanie dwóch rodzajów nanocząstek – 30 nm Au@Pt oraz 2 nm PtNPs – jako nośników radionuklidów dla terapii elektronami Augera oraz wykazujących wysoce selektywne działanie chemotoksyczne w silnie utleniającym środowisku wewnątrzkomórkowym. Ponadto, skupiono się również na poznaniu i określeniu mechanizmu biologicznej aktywności otrzymanych nanomateriałów i ich radiokoniugatów.

W części literaturowej przedstawiono najważniejsze aspekty ukazujące duży potencjał tej grupy nanomateriałów jako elementów nowoczesnych strategii terapeutycznych. Opisano cechy predysponujące je do zastosowań przeciwnowotworowych z jednoczesnym podkreśleniem ograniczeń i możliwych sposobów ich pokonania. Istotną częścią wstępu teoretycznego jest również przybliżenie roli mikrośrodowiska guza, jako złożonego układu biochemicznego regulującego wszystkie procesy kancerogenezy i progresji guza, a także jako potencjalnego celu terapeutycznego. W dalszej części opisu skupiono się na przedstawieniu charakterystyki elektronów Augera i radionuklidów o największym potencjale aplikacyjnym, wraz z metodami ich produkcji i możliwościami implementacji w potencjalnych radiofarmaceutykach. Część wstępu poświęcono także zastosowaniu nanostruktur jako nośników emiterów elektronów Augera.

Wyniki prac eksperymentalnych przedstawiono w kolejności pokazującej przebieg procesu realizacji niniejszej pracy doktorskiej stopniowo weryfikując i analizując trafność sformułowanych hipotez badawczych. Procesy syntetyczne obejmujące otrzymywanie nanocząstek, jak i ich biokoniugatów weryfikowano co najmniej dwoma niezależnymi technikami by uzyskać wiarygodne i wartościowe dane eksperymentalne. Najistotniejszą część rozprawy stanowią liczne badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek adherentnych oraz trójwymiarowych sferoidów, jako modeli guza o zdefiniowanym i ukształtowanym mikrośrodowisku. W ramach realizacji biologicznej części pracy wykorzystano pięć nowotworowych linii komórkowych, a wykonane analizy obejmowały najważniejsze aspekty weryfikacji skuteczności potencjalnych leków, takie jak test powinowactwa receptorowego i internalizacji oraz analiza cytotoksyczności. Przeprowadzono także złożone analizy na różnych poziomach molekularnych. Zalicza się do nich frakcjonowanie komórek i wyizolowanie jądra komórkowego celem określenia wewnątrzjądrowej lokalizacji otrzymanych radiokoniugatów; analizę markerów stresu oksydacyjnego i potencjału oksydacyjnego cytozolu komórek raka wątrobowokomórkowego; identyfikację uszkodzeń DNA oraz wpływ chemotoksycznego działania nanomateriałów na indukowanie śmierci komórki i inhibicję cyklu komórkowego.

Podsumowanie otrzymanych wyników i wyszczególnienie najważniejszych wniosków stanowią końcową część tej rozprawy doktorskiej. Zaprezentowane konkluzje odnoszą się nie tylko do interpretacji otrzymanych danych, lecz zawierają również krótki opis poświęcony możliwemu rozwojowi przeprowadzonych badań w przyszłości.

ABSTRACT

The aim of this dissertation was to synthesize and characterize under *in vitro* conditions potential radiopharmaceuticals based on Auger electron emitters for chemo- and radiotherapy of hepatocellular carcinoma and HER2+ breast cancer. The proposed concept involved the investigation concerned on two types of nanoparticles - 30 nm Au@Pt and 2 nm PtNPs - as radionuclide carriers for Auger electron therapy and showing impressively selective anticancer activity under highly oxidative tumor microenvironment. In addition, this thesis particularly focused on understanding and determining the mechanism of biological activity of the obtained nanomaterials and their radioconjugates.

The literature section describes the most important aspects demonstrating the great potential of this group of nanomaterials as elements of modern therapeutic strategies. The features predisposing them to anticancer applications are described, while critical aspects, limitations and possible ways to overcome them are highlighted. An important part of the theoretical introduction is also an approximation of the role of the tumor microenvironment as a complex biochemical system regulating processes of carcinogenesis and tumor progression, and as a potential therapeutic target. Subsequent part of this description focuses on presenting the characteristics of Auger electrons and radionuclides with the greatest application potential, together with methods for their production and possible implementation in considered radiopharmaceuticals. Part of the introduction is also devoted to the application of nanostructures as carriers of Auger electron emitters.

The results of the experimental work are presented in order showing the realization process of this dissertation, gradually verifying and analyzing the accuracy of the research hypotheses. Synthetic processes involving the preparation of nanoparticles as well as their bioconjugates were verified by at least two independent techniques in order to obtain reliable and valuable experimental data. The most important part of the thesis consists of numerous studies carried out *in vitro* using adherent cell cultures and three-dimensional spheroids as tumor models with a defined microenvironment. Five tumor cell lines were used to carry out the biological part of the work and the analyses performed covered the most important aspects of potential drug investigation, such as receptor binding affinity, internalization assays and cytotoxicity verification. Complex analyses were also performed at a different molecular levels. These included cell fractionation and isolation of the cell nucleus in order to determine the intranuclear uptake of the obtained radioconjugates; analysis of oxidative stress markers and oxidative potential in the cytosol of hepatocellular carcinoma cells; identification of DNA damage; and the chemotoxic effects of nanomaterials on cell death type induction and cell cycle inhibition.

Final part of this dissertation summarizes the results obtained with highlighting the most important conclusions from the research performed. The presented conclusions refer not only to the interpretation of the data obtained, but also include a brief description dedicated to the possible future development of the research carried out.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	6
Wstęp i cel pracy	8
1. Nanocząstki w terapii przeciwnowotworowej	10
1.1. Nanocząstka jako lek lub jego nośnik	12
1.2. Terapie z wykorzystaniem nanocząstek	14
1.3. Nanobrachyterapia a terapia celowana	19
1.4. Radioaktywne nanocząstki jako leki o wielokierunkowym działaniu	20
1.5. Stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych	23
1.6. Aktywność biologiczna nanocząstek platyny	24
2. Elektrony Augera w nowoczesnej celowanej radioterapii	26
2.1. Emitery elektronów Augera o istotnym potencjale terapeutycznym	28
2.2. Nanocząstki jak nośniki radionuklidów - emiterów elektronów Augera.....	30
2.3. Radionuklidy ^{193m,195m,197Pt} , metody ich produkcji oraz ich właściwości	33
2.4. Radionuklid ^{125I} w terapii elektronami Augera	34
2.5. Terapia skojarzona.....	36
3. Wykorzystywane odczynniki	38
3.1. Odczynniki chemiczne	38
3.2. Odczynniki biologiczne	38
4. Techniki i aparatura pomiarowa	39
4.1. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS).....	39
4.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)/transmisyjna mikroskopia elektronowa wysokiej rozdzielczości (HR-TEM).....	39
4.3. Techniki spektroskopowe – UV-Vis, spektrofluorymetria	40
4.4. Mikroskopia konfokalna i fluorescencyjna.....	40
4.5. Cytometria przepływowa.....	40
5. Metodyka przeprowadzonych badań	41
5.1. Otrzymywanie radionuklidów ^{195m,197Pt} oraz ^{125,131I}	41
5.2. Znakowanie peptydu SP94-DOTA.....	42
5.3. Synteza nanocząstek	42
5.3.1. AuNPs.....	43
5.3.2. Au@Pt.....	43
5.3.3. PtNPs.....	44
5.3.4. Au@ ^{197Pt} oraz ^{197Pt} NPs.....	45
5.4. Modyfikacja powierzchni otrzymanych nanomateriałów.....	45
5.4.1. PEG-owanie	45
5.4.2. Koniugacja z przeciwciałem monoklonalnym (trastuzumabem).....	46
5.4.3. Weryfikacja wydajności przyłączenia trastuzumabu do nanocząstek	47
5.5. Chemisorpcja ^{125,135I} na powierzchni nanocząstek	47
5.6. Uwalnianie ^{197Pt} i ^{131I} w środowisku silnie utleniającym	48

5.7. Badania stabilności	48
5.8. Badania <i>in vitro</i>	48
5.8.1. Wiązalność do receptora	49
5.8.2. Internalizacja.....	50
5.8.3. Frakcjonowanie – izolacja jądra komórkowego.....	50
5.8.4. Oznaczanie reaktywnych form tlenu	51
5.8.5. Oznaczanie glutationu zredukowanego (GSH)	51
5.8.6. Oznaczanie zawartości białka w komórkach.....	52
5.8.7. Test MTS.....	52
5.8.8. Cytometria przepływowa – apoptoza	52
5.8.9. Cytometria przepływowa – cykl komórkowy.....	52
5.8.10. Mikroskopia konfokalna	53
5.8.11. Sferoidy (hodowle komórkowe 3D)	54
6. Wyniki i dyskusja.....	54
6.1. Otrzymywanie radionuklidów platyny	54
6.1.1. Otrzymywanie ^{195m} Pt.....	54
6.1.2. Produkcja ¹⁹⁷ Pt.....	56
6.2. Synteza i charakterystyka zsyntetyzowanych nanocząstek i biokoniugatów.....	56
6.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek	57
6.2.2. Biokoniugaty Au@ ¹⁹⁷ Pt-PEG-trastuzumab i ¹⁹⁷ PtNPs-PEG-trastuzumab	58
6.2.3. Badania stabilności	60
6.3. Immunoreaktywność otrzymanych związków.....	61
6.3.1. Badania wiązalności do receptora	61
6.3.2. Internalizacja z wykorzystaniem receptora HER2	63
6.3.3. Transport nanocząstek do cytoplazmy komórek HCC	67
6.4. Określenie mechanizmu biologicznej aktywności nanocząstek platyny.....	69
6.4.1. Wstępna ocena cytotoksycznego działania – test MTS	69
6.4.2. Analiza markerów stresu oksydacyjnego – reaktywne formy tlenu (ROS).....	71
6.4.3. Następstwa stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2.....	73
6.4.4. Rozpuszczanie nanocząstek w środowisku silnie utleniającym.....	75
6.4.5. Badania apoptozy i cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej	77
6.5. Addytywność łączonej chemo- i radioterapii w leczeniu nowotworów wątroby.....	79
6.5.1. Radiokoniugaty ^{125,131} I-Au@Pt i ^{125,131} I-PtNP.....	79
6.5.2. Badania stabilności radiokoniugatów	81
6.5.3. Uwalnianie radionuklidu ¹²⁵ I w środowisku silnie utleniającym.....	82
6.5.4. Efekt addytywny łączonej chemo- i radioterapii.....	83
6.5.5. Dwuniciowe uszkodzenia DNA	86
6.5.6. Hodowle komórkowe 3D	88
7. Podsumowanie i wnioski	89
8. Bibliografia.....	93

Wykaz skrótów

AE - *Auger electrons*/elektrony Augera

ATP - adenzyno-5'-trifosforan

Au@Pt NPs - nanocząstki złota pokrywane platyną

AuNPs - nanocząstki złota

BCM - *ang. block copolymer micelles*/micelle kopolimerów blokowych

CTLA-4 - *cytotoxic T cell antigen*/cytotoksyczny antygen komórek T

DNA DSB – DNA double-strand breaks/dwuincliowe uszkodzenia DNA

DLS - *dynamic light scattering*/dynamiczne rozpraszanie światła

EMA - *European Medicines Agency*/Europejska Agencja Leków

EC - *electron capture*/wychwył elektronu

EGFR - *epidermal growth factor receptor*/receptor nablonkowego czynnika wzrostu

EPR - *enhanced permeability and retention*/zwiększona przepuszczalność i retencja

EVs - *extracellular vesicles*/pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

GRP78 - *glucose regulated protein*/białko regulowane glukozą

HCC - *hepatocellular carcinoma*/rak wątrobowokomórkowy

hEGF – *human epidermal growth factor*/ludzki naskórkowy czynnik wzrostu

HER2 - *human epidermal growth factor receptor*/receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu

HSP - *heat shock protein*/białko szoku cieplnego

IC - *internal conversion*/konwersja wewnętrzna

IT - *isomeric transition*/przejście izomeryczne

iTLC - *instant thin-layer chromatography*/chromatografia cienkowarstwowa

LET - *linear energy transfer*/liniowy przekaz energii

MCP - *metal chelating polymers*.polimery chelatujące metale

NLS - *ang. nuclear localization signal*sekwencja lokalizacji jądrowej

PARP - *nuclear protein Poly (ADP-ribose)-Polymerase*/białko jądrowe polimeraza poli (ADP-rybozy)

PDL1 - *programmed death ligand*/ligand programowanej śmierci

PDT - *ang. photodynamic therapy*/terapia fotodynamiczna

PSA - *prostate specific antigen*/swoisty antygen sterczowy

PSMA - *prostate-specific membrane antigen*/antygen błonowy specyficzny dla prostaty

PtNPs - nanocząstki platyny

PTT - *ang. photothermal therapy*/terapia fototermiczna

RFA/RNS - *reactive nitrogen species*/reaktywne formy azotu

RFT/ROS - *reactive oxygen species*/reaktywne formy tlenu

SLN - *solid lipid nanoparticles*/stałe nanocząstki lipidowe

SPION - *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*/nanocząstki magnetytu

SPR - *ang. surface plasmon resonance*/plazmonowy rezonans powierzchniowy

TACE - *transarterial chemoembolization*/prześwietnicza chemoembolizacja

TACE-DEB - *transarterial chemoembolization with drug-eluting beads*/prześwietnicza chemoembolizacja z użyciem kulek uwalniających leki

TARE - *transarterial radioembolization*/prześwietnicza radioembolizacja

TEM – *transmission electron microscopy*/transmisyjna mikroskopia elektronowa

TME - *tumor microenvironment*/mikrośrodowisko guza

VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule*/białko adhezji komórek naczyń

VEGFR - *vascular endothelial growth factor receptor*/receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

CZĘŚĆ LITERATUROWA

Wstęp i cel pracy

Nowoczesne podejście do planowania i projektowania terapii przeciwnowotworowej wymaga strategii łączących w sobie dwie lub więcej metod działania antynowotworowego. Jest to konieczne wobec wyzwań, jakie stawiane są przed lekarzami i naukowcami, ze względu na złożoność, zróżnicowanie i agresywność niektórych zmian nowotworowych.

Pomimo funkcjonujących w praktyce klinicznej protokołów postępowania z określonymi typami nowotworów, skuteczność wielu z nich jest niewystarczająca dla uzyskania znaczących i trwałych efektów leczenia. Opóźniona diagnostyka i związane z tym wykrycie guzów o wysokim stopniu zaawansowania jest niekiedy jedynie początkiem trudności. Związane jest to głównie z epidemiologią nowotworów i rodzajem mutacji genetycznych, jakie warunkują kancerogenezę. Oddziałuje to w dalszym okresie wzrostu na ich patofizjologię, mającą bezpośrednie przełożenie na podatność nowotworu na leczenie i jego skuteczność.

Projektując nowoczesne, multimodalne terapie należy szukać alternatywnych dróg specyficznego dostarczenia leku do komórki, jego selektywnej (względem nowotworu) aktywności, a także wielokierunkowego działania, potęgującego efekt terapeutyczny. W przypadku nowotworów o stosunkowo łatwej dostępności dzięki ich anatomicznej lokalizacji, możliwe jest niejako ominięcie problemu związanego z systemowym podaniem leku i jego mniej lub bardziej selektywnym gromadzeniu w tkance nowotworowej. Przykładem takiego podejścia jest terapia raka wątrobowokomórkowego ukierunkowana na fizjologię guza, wykorzystująca pewne wyróżniające go na tle innych komórek właściwości. Połączenie właściwości chemicznych z biologią nowotworu, pozwala wykorzystać silnie utleniający potencjał jego cytozolu jako czynnika aktywującego działanie leku, prowadząc do uzyskania oczekiwanego efektu terapeutycznego.

Przedstawiony schemat postępowania nie jest jednak uniwersalny i może być dedykowany jedynie do wąskiej grupy nowotworów, takich jak rak wątrobowokomórkowy (*ang. hepatocellular carcinoma, HCC*) czy niektóre nowotwory piersi. Ze względu na naturalną nadprodukcję nadtlenku wodoru czy zwiększoną konsumpcję tlenu (HCC), są one idealnymi kandydatami do realizacji tej koncepcji terapeutycznej. Wysoki poziom waskularyzacji i skłonność do przerzutowania są głównymi, choć nie jedynymi przyczynami niepowodzenia procesu terapeutycznego tych nowotworów, nawet po przeprowadzeniu resekcji chirurgicznej. Przyczyniają się do tego również liczne zmiany genów supresorowych wraz z pierwotną lub nabytą lekoopornością. Utrudnieniem jest również wywoływana leczeniem niewydolność wątroby, nerek oraz innych narządów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Do najbardziej obiecujących terapii będących w fazie badań zalicza się immunoterapię (m.in. inhibitory PD-L1 – *ang. programmed death ligand/ligand programowanej śmierci 1* i CTLA-4 – *ang. cytotoxic T cell antigen/cytotoksyczny antygen komórek T*) w połączeniu z radioterapią, ablacją i embolizacją. Mimo pozytywnych prognoz wciąż jednak wymagają one wielu badań przed wprowadzeniem do praktyki klinicznej [1,2]. Istotnym problemem terapeutycznym pozostaje również brak możliwości skutecznej walki z przerzutami, często zlokalizowanymi daleko od umiejscowienia guza pierwotnego.

Mimo tego, prace nad tymi terapiami pokazują jasny kierunek, w jakim dąży współczesna medycyna przy projektowaniu nowych strategii terapeutycznych, bazując na terapii łączonej.

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz określenie chemo- i radiotoksyczności radioaktywnych nanostruktur opartych na emiterach elektronów Augera $^{193m,195m}\text{Pt}$ oraz ^{125}I do terapii HER2-pozytywnego nowotworu piersi i raka wątrobowokomórkowego.

Koncepcja zaprojektowania radiofarmaceutyku o wielokierunkowej aktywności *in vitro* obejmowała założenie, że wykorzystując doskonale poznane i szeroko opisywane katalityczne właściwości platyny, możliwe będzie jej selektywne działanie jedynie w silnie utleniającym mikrośrodowisku guza. Takie właściwości zidentyfikowano m.in. w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HepG2) i niektórych komórkach nowotworu piersi i jajnika (SKOV-3). Wykonanie nanostruktur z materiału radioaktywnego lub wykorzystanie ich w postaci nośnika dla radionuklidu, powinno znacząco zwiększyć cytotoksyczne działanie związku poprzez jego wielokierunkowość, na drodze szeregu mechanizmów. Inspiracją do moich badań była w szczególności publikacja Shoshan i wsp. [3]. Wykazano w niej możliwość rozpuszczania się nanocząstek platyny w komórkach HepG2 mających podwyższone stężenie H_2O_2 oraz penetrację uwolnionych kationów Pt^{2+} do jądra komórkowego wraz z późniejszą interkalacją do nici DNA, co skutkowało wysoką toksycznością. Celem pracy było zatem również sprawdzenie, czy stosując radioaktywne nanocząstki platyny zawierające $^{193m,195m}\text{Pt}$ możliwe będzie osiągnięcie także tego efektu. Powinno to spotęgować cytotoksyczność nanocząstek oraz zapewnić wysoką selektywność terapii elektronami Augera.

Aspekt chemiczny niniejszej pracy obejmuje syntezę nanocząstek metali szlachetnych jako nośników dla emiterów elektronów Augera. Opisywanymi nanostrukturami są nanocząstki złota (AuNPs) i nanocząstki rdzeń-powłoka (Au@Pt) o średnicy 30 nm, oraz nanocząstki platyny (PtNPs) o średnicy 2 nm. Średnice rozważanych nanomateriałów dobrano w oparciu o liczne kryteria, uwzględniające między innymi możliwość uzyskania wysokich aktywności właściwych, optymalne wykorzystanie radionuklidu, łatwość funkcjonalizacji czy umożliwienie dotarcia radiofarmaceutyku do jądra komórkowego. Powierzchnia tych nanomateriałów modyfikowana jest poprzez koniugację z przeciwciałem monoklonalnym dla uzyskania większej specyficzności i internalizacji w przypadku HER2+ nowotworu piersi. Brak transbłonowych celów molekularnych, lub niska ich zawartość w przypadku raka wątrobowokomórkowego uniemożliwiły zaprojektowanie i wykonanie biokoniugatu ukierunkowanego na konkretny receptor.

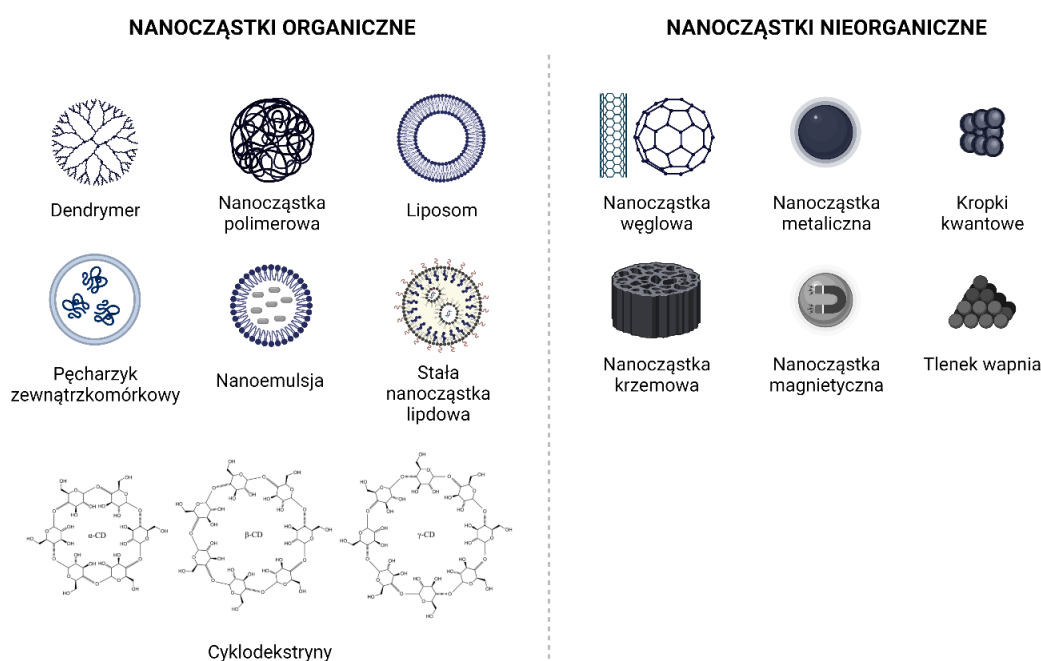
Radiochemiczna część pracy obejmuje otrzymywanie radionuklidów ^{193m}Pt , ^{195m}Pt i ^{197}Pt oraz późniejsze ich wykorzystanie jako prekursorów do syntezy radioaktywnych nanostruktur. Drugim rozwijanym w przedstawionej pracy kierunkiem badań jest immobilizacja radioaktywnych halogenków – ^{125}I oraz ^{131}I na powierzchni nanocząstek, jako alternatywnego dla $^{193m,195m}\text{Pt}$ podejścia do terapii elektronami Augera.

Badania biologiczne obejmują określenie mechanizmu odpowiedzialnego za aktywność *in vitro* nanocząstek platynowych, w celu wykazania potencjalnej selektywności zsyntetyzowanych koniugatów. Przedstawiona jest również ocena skuteczności terapeutycznej nanocząstek i radiokoniugatów w odniesieniu do hodowli komórkowych 2D i trójwymiarowego modelu guza. W przeprowadzonych analizach uwzględnione zostały również zmiany morfologiczne i fizjologiczne indukowane na wielu poziomach molekularnych pod wpływem otrzymanych związków.

1. Nanocząstki w terapii przeciwnowotworowej

Stosowane obecnie terapie przeciwnowotworowe związane są z szeregiem trudności istotnie ograniczających ich efektywność kliniczną. Głównymi czynnikami warunkującymi niepowodzenie procesu terapeutycznego z wykorzystaniem przed- i poresekcyjnej chemioterapii czy radioterapii są pierwotna lub nabyta lekooporność, słaba biodostępność i niska selektywność leku. Wysoki potencjał cytostaticzny używanych w terapii farmaceutyków oddziałujących nieselektywnie także na zdrowe tkanki może prowadzić do licznych skutków ubocznych, spośród których najpoważniejszymi są kardiotoxycznosc, supresja szpiku kostnego, toksycznosc płucna czy neuropatia. Często konsekwencje te są na tyle poważne, że skutkują koniecznością przerwania terapii i narażenia pacjenta na wznowę lub progresję nowotworu [4].

Wykorzystanie nanotechnologii daje szereg możliwości w pokonywaniu ograniczeń konwencjonalnych terapii systemowych. Nanomateriały stosowane w opracowywaniu nowoczesnych koncepcji terapeutycznych można sklasyfikować na dwie główne kategorie. W zależności od materiału z jakiego zostały wykonane klasyfikuje się je jako organiczne i nieorganiczne (rysunek 1). Pochodzenia organicznego są nanocząstki zbudowane z polimerów, dendrymerów, liposomów, nanoemulsji oraz cyklodekstryny. Należą do nich także wyizolowane po uwolnieniu z komórki pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (*ang.* EVs – *extracellular vesicles*) oraz stałe nanocząstki lipidowe (*ang.* SLN – *solid lipid nanoparticles*), różniące się od liposomów stanem skupienia oraz brakiem wodnego wnętrza zastąpionego stałym rdzeniem lipidowym [5–12]. Nanocząstki nieorganiczne to przede wszystkim struktury węglowe i metaliczne, wśród których dominującą część stanowią materiały otrzymane z metali szlachetnych [13,14]. Innymi przykładami nanocząstek należących do tej grupy są tlenki metali i niemetalu, w tym nanocząstki magnetyczne (głównie maghemitu – Fe_2O_3 i magnetytu – Fe_3O_4), kropki kwantowe, oraz zbudowane z cząsteczek fosforanu wapnia [15–18].



Rysunek 1. Przykłady nanocząstek organicznych i nieorganicznych stosowanych w terapii nowotworów.

Spośród przedstawionych rodzajów nanomateriałów, na szczególną uwagę zasługują nanocząstki metaliczne. Zróżnicowane właściwości fizykochemiczne tej grupy nanocząstek, determinują szerokie spektrum zastosowań, w jakim mogą być rozpatrywane w kontekście terapii nowotworów. Do najważniejszych parametrów, które implikują własności nanocząstek metalicznych należą stosunek powierzchni:objętość różnicujący ich reaktywność, duża powierzchnia właściwa (w tym możliwość jej modyfikacji i funkcjonalizacji) oraz możliwość precyzyjnej regulacji kształtu i rozmiaru na etapie syntezy [19,20].

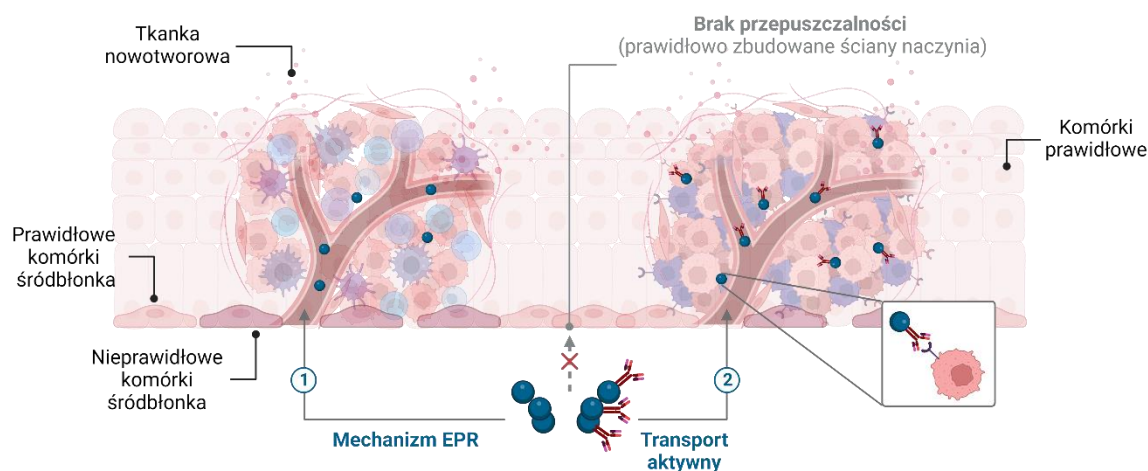
Własności nanocząstek nieorganicznych mogą być wykorzystane w radiofarmacji do projektowania i otrzymywania nośników radionuklidów. Stanowią wtedy bowiem ważną alternatywę dla stosowanych obecnie związków chelatowych, kompleksujących radionuklidy. Na przykład w przypadku bardzo istotnych dla medycyny nuklearnej radionuklidów ^{223}Ra i ^{211}At pozwalają na ich trwałe związanie i przyłączenie do wektora naprowadzającego, czego nie można osiągnąć klasycznymi metodami. Dotyczy to także emiterów promieniowania β^- (^{198}Au) i elektronów Augera ($^{193\text{m}},^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{181}Os) o wysokim potencjale terapeutycznym. Nadzieją na wprowadzenie wymienionych izotopów do praktyki klinicznej jest celowana nanobrachyterapia, polegająca na dostarczeniu radionuklidu immobilizowanego na powierzchni nanocząstki lub w jej wnętrzu, bezpośrednio w okolice guza. Zapewnia to wysoką retencję związku przy jednoczesnym zminimalizowaniu kumulacji w śledzionie, nerkach i wątrobie, stanowiącej duży mankament biodystrybucji niektórych nanocząstek [21].

Jednym z istotnych problemów w przypadku stosowania emiterów promieniowania α takich jak ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{227}Th i ^{212}Pb jest uwalnianie się radioaktywnych izotopów stanowiących produkty rozpadu radionuklidów macierzystych. Zastosowanie nanocząstek nieorganicznych daje możliwość pokonania tego ograniczenia, poprzez enkapsulację emitera α we wnętrzu nanocząstki, co zapobiega uwolnieniu radioaktywnych atomów pochodnych w następstwie powstawania dużej energii odrzutu [22].

Ponadto, dzięki zastosowaniu nanocząstek możliwe jest uzyskanie wysokich aktywności właściwych, znacznie przewyższających te otrzymywane dla klasycznych radiobiokoniugatów chelator-biomolekuła, co ma szczególnie duże znaczenie w terapii elektronami Augera. Nie bez znaczenia jest również multimodalność takich koniugatów, która pozwala zwiększać skuteczność terapeutyczną poprzez łączenie radionuklidów w nanocząstce nie tylko z peptydami i białkami specyficznymi wiążącymi się z transbłonowymi receptorami na powierzchni nowotworu, ale także z chemoterapeutykami (np. dokсорubicyną i epirubicyną). Rola nanocząstek nie musi być ograniczona jedynie do funkcji nośnikowych – szereg właściwości (m.in. radiouczulanie, właściwości magnetyczne) predysponuje je również do wywoływania silnych efektów cytotoksycznych lub ich potęgowania.

Precyzyjne dostarczanie leków opierających się na nanomateriałach może zachodzić zarówno na zasadzie transportu biernego, jak i aktywnego (rysunek 2). Progresywny wzrost zapewniony dzięki szybkiej neowaskularyzacji nowotworu, postępujący szczególnie w przypadku hipoksji lub stanów zapalnych, prowadzi do wytworzenia naczyń o zdeformowanym śródbłonku. Obecne w nim liczne pory, osiągające mikrometrowe średnice, ułatwiają dyfuzję nanomateriałów do guza, głównie na drodze mechanizmu EPR (*ang. enhanced permeability and retention*/zwiększona przepuszczalność i retencja). Upośledzona funkcja limfatyczna nowotworu powoduje natomiast zatrzymanie nanocząstek wewnątrz guza w wyniku znacznie ograniczonego poboru płynu śródmiąższowego, odpowiedzialnego w normalnych tkankach za stały drenaż naczyń limfatycznych [23,24]. Umożliwienie aktywnego transportu leku do komórki zależne

jest od zidentyfikowania na jej powierzchni celów molekularnych, a następnie przyłączenia do powierzchni nanocząstki odpowiedniego wektora, specyficznego łączącego się z określonym receptorem lub cząsteczką. Do najczęściej wykorzystywanych celów należą białka mające aktywność kinaz tyrozynowych (*ang. EGFR – epidermal growth factor receptor/receptor nabłonkowego czynnika wzrostu*), białka adhezyjne śródbłonna naczyniowego (głównie VCAM-1 – *ang. vascular cell adhesion molecule/białko adhezji komórek naczyń*), somatostatyna, swoisty antygen sterczowy (PSA) oraz kwas foliowy (izoforny α i β) [25]. Zwiększona wewnątrzkomórkowa kumulacja leku w przypadku transportu aktywnego jest wynikiem współdziałania mechanizmu EPR (1) oraz stosowania wektora (2).



Rysunek 2. Mechanizm dostarczania do komórki nanocząstkowych leków na zasadzie transportu biernego (mechanizm EPR) oraz transportu aktywnego, łączącego działanie mechanizmu EPR i ukierunkowania leku na receptory komórek nowotworowych.

Pomimo szeregu zalet, jakie niewątpliwie wykazują nanocząstki nieorganiczne, wprowadzenie ich do podstawowych protokołów terapeutycznych wymaga wielu badań. Następstwem ich przeprowadzenia będzie możliwość pokonania licznych wyzwań stawianych przed naukowcami, spośród których najważniejsze stanowi problematyczna biodystrybucja. Przy podaniu systemowym, nanocząstki wykazują bowiem tendencję do niespecyficznego akumulacji w śledzionie, nerkach i wątrobie. Wielu badań wymaga także konieczność dokładnego określenia mechanizmu ich metabolizowania i dróg eliminacji z organizmu, co może przebiegać w sposób zróżnicowany dla poszczególnych nanocząstek i ich biokoniugatów. Ważnym aspektem jest również ochrona przed opsonizacją w następstwie adsorpcji białek na ich powierzchni, wpływająca zarówno na biodystrybucję, jak i ograniczenie efektywności działania badanych związków.

1.1. Nanocząstka jako lek lub jego nośnik

Spośród zarejestrowanych i dopuszczonych do użytku nanocząstek jako leków przeciwnowotworowych, zdecydowaną większość stanowią preparaty oparte na związkach lipidowych. Średnice tych nanomateriałów są najczęściej rzędu 100-150 nm, niekiedy jednak osiągają nieco wyższe wartości dochodzące do 250-300 nm [26]. Rozmiary te stanowią poniekąd wykrócenie poza umownie przyjętą definicję nanomateriału, jako struktury, o przynajmniej jednym rozmiarze, sięgającym nie więcej niż 100 nm. Granica ta jest jednak umowna i nie stanowi sztywnego kryterium klasyfikującego. Dlatego też, pomimo dużych średnic nanocząstkowych leków, wciąż kategoryzowane są one jako struktury „nano”.

Szereg cech związanych z zachowaniem nanocząstek lipidowych w warunkach biologicznych powoduje wykorzystywanie ich jako nośników, zarówno do transportu cząsteczek hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Wynika to z wydłużonego biologicznego okresu półtrwania, szybkiego przechodzenia z krwiobiegu do tkanek, połączonego z niską toksycznością systemową, a także kontrolowanego uwalniania leku ze swojej struktury. Związkami najczęściej aplikowanymi w tego typu lekach są antybiotyki antracyklinowe immobilizowane we wnętrzu liposomów (doxorubicyna – Doxil[®]/Caelyx[®] [27], Myocet[®] [28]; daunorubicyna - DaunoXome[®] [29]) lub ich kombinacje z innymi cytostatykami (cytarabina/daunorubicyna - Vyxeos[®] [30]), których działanie polega na chemicznym uszkodzeniu DNA komórek nowotworowych. Proces enkapsulacji doxorubicyny do wnętrza liposomów oparty jest na jednym z czterech mechanizmów obejmujących: gradient pH, jonów manganowych (Mn²⁺), siarczanów ((NH₄)₂SO₄), lub cytrynianów. Ideą tych procesów jest wykorzystanie zdolności doxorubicyny do swobodnej dyfuzji do wnętrza pęcherzyka. Przekształcając ją następnie w formę niedyfundującą przez dwuwarstwą lipidową liposomu, osiągana jest retencja związku wewnątrz nanomateriału. Ładowanie liposomów doxorubicyną prowadzące do powstania stabilnych układów zachodzi poprzez wewnątrzpęcherzykową protonację (gradient pH), tworzenie kompleksów z wielowartościowymi kationami (doxorubicyna-Mn²⁺) lub na drodze wytrącania się wiązek włókien doxorubicyny wewnątrz liposomu w obecności siarczanów lub cytrynianów [31].

Poza antracyklinami, w formulacjach liposomowych wykorzystywane są również inhibitory replikacji i transkrypcji DNA – irinotekan/Onivyde[®] [32]), cząsteczki immunostymulujące – mifamurtyd/Mepact[®] [33]), a także związki hamujące podział mitotyczny – winkrystyna/Marquibo[®] [34]). Jedynym nie-lipidowym nanocząsteczkowym nośnikiem dopuszczonym do terapii jest Abraxane[®] - preparat w którym związek czynny (paklitaksel) immobilizowany jest z wykorzystaniem albuminy o średnicy około 130 nm. Jego działanie polega na zaburzaniu podziałów mitotycznych, przede wszystkim depolimeryzacji mikrotubul [35].

Nanocząstki, ze względu na swoje różnorodne właściwości, mogą pełnić rolę nie tylko nośników leków, lecz także stanowić aktywny składnik farmaceutyku powodujący cytotoksyczność lub uwrażliwienie komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków lub promieniowania. Przykładem takiego wykorzystania nanomateriałów są nanocząstki tlenku hafnu (Hensify[®]). Po iniekcji do guza, nanocząstki tworzą klastry, pozostając neutralnymi dla środowiska nowotworu, a więc nie wykazują samoistnych właściwości cytotoksycznych. Radioczułające działanie HfO₂ indukowane jest pod wpływem działania zewnętrznego źródła promieniowania. W wyniku obecności na ich powierzchni ujemnie naładowanych ligandów, dochodzi do pośredniej produkcji wolnych rodników i zwiększenia dawki promieniowania dostarczonej do guza [36]. Pod wpływem promieniowania jonizującego, na powierzchni nanocząstek HfO₂ generowana jest także kaskada elektronów konwersji i Augera intensyfikująca ich działanie terapeutyczne. Drugim przykładem nanocząstkowego leku o działaniu cytotoksycznym są 12 nm nanocząstki tlenku żelaza o właściwościach superparamagnetycznych (NanoTherm[®]). Produkt ten wykorzystywany jest do terapii glejaka (zatwierdzony przez EMA – *ang. European Medicines Agency*/Europejska Agencja Leków) i nowotworu prostaty (końcowe etapy badań klinicznych). Aplikacja SPION (*ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles*/superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza) dokonywana jest

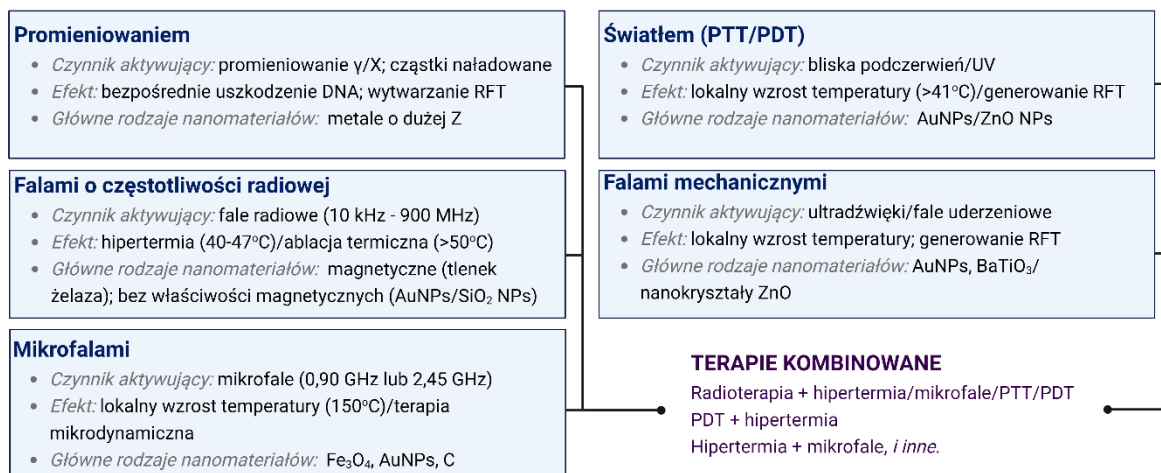
w formie gęstej pasty umieszczanej bezpośrednio w łożu pooperacyjnej. NanoTherm® poprzez indukowanie ciepła w zmiennym polu magnetycznym oferuje zarówno samoistne działanie terapeutyczne w formie termoablacji, jak również w postaci adjuwantu w terapii kombinowanej, uwrażliwiając komórki na działanie chemo- lub radioterapii poprzez magnetyczną hipertermię [37].

Analizując wymienione wyżej przykłady zarejestrowanych leków, należy podkreślić dwa istotne aspekty. Pierwszym z nich jest fakt, że mimo ogromnego potencjału, tylko w dwóch przypadkach nanocząstki nie są wykorzystywane jako nośniki, a jako związki indukujące (SPION) lub wzmacniające działanie toksyczne (HfO₂). Ponadto, żaden z opisanych leków nie jest zaprojektowany w ujęciu terapii celowanej, a więc nie zawiera wektora umożliwiającego specyficzne dotarcie do wybranych komórek i ich późniejszą selektywną internalizację, na przykład na drodze endocytozy. Formulacje liposomowe i ich pochodne bazują na podaniu systemowym i wychwytowi dzięki mechanizmowi EPR. Jest to ich niewątpliwa wada, ponieważ jak pokazują najnowsze badania, paradygmat dotyczący tego mechanizmu nie znajduje odzwierciedlenia w warunkach klinicznych. Rzeczywisty przebieg transportu nanomateriałów poprzez nieszczelne naczynia krwionośne wydaje się być o wiele bardziej – niż zakłada mechanizm EPR – złożonym procesem, a jego wydajność może być niewystarczająca do uzyskania spodziewanego efektu terapeutycznego [38–41]. Pokazuje to, że wprowadzenie nanocząstek do praktyki klinicznej wciąż wymaga poszukiwania nowych koncepcji, skupiających się przede wszystkim na specyficznym ich dostarczaniu do komórek nowotworowych, kontroli nad sposobem wywoływania efektu terapeutycznego i analizujących ich biodystrybucję oraz mechanizmy eliminacji z organizmu.

1.2. Terapie z wykorzystaniem nanocząstek

Jedną z możliwości implementacji przeciwnowotworowego wykorzystania nanocząstek w procedurach terapeutycznych jest ich zdalna aktywacja. Polega ona na skumulowaniu nanomateriału w miejscu lokalizacji nowotworu i jego późniejszej stymulacji z użyciem zewnętrznego źródła energii. Proces ten, może zarówno indukować efekt toksyczny nanocząstek, jak i powodować wzmocnienie samoistnych efektów wywoływanych oddziaływaniem nanocząstek lub używanych źródeł energii na komórki nowotworowe (rysunek 3).

NANOCZĄSTKI W TERAPII MOGĄ BYĆ AKTYWOWANE NASTĘPUJĄCYMI ŹRÓDŁAMI ENERGII:



Rysunek 3. Terapie nanocząstkowe z wykorzystaniem zewnętrznego źródła energii do ich aktywacji. PTT – ang. *photothermal therapy*/terapia fototermiczna; PDT – ang. *photodynamic therapy*/terapia fotodynamiczna.

PROMIENIOWANIE - RADIOTERAPIA

Zastosowanie promieniowania w formie teleradioterapii jest szeroko znaną i stosowaną strategią leczenia. Polega ona na precyzyjnym ukierunkowaniu promieniowania gamma, rentgenowskiego lub wiązki elektronów czy hadronów na tkankę nowotworową. Powoduje to dwukierunkowe działanie związane z indukowaniem licznych i bezpośrednich pęknięć DNA, a także uszkodzeń struktur komórkowych w wyniku działania reaktywnych form tlenu (RFT; ROS, *ang. reactive oxygen species*). Niestety, metoda ta posiada kilka ważnych ograniczeń obejmujących napromienianie zdrowych tkanek zlokalizowanych w sąsiedztwie nowotworu czy konieczność stosowania wysokich dawek w przypadku guzów litych, o wysokim poziomie hipoksji.

Pokonanie tych przeszkód możliwe jest dzięki radiouczulającym właściwościom nanocząstek zawierających metale o wysokiej liczbie atomowej (Z), do których zalicza się: metale szlachetne (złoto, srebro, platyna), gadolin oraz bizmut. Metale te absorbują i rozpraszają promieniowanie, doprowadzając tym samym do powstania także innych nośników energii, takich jak elektrony (Comptona, Augera), fotony czy fotoelektrony. Dzięki temu uzyskiwana jest poprawa koncentracji dawki w obrębie tkanki docelowej i wzmocnienie efektów działania promieniowania.

Wymienione metale mogą być stosowane zarówno samodzielnie, jak również w postaci układów nanocząstka-chemoterapeutyk czy w formie dodatków do innych nanomateriałów (np. nanocząstki tlenku hafnu - HfO_2 czy żelaza - Fe_3O_4) rozszerzając zakres ich antynowotworowego działania [42,43]. Pomimo dominującej w tej strategii terapeutycznej roli metali o wysokiej liczbie atomowej, publikowane są również prace poświęcone układom nie-metalicznym. Jako przykład może posłużyć publikacja Chen i wsp. poświęcona terapii nowotworu piersi z nadekspresją receptorów estrogeny. Analizując mechanizm działania wykorzystanych w pracy nanocząstek selenu (20-30 nm) wykazano radiouczulające właściwości, dowodząc tym samym możliwości zastosowania również tego typu układów jako substytutów metalicznych nanocząstek [44].

Jedną z nowych koncepcji rozwijających radioterapię jest tzw. terapia hadronowa, czyli użycie wiązek naładowanych cząstek H^+ , α i C^{6+} jako alternatywy dla klasycznie stosowanego promieniowania X , γ i $\bar{\nu}$. Zaletą tego rozwiązania jest zwiększony potencjał terapeutyczny będący następstwem większych zdolności do jonizacji wywoływanych naładowanymi ciężkimi cząstkami. Również w tym ujęciu nanocząstki metali o dużej liczbie atomowej postulowane są jako ważne czynniki o działaniu radiouczulającym, jednak prace badawcze nad tym zagadnieniem są dopiero na wstępnym etapie ewaluacji, dlatego wymagają dokładniejszego poznania i oceny możliwości implementacji takich terapii [45].

FALE RADIOWE

Promieniowanie o częstotliwości radiowej (10 kHz-900 MHz) znajduje zastosowanie w lokalnym indukowaniu ciepła podczas prowadzenia leczenia z wykorzystaniem hipertermii ($T \sim 40\text{-}47^\circ\text{C}$) lub ablacji termicznej ($T > 50^\circ\text{C}$). Indukowanie wysokiej temperatury może zachodzić poprzez działanie zmiennego pola magnetycznego lub elektrycznego, tak więc nanomateriały stosowane w tego typu procedurach powinny posiadać właściwości magnetyczne lub być podatne na działanie pola elektrycznego. Mechanizm indukowania ciepła pod wpływem pola magnetycznego opiera się na ruchach Browna nanocząstek i efektu Neela (materiały jednodomenowe) oraz stratach histerezyjnych (materiały wielodomenowe). Generowanie ciepła pod wpływem pola elektrycznego nie jest zjawiskiem tak dobrze poznany, a jego

fizyczne podstawy pozostają obiektem badań. Jedną z możliwości jest występowanie ogrzewania elektroforetycznego związanego z ruchem ładunków na powierzchni nanocząstek pod wpływem pola elektrycznego powodując oscylacje i tarcie mechaniczne prowadzące do generowania ciepła [46].

Nieprawidłowa i ograniczona waskularyzacja naczyń krwionośnych nowotworu, czyni go często wrażliwym na zmiany temperatury wpływające na zachwianie homeostazy wewnątrzkomórkowej. Efekt cytotoksyczny indukowany jest na drodze apoptozy (hipertermia) lub nekrozy (ablacja termiczna). Związany jest on jednocześnie z usprawnioną w podwyższonych temperaturach perfuzją stosowanych adjuwantowo chemoterapeutyków, co przyczynia się do zwiększenia skuteczności terapii. Adaptacyjne zdolności nowotworów przy powtarzających się cyklach leczenia powodują jednak wykształcenie termooporności, przez co stosowanie tego typu leczenia możliwe jest jedynie przy skojarzeniu z innymi metodami.

Zewnętrzne pole magnetyczne. Rolą nanocząstek jest w tym przypadku generacja lokalnego wzrostu temperatury. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja nanocząstek znajdujących się głównie w komórkach docelowych powoduje precyzyjne podwyższenie temperatury jedynie w obrębie nowotworu. W przypadku nanocząstek magnetycznych najpowszechniej stosowane są materiały wykonane z magnetytu (Fe_3O_4) lub maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), których monodomenowe właściwości stwarzają duże możliwości do zastosowania w hipertermii. Rzadziej stosowane są natomiast nanocząstki wykonane z kobaltu i niklu, których m.in. genotoksyczność i podatność na utlenianie marginalizuje możliwości ich stosowania [47].

Działanie pola magnetycznego na wymienione materiały jest silnie zależne od struktury i morfologii tych nanocząstek, a także rodzaju i ilości czynników powierzchniowych. Zaletą tej strategii leczenia jest możliwość uzyskiwania efektu toksycznego nie tylko jako następstwa lokalnego wzrostu temperatury, lecz również w wyniku generowania stresu oksydacyjnego pod wpływem jonów Fe^{2+} (reakcja Fentona) czy uszkodzenia błony komórkowej. Pomimo wielu zalet, stosowanie nanocząstek z tlenku żelaza obarczone jest kilkoma problemami, spośród których najważniejszym jest tendencja do agregacji. Dodatek odpowiednich czynników powierzchniowych pozwala zapobiegać nadmiernemu gromadzeniu nanocząstek w postaci skupisk, jednak dobór związków stabilizujących musi być dokonany w oparciu o wpływ na właściwości magnetyczne [48].

Zewnętrzne pole elektryczne. Nanomateriały stosowane w tym procesie to przede wszystkim nanocząstki złota (5-50 nm). Rzadziej wykorzystywane są natomiast nanocząstki platynowe, krzemowe i nanorurki węglowe. Istotnym kryterium doboru nanomateriału jest jego średnica. Dla nanocząstek <50 nm obserwowana jest silna zależność szybkości rozpraszania ciepła wzrastająca ze spadkiem średnicy nanocząstki. Efekt ten wynika ze zwiększonej rezystywności mniejszej nanocząstki, czyniąc ją tym samym lepszym uczulaczem w kontekście zastosowania terapeutycznego [46].

MIKROFALE

Kolejnym sposobem na osiągnięcie lokalnego wzrostu temperatury jest zastosowanie mikrofal o częstotliwości 0,9 GHz lub 2,45 GHz, które ze względu na swoje właściwości mogą być stosowane do ablacji guzów nawet o ograniczonym przewodnictwie cieplnym. Pod wpływem mikrofal, polarne czą-

steczki (np. woda) obecne w komórkach, zwiększają swoją energię kinetyczną, co prowadzi do miejscowego generowania ciepła. Indukowane w tym procesie temperatury są znacznie wyższe niż w przypadku magnetycznej hipertermii i osiągają wartości około 150°C. Nanocząstki (głównie żelaza, złota i węgla) podobnie jak w opisanej wyżej metodzie, stosowane są jako czynniki poprawiające wydajność absorpcji temperatury, zwiększając tym samym lokalny wzrost temperatury w guzie [49].

Poza indukowaniem ciepła, zastosowanie mikrofal stwarza też możliwość do prowadzenia tzw. terapii mikrodynamicznej. Polega ona na generowaniu reaktywnych form tlenu przy jednoczesnym braku efektu termicznego. Zjawisko to zostało zaprezentowane w pracy Chu i wsp., którzy w ten sposób wykorzystali toksyczne działanie nanocząstek TiO₂ względem pierwotnego nowotworu kości. Autorzy, wyjaśniając proapoptotyczne działanie układu nanocząstki-mikrofała, wskazują fotokatalityczną aktywność nanocząstek (poprzez efekt plazmonowy) do tworzenia RFT [50]. Nanocząstki mogą być zatem wykorzystywane nie tylko jako materiały bezpośrednio i w określony sposób poddawane działaniu mikrofal. Wykazują także zdolność do pełnienia roli nośnika substancji wzmacniających efekty termiczne, np. cieczy jonowych [51].

ŚWIATŁO – TERAPIA FOTOTERMICZNA I FOTODYNAMICZNA

Kolejną grupą procedur terapeutycznych bazujących na aktywacji nanomateriałów zewnętrznym źródłem energii jest terapia fototermiczna (PTT – *ang. photothermal therapy*) i fotodynamiczna (PDT – *ang. photodynamic therapy*). W pierwszym z wymienionych przypadków do aktywacji używane jest promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie bliskiej podczerwieni co pozwala uzyskać wysoką przenikliwość. Generowane w tym procesie temperatury wynoszą powyżej 41°C dzięki czemu indukowana jest śmierć komórki. Fizyczne podstawy tego zjawiska związane są z dwoma mechanizmami, do których zalicza się przede wszystkim powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR – *ang. surface plasmon resonance*). Drugi z postulowanych mechanizmów dotyczy natomiast relaksacji stanów wibracyjnych i występuje głównie dla materiałów węglowych. Występowanie SPR stanowi podstawę dla zastosowania do tych procedur nanocząstek metalicznych, wśród których wiodącymi materiałami są nanocząstki złota. Oddziaływanie światła z elektronami znajdującymi się przy powierzchni materiału prowadzi do generowania wzbudzonego plazmonu, mogącego ulegać relaksacji i na drodze takich przemian, jak: elektron-foton, elektron-elektron czy elektron-fonon, każdorazowo uwalniając energię cieplną.

Ze względu na bezpośrednie oddziaływanie światła z powierzchnią nanomateriału, istotny wpływ na przebieg omawianego procesu przypisuje się modyfikacjom powierzchni stosowanych materiałów, wykazując jednocześnie silną zależność efektu od rozmiaru nanocząstki. Poza nanocząstkami złota, podatnymi na tego typu wzbudzenia są również nanomateriały wykonane z platyny, palladu, miedzi i srebra, które stanowią główną, choć nie jedyną grupę związków o możliwym zastosowaniu w terapii fototermicznej [52].

Terapia fotodynamiczna pomimo wykorzystywania światła jako czynnika aktywującego, przebiega w sposób istotnie różniący się od opisanej wyżej terapii PTT. Podstawowa różnica wynika z użycia promieniowania UV jako aktywatora oraz braku efektu termicznego, zastąpionego w tym przypadku przez działanie prooksydacyjne. Fotouczulacz wzbudzany jest falą o określonej długości, co czyni go

reaktywnym z komponentami lipidowymi i białkowymi, indukując powstawanie RFT lub oddziałując bezpośrednio z tlenem cząsteczkowym, powodując wytworzenie tlenu singletowego. Bardzo dużym ograniczeniem terapii PDT jest niska penetracja światła UV stosowanego do aktywacji fotouczulacza. W związku z tym implementacja terapii fotodynamicznej nie jest możliwa w przypadku guzów zlokalizowanych na dużej głębokości. Pokonanie tego ograniczenia wymaga poprawy parametrów dostarczanego do tkanki światła. Obecnie, w tym celu najczęściej wykorzystywane są lasery, lampy LED (powierzchniowa PDT; <2 mm) oraz lasery półprzewodnikowe (śródmiaższowa PDT; <1 cm), a głównymi czynnikami wpływającymi na efektywność penetracji światła są fluencja, lokalizacja guza i obecność tlenu [53].

W terapii fotodynamicznej znajdują zastosowanie różnorodne nanomateriały, wśród których dominują nanocząstki tlenku cynku i tytanu. Ponadto, badane są również możliwości użycia fullerenów (C_{60}) oraz hybrydowych układów składających się z dwóch lub więcej metali (np. złoto, miedź, żelazo). Jednym z elementów działania tych układów jest przesunięcie absorpcji w kierunku światła widzialnego lub bliskiej podczerwieni, charakteryzujących się lepszą penetracją tkanek [54,55].

FALE MECHANICZNE

Wśród terapii bazujących na aktywacji nanomateriałów z użyciem fal mechanicznych wyróżnia się ultradźwięki i fale uderzeniowe. Użycie ultradźwięków w połączeniu ze zlokalizowanymi wewnątrz nowotworu nanocząstkami wywołuje różnorodne efekty. Przejście fali przez tkankę powoduje rozpraszanie części jej energii w postaci ciepła generowanego na skutek tarcia. Podczas terapii z wykorzystaniem mikrofal, występują również liczne efekty cytotoksyczne związane z indukowaniem stresu oksydacyjnego, uwolnieniem toksycznych jonów podczas degradacji nanocząstek, sonoluminescencją oraz licznymi mechanicznymi uszkodzeniami związanymi z poruszaniem się nanocząstek we wnętrzu guza.

Materiałami o największym potencjale aplikacyjnym w tej strategii są nanocząstki metali (złoto, srebro), tlenkowe (titan, cynk) oraz magnetyczne. Ponadto, stosowane są również nanostruktury o właściwościach piezoelektrycznych (np. $BaTiO_3$), których stymulacja mikrofalami prowadzi do generowania ładunków elektrycznych wpływających na funkcje komórek [56].

Innym przykładem zastosowania fal mechanicznych w terapii nowotworów jest użycie fal uderzeniowych. Fale te charakteryzują się skokowym wzrostem ciśnienia (nawet do poziomu 100 MPa) trwającym do 3 μ s. Pomimo stosowania tej techniki w praktyce klinicznej, prace badawcze nad implementacją nanocząstek jako uczulaczy nie są szeroko rozwijane. Jedyną koncepcją, która uwzględnia układ nanocząstka-fale mechaniczne jest praca opublikowana przez Racca i wsp., w której wykazano synergiczny efekt nanokryształów tlenku cynku w indukowaniu śmierci komórki [57].

Omawiając opisane wyżej koncepcje terapeutyczne należy podkreślić, że nanocząstki stosowane jako uczulacze do bezpośredniego indukowania efektu toksycznego, mogą stanowić również nośnik dla innych typów związków o potencjalnym działaniu uczulającym. Coraz częściej projektowane są różne metody terapeutyczne polegające na łączeniu wielu technik zdalnej aktywacji nanomateriałów. Celem tego podejścia jest zwiększenie efektów leczenia. Jako przykład może posłużyć tutaj radioterapia połączona z wieloma różnymi technikami. Zalicza się do nich głównie terapie fototermiczne/fotodynamiczne

oraz ultradźwięki, stosowane w tym połączeniu głównie do celów diagnostycznych. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad radioterapią (HfO_2) oraz terapią fototermiczną (nanosfery złota pokryte krzemionką) do leczenia guzów litych oraz przerzutów. Nanocząstki tlenku żelaza stosowane są natomiast w terapii nowotworu prostaty [58,59]. Stale pojawiające się publikacje poświęcone tej tematyce są sygnałem dla oczekiwania rosnącej liczby nowych badań klinicznych, co może przyczynić się do wprowadzenia nanocząstek w ujęciu terapeutycznym na szeroką skalę [60,61].

1.3. Nanobrachyterapia a terapia celowana

Częsta tendencja nanostruktur do akumulacji w wielu narządach oraz brak wiarygodnych danych dotyczących mechanizmu i wydajności wychwytu przez guzy, to tylko niektóre z wyzwań stawianych przed nanomedycyną w terapii nowotworów. Ze względu na istotnie zwiększone narażenie zdrowych tkanek, są to szczególnie ważne czynniki limitujące ich użycie w przypadku stosowania radioaktywnych nanocząstek. Nanobrachyterapia i terapia celowana stanowią nowoczesne koncepcje pozwalające w pewnym stopniu pokonywać te ograniczenia, jednak obydwie metody mają również liczne ograniczenia.

Nanobrachyterapia, poprzez wprowadzenie nanocząstek bezpośrednio do guza lub w jego okolice (np. do łoży pooperacyjnej i otaczających guz naczyń krwionośnych), pozwala na uzyskanie wysokiego stopnia lokalizacji leku w tkance nowotworowej. Dzięki temu możliwe jest prowadzenie procesu leczenia guzów, które nie wykazują nadekspresji żadnych receptorów lub dla których nie opracowano dotychczas skutecznych wektorów. Zastosowanie wektora w nanobrachyterapii nie jest jednak bezzasadne, gdyż jego obecność może zwiększyć stopień retencji w komórce oraz dodatkowo spotęgować efekt terapeutyczny poprzez dwukierunkowe działanie [62]. W ramach nanobrachyterapii możliwe jest także przeprowadzanie radioembolizacji, poprzez iniekcję nanocząstek w postaci dwufazowej emulsji. Pozwala to uzyskać efekty indukujące toksyczność w wyniku zamknięcia światła naczyń krwionośnych i wpływu promieniowania na komórki [63]. Szybka eliminacja lub wyciek leku z guza są jednymi z głównych, choć nie jedynych, ograniczeń tej metody. Ponadto, ze względu na swoją specyfikę, nanobrachyterapia może być stosowana jedynie w przypadku guzów litych zlokalizowanych w miejscach o łatwej dostępności, co tym samym wyklucza jej aplikację w innych typach nowotworów oraz drobnych przerzutach zlokalizowanych często daleko od umiejscowienia guza pierwotnego.

Drugą koncepcją zastosowania nanocząstek w leczeniu nowotworów jest terapia celowana. Do jej stosowania wymagane jest zidentyfikowanie określonego celu molekularnego na powierzchni guza (receptory transbłonowe) lub wykorzystanie angiogenezy (receptory wzrostu śródbłonna, VEGFR – *ang. vascular endothelial growth factor receptor*) i włączenie w strukturę leku odpowiedniego wektora, specyficznie łączącego się z receptorem, na który jest ukierunkowany. Najwięcej prac badawczych nad zastosowaniem nanocząstek w tej formie, prowadzonych jest z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych (trastuzumab/paklitaksel) i peptydów (analogi somatostatyny) lub małych cząsteczek biologicznie aktywnych (PSMA – *ang. prostate-specific membrane antigen*/antygen błonowy specyficzny dla prostaty) [64–69]. Dużym problemem, szczególnie w przypadku wykorzystania przeciwciał jest to, że na jednej nanocząstce umieszczonych jest od kilku do kilkunastu cząsteczek białka, w zależności od rozmiaru nośnika. Powoduje to aktywację układu odpornościowego przy iniekcji dożylnych takich związków,

co w konsekwencji prowadzi do szybkiej neutralizacji i eliminacji związku, a w wyjątkowych przypadkach może skutkować występowaniem działań niepożądanych [70,71]. Trzeba jednak pamiętać, że w celowanej terapii z użyciem nanocząstek występuje problem z ich niekontrolowanym gromadzeniem się w wielu istotnych organach, takich jak śledziona, wątroba czy płuca.

Mniej powszechnym, z punktu widzenia definicji terapii celowanej, aczkolwiek także jej rodzajem, jest wykorzystanie mikrośrodowiska guza (TME – *ang. tumor microenvironment*) do uzyskania wysokiej selektywności. Kierunek ten jest jednym z najnowszych i najszybciej rozwijanych, ze względu na mnogość możliwości, jakie oferuje. Na mikrośrodowisko guza składają się liczne struktury komórkowe (m.in. fibroblasty, dendrytyczne czy komórki odpornościowe), macierz zewnątrzkomórkowa, różnorodne czynniki wydzielane z komórki (np. EVs) oraz naczynia krwionośne i limfatyczne [72]. Ukierunkowanie terapii na elementy TME stanowi odejście od metod konwencjonalnych, otwierając nowe możliwości projektowania i personalizowania strategii leczenia, w celu pokonywania pierwotnej lub nabytej lekooporności. W tabeli 1 przedstawiono najważniejsze cele biochemiczne mogące być wykorzystane w tworzeniu terapii opartej na TME. Heterogeniczność guza i niejedolite rozmieszczenie różnorodnych składników komórki sprawia, że w obrębie guza mogą występować zróżnicowane lokalnie mikrośrodowiska. Zastosowanie więc terapii skupiającej się na TME pozwala nie tylko walczyć z trudnymi do leczenia zmianami, lecz także uwzględnić w postępowaniu terapeutycznym przerzuty powstające w następstwie progresji guza. Należy jednak mieć na uwadze, że mikrośrodowisko guza ma istotny i bezpośredni wpływ na ekspresję receptorów błonowych czy aktywację lub wygaszanie poszczególnych szlaków sygnałowych. Z racji tego, poznanie jego otoczenia i fizjologii stanowi kluczowe wyzwanie przy rozwijaniu koncepcji terapeutycznych poświęconych TME. Dzięki wykorzystaniu nanotechnologii możliwe jest, poprzez właściwą funkcjonalizację, kierunkowanie leków na więcej niż jeden czynnik, co może w przyszłości znacząco ułatwić i rozwinąć realizację tego typu procesów terapeutycznych [73,74].

Tabela 1. Główne cele biochemiczne w terapii TME.

Wyspecjalizowane mikrośrodowisko TME	Nisza hipoksyjna, kwasowość środowiska, stan zapalny, unerwienie guza, waskularyzacja
Immunoterapie	Inhibitory punktów kontrolnych
Główne komponenty TME	Mezenchymalne komórki stromalne, macierz zewnątrzkomórkowa, składniki wrodzonego i adaptacyjnego układu odpornościowego (makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne, komórki NK, limfocyty T)

1.4. Radioaktywne nanocząstki jako leki o wielokierunkowym działaniu

Różnorodne właściwości nanocząstek predysponują je nie tylko do włączania w różne strategie terapeutyczne, lecz również stwarzają możliwość projektowania multimodalnych leków, zapewniających wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe. Terapia skojarzona z wykorzystaniem radiofarmaceutyków opartych na nanocząstkach pozwala na połączenie fizycznych (promieniowanie, magnetyczna

hipertermia), chemicznych (działanie prooksydacyjne, interkalacja do DNA) i biologicznych (cytostatyki) metod indukowania śmierci komórki.

Dostarczanie radionuklidów emitujących promieniowanie α i β^- oraz elektrony Augera może odbywać się poprzez:

- skoniugowanie chelatora bezpośrednio z powierzchnią nanocząstki lub za pośrednictwem linkera,
- immobilizację radionuklidu bezpośrednio wewnątrz nanocząstki lub na jej powierzchni,
- wykorzystanie radioaktywnego prekursora, najczęściej metalu, do syntezy radioaktywnych nanocząstek, których rdzeń lub powłoka (w przypadku nanocząstek core-shell) wykonane są z materiału radioaktywnego.

Przykładami bezpośredniej koniugacji chelatora z powierzchnią nanocząstek są rozmaite układy, w których nośnikiem biokoniugatu jest nanocząstka złota lub dendrymer. Konstruując tego typu koniugaty wykorzystuje się dużą powierzchnię nośnika, funkcjonalizując go jednocześnie chelatorem i wektorem, tworząc multimodalny radiofarmaceutyk (np. trastuzumab-AuNPs-DTPA- ^{111}In) [75,76].

W przypadku braku możliwości wytworzenia stałego kompleksu radionuklid-chelator często stosowaną praktyką jest inkorporacja radionuklidu wewnątrz nanocząstki lub na jej powierzchni. Wykorzystanie nanocząstek pozwala na syntezę stabilnych radiobiokoniugatów dla prowadzenia celowanej α -radioterapii z radionuklidami, które nie tworzą stabilnych kompleksów z chelatorami. Stosowanie emiterów promieniowania α , takich jak ^{223}Ra , ^{225}Ac czy ^{227}Th wymaga poszukiwania skutecznych rozwiązań zapewniających lepszą kontrolę nad radioaktywnymi produktami ich rozpadu ulegającymi dalszym przemianom α i β^- . Towarzysząca inicjującej szereg rozpadów przemianie α energia przekazywana jest emitowanej cząstce α w postaci energii kinetycznej. Zgodnie z zasadą zachowania pędu, ta sama część energii rozpadu przekazywana jest do jądra pochodnego. Energia ta wynosi $\sim 0,1$ MeV co stanowi wartość blisko 1000-krotnie wyższą niż wartość energii wiązania, która jest rzędu eV. W związku z tym dochodzi do odrzutu jądra pochodnego powodującego jego wyrwanie ze struktury kompleksu, co tym samym utrudnia, choć nie wyklucza, stosowania takich układów *in vivo*. Problem ten dotyczy w szczególności ^{225}Ac , którego pierwszy radionuklid pochodny (^{221}Fr) charakteryzuje się okresem półtrwania wynoszącym 4,9 min i jako analog kationu K^+ łatwo rozprzestrzenia się po organizmie, emitując dodatkowe trzy cząstki α . Zastosowanie nanocząstek jako nośników dla emiterów promieniowania α wydaje się być jednym z najbardziej obiecujących sposobów rozwiązania tego problemu. Enkapsulacja radionuklidu wewnątrz nanocząstki umożliwia zatrzymanie jądra formowanego po rozpadzie, ograniczając tym samym niespecyficzne oddziaływanie radionuklidów pochodnych *in vivo*. Należy jednak podkreślić, że dobór modelu powinien być uzależniony od dedykowanego mu radionuklidu. Inne wymagania stawiane będą dla nanocząstek wykorzystywanych do enkapsulacji ^{225}Ac , ze względu na charakterystykę produktów jego rozpadu i związaną z tym konieczność wytworzenia warstwy o odpowiedniej grubości. Ponadto, specyfikacja wykorzystywanej warstwy zależna będzie także od materiału, z jakiego zostanie wykonana [77]. Do najbardziej obiecujących koncepcji zaliczyć można modyfikowane nanocząstki fosforanu lantanu ($\text{La}^{(225}\text{Ac})\text{PO}_4$) czy TiO_2 [78], przy czym pokrywa się je dodatkową warstwą złota.

W przypadku radu-223, brak stabilnych kompleksów Ra^{2+} i innych kationów metali alkalicznych ogranicza jego zastosowanie w medycynie do soli (chlorku radu; $^{223}RaCl_2$) [79–83]. Dla zapewnienia lepszej kontroli nad radem i produktami jego rozpadu proponuje się nanozeolity (NaA), nanocząstki siarczanu baru ($BaSO_4$), ferryt baru ($BaFe_{12}O_{19}$) czy hydroksyapatyt. Ich działanie opiera się na wzmocnieniu wiązania ^{223}Ra z powierzchnią nośnika (np. na zasadzie wymiany jonowej Na^+-Ra^{2+}) lub readsorpcji radionuklidów pochodnych, osiąganą przede wszystkim dla układów z hydroksyapatytem [84,85]. Jako inny przykład może posłużyć też astat-211 ($t_{1/2} = 7,2$ h; $E_{max} = 5,87$ MeV), którego dotychczas stosowane połączenia z atomami węgla czy boru, ulegają degradacji w roztworach biologicznych [86]. Osadzenie astatu na powierzchni nanocząstek złota ($^{211}At-AuNPs$ -trastuzumab i $^{211}At-AuNPs$ -SP(5-11)) lub na polimerowym nanoosiłku ($^{211}At-MeATE$ -SPN-GIP) umożliwiło pokonanie tych ograniczeń i pozwoliło na przeprowadzenie prac badawczych na etapie *in vitro* oraz *in vivo* [87,88].

Innym podejściem jest zastosowanie radioaktywnych nanocząstek. Polega ono na syntezie nanomateriału bezpośrednio z wykorzystaniem radioaktywnego materiału, stanowiącego rdzeń (np. ^{198}Au) lub powłokę (np. ^{166}Ho) nanocząstki, poddawanej dalszym modyfikacjom [89–92]. Może to być także zastosowane do palladu (^{103}Pd , $t_{1/2} = 16,99$ d), jako generatora *in vivo* dla rodu-103m (^{103m}Rh , $t_{1/2} = 56$ min). Krótki okres półrozpadu praktycznie wyklucza bezpośrednią aplikację ^{103m}Rh jako radionuklidu terapeutycznego. Wprowadzenie do komórki jego radionuklidu macierzystego daje możliwość prowadzenia precyzyjnej terapii z wykorzystaniem elektronów Augera, emitowanych podczas rozpadu rodu wytworzonego w reakcji $^{103}Pd(EC)^{103m}Rh$. W tym przypadku, możliwe jest użycie Pd jako materiału bazowego nanocząstek ($^{103}PdNPs$), do syntezy nanocząstek typu core-shell (np. $Au@^{103}Pd$ NPs) lub w formie radiobiokoniugatów (np. z bisfosfonianami). Właściwości katalityczne Pd predysponują oparte na nim materiały także do indukowania chemotoksycznego działania, podobnie jak w przypadku platyny [93].

Właściwości chemiczne nanocząstek mogą być także wykorzystane do bezpośredniego lub pośredniego indukowania odpowiedzi terapeutycznej. Ponadto, projektując nowe potencjalne radiofarmaceutyki coraz częściej tworzone są związki stanowiące hybrydy dwóch lub więcej wymienionych wyżej strategii. Pozwala to syntetyzować związki o wysokim stopniu złożoności, z jednej strony zapewniające dużą uniwersalność i wielokierunkowość, z drugiej zaś stanowiące niemałe wyzwanie i wymagające pokonania wielu trudnych ograniczeń. Ich bezpośrednie działanie może opierać się na wykorzystaniu mikrośrodowiska guza, którego określone właściwości mogą indukować działanie obojętnego w neutralnym środowisku materiału. Przykładem takiego zastosowania mogą być nanocząstki platynowe, które w środowisku silnie utleniającym wykazują właściwości cytotoksyczne na drodze różnych mechanizmów. Wśród obecnie publikowanych prac badawczych, coraz większą popularność zyskują także koniugaty nanocząstka-lek. Jest to koncepcja rozwijana również w Pracowni Chemii Radiofarmaceutycznej IChTJ, gdzie do wiodących koncepcji badawczych zalicza się biokoniugaty radioaktywnych nanocząstek złota z chemioterapeutyką (doksorubicyną) lub koniugatem przeciwciała-lek (trastuzumab-emptanzyna). Takie połączenie, jest szczególnie interesujące w przypadku wydajnego uwalniania leku ze struktury biokoniugatu, gdyż pozwala oczekiwać znacząco zwiększonej skuteczności działania.

Pośrednie działanie nanocząstkowego nośnika to przede wszystkim wykorzystanie jego właściwości magnetycznych w prowadzeniu terapii, z użyciem zewnętrznego pola magnetycznego do indukowania lokalnej hipertermii. Najczęściej w tym celu stosowane są nanocząstki magnetytu (Fe_3O_4 , SPION), których działanie terapeutyczne może być dodatkowo wzmacniane poprzez domieszkowanie radionuklidem (np. ^{166}Ho -SPION@Au) lub pokrycie warstwą radioaktywnego materiału, np. ^{198}Au @SPION. Stanowi to pewnego rodzaju hybrydę, łącząc bezpośrednie indukowanie cytotoksyczności poprzez promieniowanie jonizujące, z pośrednim efektem podwyższonej temperatury, indukowanym w obecności pola magnetycznego [92,94]. Dzięki temu możliwe jest osiągnięcie synergicznego efektu radioterapii i hipertermii.

1.5. Stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych

Utrzymanie homeostazy redoks w komórkach eukariotycznych jest istotnym czynnikiem warunkującym prawidłowe zachodzenie wielu procesów metabolicznych, zarówno w komórkach zdrowych, jak i nowotworowych. Wytwarzane w łańcuchu oddechowym mitochondrium, retikulum endoplazmatycznym i peroksysomach reaktywne formy tlenu oraz azotu (RFA; RNS – *ang. reactive nitrogen species*) pełnią ważną rolę w regulacji ścieżek sygnałowych, wliczając w to przede wszystkim procesy proliferacji, różnicowania, a także ekspresji genów. Prekursorem większości wolnych rodników obecnych w komórce jest anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), powstający w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Głównymi produktami dalszych jego przemian jest rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) oraz nadtlenek wodoru H_2O_2 , które są formami o najważniejszym znaczeniu w biochemii komórki. Spośród reaktywnych form azotu, strukturami o najistotniejszym znaczeniu są tlenek azotu ($\text{NO} \cdot$), dwutlenek azotu (NO_2) oraz peroksynitryt (ONOO^-), a za równowagę redoks odpowiadają również rodniki pochodzenia organicznego, np. alkoksylowy ($\cdot\text{OR}$) oraz peroksyloxy ($\cdot\text{OOR}$) [95].

Długotrwałe zachwianie równowagi redoks wynikające z nadpodaży ROS-ów lub wyczerpania możliwości antyoksydacyjnych komórki prowadzi do stresu oksydacyjnego. Może to w konsekwencji indukować liczne zmiany w fizjologii komórki wywołane działaniem enzymów utleniających i skutkujących niestabilnością genetyczną. Na uszkodzenia oksydacyjne narażone są liczne struktury komórkowe - przede wszystkim białka, lipidy oraz DNA [96,97].

Wieloetapowa peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów stanowiących główny składnik błon biologicznych jest jednym z głównych zagrożeń, na jakie narażona jest komórka podczas stresu oksydacyjnego. W następstwie tych reakcji wytwarzane są kolejne formy krótkożyciowych wolnych rodników (alkilowe i nadtlenkowe) inicjujące dalsze etapy peroksydacji. Drugą grupą produktów tych przemian są węglowodory z grupy alkanów i alkenów, których obecność powoduje obniżenie płynności i zwiększenie przepuszczalności błon. Szczególnie wrażliwym organellum na ten typ uszkodzeń jest mitochondrium, gdyż zaburzenie łańcucha oddechowego prowadzi do spadku poziomu ATP (adenozyno-5'-trifosforanu) w komórce, a więc głównego nośnika energii [98].

Uszkodzenia oksydacyjne białek mogą z kolei prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu wielu enzymów i cząsteczek sygnałowych, poprzez modyfikację grup prostetycznych. Skutkiem tych zmian jest

spotęgowanie efektów stresu oksydacyjnego, poprzez upośledzenie możliwości neutralizacji RFT. Jednym z możliwych skutków stresu oksydacyjnego jest także fragmentacja białek wynikająca z fragmentacji łańcucha peptydowego lub tworzenia wiązań krzyżowych [99].

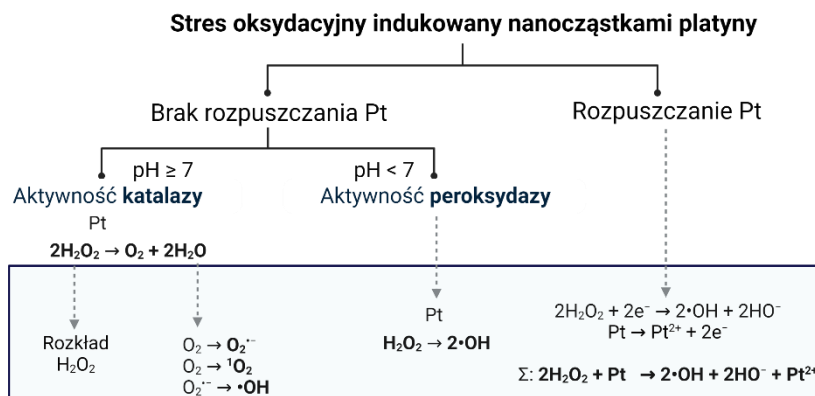
W wyniku działania reaktywnych form tlenu dochodzi również do uszkodzenia DNA – zarówno mitochondrialnego (mtDNA), jak i jądrowego (nDNA), przy czym uszkodzenia mtDNA przekładają się bezpośrednio na zmiany w nDNA [100].

Biorąc pod uwagę to, jak wiele krytycznych dla prawidłowego funkcjonowania komórki zmian może powstawać w następstwie stresu oksydacyjnego, projektowanie terapii bazujących na indukowaniu zaburzeń równowagi redoks wydaje się być niezwykle interesującą koncepcją. Istotną korzyścią jest również możliwość uzyskania wysokiej selektywności. Wykorzystanie zdolności terapeutycznych leku w zależności od potencjału oksydacyjnego komórki może pozwolić na uzyskanie wysokiej aktywności w warunkach występujących jedynie w cytozolu komórek o podwyższonym potencjale oksydacyjnym, różnicując tym samym komórki nowotworowe i zdrowe. Wedle tej koncepcji terapeutycznej zaprojektowano i wprowadzono już do praktyki klinicznej szereg leków, inicjujących stres oksydacyjny bezpośrednio lub działających jako światłouczulacz w terapii fotodynamicznej [97,101]. Głównymi mechanizmami ich prooksydacyjnego działania jest indukowanie zaburzeń w morfologii lub fizjologii mitochondriów, a także uszkodzenia retikulum endoplazmatycznego. Najczęściej ten typ leczenia stosowany jest w przypadku nowotworów płuc, aczkolwiek strategia ta pozwala na terapię nowotworów zlokalizowanych także w innych narządach [102].

1.6. Aktywność biologiczna nanocząstek platyny

Pomimo licznych prac badawczych poświęconych zastosowaniu nanocząstek platyny w terapii nowotworów, ich aktywność biologiczna oraz mechanizm odpowiedzialny za potencjalne cytotoksyczne działanie wciąż nie zostały do końca poznane. Duży potencjał aplikacyjny tej grupy nanomateriałów jest istotny szczególnie w przypadku nowotworów o podwyższonym statusie oksydacyjnym. Zwiększone stężenie nadtlenu wodoru, naturalnie występującego w cytozolu komórek niektórych nowotworów, czyni je atrakcyjnym celem dla nanocząstek platyny – metalu, o doskonale poznanych i szeroko wykorzystywanych właściwościach katalitycznych. Rak wątrobowokomórkowy (HCC, *ang. hepatocellular carcinoma*) jest głównym przykładem nowotworu, w którym mikrośrodowisko guza wykazuje właściwości predysponujące je do rozważania terapii ukierunkowanej na TME. Wątroba, jak wynika z jej anatomicznej funkcji, jest jednym z narządów o najwyższej konsumpcji tlenu, co w połączeniu z nadprodukcją H_2O_2 w przypadku HCC, istotnie wpływa na środowisko wewnątrzkomórkowe [103]. Innymi przykładami są niektóre nowotwory piersi i jajnika, jednakże w tych przypadkach jest to cecha indywidualna poszczególnych typów nowotworów [104,105].

Ze względu na katalityczne właściwości platyny, postulowane jest silnie prooksydacyjne działanie nanocząstek tego metalu, lecz mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko pozostaje wciąż nieokreślony. W literaturze proponowane są dwie koncepcje, różniące się między sobą następstwami interakcji nanocząstek platyny z nadtlakiem wodoru (rysunek 4).



Rysunek 4. Postulowane mechanizmy oddziaływania nanocząstek platyny z nadtlenkiem wodoru w warunkach *in vitro*.

Jak przedstawiono na rysunku 4, rozpuszczalność Pt i pH środowiska są głównymi czynnikami determinującymi następstwa oddziaływania nanocząstek platyny z H_2O_2 . Miara kwasowości i zasadowości środowiska jest istotna w przypadku, gdy nie dochodzi do rozpuszczania nanocząstek. Stres oksydacyjny jest w tym przypadku indukowany poprzez katalityczny rozkład nadtlenku wodoru, będącego mediatorem równowagi redoks w komórce. W $\text{pH} \geq 7$, PtNPs mogą wykazywać aktywność zbliżoną do enzymu katalazy, a więc oksydoreduktazy katalizującej rozkład nadtlenku wodoru. Dekompozycja mediatora równowagi redoks skutkuje jej zakłóceniem, doprowadzając pośrednio do wystąpienia stresu oksydacyjnego. W niższym pH udowodniono natomiast aktywność zbliżoną do peroksydazy, prowadzącą, poza dekompozycją nadtlenku wodoru, do endogennego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot -}$), tlenu singletowego (${}^1\text{O}_2$) oraz rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) o bardzo krótkim czasie życia, wynoszącym *in vivo* 10^{-9} s. Formy te mogą ulegać dalszym reakcjom rodnikowym, a także bezpośrednio indukować stres oksydacyjny [106].

Nieco inaczej wygląda przebieg procesu indukowania stresu oksydacyjnego, gdy nanocząstki platynowe są elementem dwuelektronowej redukcji nadtlenku wodoru. Produktami tej reakcji redoks – poza rodnikiem hydroksylowym ($\cdot\text{OH}$) i anionem hydroksylowym OH^- – są także kationy Pt^{2+} , co istotnie odróżnia ten mechanizm od przedstawionego powyżej. Uwalnianie się kationu platynowego z nanocząstki wskutek jej rozpuszczania, daje szansę na efektywne przejście do jądra komórkowego i bezpośrednie uszkodzenie DNA, poprzez fizyczne zaburzenie jego struktury lub interkalację [3,107].

Niezależnie od mechanizmu aktywności biologicznej nanocząstek platyny, nie ulega wątpliwości ich prooksydacyjne działanie, generujące w sposób bezpośredni lub pośredni stres oksydacyjny. Z punktu widzenia aplikacji w radiofarmacji, w tym wykorzystania ${}^{193\text{m},195\text{m}}\text{Pt}$ jako emiterów elektronów Augera, niewątpliwie korzystniejsze byłoby rozpuszczanie nanocząstek i uwalnianie radioaktywnego kationu (${}^{193\text{m},195\text{m}}\text{Pt}^{2+}$), mogącego indukować znaczące uszkodzenia jądra komórkowego i DNA oraz innych, ważnych dla utrzymania funkcji życiowych komórki struktur.

2. Elektrony Augera w nowoczesnej celowanej radioterapii

Elektrony Augera (AE – *ang. Auger electrons*) nazywane także Meitner-Auger, są niskoenergetycznymi elektronami emitowanymi z zewnętrznych powłok elektronowych. Emisja ta następuje w wyniku wypełniania luki na niższej podpowłoce elektronowej, przez elektron z wyższej podpowłoki i uwalnianej w tym procesie energii. Inicjujące cały proces usunięcie elektronu z niższej podpowłoki może nastąpić w wyniku jego wybicia kwantem promieniowania elektromagnetycznego, wychwytu elektronu (*ang. EC – electron capture*) lub konwersji wewnętrznej (*ang. IC – internal conversion*). Wytworzona luka ulega wypełnieniu przez elektron z wyższej powłoki, posiadający niższą energię wiązania. Nadmiar energii przekazywany jest do elektronu znajdującego się dalej od jądra powodując jego wybicie lub uwalnianie jest w postaci emisji charakterystycznego promieniowania X. Obydwa te procesy są względem siebie konkurencyjne (rysunek 5A). W zależności od numeru powłok, których dotyczą opisane przemiany, rozróżnia się przede wszystkim efekt Augera oraz przejście Costera-Kroniga. Przemiana typu super Costera-Kroniga stanowi odmianę Costera-Kroniga zachodzącą dla elektronów zlokalizowanych w dalszej odległości od jądra atomowego, a więc na bardziej oddalonych podpowłokach. Niezależnie jednak od typu przejścia elektronowego w atomie, wszystkie emitowane elektrony definiowane są jako elektrony Augera (rysunek 5B) [108].

Elektrony Augera charakteryzują się bardzo krótkim zasięgiem w tkance wynoszącym maksymalnie 100 nm. W rzeczywistości jednak, efektywny obszar ich biologicznego działania ograniczony jest do 10-20 nm, gdyż to w tym obszarze deponują większość swojej energii. Podczas jednego rozpadu dochodzi do uwolnienia między 5 a 35 elektronów o energiach w zakresie od kilku eV do 1 keV. Wysoki współczynnik LET (*ang. linear energy transfer*/liniowy przekaz energii) wynoszący 4-26 keV/ μm sprawia, że elektrony Augera, podobnie jak cząstki α , zdolne są do indukowania dużych uszkodzeń w tkance, jednak na znacznie mniejszych odległościach w porównaniu do cząstek alfa (rysunek 5C i 5D).

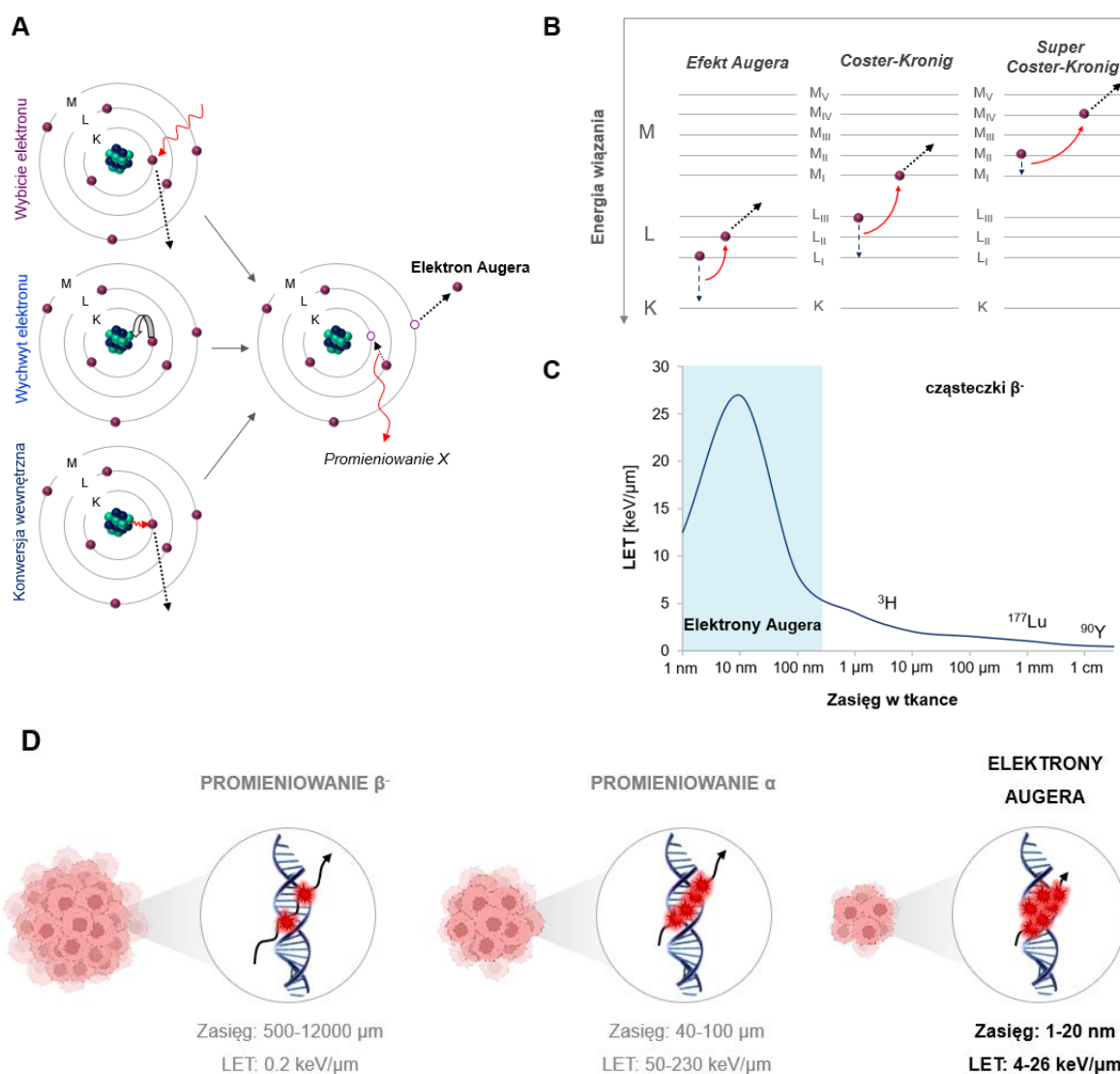
Charakterystyka AE sprawia, że są doskonałymi kandydatami do prowadzenia terapii małych zmian nowotworowych, ograniczonych do pojedynczych komórek. Jest to o tyle istotne, że obecnie brak jest skutecznych metod walki z mikroprzerzutami, poważnie utrudniającymi proces terapeutyczny ze względu na rozprzestrzenianie nowotworu często w znacznych odległościach od lokalizacji guza pierwotnego. Ważną zaletą emiterów elektronów Augera jest również ich znikoma toksyczność podczas transportu we krwi lub w stosunku do szpiku kostnego, co minimalizuje częstość występowania działań niepożądanych [109].

Głównym celem molekularnym przy rozważaniu terapii Augera jest materiał genetyczny komórki. Zasięg elektronów Augera umożliwia wygenerowanie dwuniciowych uszkodzeń na dystansie kilku nukleotydów, co stanowi najefektywniejszy sposób indukowania śmierci komórki, głównie na drodze apoptozy lub katastrofy mitotycznej.

Oddziaływanie emiterów elektronów Augera z DNA może odbywać się poprzez liczne, bezpośrednie typy oddziaływań, takie jak wiązanie kowalencyjne, interkalację, interakcję z chromatyną (głównie poprzez receptory i białka rusztowania), oraz pośrednio, poprzez indukowanie reaktywnych form tlenu i azotu. Konieczność precyzyjnego dostarczenia radiofarmaceutyku do jądra komórkowego stanowi duże wyzwanie i istotnie ogranicza możliwości aplikacyjne. Interkalacja do DNA praktycznie wyklucza

użycie dużych cząsteczek (np. przeciwciał) jako wektorów. Alternatywnymi dla DNA celami molekularnymi w przypadku elektronów Augera jest błona komórkowa i mitochondrium. Dezintegracja błony komórkowej - poprzez szereg procesów takich jak spadek poziomu ATP, uszkodzenie lizosomów czy bierny napływ jonów. prowadzi do rozpadu komórki, a upośledzenie funkcji mitochondrium zaburza wiele kluczowych szlaków sygnałowych [110]. Ponadto, powstający po emisji elektronów Augera wysocce dodatni kation, ulega szybkiej neutralizacji poprzez pobranie elektronów z wody obecnej w cytozolu. Prowadzi to do wtórnego generowania reaktywnych form tlenu mogących spotęgować działanie terapeutyczne [109,111].

Biologiczne aspekty wykorzystania elektronów Augera oraz niewielka dostępność radionuklidów, są głównymi ograniczeniami tej terapii. Pomimo tego, terapia elektronami Auger jest jedną z najbardziej obiecujących, czego odzwierciedleniem są liczne prace badawcze nad udoskonaleniem i wprowadzeniem do badań tej metody leczenia nowotworów [112–114].



Rysunek 5. Charakterystyka elektronów Augera. Schemat generowania luki elektronowej inicjujący emisję elektronów Augera (A); wykres poziomów energetycznych, na których dochodzi do przemian elektronowych - efekt Augera, przejście Costera-Kroniga i super Costera-Kroniga (B); wykres zmian liniowego przekazu energii elektronów Augera w funkcji odległości (C); zasięg w tkance elektronów Augera w porównaniu do emiterów promieniowania β⁻ i α (D).

2.1. Emitery elektronów Augera o istotnym potencjale terapeutycznym

Efektywność terapeutyczna emiterów elektronów Augera jest zagadnieniem złożonym, ponieważ za działanie biologiczne odpowiadają nie tylko elektrony Augera, lecz także emitowane podczas rozpadów elektrony konwersji. Różnią się one zdolnością penetracji tkanek na większe odległości. Liczba elektronów konwersji emitowana podczas tych przemian jest jednak niewielka, co powoduje, że ogólny efekt biologiczny zależy przede wszystkim od elektronów Augera, natomiast wpływ elektronów konwersji jest drugorzędny [115].

Innym czynnikiem, o nieco marginalnym znaczeniu, choć mogącym wpływać na efektywność terapeutyczną, jest efekt fotoelektryczny. Jego poboczna rola wynika przede wszystkim z faktu, że może on zachodzić jedynie w ściśle określonych sytuacjach, w szczególności przy immobilizacji radionuklidu na powierzchni metalu. Jednym z przykładów mogą być nanocząstki typu core-shell (rdzeń-powłoka), w których nieradioaktywny rdzeń, pokryty jest warstwą metalu będącego emiterem elektronów Augera. Absorpcja fotonu przez atomy warstwy metalu powoduje wybitego elektronu i generowanie luki, czego efektem jest jej zapełnianie, podobnie jak w przypadku inicjowania efektu Augera. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie dodatkowych elektronów pochodzących z powłoki metalicznej nanocząstki [116].

Głównymi czynnikami determinującymi możliwość wykorzystania emitera elektronów Augera w terapii są:

- liczba i energia emitowanych podczas rozpadu elektronów,
- stosunek p/e (foton/elektron) określający prawdopodobieństwo emisji elektronów Augera względem konkurencyjnej emisji kwantów promieniowania γ i X,
- okres półrozpadu ($t_{1/2}$),
- możliwość produkcji radionuklidu o wysokiej aktywności właściwej w formie beznośnikowej.

Bazując na przedstawionych kryteriach, w tabeli 2 zestawiono radionuklidy o najistotniejszym potencjale terapeutycznym.

Tabela 2. Wybrane emitery elektronów Augera o największym potencjale terapeutycznym [109].

Radionuklid	Okres półrozpadu	Liczba e na rozpad	Typ rozpadu	Energia γ [keV]	Produkcja
⁶⁷ Ga	78,3 h	7,03	EC	93, 185, 300	Cyklotron
^{103m} Rh	56,11 min	b/d	IT	-	Generatory: ¹⁰³ Ru/ ^{103m} Rh, ¹⁰³ Pd/ ^{103m} Rh
¹¹¹ In	2,82 d	6,05	EC	171, 245	Cyklotron
¹²⁵ I	59,4 d	21,0	EC	36	Cyklotron
^{193m} Pt	4,33 d	27,0	IT	-	Reaktor/cyklotron
^{195m} Pt	4,03 d	37,0	IT	98,9	Reaktor/cyklotron
¹⁹⁷ Hg	64,1 h	23,2	EC	134	Reaktor/cyklotron
^{197m} Hg	23,8 h	19,4	IT/EC	77	Reaktor/cyklotron

Ze wzgledu na bardzo ograniczoną dostępnosc najbardziej obiecujacych radionuklidow (^{193m}Pt , ^{195m}Pt) lub krótki czas polowicznego rozpadu (^{103m}Rh), wiekszosc badan pilotażowych nad terapią Augera prowadzona jest z ^{111}In i ^{125}I . Poza stosunkowo łatwą dostępnoscia tych radionuklidow o wysokiej aktywnosci wlasciwej, ich niewatpliwą zaletą jest rowniez latwosc koniugacji z różnymi wektorami. Ind-111 na +III stopniu utlenienia tworzy stabilne kompleksy z DTPA (kwas pentetynowy), dzieki czemu moze byc z latwoscia koniugowany do szeregu nosnikow lub wektorow, takich jak peptydy czy przeciwciala. Jod-125 natomiast moze byc latwo i wydajnie wbudowywany w strukture przeciwciala poprzez substitucje elektrofilową w aminach I-rzędowych. Mono- lub dipodstawieniu ulega najczesciej pierścien aromatyczny tyrozyny. Radionuklid przyłączany jest w pozycjach orto- i para- wzgledem grupy hydroksylowej, która ze wzgledu na obecność wolnej pary elektronowej pełni role aktywatora pierścienia i podstawnika kierujacego w wymienione pozycje. Pomimo uzyskiwania odpowiedzi na leczenie, czesto istotnym problemem jest zbyt niska aktywnosc wlasciwa przekladajaca sie nie tylko na ograniczenie efektywnosci dzialania związku, lecz rowniez powodujaca występowanie efektow ubocznych [117–119]. Stosowanie wysokich dawek uniemozliwia dodatkowo towarzysząca rozpadowi indu-111 emisja kwantow γ o duzej intensywnosci (245,35 keV/94%; 171,28 keV/91%).

Drugą grupą badanych klinicznie układow sa związki oddziałujace bezposrednio z DNA na drodze interkalacji lub inkorporacji w jego strukture, znakowane przede wszystkim jodem-125. Radionuklid ten pojawia sie w wielu rodzajach związkw występujacych w postaci 5-jodo-2'-deoksyurydyny oraz antracyklin. Pomimo požadanej, z punktu widzenia terapii Augera lokalizacji w poblizu DNA, obserwowane efekty terapeutyczne sa dalekie od oczekiwanych, co moze wynikać ze stosunkowo niskiej energii elektronow emitowanych z rozpadu ^{125}I [120].

Publikowane sa rowniez prace z ^{195m}Pt w postaci kompleksow *cis*-platyny i bisfosfonianow. Mimo zachęcajacych rezultatow otrzymanych w badaniach *in vitro* i *in vivo*, toksycznosc systemowa *cis*-platyny, czy niewystarczajaca aktywnosc konieczna do badan przedklinicznych, stanowi duze wyzwanie przed rozwijaniem tej strategii terapeutycznej [121–123]. O ile zastosowanie ^{195m}Pt w postaci kompleksow radioaktywnej *cis*-platyny jest mozliwe, o tyle dostepne aktywnosci tego radionuklidu sa zdecydowanie zbyt niskie, by realizowac terapie oparta glownie na dzialaniu ^{195m}Pt . Rola platyny-195m w kompleksach *cis*-platyny przy aktualnie dostępnosciach ^{195m}Pt ograniczona jest jedynie do slabego wzmozczenia efektow terapeutycznych uzyskiwanych od chemoterapeutyku.

Niezwykle ciekawą koncepcje opublikowano niedawno w pracy poswieconej radiobiokoniugatom ^{161}Tb ($t_{1/2} = 6,65$ d) z analogami somatostatyny. Charakterystyka tego radionuklidu zbliżona jest do ^{177}Lu , najpopularniejszego radionuklidu terapeutycznego w medycynie nuklearnej. Interesujacą wlasnoscia terbu-161 jest emisja elektronow Augera i konwersji towarzysząca rozpadowi β^- , co pozwala łączyc dwie strategie terapeutyczne. Przedstawione wyniki badan sa bardzo obiecujace i prezentuja znaczącą przewage ^{161}Tb nad ^{177}Lu , szczególnie w przypadku nieinternalizujacego liganda DOTA-LM3, lokalizujacego sie w błonie komórkowej. Badania te wykazaly, ze błona komórkowa podobnie jak DNA moze byc celem dla radiofarmaceutykow znakowanych emiterami elektronow Augera. Efekty uzyski-

wane przy ukierunkowaniu emitera elektronów Augera na błonę komórkową są według autorów niektórych prac lepsze niż w przypadku lokalizacji radionuklidu wewnątrz komórki, a poza jej jądrem [124,125]. Kaskada elektronów Augera oddziałując z błoną komórkową powoduje tworzenie dużych struktur nazywanych raftami lipidowymi. Aktywują one liczne szlaki sygnałowe prowadzące do generowania reaktywnych form tlenu [126]. Obserwując różnice *in vitro* pomiędzy czystym emitery promieniowania β^- (^{177}Lu) a ^{161}Tb , doskonale widoczna jest rola i potencjał dodatkowo emitowanych elektronów Augera i konwersji. Ze względu na wczesną fazę tych testów, wciąż wymagana jest jednak rozszerzona ewaluacja w postaci badań klinicznych [127]. Pokazuje to jednak, jak ważne i potrzebne jest rozwijanie koncepcji terapeutycznych poświęconych nie tylko terapii Augera w ujęciu indywidualnym, lecz również jako element terapii kombinowanej.

2.2. Nanocząstki jak nośniki radionuklidów - emitery elektronów Augera

Jak opisano w podrozdziale 1.2 jednym z zastosowań nanocząstek jest ich użycie jako radioczułaczy lub czynników pośredniczących w generowaniu efektu terapeutycznego na drodze aktywacji zewnętrznym źródłem energii. Drugim z potencjalnych zastosowań jest wykorzystanie nanocząstek do dostarczania emitery elektronów Augera w postaci radiobiokoniugatów lub jako nośników radionuklidów indukujących emisję elektronów Augera z powierzchni nanocząstki.

Otrzymywane w licznych publikacjach proste radiofarmaceutyki składające się ze skomplexowanego radionuklidu związanego z wektorem są niezwykle pożądane i często stanowią optymalny z punktu widzenia medycyny nuklearnej układ. Niestety, w związku z tym, że terapia elektronami Augera wymaga stosowania zdecydowanie wyższych, niż ma to miejsce dla emitery α i β^- , aktywności, takie podejście nie może być stosowane. Przebiegające z niską wydajnością procesy koniugowania chelatora z wektorami są dodatkowo ograniczone ryzykiem upośledzenia aktywności biologicznej wektora w przypadku zajęcia miejsc wiążących przez cząsteczki kompleksu. Oparcie struktury radiofarmaceutyku na nanocząstkach jest zatem efektem konieczności poszukiwania alternatywnych metod dla zapewnienia dostatecznie dużej aktywności właściwej i wydajnego dostarczania emitery elektronów Augera w okolicy nowotworu.

NOŚNIKI ORGANICZNE

Do najważniejszych grup organicznych nanomateriałów, stanowiących platformy dla emitery elektronów Augera zaliczane są dendrymery i liposomy. Dendrymery, ze względu na stopniowy przebieg procesu syntezy, dają możliwość precyzyjnego formowania monodispersyjnych struktur o ściśle zdefiniowanym kształcie. Obecność licznych grup peryferyjnych stanowi doskonałe miejsce przyłączenia chelatora, co umożliwia uzyskiwanie wysokich aktywności właściwych, czy chemoterapeutyków, zapewniając tym samym multimodalne działanie. Największe zainteresowanie w pracach badawczych skupia się wokół dendrymerów poli(amyloamidowych) – PAMAM, koniugowanych z DTPA/DOXA (tetraksetan) i białkami (np. awidyną o silnym powinowactwie do biotyny). Cechą wyróżniającą te radiobiokoniugaty są szacunkowe teoretyczne aktywności właściwe, przekraczające 30 GBq/ μg uzyskiwane dzięki kilkudziesięciu (>50) cząsteczkom chelatora w przeliczeniu na jedną nanocząstkę [128,129].

Liposomy uznawane są za jedne z najlepszych nanomateriałów dla zastosowań w terapii nowotworów. Łatwość ich syntezy w połączeniu z możliwością enkapsulacji radionuklidów lub chemoterapeutyków przyczynia się do implementowania tych struktur w wiele różnorodnych strategii terapeutycznych. Zalicza się do nich na przykład enkapsulację daunorubicyny znakowanej ^{125}I dla terapii HER2+ nowotworu piersi. Nowocześniejsze koncepcje skupiają się wokół uzyskiwania większej kontroli nad selektywnym dostarczaniem i uwalnianiem zawartości liposomów w komórkach nowotworowych. Elghobary i wsp. zaprojektowali termoczułe liposomy z doxorubicyna znakowaną ^{125}I , z których kontrolowane uwalnianie radiokoniugatu osiągnięto w warunkach podwyższonej temperatury. Owen i wsp. przedstawili natomiast koncepcję wykorzystania ultradźwięków jako czynników pośredniczących w procesie uwalniania peptydu hEGF (*ang. human epidermal growth factor*/ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu) znakowanego ^{111}In [130–132].

Spośród nanocząstek pochodzenia organicznego jedną z proponowanych koncepcji są także micelle kopolimerów blokowych (BCM – *ang. block copolymer micelles*). Są to struktury o właściwościach amfifilowych, składające się z hydrofobowego rdzenia otoczonego hydrofilową koroną. Mogą być one stosowane do enkapsulacji radionuklidów w rdzeniu lub do koniugacji z chelatorami, poprzez elementy korony. Jednym z układów tego typu, przedstawionych w pracy Hoang i wsp. [133], jest radiobiokoniugat składający się z radiouczulacza (metotreksatu; 1) umieszczonego wewnątrz rdzenia, radionuklidu ^{111}In przyłączonego do korony z użyciem DTPA (2) oraz wektora – trastuzumabu (3), do którego przyłączono dodatkowo (4) peptyd NLS (*ang. nuclear localization signal*; GYGPKKKRKVGG), dla umożliwienia wewnątrzjądrowej lokalizacji związku. W przedstawionej pracy wykazano synergiczny efekt pochodzący od indu-111 oraz metotreksatu, dowodząc możliwości równoczesnego dostarczania składników radiofarmaceutyku do komórki. Innym przykładem związków projektowanych w bardzo podobnym ujęciu są również radiobiokoniugaty oparte na polimerach chelatujących metale (MCP – *ang. metal chelating polymers*), stosowane w celu zwiększenia aktywności właściwej radionuklidu. Osiągane jest to dzięki zastosowaniu MCP jako czynnika bezpośrednio koniugowanego z chelatorem, co umożliwia przyłączenie większej liczby cząsteczek chelatora względem bezpośredniej koniugacji z przeciwciałem [134].

Drugą kategorią organicznych nanoosników wykorzystywanych jako potencjalne radiofarmaceutyki w terapii Augera są nanocząstki oparte na streptawidynie, tetramerycznym białku o masie molowej wynoszącej około 60 kDa [135,136]. Struktury te stanowią najczęściej nośniki dla ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i ^{125}I ze względu na łatwość kompleksowania tych radionuklidów. W procesach syntetycznych wykorzystywane jest silne powinowactwo tego białka do biotyny, stanowiące jedno z najsilniejszych niekowalencyjnych oddziaływań w przyrodzie, ze stałą dysocjacji wynoszącą 10^{-14} mol/L. Podobnie jak w przypadku BCM, nanocząstki te mogą być dodatkowo funkcjonalizowane wektorem. Innymi przykładami cząsteczek wchodzących w skład syntetyzowanych radiobiokoniugatów są peptydy, umożliwiające lokalizację wewnątrzkomórkową i wewnątrzjądrową. Zalicza się do nich peptyd tat (GRKKRRQRRPQ) skoniugowany z sekwencją NLS, a także oligomery morfoliny zaprojektowane jako czynniki umożliwiające interakcje z DNA i RNA. Pomimo obiecujących wstępnych wyników *in vitro*, dalsze badania komórkowe, jak również ewaluacja *in vivo* wykazały wiele mankamentów związanych z selektywnością i problematyczną biodystrybucją.

Jedną z najnowszych koncepcji są nanomicelle zbudowane z radioczułacza (chloryna e6) oraz amfifilowych polimerów. Koncepcja ta opiera się na zwiększeniu wychwytu radiobiokoniugatu poprzez wykorzystanie radioczułających właściwości chloryny e6 i indukowanych pod wpływem promieniowania podczerwonego uszkodzeń naczyń krwionośnych guza. Dzięki wydajnemu uwolnieniu kurkuminy znakowanej ^{125}I , możliwe jest uzyskanie wysokiej lokalizacji w jądrze komórkowym bezpośrednio przekładającej się na wymierne efekty terapeutyczne. Wyniki te, zweryfikowane zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, dostarczyły bardzo obiecujących rezultatów, wykazując wysoką skuteczność poprzez indukowanie licznych uszkodzeń DNA [137].

NOŚNIKI NIEORGANICZNE

Nośniki emiterów elektronów Augera wykonane z nieorganicznych nanocząstek stanowią zdecydowanie mniej rozbudowaną pod względem różnorodności grupę materiałów. Wynika to z faktu, że kompozyty organiczne ze względu na swoją naturę posiadają większe możliwości zróżnicowania funkcjonalizacji. Pomimo tego, duża część publikowanych prac badawczych skupia się na nanocząstkach nieorganicznych, eksponując zalety także tej grupy nanomateriałów. W tym przypadku wyróżnić można dwie zasadnicze grupy – radio(bio)koniugaty oparte na metalicznych nanocząstkach złota oraz nanomateriały wykonane z tlenku tytanu.

Nanocząstki złota o średnicach rzędu 5-60 nm stosowane są, podobnie jak ich organiczne odpowiedniki, głównie jako nośniki dla ^{111}In i ^{125}I . Podobieństwa dotyczą nie tylko samych radionuklidów lecz również sposobu ich włączania w strukturę radiobiokoniugatu za pośrednictwem chelatora (^{111}In) lub radiojodowanych przeciwciał i bezpośredniej sorpcji na powierzchni metalu (^{125}I). Głównymi wektorami w opisywanych pracach pozostają cząsteczki ukierunkowane na receptory z grupy naskórkowego czynnika wzrostu takie jak EGFR czy HER2. Problematiczna biodystrybucja skutkująca tendencją do akumulacji w śledzionie i wątrobie wyklucza jednak, pomimo stosowania wektora, podanie systemowe, ograniczając tym samym opracowywane strategie do formy nanobrachyterapii [138–140].

Opisując zastosowanie nieorganicznych nanocząstek jako nośników emiterów Augera, należy uwzględnić także ich aplikację jako materiałów zdolnych do emisji fotolektronów ze swojej powierzchni. Zjawisko to po raz pierwszy opisane zostało przez Pronschinske i wsp. gdy wykazali oni 600% amplifikację niskoenergetycznych elektronów w układzie ^{125}I -Au, w porównaniu do ^{125}I [141]. Rozwinięciem tej koncepcji stanowią prace poświęcone immobilizacji ^{169}Yb na powierzchni AuNPs i $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na powierzchni nanocząsteczkowych polimerów modyfikowanych hafnem. W obydwu przypadkach wykorzystywane jest zjawisko emisji wtórnych fotolektronów generowanych na powierzchni metalu, jednak są to prace będące wciąż na wstępnym etapie realizacji [142, 143].

Inną od dotychczas opisywanych koncepcji stosuje się w przypadku nanocząstek tlenku tytanu (TiO_2). Wykorzystując ich katalityczne właściwości, możliwe jest zintensyfikowanie wtórnej produkcji wolnych rodników. Elektrony Augera emitowane podczas rozpadu ^{125}I indukują redukcję jonów Ti^{4+} do Ti^{3+} . Powstałe jony oddziałują z cząsteczkami wody obecnymi w cytozolu, rozciągając wiązanie O-H i obniżając tym samym jego energię. Obecne w komórce promieniowanie γ (pochodzącego również z rozpadu ^{125}I) doprowadza do radiolizy wody skutkującej powstawaniem rodnika hydroksylowego. Wstępne badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazały duży potencjał tej nowoczesnej koncepcji wykorzystania elektronów Augera w terapii [144].

2.3. Radionuklidy ^{193m,195m,197}Pt, metody ich produkcji oraz ich właściwości

Spośród 36 izotopów platyny, jedynie cztery wykazują właściwości, pozwalające rozważać ich użycie w postaci radiofarmaceutyków terapeutycznych. Metastabilne radionuklidy platyny (^{193m}Pt i ^{195m}Pt) poza bardzo dobrymi właściwościami jądrowymi (okres półrozpadu, długożyciowe lub stabilne produkty rozpadu), posiadają również szereg cech chemicznych, predysponujących je do wykorzystania jako radionuklidy terapeutyczne. Platyna, jako pierwiastek z grupy metali przejściowych, posiada dobrze poznane i szeroko wykorzystywane w przemyśle właściwości katalityczne [145]. Wysoka i selektywna reaktywność w środowisku silnie utleniającym może być elementem strategii walki z niektórymi nowotworami, charakteryzującymi się określonym TME. Dzięki temu, zastosowanie radionuklidów platyny niesie ze sobą szereg korzyści, do których zalicza się:

- terapię skojarzoną, łączącą efekt radio- i chemoterapeutyczny,
- zwiększoną selektywność – katalityczne właściwości platyny aktywowane jedynie w środowisku utleniającym,
- teoretyczną możliwość obserwacji postępów leczenia i kumulacji związku w organizmie, z wykorzystaniem SPECT ($E_{\gamma} = 98,9 \text{ keV}$).

Innymi radionuklidami platyny, które mogą stanowić alternatywę dla wymienionych wyżej są ¹⁹¹Pt ($t_{1/2} = 2,83 \text{ d}$; EC) i ¹⁹⁷Pt ($t_{1/2} = 19,9 \text{ h}$; β^{-}). Ich wykorzystanie ogranicza się jednak jedynie do badań podstawowych, ze względu na niski potencjał terapeutyczny niewielkiej liczby elektronów Augera (¹⁹¹Pt) lub stosunkowo krótki okres półrozpadu (¹⁹⁷Pt) i dużą konkurencję lepiej poznanych i scharakteryzowanych emiterów promieniowania β^{-} .

Pomimo szeregu zalet, głównym czynnikiem ograniczającym szerokie zastosowanie ^{193m}Pt i ^{195m}Pt jest trudność ich produkcji. Przedstawione w tabeli 3 metody produkcji tych radionuklidów związane są z wieloma przeszkodami, których pokonanie jest trudne lub wręcz niemożliwe.

Tabela 3. Metody produkcji ^{193m}Pt i ^{195m}Pt.

	Tarcza (% wzbogacenia)	Reakcja jądrowa	Strumień/ energia	Czas aktywacji	Aktywność
Cyklotron	¹⁹² Os (99,65%)	¹⁹² Os(α, n) ^{195m} Pt	$E_{\alpha} = 40 \rightarrow 30 \text{ MeV}$	1 h	0,06 MBq/ μ Ah
		¹⁹² Os($\alpha, 3n$) ^{193m} Pt		(0,1 μ A)	10 MBq/ μ Ah
Reaktor	¹⁹² Pt (57%)	¹⁹² Pt(n, γ) ^{193m} Pt	$4 \times 10^{14} \text{ n/cm}^2/\text{s}$	7 d	0,06 MBq/mg
	¹⁹⁴ Pt (>95%)	¹⁹⁴ Pt(n, γ) ^{195m} Pt	$\sim 10^{15} \text{ n/cm}^2/\text{s}$	8 d	21,4 MBq/mg
	¹⁹³ Ir (>99%)	¹⁹³ Ir(n, γ) ¹⁹⁴ Ir(n, γ) ¹⁹⁵ Ir(β^{-}) ^{195m} Pt [$\sim 50\%$]	$\sim 10^{15} \text{ n/cm}^2/\text{s}$	7 d	0,7 MBq/mg*

*Dane szacunkowe, oparte na obliczeniach, które przeprowadził prof. Ulli Koester (Institute Laue-Langevin (ILL) w Grenoble)

Metastabilne radionuklidy platyny mogą być otrzymywane zarówno metodą reaktorową, jak i cyklotronową. Obydwie drogi produkcji są jednak w dużej mierze oparte na doniesieniach literaturowych,

bazujących na właściwościach platyny, a także teoretycznych wariantach i wydajnościach aktywacji materiałów tarczowych. Praktyczna ewaluacja opisywanych w publikacjach metod utrudniona jest ze względu na niewielką dostępność wymaganych materiałów tarczowych, urządzeń i brak wartościowych danych eksperymentalnych.

Metoda cyklotronowa wymaga użycia urządzeń operujących wiązkami alfa o wysokich energiach ($E_\alpha = 40 \rightarrow 30$ MeV) i tarcz osmowych (^{192}Os) o bardzo wysokim stopniu wzbogacenia (>99%). W efekcie aktywacji, zawartość produktów ubocznych jest na stosunkowo niskim poziomie (5-10%) i stanowią je głównie ^{191}Pt oraz $^{195\text{m}}\text{Pt}$ (w przypadku reakcji $\alpha, 3n$). Z punktu widzenia czystości radiochemicznej nie jest to więc problematyczne, gdyż ^{191}Pt może być również stosowana jako emiter elektronów Augera. Rzeczywiste wydajności reakcji osiągają jednak wartości zdecydowanie poniżej oczekiwanych i wymaganych dla rozważania zastosowań terapeutycznych ich produktów. Na drodze do wysokich aktywności właściwych stają niski przekrój czynny dla $^{195\text{m}}\text{Pt}$ (5-10 mb) oraz ograniczona dostępność cyklotronów o odpowiednich energiach, co nawet przy wysokim przekroju czynnym dla $^{193\text{m}}\text{Pt}$ (1,5 b) nie daje możliwości wydajnej produkcji tego radionuklidu [146–148]. Niskie aktywności właściwe stosowane są do badań poświęconych radioaktywnej *cis*-platynie, gdyż w tym przypadku wykorzystuje się ją głównie do znakowania radiofarmaceutyków platynowych i śledzenia ich biodystrybucji.

Produkcja reaktorowa $^{193\text{m}}\text{Pt}$ i $^{195\text{m}}\text{Pt}$ może odbywać się na drodze bezpośredniej aktywacji lub metodą pośrednią, polegającą na dwuetapowej aktywacji tarczy ^{193}Ir [149,150]. W porównaniu do metod cyklotronowych, produkcja w reaktorach z wykorzystaniem strumieni $>10^{14}$ n/cm²/s prowadzi do zdecydowanie niższych aktywności właściwych oraz licznych, często trudnych lub niemożliwych do usunięcia produktów ubocznych. Nawet wykorzystanie reaktorów wysokostrumieniowych ($>10^{15}$ n/cm²/s), nie rozwiązuje problemu niskich wydajności procesu aktywacji. Ponad 200-godzinna aktywacja tarczy (^{194}Pt) o wzbogaceniu powyżej 95% skutkowałą otrzymaniem „jedynie” 21,4 MBq/mg tarczy [149], co przy bardzo wysokim koszcie (60\$/mg) tarczy i znikomej jej dostępności, czyni tę metodę nieopłacalną. Dwuetapowa aktywacja tarczy ^{193}Ir stanowi natomiast jedynie teoretyczną alternatywę dla metody bezpośredniej. Nieznany i trudny do obliczenia przekrój czynny, czy praktycznie nierozpuszczalna tarcza irydowa to główne powody, dla których metoda ta nie jest obecnie rozwijana. Istotnym problemem jest także możliwość aktywacji jedynie 1-2 mg tarczy ze względu na duże aktywności produktów ubocznych, takich jak $^{192,194,194\text{m}}\text{Ir}$. Szczególnie aktywność ^{192}Ir w naświetlonej tarczy jest bardzo wysoka, co znacznie utrudnia jej bezpieczny przerób. Ponadto, ze względu na przebieg reakcji jądrowych, otrzymywana w procesie $^{195\text{m}}\text{Pt}$ jest w stosunku ~1:1 z nośnikiem (^{195}Pt), co znacząco obniża jej aktywność właściwą [150]. Obliczenia teoretyczne, które przeprowadził prof. Ulli Koester i wstępne badania aktywacji wskazują, że aktualnie zastosowanie do terapii radionuklidów $^{193\text{m}}/^{195\text{m}}\text{Pt}$ jest praktycznie niemożliwe, gdyż do terapii jednego pacjenta potrzebne są pojedyncze dawki rzędu 5-10 GBq (porównując ze ^{125}I UdR), nieosiągalne w obecnych warunkach, ze względu na szereg ograniczeń technologicznych.

2.4. Radionuklid ^{125}I w terapii elektronami Augera

Słaba dostępność emiterów Augera o najbardziej pożądanym właściwościach sprawia, że konieczne jest poszukiwanie alternatywnych rozwiązań, mogących w przyszłości pozwolić na wprowadzenie tego typu leczenia do praktyki klinicznej. Jednym z radionuklidów mogących stanowić substytut m.in.

$^{193m,195m}\text{Pt}$ jest jod-125, który może być wytwarzany metodą reaktorową na drodze dwóch podobnych reakcji jądrowych, różniących się stanem energetycznym produktu pośredniego (^{125}Xe): $^{124}\text{Xe}(n,\gamma) \rightarrow ^{125m}\text{Xe}$ (28 b; 57s) $\rightarrow ^{125}\text{I}$ oraz $^{124}\text{Xe}(n,\gamma) \rightarrow ^{125g}\text{Xe}$ (137 b; 19.9 h) $\rightarrow ^{125}\text{I}$. Słabą stroną tej drogi wytwarzania jest wysoki przekrój czynny ^{125}I (900 b), co przy dłuższej aktywacji prowadzi do powstania ^{126}I ($t_{1/2} = 13$ d, β^-), szczególnie w przypadku użycia naturalnej tarczy ksenonowej. W celu minimalizacji poziomu jodu-126 stosuje się wzbogacane tarcze ksenonowe, których aktywacja skutkuje śladową zawartością ^{126}I , lub wydłużenie chłodzenia tarczy doprowadzające do jego rozpadu. W przypadku zastosowania w reaktorze naturalnej tarczy ksenonowej cyrkulacja gazu może być wykorzystywana jako dodatkowa metoda obniżająca zawartość ^{126}I w produkcie.

Najważniejszymi korzyściami stosowania ^{125}I są:

- komercyjna dostępność produktu o wysokiej aktywności właściwej (>600 GBq/mg),
- niewielka zawartość zanieczyszczeń (^{126}I ; 0.005%),
- możliwość uzyskania dawek terapeutycznych,
- dużo prostszy proces rozdzielania i oczyszczania (ważne szczególnie w kontekście bardzo ograniczonej rozpuszczalności platyny i irydu),
- możliwość uzyskania wysokiej aktywności właściwej w koniugatach nanocząstkowych.

Potencjał terapeutyczny ^{125}I ze względu na jego właściwości jądrowe jest mniejszy niż $^{193m,195m}\text{Pt}$, natomiast, doskonale poznana chemia tego halogenu i wykorzystywanie obecnie radionuklidów jodu w procedurach diagnostycznych (SPECT, PET) czynią zasadnym rozważanie ^{125}I jako radionuklidu terapeutycznego (tabela 4).

Tabela 4. Porównanie właściwości radiochemicznych ^{125}I , ^{193m}Pt oraz ^{195m}Pt .

Radionuklid	Elektrony Augera		Elektrony konwersji	
	Liczba \bar{e} /rozpad	Średnia energia na \bar{e} [keV]	Liczba \bar{e} /rozpad	Średnia energia na \bar{e} [keV]
^{125}I	23,0	0,5	0,9	7,7
^{193m}Pt	27,0	0,4	3,0	42,4
^{195m}Pt	37,0	0,8	2,8	58,1

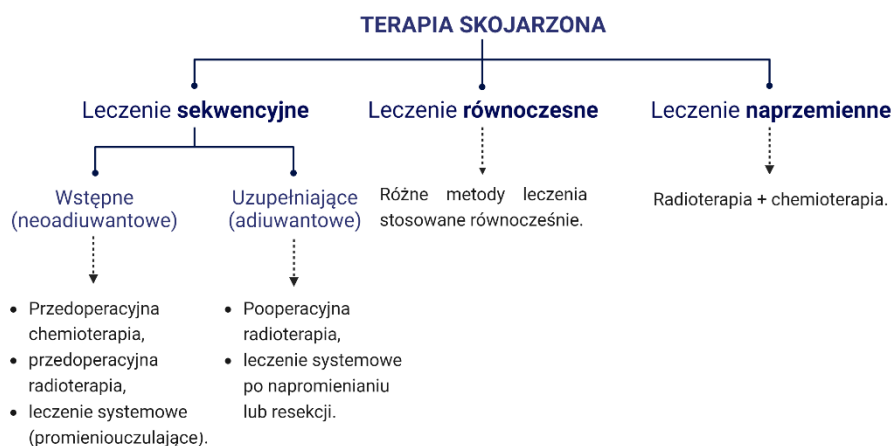
Przewidując efektywność terapeutyczną ^{125}I w porównaniu do ^{193m}Pt i ^{195m}Pt na podstawie ich właściwości jądrowych, należy spodziewać się słabszego niż dla platyny efektu terapeutycznego. O ile w przypadku elektronów Augera różnice nie są drastycznie duże, o tyle w przypadku elektronów konwersji uwidacznia się mankament tego radionuklidu. Emitowane w mniejszej liczbie i o kilkukrotnie niższej energii elektrony konwersji jodu-125 stanowią znacznie mniejszą siłę rażenia w porównaniu do obydwu omawianych radionuklidów platyny. Koncepcja terapeutycznego zastosowania jodu-125 jest szeroko stosowana i rozwijana w pracach badawczych w postaci różnych radiokoniugatów, np. $^{125}\text{I}UdR$ czy $^{125}\text{I}PARPi-01$ (nuclear protein Poly (ADP-ribose)-Polymerase 1) [151,152]. Możliwość otrzymywania różnorodnych jodowanych związków organicznych jest niewątpliwą zaletą, stanowiącą istotny benefit względem radionuklidów platyny. Problemem tego typu związków, ukierunkowanych na oddziaływanie

z DNA (IUDR) lub ingerencją w mechanizmy naprawcze DNA (PARP), jest niska selektywność powodująca występowanie częstych i intensywnych działań niepożądanych.

Jedną z możliwości efektywnego dostarczenia ^{125}I do komórek nowotworowych jest rozwijana w Pracowni Chemii Radiofarmaceutycznej IChTJ koncepcja immobilizacji ciężkich halogenków na powierzchni nanocząstek metali. Wykorzystując ich silne powinowactwo do metali szlachetnych, możliwe jest wytworzenie wiązania kowalencyjnego metal-halogenek, o sile wiązania rosnącej w szeregu $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I} < \text{At}$ [81,82,88,153]. Dotychczas opublikowane prace obejmowały zastosowanie nanocząstek złota, jako materiału nośnikowego. Nową koncepcją, realizowaną w Pracowni jest wykorzystanie nanocząstek platyny, co pozwoliłoby na zaprojektowanie terapii skojarzonej „chemo-Auger” łączącej wysoką selektywność nanocząstek platyny, indukujących stres oksydacyjny w określonym mikrośrodkowisku guza, z działaniem elektronów Augera. Zaprojektowanie radiokoniugatu mającego zdolność internalizacji do jądra komórkowego pozwoliłoby na selektywne dostarczenie ^{125}I w pobliże materiału genetycznego. Jedną z możliwości efektywnego wprowadzania ^{125}I do jądra komórkowego jest desorpcja radionuklidu w środowisku silnie utleniającym. Proces ten jest wysoce prawdopodobny, gdyż jod *in vitro* ulega szeregowi przemian w obecności nadtlenu wodoru, szeroko opisywanych w literaturze [154,155]. Przedstawione strategie są szczególnie istotne przy rozważaniu nowotworów o dużej heterogeniczności i braku dobrze rozpoznanych i zdefiniowanych celów molekularnych na powierzchni błony komórkowej. Dzięki temu, przy braku możliwości aktywnego celowania w określone białka transbłonowe, powinno być możliwe uzyskanie wysokiej selektywności podczas procesu terapeutycznego.

2.5. Terapia skojarzona

Terapią skojarzoną określa się procedurę leczenia obejmującą implementację różnych strategii terapeutycznych dla uzyskania najlepszych efektów w walce z nowotworami złośliwymi, cechującymi się zwiększoną proliferacją, pierwotną lub nabytą lekoopornością, a także skłonnością do przerzutowania i wznowy [156]. Klasyczny schemat postępowania w przypadku wdrożenia tej metody leczenia obejmuje terapię sekwencyjną, równoczesną i leczenie naprzemienne (rysunek 6).



Rysunek 6. Terapia skojarzona – strategie jej wykorzystywania.

Terapia skojarzona pozwala na uzyskanie wielu korzyści, w tym celu nadrzędnego, jakim jest zwiększenie efektywności samego leczenia i długoterminowej remisji. Skuteczność tego schematu wynika z szeregu czynników, związanych z pokonaniem heterogeniczności klonalnej tego samego typu nowotworu u różnych pacjentów i uzyskaniem synergicznego lub addytywnego efektu podawanych leków. Ponadto, kombinacja schematów lekowych jest często niezbędna dla umożliwienia wykonania resekcji chirurgicznej i pozwala znacząco obniżyć dawki poszczególnych leków, redukując tym samym częstość i intensywność działań niepożądanych [157,158].

Mnogość zalet, jakie niesie za sobą terapia skojarzona nie jest tożsama z jej doskonałością i uniwersalnością. Istnieje wiele czynników stanowiących wyzwanie przy wprowadzaniu tego schematu postępowania lub jego rozwijaniu. Poza czynnikami biochemicznymi, takimi jak interakcje lekowe i farmakokinetyka, wiele nowotworów wciąż pozbawionych jest skutecznych protokołów terapeutycznych. Rozważanie terapii skojarzonej jest w takich przypadkach jedynie punktem wyjściowym do planowania nowych strategii leczenia. Pomimo rosnącego postępu w diagnostyce i terapii nowotworów, wciąż widoczne są ogromne potrzeby projektowania nowych terapii. Konieczne jest poszukiwanie nowych dróg dostarczania leków i wywoływania pożądaných odpowiedzi na leczenie, nie tylko wykorzystując znane już farmaceutyki, lecz także wdrażając nowe [159].

Jednym z nowotworów, charakteryzujących się wyjątkowo dużą trudnością leczenia jest agresywny i oporny na leczenie rak wątrobowokomórkowy. Niejednoznaczne i ukryte objawy przyczyniają się do opóźnionej diagnostyki, przez co sam proces leczenia rozpoczynany jest w momencie, gdy nowotwór osiąga znaczny stopień zaawansowania. Ponadto, wysoka heterogeniczność guza związana z licznymi modyfikacjami szlaków sygnałowych i złożona patofizjologia, komplikują nie tylko opracowanie skutecznych strategii terapeutycznych, ale przyczyniają się również do utrudnienia wyboru optymalnej ścieżki leczenia [160]. Potrzeba opracowywania nowych terapii wynika ze stosunkowo niskiej skuteczności szeregu terapii, na których opierają się obecne protokoły kliniczne obejmujące działanie miejscowe (embolizacja – TACE/TACE-DEB/TARE, *ang. transarterial chemo/radioembolization, TACE/TARE; drug eluting beads – DEB*), systemowe (chemioterapeutyki) i obejmujące ukierunkowanie molekularne (głównie inhibitory kinaz białkowych, np. sorafenib/Nexavar®), sunitinib/Sutent®) [161,162].

Kierunkiem, który wskazywany jest jako kluczowy dla poprawy efektów leczenia w tak złożonych nowotworach jest multimodalność stosowanych terapii [163]. Interesującą koncepcją leczenia HCC może być wykorzystanie fizjologii guza, którego środowisko, ze względu na jego etymologię i anatomiczną funkcję wątroby, często wykazuje właściwości silnie utleniające [164,165]. Zaprojektowanie leku niejako aktywującego swoje działanie w ściśle określonych warunkach, daje unikalną okazję uzyskania wysokiej selektywności, a połączenie dwóch lub więcej możliwości indukowania śmierci komórki, pozwala spodziewać się wysokiej skuteczności terapeutycznej. Przykładem tego jest badana w ramach niniejszej pracy koncepcja „chemo-Auger” terapii, łączącej chemotoksyczność indukowaną nanocząstkami platyny z radiotoksycznością emitera elektronów Augera, selektywnie indukowanych jedynie w środowisku komórek docelowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3. Wykorzystywane odczynniki

3.1. Odczynniki chemiczne

- Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ, USA):

Kwas chloroplatynowy ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); kwas chlorozłotowy ($\text{H}_2\text{AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$); heksachloroplatynian sodu ($\text{Na}_2\text{PtCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$); chlorek platyny (II) (PtCl_2); rodizonian sodu 97% ($\text{C}_6\text{Na}_2\text{O}_6$); węgiel sodu (Na_2CO_3); wodorowęgiel sodu (NaHCO_3); chlorek sodu (NaCl); wodorotlenek sodu (NaOH); wodorotlenek potasu (KOH); kwas solny (HCl); kwas askorbinowy ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$); heterobifunkcyjny poli(tlenek etylenu) (HS-PEG-COOH, 5 kDa); N-acetylo-L-cysteina (NAC); nadtlenuk wodoru 30% (H_2O_2); L-glutation zredukowany (GSH); L-sulfoksymina butioniny (L-BSO); albumina surowicy bydłowej (BSA); N-etylomaleimid (NEM); kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA); triton X-100; kwas fosforowy (H_3PO_4); ditionin sodu ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$); o-ftalaldehid (OPA); alkohol metylowy i etylowy (MeOH/EtOH); kwas trichlorocotowy (TCA).

- Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA):

Chlorometylowa pochodna fluoresceiny H_2DCFDA (CM- H_2DCFDA); annexin-V FITC z buforem do koniugacji; jodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3R,6R-diphenylglycouril); Pierce™ BCA Protein Assay Kit; hoechst 33258, jodek propidyny ($\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{N}_4$), przeciwciało anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), klon JBW301; przeciwciało anti-Mouse IgG (H+L) skoniugowane z barwnikiem CF™ 633; staurosporyna; sól fizjologiczna buforowana trisem (TBS); Tween 20.

- Pozostałe:

Kwas dietylenotriaminepentaoctowy (DTPA) - ChemaTech (Dijon, Francja); Orthopyridyldisulfide-polyethyleneglycol-succinimidyl carboxymethyl ester (OPSS-PEG-NHS, 5 kDa) - Creative PEGworks (Chapel Hill, NC, USA). Trastuzumab wyizolowano z komercyjnie dostępnych leków: Herceptin® (Roche Pharmaceuticals, Basel, Szwajcaria), Ogivri® (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV, USA) oraz Kanjinti® (Amgen, Center Drive Thousand Oaks, CA, USA) z użyciem koncentratorów wirówkowych Vivaspin o odcięciu membrany 50 kDa (Sartorius, Goettingen, Niemcy). Koniugat SP94-DOTA zakupiono z firmy CASLO ApS (Kongens Lyngby, Dania).

3.2. Odczynniki biologiczne

- Biological Industries (Beth Haemek, Izrael)

Media hodowlane: EMEM; DMEM, McCoy's 5A; trypsyna EDTA roztwór C; woda komórkowa; sól fizjologiczna buforowana fosforanami bez jonów magnezu i wapnia (PBS); barwnik Trypan Blue; surowica płodu cieląt (FBS); penicylina-streptomycyna (penicylina 10000 jedn./ml, streptomycyna 10 mg/ml).

- Pozostałe:

CellTiter96® AQueous One Solution Reagent (odczynnik MTS) - Promega (Mannheim, Niemcy). Linie komórkowe: HepG2, SKOV-3, HeLa, MDA-MB-231, BT-474 zakupiono z American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) i hodowano zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta.

Wszystkie roztwory przygotowywano z użyciem wody dejonizowanej o oporności 18.2 MΩ·cm (Hydrolab, Straszyn, Polska). Wymienione odczynniki – o ile nie opisano inaczej – były jakości cz.d.a (czyste do analizy) i używano ich bez dodatkowego oczyszczania.

4. Techniki i aparatura pomiarowa

4.1. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Zjawisko dynamicznego rozpraszania światła (*ang.* DLS - *dynamic light scattering*) zostało wykorzystane do wstępnej charakterystyki zsyntetyzowanych nanocząstek oraz ich dalszych modyfikacji. Analizowano średnicę hydrodynamiczną oraz potencjał zeta (ζ), pozwalające określić rozmiar nanocząstek w roztworze, śledzić postępy reakcji oraz ocenić stabilność otrzymanych koloidów. Każdorazowo, próbkę rozcieńczano 1:10 wodą dejonizowaną i umieszczano w U-kształtnej kapilarnej celce pomiarowej (DTS 1070, Malvern, Wielka Brytania). W badaniach stabilności, pomiary przeprowadzono dodatkowo w roztworach soli fizjologicznej oraz PBS i tych mediów używano do rozcieńczania analizowanej próbki. Do badań wykorzystano aparat Zetasizer NanoZS firmy Malvern (Malvern, Wielka Brytania).

4.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)/transmisyjna mikroskopia elektronowa wysokiej rozdzielczości (HR-TEM)

Obrazowanie z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej miało na celu zmierzenie rozmiaru nanocząstek oraz potwierdzenie sferycznego kształtu zsyntetyzowanych nanocząstek. Ponadto technika ta charakteryzuje się większą dokładnością pomiaru, dzięki czemu możliwe było określenie precyzyjnej średnicy nanocząstkowego rdzenia bez uwzględnienia wpływu na jego wartość czynników stabilizujących.

Wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa z mapowaniem powierzchni została wykorzystana do obrazowania rozmieszczenia atomów platyny na powierzchni nanocząstki typu core-shell. Ze względu na potencjalne zastosowanie tego rodzaju nanomateriału do terapii elektronami Augera, istotnym aspektem było uzyskanie jednorodnej warstwy platyny na powierzchni zewnętrznej nanocząstki złota. HR-TEM umożliwił zaobserwowanie depozycji na poziomie pojedynczych atomów, dzięki czemu potwierdzono uzyskanie oczekiwanego efektu syntezy.

Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopów TEM - Zeiss Libra 120 Plus (Jena, Niemcy) oraz HR-TEM - TALOS F200X (ThermoFisher, Madison, WI, USA). Próbki (3-5 μ L) rozcieńczone w 1 mL wody nanoszono na standardowo wykorzystywane siatki miedziane.

4.3. Techniki spektroskopowe – UV-Vis, spektrofluorymetria

Spektroskopia UV-Vis wykorzystywana była do pośredniego potwierdzenia rozmiaru syntetyzowanych nanocząstek. W zależności od średnicy nanocząstek maksimum absorpcji przesuwają się w kierunku wyższych długości fal w zakresie 510-560 nm. W celu rejestracji widma nanocząstki rozcieńczano 1:10 wodą dejonizowaną i umieszczano w kuwecie pomiarowej.

Pomiar absorbancji dla $\lambda = 280$ nm wykorzystano przy oznaczaniu stężenia oczyszczanego przeciwciała monoklonalnego (trastuzumabu). Do obliczeń wykorzystano wartość molowego współczynnika ekstynkcji (ϵ) $225000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [166]. Wszystkie analizy przeprowadzono w kuwetach o objętości 1 mL z wykorzystaniem aparatu Evolution 600 (ThermoFisher, Madison, WI, USA).

Pomiary spektroskopowe wykorzystano także podczas badań *in vitro*. Analiza spektrofotometryczna umożliwiła ocenę cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTS poprzez rejestrację absorbancji przy długości fali $\lambda = 490$ nm (Berthold LB913, Bad Wildbad, Niemcy). Podczas detekcji stresu oksydacyjnego stosowano natomiast fluorescencyjne pomiary sondy CM-H₂DCFDA (ThermoFisher, Madison, WI, USA) o $\lambda_{\text{Ex}} \sim 495$ nm i $\lambda_{\text{Em}} \sim 525$ nm. Do tych pomiarów wykorzystano aparat Berthold Tristar 3 (Bad Wildbad, Niemcy).

4.4. Mikroskopia konfokalna i fluorescencyjna

Mikroskopię konfokalną wykorzystano do obrazowania kumulacji nanocząstek i ich biokoniugatów w komórkach nowotworowych. W tym celu poza obrazowaniem barwników fluorescencyjnych (FITC – $\lambda_{\text{Em}} = 525$ nm oraz Hoechst 33258 – $\lambda_{\text{Em}} = 460$ nm) wykonano również zdjęcia techniką jasnego pola. Dzięki temu możliwa była wizualizacja zarówno fluorescencyjnych składników biokoniugatu i jądra komórkowego, a także samych nanocząstek, których metaliczny charakter powodował punktowe przysłanianie światła padającego. Ponadto, mikroskopię konfokalną wykorzystano przy obrazowaniu podwójnie niciowych pęknięć DNA (CF633 – $\lambda_{\text{Em}} = 650$ nm). Obrazowanie przeprowadzono z użyciem mikroskopów Zeiss LSM800 (Jena, Niemcy) oraz Olympus FV-1000 (Tokio, Japonia).

Obrazowanie fluorescencyjne zostało wykorzystane do wizualizacji cytotoksycznego działania otrzymanych koniugatów na trójwymiarowe modele guza (sferoidy). W tym celu, stosując barwniki fluorescencyjne, wizualizowano wszystkie komórki wchodzące w skład sferoidu (hoechst 33258) oraz komórki, które wykazywały właściwości apoptotyczne i nekrotyczne (jodek propidyny - $\lambda_{\text{Em}} = 617$ nm). Do wizualizacji barwników fluorescencyjnych i samych steroidów wykorzystano mikroskop Zeiss AxioVert A.1 (Jena, Niemcy).

4.5. Cytometria przepływowa

Wykorzystanie cytometrii przepływowej pozwoliło na dokładne określenie cytotoksycznego działania zsyntetyzowanych koniugatów na komórki nowotworowe. Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwe było rozróżnienie populacji komórek żywych oraz będących w stanie wczesnej/późnej apoptozy i nekrozy. Dostarczyło to wielu istotnych informacji odnośnie tempa indukowanych nanocząstkami zmian oraz ich mechanizmu. Ponadto, ocenie poddano również fazę cyklu komórkowego, w jakiej nastąpiło jego zatrzymanie, jako bezpośredni efekt toksycznego działania badanych związków. W tym celu wykorzystano

skoniugowaną z FITC aneksynę-V, jako związek selektywnie wiążący się z fosfatydyloseryną – transbłonowym markerem apoptozy, oraz jodek propidyny – interkalujący do DNA komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Analizy przeprowadzono z użyciem cytometru BD FACSCelesta (East Rutherford, NJ, USA).

5. Metodyka przeprowadzonych badań

5.1. Otrzymywanie radionuklidów $^{195m,197}\text{Pt}$ oraz $^{125,131}\text{I}$

Radionuklidy jodu w postaci bezośnikowej otrzymano z Ośrodka Radioizotopów POLATOM w Świerku. Aktywność właściwa dostarczonych izotopów wynosiła >600 GBq/mg (^{125}I) oraz >550 GBq/mg (^{131}I), a ich postać chemiczna to wodny roztwór jodku sodu o pH 10-12 ustalonym przy użyciu NaOH (^{125}I) lub buforu węglanowego (^{131}I). Czystość radionuklidowa według informacji producenta wynosiła $>99\%$.

Lutet-177 (POLATOM, Świerk) użyty został w badaniach powinowactwa receptorowego peptydu SP94 skoniugowanego z chelatorem DOTA (SP94-DOTA. Chlorek lutetu ($^{177}\text{LuCl}_3$) o aktywności właściwej ≥ 350 GBq/mg Lu przygotowano w postaci roztworu w 0,04M HCl. Czystość radionuklidowa preparatu według charakterystyki producenta była na poziomie $>99,97\%$.

Do produkcji ^{195m}Pt wykorzystano dwuetapową reakcję neutronowej aktywacji tarczy irydowej: $^{193}\text{Ir}(n,\gamma) \rightarrow ^{194}\text{Ir}(n,\gamma) \rightarrow ^{195}\text{Ir}(\beta^-) \rightarrow ^{195m}\text{Pt}$ (50%). W tym celu odważono 1 mg tarczy ^{193}Ir o wzbogaceniu 99,46% (^{191}Ir 0,54%) (Isoflex, San Francisco, CA, USA) i umieszczono w kwarcowej fiolce. Tarczę aktywowano w reaktorze Maria przez 1 h (10^{14} n/cm²/s), a następnie schładzano przez 24 godziny. Bezpośrednio po otrzymaniu tarczy zmierzono jej aktywność i po przeniesieniu do probówki zarejestrowano widmo γ , by potwierdzić powstanie pożądanego produktu, wykryć rodzaj i liczbę produktów ubocznych oraz określić ich aktywność. Proces rozpuszczania tarczy przeprowadzono według metody opublikowanej przez Hodgsona i wsp. [167, 168] z nieznacznymi modyfikacjami określonymi podczas optymalizacji procesu na nieradioaktywnym materiale. Materiał przeniesiono do teflonowego wkładu a następnie kilkukrotnie przepłukano kwarcową fiolkę stężonym HCl, w celu zminimalizowania strat materiału. Używając miernika aktywności Biodex AtomLab 500 (Biodex Medical Systems, Shirley, NY, USA) zmierzono aktywność fiolki, po czym do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 4 mL HCl_{st.} dodano 4 mL 30% H₂O₂. Wkład umieszczono w reaktorze wysokociśnieniowym Berghof Products+Instruments GmbH (Eningen unter Achalm, Niemcy) i mieszając z szybkością 800 rpm przez 4 h prowadzono reakcję w temperaturze 220°C. Następnie, układ reakcyjny schładzano przez całą noc. Kolejnego dnia wyjęto naczynie teflonowe i rozdzielono frakcję rozpuszczoną (zielononiebieski roztwór) od stałej pozostałości w formie zielono-brązowego wilgotnego osadu o dużej gęstości. Aktywność roztworu zmierzono na mierniku aktywności, określając procent materiału tarczowego jaki uległ rozpuszczeniu i zarejestrowano widmo γ w celu identyfikacji obecnych we wskazanej frakcji radionuklidów.

W związku z wysokim kosztem i brakiem możliwości wykorzystania tarczy wzbogaconej, platynę-197 otrzymano poprzez aktywację naturalnej tarczy platynowej ($^{\text{nat}}\text{PtCl}_2$). Skład izotopowy tego materiału obejmuje: ^{192}Pt (0,78%); ^{194}Pt (33%); ^{195}Pt (34%); ^{196}Pt (25%) oraz ^{198}Pt (7%) [169]. Do aktywacji odważono 100 mg PtCl₂ i umieszczono w fiolce kwarcowej. Tarczę aktywowano przez 4 h strumieniem neutronów termicznych (10^{14} n/cm²/s), a następnie schładzano przez 6 h. Materiał przeniesiono do fiolki

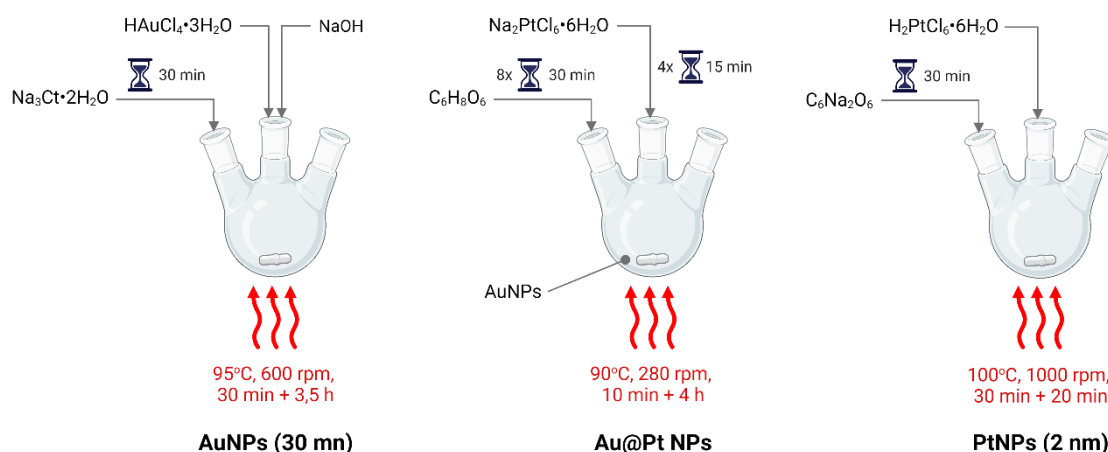
szklanej mierząc straty poniesione na tym etapie poprzez pomiar aktywności obydwu frakcji i zarejestrowano widmo γ , w celu określenia procentowej zawartości poszczególnych izotopów platyny. Tarczę rozpuszczano dodając przez ok. 5 h naprzemiennie HCl_{st} oraz 30% H_2O_2 porcjami po 250 μL i odparowując do pozostawienia niewielkiej ilości roztworu na dnie naczynka w temperaturze 120°C. Po całkowitym rozpuszczeniu tarczy roztwór odparowano i dodawano trzykrotnie 0,1 M HCl każdorazowo odparowując i nie dopuszczając do całkowitego wysuszenia materiału. Następnie dodawano trzykrotnie H_2O i odparowano, ostatecznie zawieszając produkt w 0,01 M HCl . Po zakończeniu procesu zmierzono aktywność roztworu przenosząc go do nowej fiolki co pozwoliło na określenie strat podczas rozpuszczania. Na podstawie wydajności określono zawartość poszczególnych radionuklidów platyny w fiołce. W pomiarach wykorzystano piki γ o energii 77,35 keV (17%) oraz 191,44 keV (3,7%) – ^{197}Pt ; 98,8 keV (11%) – $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Analizy przeprowadzono na urządzeniu GENIE 2000 (Cannberra Industries, Meriden, CT, USA).

5.2. Znakowanie peptydu SP94-DOTA

Znakowanie peptydu SP94 z chelatorem DOTA przeprowadzono według standardowej procedury, dla tego typu kompleksów [170]. Do 15 nmol roztworu SP94-DOTA (2 mg/mL) w wodzie dejonizowanej dodano 10-15 MBq $^{177}\text{LuCl}_3$ i uzupełniono do objętości 250 μL 0,2 M buforem octanowym o $\text{pH}\sim 4,5$. Mieszaninę ogrzewano przez 30 min w temperaturze 95°C. Po zakończeniu reakcji i schłodzeniu próbki do temperatury pokojowej określono wydajność reakcji znakowania. W tym celu 1 μL roztworu naniesiono na paski z włókna szklanego impregnowane żelazem krzemionkowym (Agilent, Santa Clara, CA, USA) i rozwijano stosując 0,2 M bufor cytrynianowy ($\text{pH}\sim 5,0$) jako fazę ruchomą. Sygnał od wyznakowanego peptydu pozostawał na dole paska, natomiast wolny ^{177}Lu migrował z czołem rozpuszczalnika.

5.3. Synteza nanocząstek

Schemat postępowania przy syntezie nanocząstek przedstawiono na rysunku 7.



Rysunek 7. Schemat syntezy AuNPs, Au@Pt oraz PtNPs.

5.3.1. AuNPs

Syntezę nanocząstek złota o średnicy 30 nm przeprowadzono metodą Turkevicha, polegającą na redukcji jonów Au^{3+} przy użyciu cytrynianu sodu [171]. W tym celu 4,95 mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i rozpuszczono w 50 mL wody dejonizowanej. Następnie, roztwór alkalizowano 0,1 M NaOH do uzyskania pH 3,5 - 6,0. Odczyn roztworu każdorazowo sprawdzano poprzez naniesienie niewielkiej objętości mieszaniny na papierek wskaźnikowy. Przeprowadzenie syntezy w różnych warunkach pH umożliwiło zoptymalizowanie parametrów reakcji, do uzyskania pożądanej średnicy nanocząstek złota (30 nm), gdyż pH jest głównym czynnikiem determinującym średnicę nanocząstek [172]. Tak przygotowaną mieszaninę przeniesiono do okrągłodennej kolby dwuszyjnej, podłączono do chłodnicy zwrotnej i umieszczono na mieszadle magnetycznym. Po 30 min ogrzewania w temperaturze 95°C i mieszania z szybkością 600 rpm, do roztworu dodano 170 μL 340 mM $\text{Na}_3\text{Ct} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ jako czynnik redukujący i stabilizujący. Syntezę prowadzono w niezmiennych warunkach przez 3,5 h obserwując po około 45 minutach zmianę zabarwienia roztworu z żółtego na czerwony i jasnoróżowy, w zależności od średnicy powstających nanocząstek. Im mniejszy rozmiar nanocząstek, tym ich barwa zbliża się do koloru bordowego, natomiast wraz ze wzrostem średnicy kolor nanocząstek zmienia się od czerwonego przez jasnoróżowy do odcieni fioletowego, charakterystycznych dla dużych nanocząstek. Po zakończeniu reakcji roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej. Do analizy DLS i UV-Vis pobrano 3 próbki o objętości 1 mL i przygotowano je do pomiaru zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 5. Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do szklanej kolby stożkowej z korkiem szklanym i po okryciu folią aluminiową przechowywano w temperaturze 4°C . Nanocząstki metali szlachetnych charakteryzują się światłoczułością, w związku z czym ich przechowywanie wymaga osłaniania mieszaniny materiałem nieprzepuszczalnym dla światła.

Stężenie nanocząstek złota w mieszaninie obliczano zakładając ich sferyczny kształt. Do obliczeń wykorzystano masę złota użytego do reakcji oraz średnicę uzyskaną z analizy TEM (rysunek 8).

<p>• Objętość jednej nanocząstki złota (1):</p> <p>$d = 30 \text{ nm}; r = 15 \text{ nm}$</p> <p>$\rho_{\text{Au}} = 19,30 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$</p> <p>$V_{\text{AuNP}} = \frac{4}{3}\pi r^3 = 1,41 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^3$</p> <p>• Masa wszystkich nanocząstek w roztworze (2):</p> <p>$4,95 \text{ mg HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,475 \text{ mg Au} = 2,475 \cdot 10^{-3} \text{ g Au}$</p> <p>• Masa jednej nanocząstki w roztworze (3):</p> <p>$m = V \cdot \rho = 1,41 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^3 \cdot 19,30 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 2,73 \cdot 10^{-16} \text{ g}$</p>	<p>• Liczba nanocząstek w roztworze:</p> <p>$\text{NPs} = \frac{(2)}{(3)} = \frac{2,475 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{2,73 \cdot 10^{-16} \text{ g}} = 9,07 \cdot 10^{12}$</p> <p>$\text{NPs/mL} = \frac{9,07 \cdot 10^{12}}{50,57 \text{ mL}} = 1,79 \cdot 10^{11}$</p>
---	--

Rysunek 8. Metodyka obliczenia stężenia AuNPs w roztworze.

5.3.2. Au@Pt

Bazując na wynikach optymalizacji syntezy AuNPs, do dalszych prac zdecydowano się wykorzystać reakcję prowadzoną w pH 4,5. (dodając do roztworu 400 μL 0,1 M NaOH). W celu pokrycia nanocząstek

złota platyną wykorzystano prekursor w postaci $\text{Na}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ze względu na jego dobrą rozpuszczalność w wodzie. Przebieg reakcji opracowano na podstawie pracy [173]. Kluczowym z punktu widzenia dalszego zastosowania w terapii Augera aspektem tej syntezy było uzyskanie stosunkowo jednorodnej warstwy platyny i uniknięcie lokalnej, wyspowej lokalizacji atomów Pt.

Do syntezy każdorazowo używano 32 mL roztworu nanocząstek złota. Wstępny etap reakcji polegał na ogrzaniu mieszaniny umieszczonej w dwuszyjnej kolbie okrągłodennej i podłączonej do chłodnicy zwrotnej (10 min, 90°C , 280 rpm). Roztwór prekursora platynowego przygotowano rozpuszczając odpowiednią ilość $\text{Na}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w wodzie dejonizowanej do uzyskania stężenia 0,001 M. Podczas optymalizacji procesu syntezy przeprowadzono dodając do mieszaniny 0,24 – 4,30 mg soli, co przekładało się na zakres 0,08 – 1,49 mg Pt. W celu uzyskania homogenicznego rozkładu atomów Pt na powierzchni AuNPs roztwór prekursora Pt wprowadzano do mieszaniny reakcyjnej etapowo w czterech jednakowych porcjach podawanych w 15-minutowych interwałach czasowych. Po wprowadzeniu ostatniej porcji $\text{Na}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ obserwowano zmianę zabarwienia roztworu z czerwonej na odcienie koloru szaroniebieskiego, o intensywności rosnącej wraz ze wzrostem ilości soli użytej do reakcji. Jako czynnik redukujący i stabilizujący wykorzystano w tej syntezie roztwór kwasu askorbinowego w wodzie dejonizowanej (0,004 M, 28 mg, 40 mL). Reduktor wprowadzano do mieszaniny reakcyjnej w postaci 8 jednakowych porcji w 30-minutowych odstępach czasowych. Pierwsza porcja prekursora i reduktora każdorazowo podawana była w tym samym czasie (po 10 min ogrzewania wstępnego), przy czym prekursor zawsze podany był jako pierwszy. Po dodaniu ostatniej porcji reduktora, syntezę kontynuowano przez 30 min w niezmiennych warunkach (90°C , 280 rpm). Po zakończeniu reakcji i ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej postępowano analogicznie jak z nanocząstkami złota. Ponadto, w celu określenia wydajności depozycji Pt na powierzchni AuNPs, z każdej syntezy pobrano trzykrotnie 1-mililitrowe próbki, i zwirowano na wirówce Eppendorf MiniSpin (Hamburg, Niemcy) w celu oddzielenia supernatantu (roztworu znajdującego się nad nanocząstkowym peletem) zawierającego niezwiązaną z nanocząstkami platynę. Do procesu rozdziału zastosowano 10-minutowe wirowanie z prędkością 10 000 rpm. Następnie zawartość platyny w supernatancie zmierzono z wykorzystaniem techniki ICP-MS (spektrometria mas z plazmą wzbudzaną indukcyjnie). Analizę przeprowadzono na spektrometrze ELAN DRC II (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) dostępnym w Laboratorium Jądrowych Technik Analitycznych IChTJ. W ten sam sposób przygotowano próbki do obrazowania HR-TEM.

Stężenie nanocząstek Au@Pt w mieszaninie odpowiadało liczbie AuNPs użytych do reakcji.

5.3.3. PtNPs

Syntezę nanocząstek platyny o średnicy 2 nm przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Islama i wsp. [174], modyfikując już na etapie początkowym stężenie platyny, zwiększając je 10-krotnie. Dzięki temu uzyskano produkt o wysokim stężeniu nanocząstek w 1 mL, co było istotne z punktu widzenia planowanego wykorzystania nanocząstek w badaniach *in vitro*. Do syntezy użyto 19,51 mg Pt w formie $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (51,7 mg w 20 mL wody dejonizowanej) do uzyskania stężenia 5 mM. Roztwór umieszczono w dwuszyjnej kolbie okrągłodennej i po podłączeniu do chłodnicy zwrotnej mieszano (1000 rpm) na mieszadle magnetycznym przez 30 min w temperaturze 100°C . Następnie, do mieszaniny reakcyjnej dodano czynnik redukujący $\text{C}_6\text{Na}_2\text{O}_6$ (83 mg, 48,5 mM) zachowując stosunek molowy $\text{C}_6\text{Na}_2\text{O}_6/\text{Pt} = 3.88$ [174]. Reakcję prowadzono w niezmiennych warunkach przez 20 min, obserwując

zmianę zabarwienia z żółtego na brązowy po około 5 minutach od dodania czynnika redukującego. Po zakończeniu syntezy mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej. Następnie pobrano trzy próbki o objętości 0,5 mL do analizy TEM. W tym celu dokonano wstępnego oczyszczenia produktu poprzez umieszczenie na koncentratorach wirówkowych Vivaspin o odcięciu membrany 3 kDa. Próbkę wirowano przez 20 min z szybkością 13400 rpm, a następnie dwukrotnie przepłukano wodą dejonizowaną. Ostatecznie nanocząstki zdjęto z membrany 500 μL wody dejonizowanej i przekazano do analizy mikroskopowej. Stężenie nanocząstek PtNPs w mieszaninie obliczano zakładając ich sferyczny kształt (rysunek 9).

<p>▪ Objętość jednej nanocząstki platyny (1):</p> $d = 2 \text{ nm}; r = 1 \text{ nm}$ $\rho_{\text{Pt}} = 21,45 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ $V_{\text{PtNP}} = \frac{4}{3}\pi r^3 = 4,19 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3$ <p>▪ Masa wszystkich nanocząstek w roztworze (2):</p> $51,7 \text{ mg H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 19,51 \text{ mg Pt} = 19,51 \cdot 10^{-3} \text{ g Pt}$ <p>▪ Masa jednej nanocząstki w roztworze (3):</p> $m = V \cdot \rho = 4,19 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3 \cdot 21,45 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 8,99 \cdot 10^{-20} \text{ g}$	<p>▪ Liczba nanocząstek w roztworze:</p> $\text{NPs} = \frac{(2)}{(3)} = \frac{19,51 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{8,99 \cdot 10^{-20} \text{ g}} = 2,17 \cdot 10^{17}$ $\frac{\text{NPs}}{\text{mL}} = \frac{2,17 \cdot 10^{17}}{28 \text{ mL}} = 7,75 \cdot 10^{11}$
--	--

Rysunek 9. Metodyka obliczenia stężenia PtNPs w roztworze.

5.3.4. Au@¹⁹⁷Pt oraz ¹⁹⁷PtNPs

Syntezę radioaktywnych nanocząstek przeprowadzono postępując zgodnie z procedurą opisaną dla związków nieradioaktywnych. Na podstawie wydajności aktywacji określono zawartość masową platyny w fiolce i przeprowadzono syntezę nanocząstek zgodnie z opisem w punktach 5.3.2 oraz 5.3.3. Wydajność depozycji Pt na powierzchni nanocząstek złota zweryfikowano postępując analogicznie jak opisano w punkcie 5.3.2, przy czym analizę ICP-MS zastąpiono detekcją radiometryczną, w celu uzyskania danych porównawczych.

5.4. Modyfikacja powierzchni otrzymanych nanomateriałów

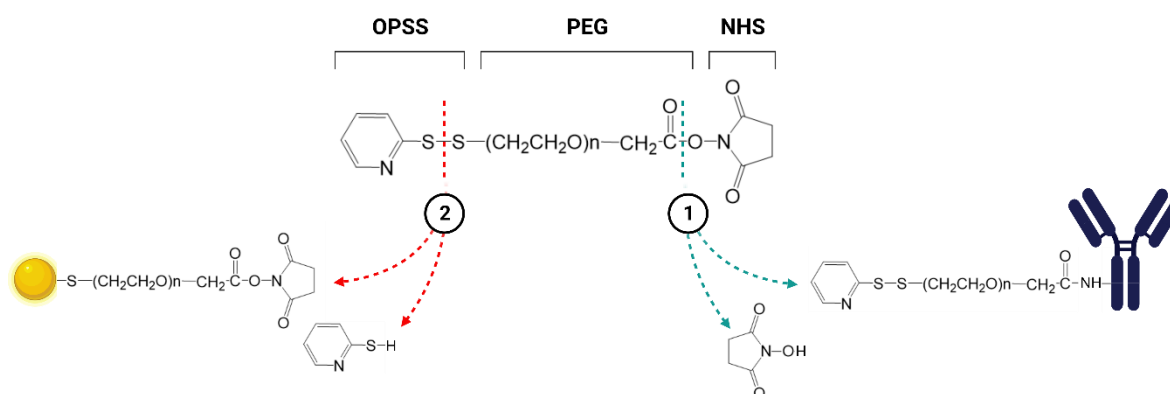
5.4.1. PEG-owanie

W celu zwiększenia stabilności otrzymanych nanocząstek do ich powierzchni przyłączono heterobifunkcyjny poli(tlenek etylenu) o średniej masie molowej wynoszącej 5000 Da. Obecna na jednym końcu grupa tiolowa (-SH) umożliwiła wytworzenie kowalencyjnego wiązania metal-siarka, co zapewniło łatwe przyłączenie polimeru do powierzchni nanocząstki. Grupa karboksylowa znajdująca się na drugim końcu łańcucha umożliwiła potencjalne wykorzystanie do koniugacji z przeciwciałem, poprzez aktywację do estru aktywnego. Do stabilizacji przygotowano w wodzie dejonizowanej roztwory PEG o stężeniu 2 mg/mL (AuNPs i Au@Pt) oraz 100 mg/mL (PtNPs). Było to efektem dużych różnic w liczbie nanocząstek w przeliczeniu na 1 mL roztworu oraz innych nadmiarów molowych polimeru używanych do stabilizacji. W przypadku AuNPs oraz Au@Pt do reakcji użyto 10000 nadmiar molowy PEG względem nanocząstek, natomiast do modyfikacji powierzchni PtNPs zastosowano 100 nadmiar molowy, ze względu

na znacznie mniejszą ich powierzchnię. Ilości te są zgodne z trendami występującymi w licznych publikacjach poświęconych PEGowaniu nanocząstek [21,88,175]. Reakcję przyłączenia polimeru do powierzchni nanocząstek prowadzono w plastikowych probówkach typu Eppendorf przez 30 min w temperaturze pokojowej z użyciem wytrząsarki Stuart SB3 (Richmond Scientific, Chorley, Wielka Brytania) o ruchu obrotowym i szybkością obrotów równą 36 rpm. Po zakończeniu reakcji próbki odwirowano (10 min, 10000 rpm) i po usunięciu supernatantu pellet zdyspergowano w pożądanej objętości wody dejonizowanej. Przyłączenie polimeru weryfikowano poprzez analizę DLS.

5.4.2. Koniugacja z przeciwciałem monoklonalnym (trastuzumabem)

Przyłączenie nanocząstek to przeciwciała monoklonalnego mogło zostać przeprowadzone poprzez aktywację grupy karboksylowej PEG i wytworzenie wiązania peptydowego pomiędzy estrem aktywnym wytworzonym z grupy -COOH a wolną grupą aminową w lizynach trastuzumabu. Mając jednak na uwadze konieczność 24-godzinnej koniugacji oraz ryzyko wystawienia nanocząstek na działanie różnych warunków środowiskowych zdecydowano się na przeprowadzenie dwuetapowej syntezy. W pierwszym etapie przeciwciało skoniugowano z heterobifunkcyjnym OPSS-PEG-NHS (rysunek 10) [139].



Rysunek 10. Struktura OPSS-PEG-NHS wraz z mechanizmem jego koniugacji z przeciwciałem monoklonalnym i nanocząstką.

Do reakcji użyto 85,5 μL roztworu OPSS-PEG-NHS (2 mg/mL) w H_2O oraz 200 μg białka o stężeniu 8 mg/mL. Mieszaninę reakcyjną uzupełniono do objętości 150 μL 0,1 M buforem węglanowym o pH 8,90, zachowując tym samym 25-krotny nadmiar molowy polimeru względem białka. Reakcję prowadzono przez 24 h w temperaturze pokojowej z mieszaniem magnetycznym. Następnie produkt reakcji oczyszczono z wykorzystaniem koncentratorów wirówkowych Vivaspin o odcięciu membrany 50 lub 100 kDa. Ze względu na ciężar cząsteczkowy używanego białka (150 kDa) takie odcięcie zapewniło retencję koniugatu OPSS-PEG-trastuzumab i usunięcie nieprzereagowanego polimeru. Produkt wirowano trzykrotnie przez 20 min (13400 rpm) każdorazowo płuczając membranę 500 μL H_2O . Finalnie biokoniugat zdjęto z membrany przy użyciu 500 μL H_2O . W drugim etapie do uprzednio oczyszczonych i zdyspergowanych w 0,02 M buforze węglanowym nanocząstek dodano biokoniugat OPSS-PEG-trastuzumab w stosunku 7 μg białka na 1 mL nanocząstek (AuNPs); 6 μg białka na 1 mL nanocząstek (Au@Pt) lub 40 μg białka na 1 mL PtNPs. Reakcję prowadzono w probówkach typu LoBind firmy eppendorf w temperaturze pokojowej przez 45 min mieszając na wytrząsarce o ruchu obrotowym (36 rpm). Po tym etapie

produkt zwirowano (AuNPs i Au@Pt) w celu usunięcia niezwiązanego biokonjugatu PEG-trastuzumab oraz samego, nieskoniugowanego z polimerem białka (20 min, 6 500 rpm) lub oczyszczono na koncentratorach wirówkowych (PtNPs, 10 min, 7000 rpm, $MW_{cut-off} = 100$ kDa) i zdyspergowano w pożądanej objętości H₂O. Ostatnim etapem syntezy było ustabilizowanie biokonjugatów AuNP-PEG-trastuzumab/Au@Pt-PEG-trastuzumab/PtNPs-PEG-trastuzumab poprzez PEGowanie. Produkt końcowy oczyszczono podobnie jak po koniugacji z białkiem (poprzez wirowanie lub użycie koncentratorów wirówkowych) i zdyspergowano w 500 μ L H₂O. Na każdym etapie syntezy weryfikowano przyłączenie białka i PEG poprzez analizę DLS (AuNPs/Au@Pt), lub metodą radiometryczną (AuNPs/Au@Pt/PtNPs).

5.4.3. Weryfikacja wydajności przyłączenia trastuzumabu do nanocząstek.

Określenie liczby cząsteczek białka przyłączonych do 1 nanocząstki było istotne ze względu na późniejszą wiązalność biokonjugatu do receptorów transbłonowych. Do tego celu wykorzystano syntezę ze znakowanym ¹³¹I trastuzumabem. Wstępny etap polegał na jodowaniu białka, a więc podstawieniu ¹³¹I do pierścienia tyrozynowego na drodze substytucji nukleofilowej. W tym celu 1 mg białka umieszczono w szklanej fiolce z osadzonym na ściankach czynnikiem utleniającym – jodogenem (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -difenylo-glikouryl). Następnie do fiolki dodano 10-20 MBq ¹³¹I w postaci Na¹³¹I i uzupełniono 0,1 M PBS do objętości 250 μ L. Reakcję prowadzono przez 15 min w temperaturze pokojowej. Produkt oczyszczono z wykorzystaniem kolumny PD10 ze złożem Sephadex G25 kondycjonowanej 0,1 M PBS, zbierając frakcje po 5 kropli (~ ok. 100 μ L). Następnie, połączono ze sobą frakcje o największej aktywności i stopień przyłączenia ¹³¹I do trastuzumabu. Analizę wykonano z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (iTLC, *ang. instant thin-layer chromatography*) nanosząc 1 μ L roztworu na pasek oraz stosując 0,1 M PBS jako fazę ruchomą (niezwiązany jod migrował z czołem rozpuszczalnika). W ostatnim kroku używając koncentratorów wirówkowych Vivaspin o odcięciu membrany 50 lub 100 kDa zatężono radiobiokonjugat do stężenia ok. 8 mg/mL. Dalsze etapy syntezy przebiegały analogicznie do opisu przedstawionego w części 6.3.2 Wydajność reakcji przyłączania OPSS-PEG-trastuzumab[¹³¹I] określono na podstawie stosunku aktywności supernatantu do pelletu zawierającego produkt.

5.5. Chemisorpcja ^{125,135}I na powierzchni nanocząstek

Do badań chemisorpcji radionuklidów jodu wykorzystano następujące ilości nanocząstek: 4,5 x 10¹⁰ (AuNPs), 1,9 x 10¹⁰ (Au@Pt), i 3,95 x 10¹⁴ (PtNPs) w celu uzyskania porównywalnej powierzchni zewnętrznej. Reakcję chemisorpcji przeprowadzono zgodnie z protokołem przedstawionym w pracach [82,176,177]. Na wstępnym etapie nanocząstki oczyszczono poprzez wirowanie (AuNPs i Au@Pt – 10 min, 10 000 rpm) lub wykorzystanie koncentratorów wirówkowych Vivaspin o odcięciu membrany 3 kDa (PtNPs - 20 min, 13 400 rpm). Do zdyspergowanych w wodzie dejonizowanej nanocząstek dodano 5 MBq ¹³¹I i mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h. Następnie do mieszaniny dodano HS-PEG-COOH w celu zwiększenia stabilności i dyspersyjności nanocząstek. Po 30 min reakcji wydajność adsorpcji sprawdzono z wykorzystaniem techniki iTLC oraz MeOH, jako fazy ruchomej. Badanie iTLC przeprowadzono również po 1 etapie syntezy, poprzedzającym dodanie polimeru. Dodatkowo, w celu

potwierdzenia wyników chromatografii cienkowarstwowej otrzymane półprodukty i produkty końcowe wirowano mierząc stosunek aktywności w supernatancie do aktywności nanocząstek.

W celu określenia maksymalnej aktywności radionuklidu, który może zostać efektywnie związany z powierzchnią nanocząstki przeprowadzono analogiczną reakcję. Nanocząstki inkubowano z różnymi aktywnościami jodu, w zakresie 5-100 MBq/mL wyznaczając każdorazowo wydajność reakcji poprzez wirowanie (1) i analizę iTLC (2).

5.6. Uwalnianie ^{197}Pt i ^{131}I w środowisku silnie utleniającym

Uwalnianie platyny i jodu w środowisku silnie utleniającym zbadano poprzez inkubację radiokoniugatów stabilizowanych PEG w H_2O_2 o stężeniu: 10 mM, 10 μM oraz 10 nM. Radioaktywne nanocząstki przed badaniem odwirowano, zdyspergowano bezpośrednio w 1 mL roztworu nadtlenku wodoru o zadanym stężeniu i inkubowano przez 60 min w temperaturze pokojowej. Ilość uwolnionego radionuklidu badano poprzez iTLC oraz wirowanie, mierząc aktywność supernatantu, jako frakcji uwolnionego jodu i pelletu.

5.7. Badania stabilności

Badania stabilności koloidu nieradioaktywnych nanocząstek, ich koniugatów z PEG oraz biokoniugatów z trastuzumabem przeprowadzono z wykorzystaniem techniki DLS. Próbkę umieszczono w 0,01 M roztworze PBS; 0,9% NaCl oraz H_2O i analizowano codziennie przez 14 dni sprawdzając zmiany średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta w temperaturze 37°C i 4°C . Ze względu na specyfikę pomiaru DLS niemożliwe było wykorzystanie surowicy ludzkiej krwi jako jednego z mediów biologicznych.

Trwałość radiokoniugatów z jodem-131 sprawdzano metodą iTLC. W tym celu próbki zostały odwirowane i zdyspergowane bezpośrednio w surowicy ludzkiej krwi (HS) oraz 0,01 M PBS. Badania trwałości przeprowadzono w temperaturze 37°C przez 72 h wykorzystując MeOH jako fazę ruchomą.

5.8. Badania *in vitro*

Badania biologiczne w ramach niniejszej pracy przeprowadzono w postaci hodowli komórek adherentnych oraz sferoidów (hodowle 3D). Komórki hodowano w warunkach tlenowych w plastikowych butelkach z modyfikowanym radiacyjnie podłożem przystosowanym do wzrostu komórek adherentnych. Wszystkie procedury hodowlane wykonywano zgodnie z protokołem rekomendowanym przez dystrybutora - American Tissue Culture Collection (ATCC) od którego zakupiono wszystkie używane linie komórkowe. W tabeli 5 zestawiono wszystkie używane rodzaje linii komórkowych wraz z charakterystyką medium, w jakim prowadzono hodowlę.

Tabela 5. Charakterystyka wykorzystywanych linii komórkowych.

Linia komórkowa	Nowotwór	Podtyp	Medium hodowlane
SKOV-3	Jajnik	HER2+	McCoy's 5A
BT474	Pierś	HER2+	RPMI 1640
MDA-MB-231	Pierś	HER2-	DMEM
HeLa	Szyjka macicy	-	RPMI 1640
HepG2	HCC*	-	EMEM + 1% L-Glu**

*HCC – hepatocellular carcinoma (rak wątrobowokomórkowy)
 **L-Glu – L-glutamina

Wszystkie media były suplementowane do uzyskania 10% stężenia surowicy płodu cieląt (FBS) oraz 1% mieszaniny pen-strep, stanowiącej połączenie penicyliny i streptomycyny. Do pasażowania komórek wykorzystywano trypsynę z EDTA (trypsyna 0,25%; EDTA 0,05%) oraz PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Prace wykonywano w warunkach sterylnych w komorze laminarnej używając każdorazowo sterylnych jednorazowych pipet i plastików hodowlanych (TPP, Trasadingen, Szwajcaria). W trakcie przygotowywania komórek do eksperymentu liczone je pod mikroskopem podczas pasażowania poprzez rozcieńczenie w stosunku 1:10 w roztworze barwnika (trypan blue) i umieszczenie roztworu w komorze Bürkera (Brand GmbH, Wertheim, Niemcy) przykrytej szkiełkiem. Inkubacja – o ile w opisie nie wskazano inaczej - podczas hodowli i wykonywania prac eksperymentalnych przeprowadzana była w inkubatorze Safe-Grow 188 (Euroclone, S.p.A., Pero, Włochy) z regulacją poziomu dwutlenku węgla. Temperatura podczas inkubacji wynosiła 37°C, a atmosfera suplementowana była dodatkiem 5% CO_2 . Rozcieńczenia barwników fluorescencyjnych używanych do obrazowania przygotowywano zgodnie z rekomendacjami producenta.

5.8.1. Wiązalność do receptora

Badania wiązalności do receptora przeprowadzono na liniach komórkowych wykazujących nadekspresję receptora HER2 – SKOV-3 oraz BT474. Jako linię kontrolną wykorzystano potrójnie negatywny nowotwór piersi (linia MDA-MB-231).

Komórki SKOV-3 (6×10^5 /dołek), BT474 (8×10^5 /dołek) oraz MDA-MB-231 (6×10^5 /dołek) wysiano do płytki 6-dołkowej i inkubowano przez noc. W dniu eksperymentu pożywkę usunięto, a dołki dwukrotnie przepłukano przy użyciu PBS. Następnie do dołków dodano 0,31 - 20 nM testowanych radiobiokoniugatów: Au@ ^{197}Pt -PEG-trastuzumab i $^{197}PtNP$ -PEG-trastuzumab rozcieńczonych w medium hodowlanym. Komórki ze związkami inkubowano przez 2 h. Po zakończeniu inkubacji medium odmyto i dwukrotnie przepłukano komórki PBS. Zebraną frakcję niezwiązanego radiobiokoniugatu przeniesiono do 4 mL plastikowych probówek pomiarowych. Komórki, zawierający związany radiobiokoniugat zebrano poprzez trzykrotne przemycie 1 M NaOH. W celu weryfikacji niespecyficznego wiązania przygotowano drugi zestaw komórek, które przed dodaniem związku inkubowano przez 15 min z 100-krotnym nad-

miarem molowym przeciwiła. Aktywność poszczególnych frakcji zmierzono przy użyciu automatycznego licznika gamma Wizard2® 2480 (Perkin Elmer, MA, USA). W pomiarach wykorzystano piki γ o energii 77,35 keV (17%) oraz 191,44 keV (3,7%).

Badania wiązalności peptydu SP94 do komórek HepG2 przeprowadzono wykorzystując taką samą procedurę. Dwa dni przed eksperymentem do płytek 6-dołkowych wysiano 4×10^5 komórek/dołek. Wydłużenie inkubacji przed eksperymentem było spowodowane wolniejszą niż dla komórek HER2+/- adherencją komórek HepG2 do powierzchni płytki. W dniu eksperymentu do dołek dodano 1,22 – 200 nM radiobiokoniugatu ^{177}Lu -DOTA-SP94. Blokowanie receptorów przeprowadzono z użyciem peptydu SP94 bez przyłączonego chelatora DOTA stosując 1000-krotny nadmiar molowy względem stężenia związku badanego.

5.8.2. Internalizacja

Badanie internalizacji stanowiące rozwinięcie opisanych w podrozdziale 5.8.1. protokołów przeprowadzono przygotowując komórki w taki sam sposób. Po dodaniu radiobiokoniugatów do komórek inkubowano je przez 1 h w temperaturze 4°C. Miało to na celu zatrzymanie internalizacji receptora przy jednoczesnym zachowaniu jego aktywności wiążącej. Po zakończeniu inkubacji medium zebrano (frakcja niezwiązana) a do komórek dodano 1 mL medium hodowlanego i inkubowano przez 1 h, 6 h, 18 h i 24 h w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Medium, w którym przeprowadzono drugą inkubację zebrano w celu weryfikacji potencjalnego odłączenia się biokoniugatu od receptora (frakcja II). Kolejnym krokiem było dwukrotne przeprowadzenie 5-minutowej inkubacji z roztworem 0,05 M glicyny z HCl (pH ~ 2,5). Wykonano to w celu zebrania frakcji związanej z receptorem, ale nie internalizowanej. Internalizowaną część biokoniugatu oznaczono poprzez pomiar jego zawartości w lizatach komórkowych uzyskanych po traktowaniu i dwukrotnym przemyciu komórek 1 M NaOH. W celu weryfikacji niespecyficznego wiązania przygotowano drugi zestaw komórek, które przed dodaniem związku preinkubowano przez 15 min ze 100-krotnym nadmiarem molowym przeciwiła. Aktywność poszczególnych frakcji zmierzono przy użyciu automatycznego licznika gamma Wizard2® 2480 (Perkin Elmer, MA, USA). W pomiarach wykorzystano piki γ o energii 77,35 keV (17%) oraz 191,44 keV (3,7%).

5.8.3. Frakcjonowanie – izolacja jądra komórkowego

Izolacja jądra komórkowego z komórek raka wątrobowokomórkowego przeprowadzono w celu sprawdzenia czy nanocząstki mogą internalizować do jądra komórek HepG2. Do izolacji wykorzystano zestaw Nuclei Isolation Kit: Nuclei EZ Prep (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA). W tym celu $1,5 \times 10^7$ komórek wysiano na szalki Petriego (\varnothing 100 mm) i inkubowano przez noc. Następnie, po uprzednim odmyciu medium, komórki potraktowano 5 nM Au@Pt-PEG-COOH lub PtNP-PEG-COOH rozcieńczonych w pożywce. Po 24 h, 48 h i 72 h inkubacji medium odmyto i komórki przemyto zimnym PBS. Do komórek dodano bufor lizujący stanowiący część zestawu i po 5-minutowej inkubacji zebrano je używając skrobaka do komórek. Czynność tę powtórzono dwukrotnie. Zebrane frakcje odwirowano w celu oddzielenia pelletu (jądra komórkowe) i supernatantu zawierającego składniki komórki (5 min, 1750 rpm, 4°C). Analizę zawartości nanocząstek w poszczególnych frakcjach przeprowadzono z wykorzystaniem

ICP-MS (związki nieradioaktywne) oraz detekcji radiometrycznej (w przypadku badań z wykorzystaniem ^{197}Pt).

5.8.4. Oznaczanie reaktywnych form tlenu

Do detekcji reaktywnych form tlenu wykorzystano fluorescencyjną sondę CM-H₂DCFDA (Thermo-Fisher). Obecność grup chlorometylowych w strukturze sondy zapewnia większą retencję wewnątrzkomórkową poprzez kowalencyjne oddziaływanie z tiolami wchodzącymi w skład struktur komórkowych [178]. Procedurę oznaczania RFT przeprowadzono zgodnie z protokołem opublikowanym przez Szwed i wsp. [179]. Komórki (1-2 x 10⁴/dołek) SKOV-3 i HepG2 wysiano na 96-dołkowe czarne płytki z transparentnym dnem i inkubowano (37°C, 5% CO₂) przez noc. Po odmyciu pożywki przeprowadzono 45-minutową preinkubację z sondą w medium bez czerwieni fenolowej. Następnie, po usunięciu sondy i jednokrotnym przemyciu PBS, w części płytek (NAC+) przeprowadzono 60-minutową inkubację z N-acetylo-L-cysteiną (NAC), natomiast pozostałe komórki (NAC-) inkubowano w tym czasie z pożywką. Komórki po zakończeniu tego etapu potraktowano Au@Pt-PEG-COOH, PtNP-PEG-COOH oraz H₂O₂ stosowanym w tym eksperymencie jako kontrola pozytywna. Pomiary fluorescencji wykonano na aparacie TRISTAR LB 231 (Berthold, Bad Wildbad, Niemcy). Przy testowaniu działania związków dłuższym niż 24 h inkubację z sondą przeprowadzono bezpośrednio przed pomiarem, by uniknąć błędów spowodowanych potencjalnym spadkiem liczebności komórek. Otrzymane wyniki każdorazowo standaryzowano względem danych dotyczących przeżywalności komórek.

5.8.5. Oznaczanie glutationu zredukowanego (GSH)

Zmiany poziomu GSH badano zgodnie z protokołem opublikowanym wcześniej [180]. W tym celu 6 x 10⁵/dołek komórek HepG2 wysiano do płytek 6-dołkowych i inkubowano przez noc. Po przemyciu PBS lub medium hodowlanym przeprowadzono 45-minutową inkubację z NAC. Następnie po odmyciu NAC komórki potraktowano Au@Pt-PEG-COOH i PtNP-PEG-COOH (C_{Pt} = 145 ug/mL) i inkubowano przez 12 h, 24 h i 48 h. W dalszej części eksperymentu komórki trypsynizowano i wirowano przez 5 min (4°C, 300 g). Pellety zdyspergowano w buforze lizującym (NaCl, Na₂HPO₄ i EDTA; pH ~ 7,40) suplementowanym Tritonem X-100 i inkubowano na lodzie przez 10 min. Lizaty rozcieńczono następnie (1:1) buforem (TCA, DTPA, HCl)/kwas askorbinowy (1:1). Po 30 minutowej inkubacji komórki zwirowano (10 min, 13000 rpm, 4°C), a supernatanty przeniesiono do 96-dołkowych czarnych płytek.

W celu określenia poziomu GSH wykorzystano reakcję z o-ftalaldehydem (OPA) [180]. Ideą metody jest wytworzenie grup hemitioacetalowych reaktywnych względem amin pierwszorzędowych. Produktem tej reakcji jest fluorescencyjny kompleks izoindolowy. Do kontroli przebiegu reakcji wykorzystano bufor gaszący – TCA-RQB (ang. redoks quenching buffer) oraz fosforan potasu dodane do wszystkich dołków. Następnie, do połowy dołków dodano N-etylomaleimid w celu wytworzenia pochodnej GSH. Do drugiej połowy dołków dodano TCA-RQB. Po 5-minutowej inkubacji dodano OPA i przystąpiono do pomiarów mierząc intensywność fluorescencji ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Krzywą kalibracyjną wykonano w zakresie stężeń 0-0,5 mM GSH.

5.8.6. Oznaczanie zawartości białka w komórkach

Oznaczenie zawartości białka było konieczne, aby prawidłowo określić poziom GSH ze względu na postępujące z czasem cytotoksyczne działanie testowanych związków i wynikającą z tego zredukowaną liczebność komórek. W tym oznaczeniu wykorzystano Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) z krzywą kalibracyjną BSA. Do tej analizy wykorzystano lizaty otrzymane podczas przygotowania oznaczeń GSH. Niewielką ilość lizatu przeniesiono bezpośrednio do płytek 96-dołkowych i dodano odczynnik Pierce. Po 5-minutowej inkubacji zmierzono absorbancję przy długości fali 660 nm korzystając ze spektrofotometru UV-Vis firmy BioTek Instruments (Winooski, VT, USA).

5.8.7. Test MTS

Cytotoksyczność badanych związków sprawdzano wykorzystując odczynnik MTS. Ideą tego testu jest pośrednie oznaczenie aktywności mitochondrium badanych komórek. Komórki żywe poprzez działanie dehydrogenazy mitochondrialnej powodują redukcję żółtej soli tetrazolowej do ciemnobrunatnego formazanu co pozwala określić zmiany w liczebności komórek na podstawie zmniejszonej ilości powstałego produktu. Badanie cytotoksyczności przeprowadzono w dwóch wariantach – w celu oceny przeżywalności komórek SKOV-3 i HepG2 traktowanych związkami (wariant I) i w celu określenia czy preinkubacja z NAC wpływa na zwiększenie przeżywalności komórek HepG2 (wariant II). Każdorazowo do 96-dołkowych płytek wysiano $3-4.5 \times 10^3$ komórek i po całonocnej inkubacji (37°C, 5% CO₂) dodano testowane związki rozcieńczone w 100 µL medium hodowlanego, uprzednio odmywając pożywkę. Po 24 h, 48 h i 72 h usunięto medium i dodano 100 µL nowego. Następnie dodano również 20 µL odczynnika MTS i po 2-godzinnej inkubacji (37°C, 5% CO₂) zmierzono absorbancję przy długości fali 490 nm.

5.8.8. Cytometria przepływowa – apoptoza

Zastosowanie cytometrii przepływowej umożliwiło dokładniejszą ocenę rodzaju śmierci komórki, do jakiego prowadzi traktowanie ich otrzymanymi w ramach pracy nanocząstkami i ich modyfikacjami. W tym celu 8×10^5 komórek HepG2 wysiano do płytek 6-dołkowych i po całonocnej inkubacji dodano Au@Pt-PEG-COOH i PtNP-PEG-COOH ($C_{Pt} = 145 \mu\text{g/mL}$). Komórki traktowano związkami przez 24 h, 48 h i 72 h. Po zakończeniu tego procesu komórki przepłukano zimnym PBS i trypsynizowano w celu przeniesienia do probówek typu falkon o pojemności 15 mL. Następnie komórki wirowano (5 min, 1000 rpm) i po usunięciu supernatantu dyspergowano w 100 µL buforu wiążącego (1X). Do próbek dodano aneksynę-V skoniugowaną z FITC oraz jodek propidyny i po 1-godzinnej inkubacji bez dostępu światła (37°C, 5% CO₂) analizowano na cytometrze przepływowym uprzednio uzupełniając mieszaninę 100 µL buforu wiążącego (1X). Próbkę analizowano wykorzystując cytometr BD FACSCelesta™ i oprogramowanie BD FACSDiva, v.8.0.1.1 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA).

5.8.9. Cytometria przepływowa – cykl komórkowy

W celu określenia etapu cyklu komórkowego na jakim dochodzi do jego zatrzymania pod wpływem działania badanych związków postępowano analogicznie jak przy ocenie apoptozy (6.7.8.). Po wirowa-

niu pellety, w celu utrwalenia zdyspergowano w zimnym 70% EtOH i inkubowano przez 1,5 h w temperaturze -20°C. Następnie, poprzez dwukrotne przemycie PBS i wirowanie usunięto cały alkohol zawieszając komórki w PBS. Do tak przygotowanych próbek dodano jodek propidyny i RNAzy i inkubowano przez 45 min w ciemności (37°C, 5% CO₂). Do analizy wyników poza oprogramowaniem BD FACSDiva v.8.0.1.1 wykorzystano również program ModFit™ LT 5.0 (Verity Software House Topsham, ME, USA).

5.8.10. Mikroskopia konfokalna

Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej zastosowano w celu weryfikacji internalizacji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji nanocząstek i ich biokoniuatów. Ponadto przy użyciu tej techniki dokonano detekcji podwójnie niciowych uszkodzeń DNA.

Komórki SKOV-3 i HepG2 (2 x 10⁵/dołek) wysiano do płytek 6-dołkowych z umieszczonymi na podłożu szkiełkami nakrywkowymi (φ 12 mm, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Następnego dnia odmyto pożywkę i dodano nową z testowanymi związkami w stężeniu odpowiadającym 5 nM biokoniuatu (1,43 x 10¹¹ nanocząstek/mL). Po okresie 12 h i 24 h inkubacji szkiełka przełożono do 24-dołkowych płytek umieszczając jedno szkiełko w każdym dołku, następnie przemywamp je PBS, utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu w PBS i permabilizowano 0,1% tritonem X-100 według opisanej metody [88]. Przed rozpoczęciem procedury barwienia szkiełka z komórkami inkubowano w buforze blokującym (5% BSA) by zminimalizować wiązanie niespecyficzne używanych w późniejszych etapach reagentów.

W celu określenia internalizacji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji związków, trastuzumab w biokoniuacie wybarwiono II-rzędowym przeciwciałem (anti-IgG) skoniugowanym z FITC Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ, USA). Roztwór barwnika dodano do dołków i inkubowano przez 1 h w ciemności (37°C). Następnie dołki trzykrotnie przemyto PBS i wybarwiono jądra komórkowe barwnikiem Hoechst 33258 lub DAPI, z którym inkubację prowadzono przez 15 min w ciemności (37°C).

Detekcję dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach HepG2 przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie wykorzystano przeciwciało I-rzędowe anti-phospho-histone H2A.X (klon JBW301, Merck) rozcieńczone 1:100 w buforze blokującym i przeprowadzono całonocną inkubację w temperaturze 4°C. Następnego dnia przeciwciało odmyto płuczając dołki trzykrotnie roztworem TBST (1X TBS + 0.1% Tween 20) i dodano II-rzędowe przeciwciało (anti-IgG) skoniugowane z barwnikiem CF633. Po 2-godzinnej inkubacji komórki ponownie przemyto roztworem TBST i wybarwiono jądra komórkowe barwnikiem Hoechst 33258. W tej procedurze nie używano roztworu PBS, gdyż przy detekcji produktów fosforylacji obecność grup fosforanowych może powodować interferencje i niespecyficzne łączenie się przeciwciał.

Po zakończeniu procesów barwienia, szkiełka przemyto dwukrotnie wodą i przeniesiono na szkiełka podstawowe (ThermoFisher). Do zamknięcia preparatu wykorzystano DAKO Fluorescence Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA, USA), poprzez umieszczenie 1 kropli na szkiełku podstawowym i nałożenie szkiełek nakrywkowych z komórkami.

Obrazowanie internalizacji przeprowadzono w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie z użyciem mikroskopu Zeiss LSM800 (Jena, Niemcy). Do detekcji dwuniciowych pęknięć DNA wykorzystano natomiast mikroskop Olympus FV100 (Tokio, Japonia) znajdujący się w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Analizę zdjęć wykonano programem Fiji 2.9.0.

5.8.11. Sferoidy (hodowle komórkowe 3D)

Do hodowli trójwymiarowych modeli guza (sferoidy) wykorzystano 96-dółkowe płytki z U-kształtnym dnem o ultraniskiej adhezji (Corning®, Corning, NY, USA). W tym celu 1×10^3 komórek HepG2 wysiano 7 dni przed eksperymentem, co dwa dni wymieniając połowę objętości medium hodowlanego. Gdy sferoidy osiągnęły średnicę 250 – 300 μm potraktowano je testowanymi związkami przez okres 7 dni. Przed każdym obrazowaniem sferoidy przemywano od 3 do 5 razy PBS i barwiono przy użyciu barwnika wizualizującego materiał DNA komórek żywych i martwych (Hoechst 33258) oraz jodku propidyny, przepuszczalnym jedynie dla komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Dodatkowo, począwszy od dnia „0” codziennie mierzono średnicę i powierzchnię sferoidów badanych i kontrolnych. Obrazowanie przeprowadzono na mikroskopie ZEISS AxioVert.A1 i z użyciem oprogramowania ZEN 2.1 (Zeiss, Jena, Niemcy).

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Otrzymywanie radionuklidów platyny

6.1.1. Otrzymywanie $^{195\text{m}}\text{Pt}$

Podjęto próbę otrzymania $^{195\text{m}}\text{Pt}$ poprzez naświetlanie neutronami tarczy ^{193}Ir . Jest to reakcja trójeta-powa opisana w pracy [150, 168]: w pierwszym etapie w reakcji $^{193}\text{Ir}(n, \gamma)$ powstaje ^{194}Ir , który następnie, w ponownej reakcji (n, γ) przechodzi w ^{195}Ir . Ostatecznie, po przemianie β^- irydu-195 otrzymujemy $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Ponieważ jest to złożona reakcja trójeta-powa oszacowanie przewidywanej aktywności otrzymanej po aktywacji tarczy ^{193}Ir jest bardzo trudne, ze względu na brak wystarczających danych - głównie przekroju czynnego dla reakcji $^{194}\text{Ir}(n, \gamma)^{195\text{m}}\text{Pt}$. Obliczenia, które pozwoliły na oszacowanie przewidywanej aktywności $^{195\text{m}}\text{Pt}$ oraz innych współprodukowanych radionuklidów przeprowadził dla nas prof. Ulli Koester z Institute Laue-Langevin (ILL) w Grenoble. Wykazały one, że przewidywana aktywność właściwa wynosi około 0,7 MBq/mg (masa tarczy = 1 mg; strumień 10^{15} n/cm²/s, 7 dni naświetlania). Obliczeń tych, ze względu na brak znajomości przekroju czynnego dla reakcji $^{194}\text{Ir}(n, \gamma)^{195\text{m}}\text{Pt}$, dokonano zakładając, że $^{195\text{m}}\text{Pt}$ powstaje jedynie w wyniku aktywacji neutronami powstającego w procesie radionuklidu ^{194}Pt . Stanowi to duże zaniżenie w stosunku do wartości rzeczywistych, jednak uzyskanie dokładniejszego modelu nie jest możliwe.

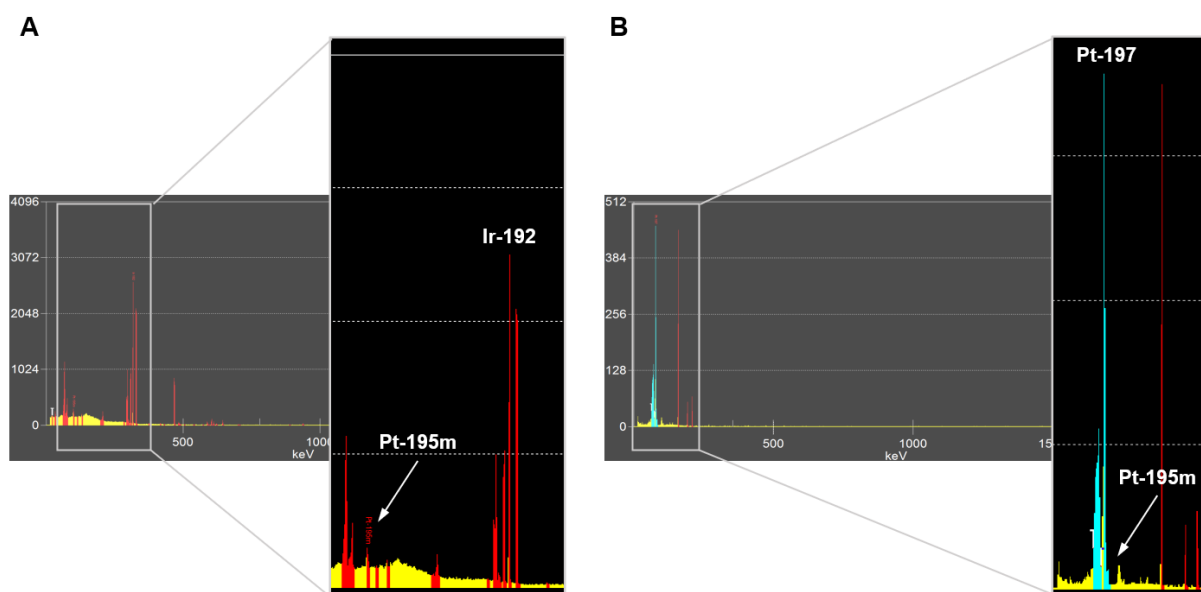
W przeprowadzonym w reaktorze Maria naświetlaniu 1 mg tarczy ^{193}Ir przez 1 h w strumieniu neutronów 10^{14} n/cm²/s uzyskano bardzo złożone widmo γ z nakładającymi się pikami i efektem Comptona od ^{192}Ir (rysunek 11A), przez co bez chemicznego wydzielenia $^{195\text{m}}\text{Pt}$ nie można określić jej aktywności. Brak danych kalibracyjnych wymaganych do bezpośredniego pomiaru radionuklidów irydu pozwolił natomiast na pomiary aktywności jedynie ^{192}Ir , jako głównego produktu ubocznego aktywacji. Najlepszym źródłem do oszacowania wydajności produkcji $^{195\text{m}}\text{Pt}$ z tarczy ^{193}Ir jest praca Knappa Jr. i wsp. [150], gdzie oszacowano wydajność produkcji na poziomie 75 MBq na 1 mg wzbogaconej tarczy, przy naświetlaniu przez 7 dni w strumieniu neutronów termicznych 10^{15} n/cm²/s. Tak więc, na wyprodukowanie minimalnej aktywności 1 GBq $^{195\text{m}}\text{Pt}$ koniecznej do przeprowadzenia badań *in vitro* potrzebna w tych warunkach byłaby tarcza o masie 13 mg, a zawartość ^{192}Ir , jako głównego produktu ubocznego, wynosiłaby 5,9 GBq. Spowodowałoby to problemy w przerobieniu tarczy i jej transporcie. Istnieje również poważne

narażenie na zanieczyszczenie produktu stosunkowo długożyciowym radionuklidem ($t_{1/2} = 73,8$ d). W związku z tym, zastosowanie reaktora, nawet wysokostrumieniowego, nie jest obecnie możliwe i naukowo uzasadnione.

Obliczenia dotyczące strat poniesionych podczas obróbki materiału tarczowego oparto zatem na analizie stosunku aktywności poszczególnych frakcji, na podstawie pomiarów ^{192}Ir , którego obecność w badanej próbce potwierdzono rejestrując widmo γ (rysunek 11A).

Na podstawie obliczeń oszacowano, że podczas przeniesienia próbki z fiolki kwarcowej do teflonowego naczynia reakcyjnego straty materiału wyniosły około 3,3%. Po zakończeniu procesu rozpuszczania w reaktorze wysokociśnieniowym zaobserwowano powstanie dwóch, wyraźnie oddzielonych warstw materiału. Stanowiły je ciemnozielony roztwór oraz stała pozostałość w formie zielono-brązowego wilgotnego osadu o dużej gęstości. Ciemnozielone zabarwienie roztworu wskazywało na obecność w próbce jonu irydu na +III stopniu utlenienia (IrCl_6^{3-}) i dowiodło, że proponowana koncepcja rozpuszczenia tarczy poprzez jej utlenienie nadtlenkiem wodoru jest chemicznie uzasadniona. Niestety, pomiar aktywności frakcji cieklej zebranej z gęstego osadu wykazał jedynie śladowe ilości aktywności (<10%). Dalsze próby rozpuszczenia stałej pozostałości w różnorodnych warunkach, zarówno z użyciem reaktora wysokociśnieniowego, jak i w warunkach standardowych, nie były skuteczne i nie pozwoliły na kontynuowanie badań nad rozdziałem radionuklidów platyny i irydu.

Ze względu na problemy z aktywacją i rozpuszczaniem tarczy irydowej, niemożliwe było przeprowadzenie nawet pojedynczych prac eksperymentalnych z radionuklidem $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Brak dostępu do cyklotronu uniemożliwił natomiast otrzymanie $^{193\text{m}}\text{Pt}$ w reakcji $^{192}\text{Os}(\alpha,3n)^{193\text{m}}\text{Pt}$. W związku z tym, część prac badawczych (poza oceną cytotoksyczności) przeprowadzono na nieradioaktywnych nanocząstkach lub radioaktywnych produktach zawierających izotop ^{197}Pt , stosowany jako radioznacznik.



Rysunek 11. Widma gamma zarejestrowane dla tarczy ^{193}Ir (A) oraz ^{193}Pt (B) w celu identyfikacji radionuklidów obecnych w próbkach.

6.1.2. Produkcja ^{197}Pt

W wyniku aktywacji tarczy $^{\text{nat}}\text{Pt}$ otrzymano łącznie 3,41 GBq $^{195\text{m},197}\text{PtCl}_2$, co przekłada się na aktywność właściwą równą ~ 46 MBq/mg Pt, przy zawartości początkowej metalicznej Pt równej 73,5 mg. Radionuklidy obecne w próbce zidentyfikowano poprzez zarejestrowanie widma gamma (rysunek 11B). Stosunek aktywności ^{197}Pt do $^{195\text{m}}\text{Pt}$ na podstawie zdefiniowanych na potrzeby analizy pików charakterystycznych wynosił około 14:1. Pomimo przeprowadzenia aktywacji w kwarcowej fiolce, odzyskanie części materiału podczas jej otwierania i przenoszenia do naczynia reakcyjnego nie było możliwe. Straty poniesione na tym etapie wynosiły około 35%, przez co aktywność tarczy przed rozpoczęciem procesu rozpuszczania wynosiła 2,18 GBq. Ze względu na krótki okres półtrwania ^{197}Pt , aktywność zmierzona po rozpuszczeniu przeliczono na czas początkowy i wynosiła ona 2,048 GBq, co stanowi 94% wartości początkowej. Łączne straty poniesione podczas obróbki tarczy wynosiły zatem 42%, z czego ponad 85% stanowił ubytek związany z procesem otwierania i przenoszenia materiału po aktywacji do naczynia reakcyjnego. Na podstawie pomiarów aktywności określono, że masa platyny (w przeliczeniu na metal) wynosiła 44,1 mg (2,048 GBq) i korzystając z tych wyliczeń przystąpiono do syntezy nanocząstek.

6.2. Synteza i charakterystyka zsyntetyzowanych nanocząstek i biokoniugatów

Prace badawcze obejmowały zastosowanie dwóch różnych typów nanomateriałów – stosunkowo dużych nanocząstek typu core-shell o średnicy 30 nm oraz bardzo małych nanocząstek platyny o średnicy 2 nm. Zróżnicowanie materiałów miało na celu umożliwienie wykorzystania zalet poszczególnych nanocząstek i jednocześnie pozwolić zaobserwować różnice i ograniczenia, z jakimi wiąże się stosowanie obydwu rodzajów tych nanocząstek w terapii elektronami Augera. Nanocząstki PtNPs dzięki wysokiemu stosunkowi powierzchnia:objętość powinny wykazywać zwiększoną reaktywność, a mała średnica może umożliwiać im dotarcie do głębiej ulokowanych struktur komórkowych. Duża powierzchnia 30 nm Au@Pt pozwala na otrzymanie wysokich aktywności właściwych i najbardziej efektywne wykorzystanie osadzonej na rdzeniu złota platyny, gdyż ulokowanie jej głębiej, znacząco obniżyłoby możliwość dotarcia elektronom Augera do celów biologicznych. Na etapie koncepcyjnym zakładano pokrycie AuNPs monowarstwą platyny lub kilkoma warstwami, tworząc jedynie zewnętrzne warstwy z wykorzystaniem radioaktywnego metalu dla jego najbardziej optymalnego wykorzystania. Umożliwiłoby to dostosowanie stężenia Pt w zależności od wartości pożądanego z punktu widzenia indukowania chemoterapeutycznego działania *in vitro*. Dzięki temu uzyskano materiały podatne na dalsze modyfikacje, o potencjalnie różnych właściwościach biologicznych (tabela 6).

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek Au@Pt i PtNPs. W obliczeniach dla Au@Pt uwzględniono produkt syntezy z wykorzystaniem 4,30 mg prekursora (1,49 mg Pt) i wykorzystano wartość promienia atomowego Pt = 139 pm.

Nanocząstki	Średnica	Stosunek SA:V*	Liczba at. Pt na 1 nanocząstkę	% at. powierzchniowych**
Au@Pt NPs	30 nm (rdzeń)/ 9 nm powłoka	0,16	788 882	8,9%
PtNPs	2 nm	3,0	273	61%

**Stosunek SA:V – stosunek powierzchni zewnętrznej do objętości*

***Obliczone teoretycznie przy założeniu sferycznego kształtu nanocząstek*

(potwierdzono obrazowaniem TEM/HR-TEM)

Uwzględniając różnice w właściwościach fizykochemicznych opisanych nanomateriałów obliczono, że na jednej PtNP 61% atomów znajduje się na powierzchni zewnętrznej. Dla porównania, jedynie 8,9% atomów Pt znajduje się na zewnętrznej powierzchni otrzymanych nanocząstek typu core-shell. Następstwem tego może być zróżnicowana aktywność biologiczna związana z mniejszą reaktywnością Au@Pt NPs względem PtNPs. Dodatkową zaletą 2 nm PtNPs jest teoretyczna możliwość wewnątrzjądrowej lokalizacji na drodze dyfuzji przez jądro kompleksu porowy przepuszczalny dla cząstek o średnicy mniejszej niż 5 nm i masie molowej rzędu 30-60 kDa [181]. Wymienione czynniki pozwalały na oczekiwanie istotnych różnic w stopniu internalizacji, lokalizacji wewnątrzjądrowej, reaktywności i efektywności terapeutycznej oraz mechanizmu jej indukowania. Wszystkie te aspekty zostały zbadane w trakcie prowadzonych prac eksperymentalnych.

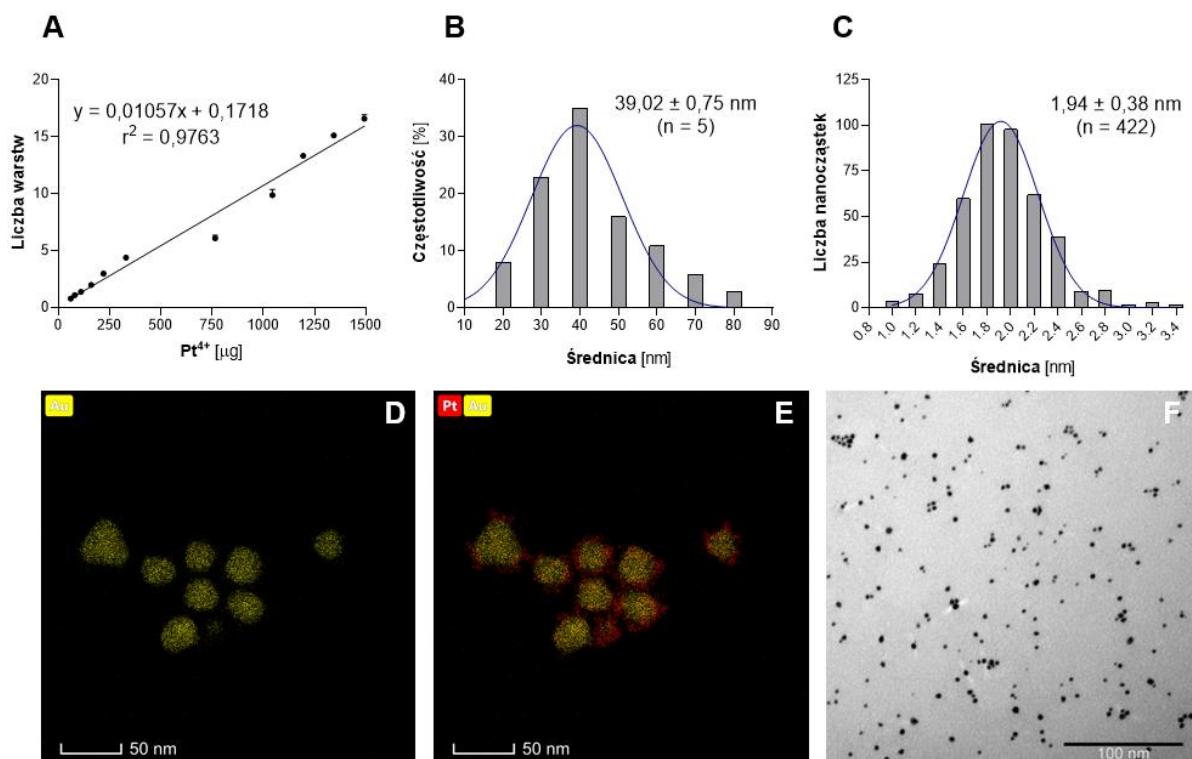
6.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek

Optymalizacja parametrów syntezy umożliwiła otrzymanie nanocząstek złota o średnicy 30 nm. W różnych warunkach pH średnica produktu zmieniała się w zakresie od 15 nm (dla pH ~ 3,5 – uzyskanego bez alkalizacji z użyciem NaOH) do 50 nm (dla pH ~ 6,0). Nanocząstki o średnicy 30 nm otrzymano przy pH 4,5 i ten produkt wykorzystywano do dalszych modyfikacji.

Pokrywanie nanocząstek złota platyną przebiegało każdorazowo z wysoką wydajnością i powtarzalnością. Zaobserwowano dobrą korelację ($r^2 = 0,9763$) pomiędzy masą prekursora użytego do reakcji, a ilością platyny związanej z powierzchnią nanocząstki (rysunek 12A). Pokazuje to, że możliwe jest nie tylko wysycenie powierzchni monowarstwą (uzyskane według obliczeń przy użyciu 1,60 μg Pt na 1 mL nanocząstek), lecz także formowanie kolejnych warstw. Wydajność pokrywania obliczona dla największej masy prekursora (4,30 mg $\text{Na}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) w zależności od metody detekcji wynosiła $95,0 \pm 3,4\%$ (ICP-MS) lub $90,2 \pm 5,7\%$ (detekcja radiometryczna ^{197}Pt), co wiązało się z formowaniem około 12 warstw platyny. Nie zaobserwowano istotnego wpływu rodzaju prekursora na wydajność reakcji – użycie PtCl_2 pozwoliło na osiągnięcie $92,0 \pm 5,0\%$, pomimo długiego i złożonego procesu rozpuszczania materiału przed syntezą. Na podstawie obliczeń modelowych zakładających: idealne upakowanie nanocząstek (1), równomierną depozycję atomów (2) oraz tworzenie jednorodnych warstw (3) oszacowano, że w wyniku opisanej reakcji spodziewany wzrost średnicy nanocząstki wynosić będzie 6,6 nm. Wartość ta odpowiada warstwom w pełni uformowanym, czyli takim, dla których osiągnięto wysycenie całej dostępnej powierzchni. Nie jest to jednak tożsame z depozycją wszystkich atomów Pt przyłączonych do nanocząstki. Jak obliczono, 4,3% z ich liczby początkowej powinno uformować się na powierzchni ostatniej warstwy nie wysycając całkowicie jej powierzchni. Należy jednak pamiętać, że tego typu obliczenia ze względu na rozrzut średnicy nanocząstek w koloidzie i niewystępowanie idealnego stopnia upakowania są w przypadku nanocząstek obciążone dużym błędem. W związku z czym, nie mogą stanowić wiarygodnej podstawy dla formułowania jednoznacznych wniosków.

Mając na uwadze istotne różnice pomiędzy średnicą hydrodynamiczną, a rzeczywistym rozmiarem badanego obiektu, w analizie danych DLS (rysunek 12B) oceniono przede wszystkim zmiany w potencjale elektrokinetycznym (ζ). Potencjał zeta w wyniku syntezy ulegał nieznacznemu obniżeniu od wartości $-43,5 \pm 0,6$ mV (AuNPs) do $-45,1 \pm 1,3$ mV (Au@Pt), co wynikało z ujemnego ładunku kwasu askorbinowego używanego jako czynnika redukującego i stabilizującego podczas syntezy Au@Pt. Otrzymane wartości potencjału zeta pozwoliły sklasyfikować zsyntetyzowane nanocząstki jako stabilne. Zgodnie z przyjętą zasadą, za stabilne uznaje się nanomateriały, których wartość bezwzględna potencjału zeta przekracza 30 mV [182]. Obrazowanie HR-TEM (rysunek 12D/E) wykazało homogeniczne rozmieszczenie atomów platyny na powierzchni nanocząstek złota i równomierne pokrycie wszystkich nanocząstek znajdujących się w polu widzenia podczas obrazowania.

Średnica nanocząstek platyny (PtNPs) obliczona na podstawie pomiarów TEM wynosiła $1,94 \pm 0,38$ nm (rysunek 12C). Ze względu na niewielki rozmiar niemożliwe było natomiast wykonanie analizy porównawczej DLS. Zdjęcia mikroskopowe potwierdziły sferyczny kształt nanocząstek, stosunkowo dużą jednorodność ($SD = 0,38$ nm) oraz brak tendencji do aglomeracji, nawet przy długookresowym przechowywaniu produktu (rysunek 12F).



Rysunek 12. Charakterystyka fizykochemiczna zsyntetyzowanych nanomateriałów. Zależność pomiędzy masą prekursora Pt użytego do reakcji a liczbą warstw (A); rozrzut średnicy hydrodynamicznej Au@Pt na podstawie pomiarów DLS (B); rozrzut średnicy PtNPs na podstawie obrazowania TEM (C); obrazowanie HR-TEM z mapowaniem powierzchni AuNPs (D) i Au@Pt (E); obrazowanie TEM PtNPs (F).

6.2.2. Biokoniugaty Au@¹⁹⁷Pt-PEG-trastuzumab i ¹⁹⁷PtNPs-PEG-trastuzumab

Proces syntezy biokoniugatu z trastuzumabem przebiegał dwuetapowo. Ze względu na zróżnicowane rozmiary nanocząstek i wiążący się z tym brak możliwości poddania PtNPs analizie DLS, jako

metodę analityczną do weryfikacji postępów reakcji wybrano detekcję radiometryczną z wykorzystaniem radiojodowanego przeciwciała ($[^{131}\text{I}]$ trastuzumab). We wstępnym etapie trastuzumab wyznakowano radionuklidem jodu-131 i oczyszczono na kolumnie PD10 ze złożem Sephadex G25 uzyskując >95% wydajność potwierdzoną analizą iTLC. Dzięki zastosowaniu $[^{131}\text{I}]$ trastuzumab możliwe było łatwe określenie odzysku z membrany i potencjalnych strat podczas oczyszczania biokoniugatu $[^{131}\text{I}]$ trastuzumab-PEG-OPSS przebiegającego bezpośrednio po etapie koniugacji. Straty białka podczas oczyszczania, określone na podstawie zmniejszonej radioaktywności radiobiokoniugatu, były nieznaczne i wynosiły 5-8%. Na tej podstawie obliczano także stężenie masowe białka po koniugacji, co pozwoliło na precyzyjne dobranie ilości produktu do syntezy z nanocząstkami. W celu zapewnienia jak największej powierzchni dostępnej dla biokoniugatu $[^{131}\text{I}]$ trastuzumab-PEG-OPSS, proces stabilizacji nanocząstek, poprzez przyłączenie HS-PEG-COOH przeprowadzano każdorazowo po koniugacji z białkiem i oczyszczaniu produktu pośredniego.

Istotnym parametrem dla tej ścieżki syntetycznej był odpowiedni dobór nadmiaru polimeru użytego do reakcji. Jak przedstawiono w pracy Chattopadhyay i wsp. [138] użycie zbyt dużego nadmiaru OPSS-PEG-NHS prawdopodobnie prowadzi do koniugacji z grupami $-\text{NH}_2$ znajdującymi się w lizynach zlokalizowanych w miejscach wiążących przeciwciała. Wywiera to znaczący wpływ na aktywność biologiczną przeciwciała, przekładając się na obniżenie jego immunoreaktywności. W celu pośredniego potwierdzenia przyłączenia przeciwciała, produkt reakcji poddawano analizie DLS na każdym etapie syntezy biokoniugatu (tabela 7). Ze względu na małą średnicę PtNPs, wykonanie analogicznej analizy dla PtNP-PEG-trastuzumab nie było możliwe.

Tabela 7. Zmiany średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta podczas biokoniugacji Au@Pt z trastuzumabem.

	Średnica hydrodynamiczna [nm]	Potencjał zeta ζ [mV]
Au@Pt	39,02 \pm 0,75	-45,1 \pm 1,3
Au@Pt-PEG-trastuzumab	88,86 \pm 3,13	-31,0 \pm 0,1
Au@Pt-PEG-trastuzumab (z HS-PEG-COOH)	92,19 \pm 5,20	-35,3 \pm 0,7

Przeprowadzona analiza DLS wykazała wyraźne zwiększenie średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta po procesie koniugacji nanocząstek z przeciwciałem. Ze względu na ograniczenia tej techniki i wpływ wielu czynników na formowanie warstwy hydratacyjnej dane te nie mogą stanowić jednoznacznego potwierdzenia skuteczności koniugacji. Przeprowadzając tę analizę dokonywano porównawczej oceny zmian średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta pomiędzy Au@Pt inkubowanymi z koniugatem przeciwciała-PEG, a także z samym przeciwciałem (1) i z samym OPSS-PEG-NHS (2) jako próbkami referencyjnymi. Opierając się na zaobserwowanych różnicach zauważono, że po dodaniu do nanocząstek przeciwciała pozbawionego polimerowego linkera (1) nie dochodzi do istotnych zmian średnicy i potencjału zeta. Ponadto, w przypadku drugiego typu próbek referencyjnych (2), obserwowane zmiany parametrów były w zakresie odpowiednich dla przyłączenia OPSS-PEG-NHS do Au@Pt (średnica: 53,86 \pm 0,66; potencjał zeta: -17,40 \pm 0,14). W związku z tym, analizując przedstawione

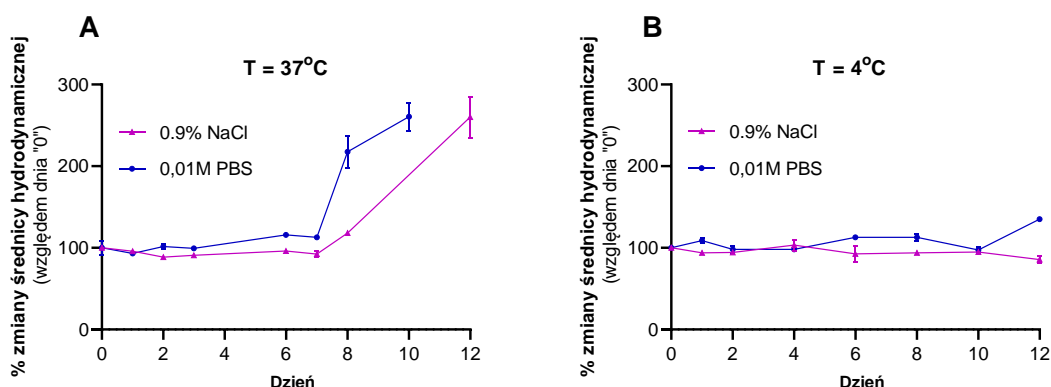
w tabeli 7 wyniki, wykazujące wyraźnie większy – niż dla OPSS-PEG-NHS – wzrost średnicy oraz zmiany potencjału zeta, w sposób pośredni i niejednoznaczny, potwierdzono przyłączenie biokoniugatu przeciwciała-PEG do powierzchni nanocząstki. Przyłączenie w ostatnim etapie syntezy HS-PEG-COOH nie wpłynęło istotnie na zmianę średnicy biokoniugatu ($p > 0,05$), jednocześnie nieznacznie obniżając potencjał zeta. Wartość potencjału zeta $> \pm 30$ mV wskazała na dobrą stabilność otrzymanego biokoniugatu, podobnie jak miało to miejsce w przypadku samych nanocząstek.

Na podstawie detekcji radiometrycznej obliczono, że na jedną nanocząstkę Au@Pt przypada około $22,4 \pm 1,4$ cząsteczek białka, natomiast w przypadku PtNP około $2,1 \pm 0,5$. Wartości te są zgodne z poprzednio opisywanymi w artykułach naukowych [88,138,183].

6.2.3. Badania stabilności

Stabilność koloidów Au@Pt i PtNPs oceniana była w warunkach statycznych, podczas przechowywania zsyntetyzowanych nanomateriałów w temperaturze 4°C. W obydwu przypadkach nanocząstki zachowywały swoje pierwotne właściwości fizykochemiczne przez okres co najmniej jednego miesiąca, co potwierdzono przeprowadzonymi pomiarami. Nanocząstki Au@Pt poddawano cyklicznej analizie DLS, w celu bieżącego monitorowania średnicy hydrodynamicznej i potencjału ζ . W tym czasie nie stwierdzono występowania żadnych symptomów świadczących o spadku lub utracie stabilności koloidu. Pomiarzy średnicy i potencjału zeta nie wykazywały znaczących różnic co potwierdzało ich długookresową stabilność. Nanocząstki platyny o średnicy 2 nm poddano powtórnej analizie TEM po upływie jednego miesiąca. Wykonane obrazowanie nie wykazało zmian morfologicznych w próbce – nie stwierdzono wzrostu średnicy nanocząstek ani tendencji do agregacji.

Otrzymany biokoniugat Au@Pt-PEG-trastuzumab zawieszony w roztworach biologicznych – 0,9% NaCl oraz 0,01 M PBS poddawano codziennej analizie przez okres 12 dni w celu określenia zmian stabilności (rysunek 13).



Rysunek 13. Badania stabilności biokoniugatu Au@Pt-PEG-trastuzumab w temperaturze 37°C (A) i 4°C (B) (n=5).

Ze względu na ograniczenia metody DLS niemożliwe było przeprowadzenie analizy w surowicy ludzkiej krwi, która z naukowego punktu widzenia była najistotniejszym medium pomiarowym. Obecność licznych białek wynikająca z naturalnej kompozycji chemicznej tego medium powodowałaby uniemożli-

wijające analizę interferencje. Jak pokazano na rysunku 13A biokoniugat w temperaturze 37°C zachowywał stabilność przez 7 dni, natomiast po tym okresie stwierdzono występowanie silnej agregacji prowadzącej do wzrostu średnicy hydrodynamicznej. Szczególnie widoczne zmiany zaobserwowano w 0,01 M PBS. Przechowywanie biokoniugatu w temperaturze 4°C wydłużyło jego stabilność, ponieważ analizy nie wykazały wyraźnych zmian średnicy hydrodynamicznej przez 10 dni w 0,01 M PBS i o 2 dni dłużej w 0,9% NaCl (rysunek 13B). Celem tej części badań stabilności było jedynie określenie możliwości przechowywania zsyntetyzowanego biokoniugatu przed jego dalszym wykorzystaniem. Określenie stabilności PtNP-PEG-trastuzumab nie było możliwe ze względu na fakt, iż obrazowanie TEM nie pozwoliłoby jednoznacznie zobrazować białka skoniugowanego z nanocząstką. Obecność przeciwciała mogłaby być wyłącznie pośrednio zauważona poprzez niejednorodną otoczkę (koronę) wokół nanocząstki, jednak ze względu na niską wiarygodność takich danych odstąpiono od pomiaru.

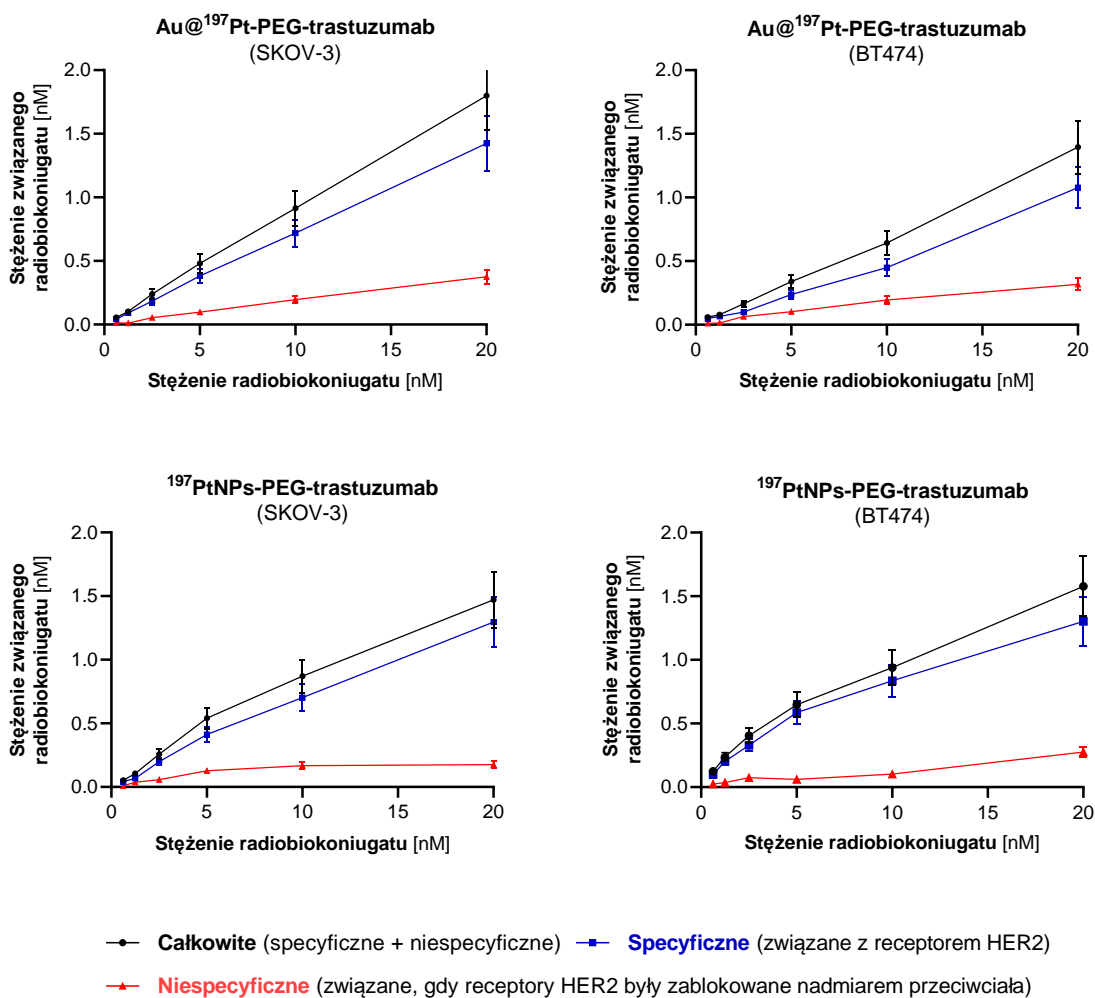
6.3. Immunoreaktywność otrzymanych związków

Rozważanie łączonej chemo- i radioterapii elektronami Augera sprawia, że wyjątkowo dużo uwagi należy poświęcić takiemu zaprojektowaniu potencjalnego radiofarmaceutyku, by zapewnić jego przynajmniej wewnątrzkomórkową lokalizację lub dużą akumulację w błonie komórkowej. Jest to szczególnie istotne nawet w sytuacji, gdy nie jest rozpatrywane podanie systemowe. Ukierunkowanie na odpowiednie cele molekularne istotnie zwiększa bowiem wychwyt przez komórki guza i stopień retencji związku, nawet przy podaniu do żyły pooperacyjnej lub do naczyń krwionośnych znajdujących się w jego bezpośredniej okolicy. W tym celu zbadano zdolność otrzymanych koniugatów i biokoniugatów do specyficznego oddziaływania z komórkami, na które zostały ukierunkowane.

6.3.1. Badania wiązalności do receptora

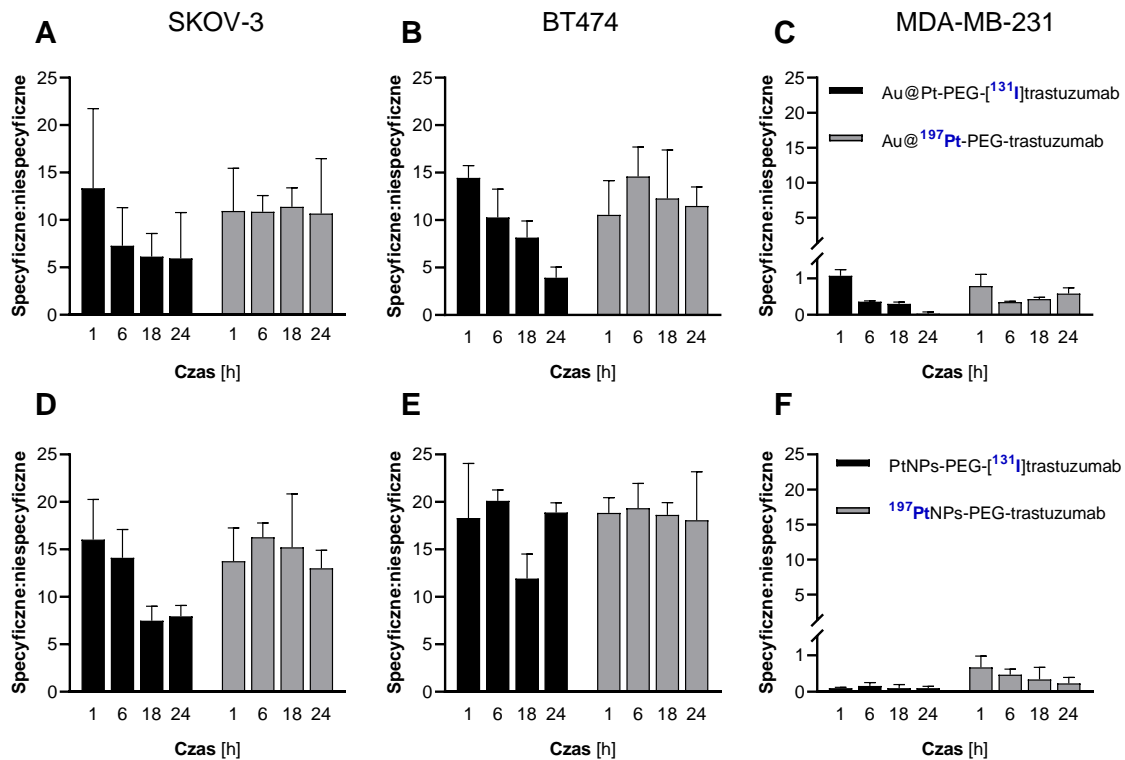
Nadekspresja receptora HER2 w przypadku komórek HER2-pozytywnego nowotworu piersi stanowi atrakcyjny cel molekularny wykorzystywany w licznych protokołach terapeutycznych. Po koniugacji Au@Pt i PtNPs z funkcjonalizowanym polimerem trastuzumabem (OPSS-PEG-trastuzumab), przeprowadzono badania wiązalności do receptora. Celem tych analiz było określenie czy otrzymane radiobiokoniugaty łączą się specyficznie z transbłonowymi receptorami HER2 (rysunek 14).

Zsyntetyzowane radiobiokoniugaty łączyły się specyficznie z receptorami HER2, co potwierdzono poprzez wyraźne obniżenie wydajności wiązania, przy wcześniejszym zablokowaniu receptorów 100-krotnym nadmiarem molowym przeciwciała (rysunek 14, czerwona krzywa). Na podstawie danych eksperymentalnych obliczono, że frakcja związana stanowiła około 6-7% całkowitej, co stanowi typową wartość dla rozważanych w medycynie nuklearnej radiofarmaceutyków bazujących na nanocząstkach [21,140]. Nie zaobserwowano natomiast wysycania receptorów radiobiokoniugatami charakteryzującego się występowaniem plateau przy najwyższych stężeniach. Jest to efektem braku możliwości zbadania otrzymanych związków w szerokim zakresie stężeń (np. do 100 nM). Wynika to ze specyfiki nanocząstek predysponujących je do niespecyficznego osadzania się na plastikowych elementach zestawu eksperymentalnego lub ich przyklejania się do komórek, wynikającego ze zbyt dużego stężenia w przeliczeniu na jednostkę objętości.



Rysunek 14. Krzywe wiązalności do receptora HER2 otrzymanych radiobiokoniugatów (n=3).

W ramach oceny immunoreaktywności otrzymanych związków obliczono również stosunek wiązania specyficznego do niespecyficznego, by określić relację tych dwóch typów oddziaływań. Dla uzyskania porównawczych danych eksperymentalnych, w tym badaniu wykorzystano radioaktywne nanocząstki (¹⁹⁷Pt) oraz jodowany trastuzumab (¹³¹I). Stosunek aktywności związanej specyficznemu do niespecyficznego oddziaływania biokoniugat-komórka był wysoki dla komórek HER2+ (rysunek 15A/B i 15D/E). Zaobserwowano przeważający udział wiązania specyficznego, w każdym z analizowanych punktów czasowych. W przypadku komórek HER2- stwierdzono pomijalnie małe oddziaływanie specyficzne i niespecyficzne. Niska wiązalność do komórek MDA-MB-231 potwierdza wysoką specyficzność otrzymanych biokoniugatów (rysunek 15C i 15F).

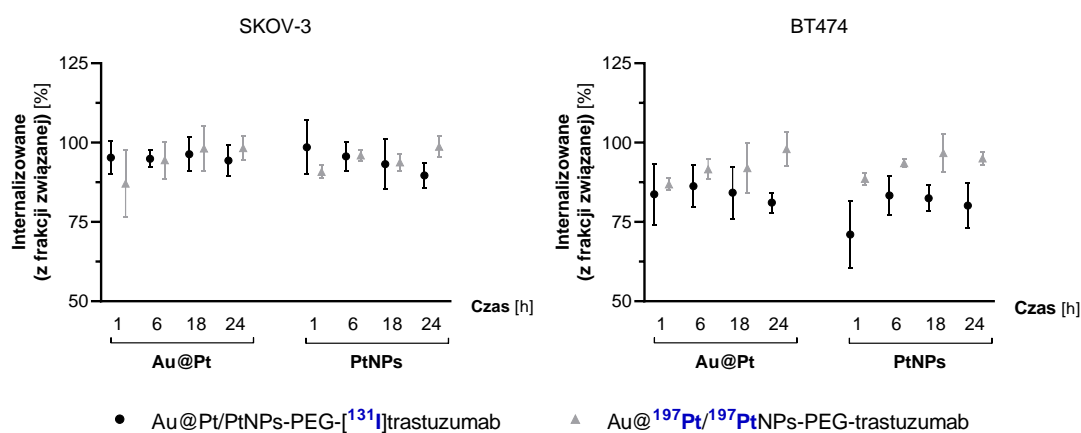


Rysunek 15. Stosunek wiązania specyficznego do niespecyficznego – Au@¹⁹⁷Pt-PEG-trastuzumab (A-C); ¹⁹⁷PtNPs-PEG-trastuzumab (D-F) (n=3).

6.3.2. Internalizacja z wykorzystaniem receptora HER2

Wykorzystywany dla ukierunkowania radiobiokoniugatów wektor zaprojektowany został by oddziaływać na komórkę w sposób dualny. Poza aktywacją układu odpornościowego ukierunkowaną na komórkę nowotworową, trastuzumab wykazuje zarówno cechy antagonisty, jak i agonisty receptora HER2. Antagonistyczne działanie polega na blokowaniu funkcji receptora HER2 poprzez uniemożliwienie homodimeryzacji z receptorami HER2 lub heterodimeryzacji z innymi receptorami grupy HER, stanowiącej naturalny element działania tego białka. Agonistyczna funkcja trastuzumabu związana jest natomiast z indukowaniem zmian strukturalnych w domenie kinazy tyrozynowej, prowadząc do późniejszej internalizacji [184,185]. Wejście do wnętrza komórki powinno być w przypadku leków ukierunkowanych na białko HER2, naturalną konsekwencją oddziaływania związek-receptor, głównie na drodze endocytozy zależnej od klatryny [186]. W otrzymanych biokoniugatach stężenie trastuzumabu dobrano w taki sposób, by ograniczyć jego działanie do aktywnego ukierunkowania na komórki nowotworowe, gdyż uzyskanie aktywności terapeutycznej, wymagałoby użycia zbyt dużych stężeń białka względem nanocząstek.

W celu sprawdzenia, czy związki są w stanie internalizować poprzez białko przyłączone do nanostruktury, przeprowadzono badanie internalizacji (rysunek 16).



Rysunek 16. Kinetyka internalizacji otrzymanych radiobiokoniugatów z detekcją radiometryczną ^{131}I oraz ^{197}Pt (n=4).

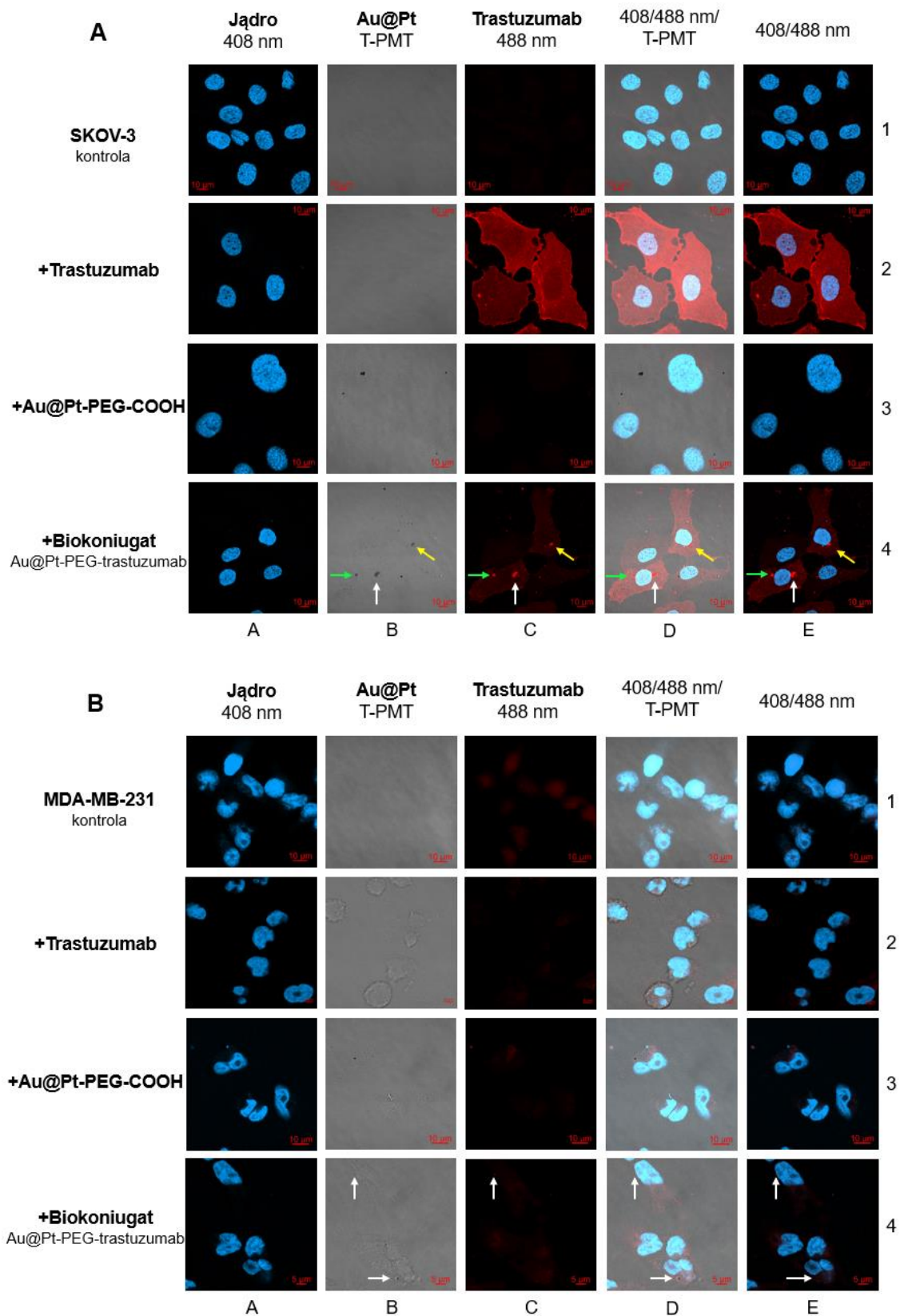
Dla rozszerzenia zakresu analizy przeprowadzono badania porównawcze radiobiokoniugatów z platyną-197 oraz z przeciwciałem znakowanym jodem-131 by określić, czy nanocząstki wykazują zmiany względem przeciwciała czas retencji w komórce (rysunek 16). Jak przedstawiono na rysunku, wysoki (ponad 75%) stopień internalizacji związanej frakcji uzyskiwano już po upływie 1 godziny. Biologiczna aktywność trastuzumabu i jego internalizacja jest procesem zachodzącym bardzo szybko, natomiast czynnikiem limitującym w tym przypadku jest obecność dołączonej do białka nanocząstki. Wykorzystane w badaniu linie komórkowe charakteryzują się zróżnicowaną nadekspresją receptora HER2 – SKOV-3 posiadają $\sim 1,4 \times 10^6$ receptorów na komórkę, natomiast w BT474 liczba receptorów jest większa i wynosi $\sim 1,9 \times 10^6$ [187]. Opisywane różnice mogły przełożyć się na zróżnicowanie kinetyki internalizacji. Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w stopniu internalizacji pomiędzy obydwoma liniami komórkowymi. Dostrzeżono natomiast interesującą odmienność pomiędzy wynikami z jodem-131, a platyną-197. W większości analizowanych próbek zauważono malejące z czasem stężenie frakcji związanej z receptorem przy pomiarach ^{131}I . Jest to wynikiem dalszej internalizacji związku i metabolizowania przeciwciała prowadzącego do jego eliminacji z komórki [186]. Nie stwierdzono natomiast podobnych tendencji przy pomiarach ukierunkowanych na platynę-197 stanowiącą integralny element nanocząstek. Potwierdza to, że poszczególne elementy biokoniugatu poddawane są przebiegającym w różnym tempie procesom metabolicznym, a nanocząstki utrzymują się w cytoplazmie przez co najmniej 24 h, co ma szczególne znaczenie z punktu widzenia indukowania ich potencjalnego cytotoksycznego działania. W badanej próbce pośrednio wykazano także zwiększoną względem trastuzumabu retencję związku, co może stanowić istotną zaletę w procesie terapeutycznym.

Obrazowanie internalizacji z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej przeprowadzono jedynie dla biokoniugatu Au@Pt-PEG-trastuzumab. Ze względu na ograniczenie tej techniki, obserwacja PtNP-PEG-trastuzumab nie była możliwa, gdyż w - zależności od mikroskopu - limit detekcji przy obrazowaniu tego typu nanostruktur wynosi 80-120 nm. Średnica Au@Pt nie daje możliwości rozróżnienia punktowego, jednostkowego sygnału o wysokiej rozdzielczości podczas obrazowania - możliwym jest natomiast zaobserwowanie większych skupisk nanocząstek w komórce po internalizacji. W celu analizy,

porównywano lokalizację czerwonego sygnału pochodzącego od II-rzędowego przeciwciała skoniugowanego z trastuzumabem i punktowych sygnałów nanocząstek uzyskanych w obrazowaniu techniką jasnego pola. Następnie, dzięki nałożeniu obrazów klasyfikowano poszczególne sygnały jako należące (lub nie) do biokoniugatu.

W przypadku komórek SKOV-3 zidentyfikowano liczne sygnały pochodzące od biokoniugatu zlokalizowanego w cytoplazmie (rysunek 17A, 4B-E). Zauważono także tendencję do akumulacji nanocząstek w przestrzeni okołojądrowej. Stanowi to ważny aspekt w kontekście terapii elektronami Augera, ze względu na możliwość indukowania uszkodzeń materiału genetycznego bez lokalizacji wewnątrz jądra. Jak opisano we wstępie teoretycznym, w niedawno opublikowanej pracy wykazano, że w terapii elektronami Augera błona komórkowa może być równie ważnym celem molekularnym dla emiterów elektronów Augera, jak jądro komórkowe i mitochondria [127]. Umieszczenie emitera elektronów Augera w receptorach błony komórkowej spowodowało jej zniszczenie i śmierć komórki. W związku z lokalizacją emitera elektronów Augera, także w kopercie jądrowej (błona złożona z dwóch warstw podobnych do błony komórkowej) lub w jej pobliżu (jak obserwujemy na obrazach mikroskopii konfokalnej dla Au@Pt-PEG-trastuzumab), możliwe jest również doprowadzenie do jej uszkodzenia. Jak wiadomo, koperta jądrowa jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek i jej uszkodzenie spowoduje śmierć komórki. Tak więc, nanocząstkowe koniugaty emiterów elektronów Augera z trastuzumabem mogą wykazywać silny i różnorodny efekt cytotoksyczny, zależny między innymi od ich lokalizacji w komórce.

Obrazowanie koniugatów niesfunkcjonalizowanych białkiem wykazało brak ich wychwytu przez komórkę (17A, 3B-E), co podkreśla istotność roli przeciwciała i dowodzi, że mechanizm odpowiedzialny za lokalizację w cytoplazmie uwzględnia endocytozę receptora HER2. Analiza komórek MDA-MB-231 (HER2-) nie wykazała obecności nanocząstek ani biokoniugatu w cytoplazmie (rysunek 17B). Stanowi to potwierdzenie uzyskanych wcześniej wyników wskazujących na wysoką specyficzność zsyntetyzowanego Au@Pt-PEG-trastuzumab.

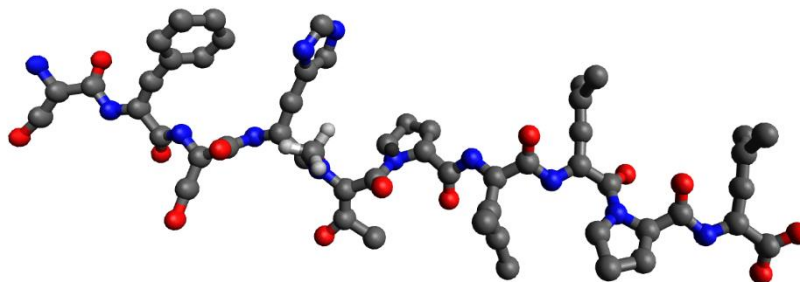


Rysunek 17. Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej lokalizacji biokoniugatu Au@Pt-PEG-trastuzumab w komórkach HER2+ (SKOV-3; **A**) oraz HER2- (MDA-MB-231; **B**). Niebieski sygnał pochodzi od barwnika Hoechst 33258 związanego z DNA w jądrze komórkowym; czerwony sygnał pochodzi od II-rzędowego przeciwciała skoniugowanego z trastuzumabem; ciemne, punktowe sygnały w obrazie T-PMT pokazują lokalizację nanocząstek metalicznych. Strzałkami oznaczono sygnały pochodzące od biokoniugatu.

6.3.3. Transport nanocząstek do cytoplazmy komórek HCC

Duża heterogeniczność raka wątrobowokomórkowego i brak zidentyfikowanych potencjalnych celów molekularnych na powierzchni błony tych komórek utrudnia, a poniekąd uniemożliwia opracowanie koniugatów do terapii celowanej. Stale poszukiwane są nowe markery mogące w przyszłości przyczynić się do postępu w tym zakresie. Opublikowano szereg prac na temat przeciwciał, mających potencjał do specyficznego ukierunkowania leków na komórki HepG2 [188–191]. Pomimo licznych i stale prowadzonych badań, nie udało się jednak zidentyfikować i opracować żadnej możliwości selektywnego dostarczania leku na zasadzie celowanego transportu aktywnego.

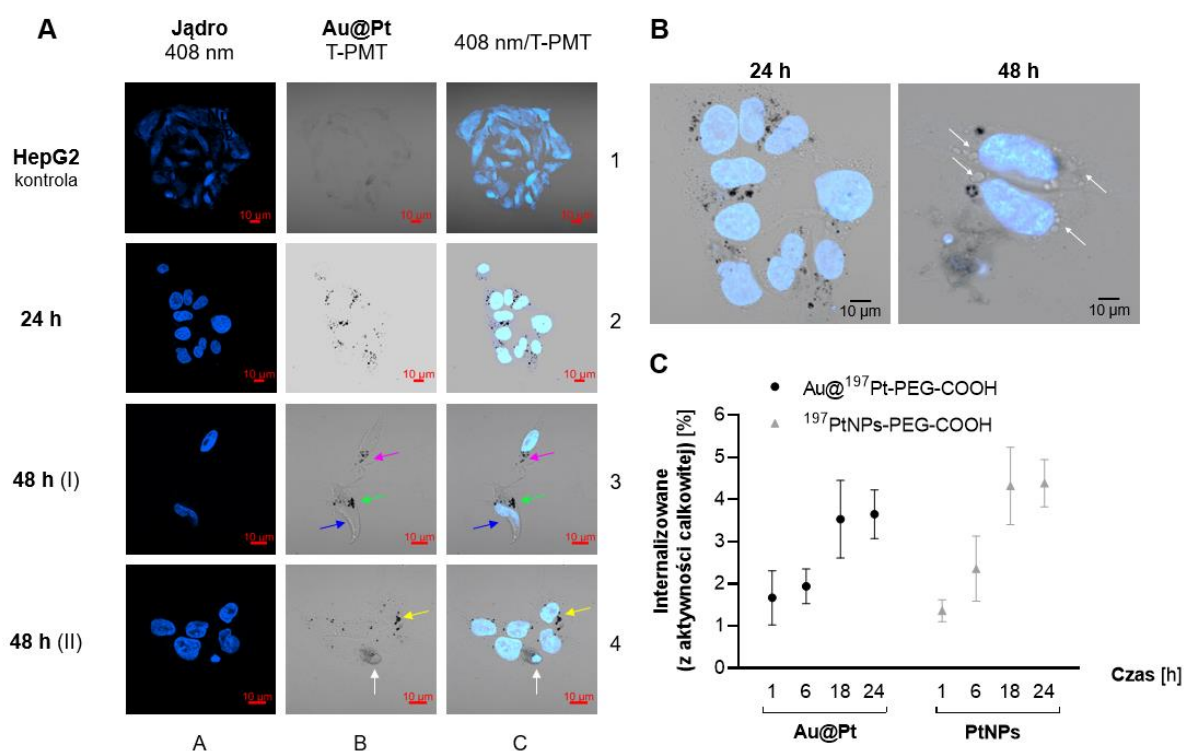
Mimo ograniczonych danych naukowych, kierując się poszukiwaniem nowych koncepcji terapeutycznych, zweryfikowano możliwość użycia peptydu SP94, w celu zapewnienia specyficznego naprowadzania radiobiokoniugatu na komórki HCC [192]. Omawiana cząsteczka to 13-aminokwasowy peptyd (SFSHTPILPL) o masie molowej 1724,06 g/mol i strukturze przedstawionej na rysunku 18. Celem molekularnym, który uznawany jest za najbardziej prawdopodobny dla SP94, jest receptor GRP78 (*ang. glucose regulated protein*), o czym po raz pierwszy napisano w pracy Li i wsp. [193]. Jest to białko o masie cząsteczkowej 70 kDa należące do grupy HSP (*ang. heat shock protein*/białko szoku cieplnego). Jest ono odpowiedzialne za proces syntezy białek w retikulum endoplazmatycznym, zapewniając jego prawidłową konformację. W nowotworach złośliwych o dużych skłonnościach do przerzutowania i oporności na chemioterapię wykryto translokację tego białka do błony komórkowej [194].



Rysunek 18. Struktura peptydu SP94 (Ser-Phe-Ser-Ile-Ile-His-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Leu).

W przedwstępnych analizach mających na celu zweryfikowanie powinowactwa peptydu do komórek HCC przeprowadzono badania wiązalności receptorowej peptydu skoniugowanego poprzez N-koniec z grupą karboksylową chelatora DOTA i wyznakowanego ^{177}Lu . Niestety, w naszych badaniach nie wykazano specyficznego wiązania radiobiokoniugatu, czego potwierdzeniem były śladowe ilości sygnału zidentyfikowane podczas detekcji radiometrycznej ^{177}Lu . Poziom wiązania całkowitego nie przekroczył 0,5% natomiast frakcja związana specyficznie stanowiła mniej niż 0,1% aktywności całkowitej [195]. Prawdopodobną przyczyną jest niewystarczająca ekspresja receptora GRP78 (lub innego, z którym SP94 może potencjalnie oddziaływać). Nie należy też wykluczać, jako jednej z przyczyn, dużej heterogeniczności raka wątrobowokomórkowego, co bezpośrednio przekłada się na ekspresję i aktywność biologiczną poszczególnych receptorów. Brak alternatywnych modeli *in vitro* stanowi istotną przeszkodę nie tylko na etapie badań komórkowych, lecz także znacząco przekłada się na trudności w dostosowaniu protokołów klinicznych do wymagań tego nowotworu.

Ze względu na brak możliwości syntezy biokoniugatu z odpowiednim wektorem, zdecydowano się na sprawdzenie czy nanocząstki stabilizowane polimerem (Au@Pt/PtNP-PEG-COOH) będą zdolne do penetrowania błony komórkowej i internalizacji. Badania internalizacji przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz metodą radiometryczną (rysunek 19). Dla uzyskania wartościowych danych porównawczych przy detekcji radiometrycznej przeprowadzono pomiary w takich samych punktach czasowych (1-24 h), jak w przypadku komórek SKOV-3, BT474 i MDA-MB-231. Ponieważ w opisywanym przypadku mechanizm internalizacji jest nieznan i ze względu na brak wektora może zachodzić wolniej, przy obrazowaniu konfokalnym Au@Pt-PEG-COOH wykonano dodatkową analizę po 48 h (rysunek 19A-B).



Rysunek 19. Badanie internalizacji Au@Pt-PEG-COOH/Au@¹⁹⁷Pt-PEG -COOH oraz PtNPs-PEG-COOH/Au@¹⁹⁷PtNPs-PEG -COOH względem komórek HepG2. Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej przeprowadzone dla Au@Pt-PEG-COOH (A, B); analiza z wykorzystaniem detekcji radiometrycznej (C).

Analiza radiometryczna wykazała nieznaczny stopień internalizacji po upływie 1 i 6 godzin. Wyraźny wzrost zaobserwowano w okresie 6-18 h przy późniejszej stabilizacji % internalizowanego związku, do upływu 24 h na poziomie 4-5% (rysunek 19C). Nie stwierdzono istotnych różnic w szybkości i efektywności internalizacji pomiędzy radiokoniugatami o średnicy 30 nm i 2 nm. Podczas obrazowania na mikroskopie konfokalnym, ujawniono liczne sygnały Au@Pt zgromadzonych w przestrzeni okołojądrowej (rysunek 19A, obrazy 2B/C). Podobnie jak w przypadku komórek SKOV-3, nanocząstki po internalizacji lokalizowały się w postaci skupisk w okolicy jądra komórkowego, ściśle przylegając do błony jądrowej. Takie umiejscowienie nanocząstek w komórce pozwala spodziewać się dodatkowych efektów w postaci uszkodzenia błony komórkowej przy zastosowaniu radiokoniugatu. Wizualizacja próbek po 48-godzinnej inkubacji wykazała także pierwsze symptomy cytotoksycznego działania Au@Pt (rysunek 19B, obrazy 3-4). Zaobserwowano powstawanie licznych ciałek apoptotycznych - zawierających skon-

densowane fragmenty cytoplazmy, organelli komórkowych i chromatyny - będących objawem programowanej śmierci komórki. Efektem działania nanocząstek było także charakterystyczne dla dezintegracji jądra komórkowego rozmycie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od DNA i zwiększona przepuszczalność błony jądrowej, skutkująca dużą intensywnością lokalnie zgromadzonego znacznika (rysunek 19, obraz 4C, biała strzałka). Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej umożliwiło nie tylko potwierdzenie wychwytu nanocząstek przez komórki raka wątrobowokomórkowego, lecz także uwidocznilo pierwsze symptomy cytotoksycznego działania analizowanych związków.

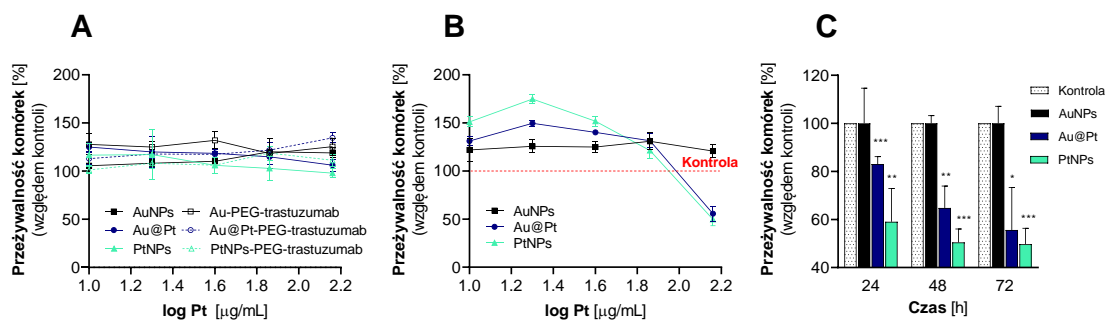
6.4. Określenie mechanizmu biologicznej aktywności nanocząstek platyny

Biologiczna aktywność nanocząstek platyny i związany z tym mechanizm indukowania pod ich wpływem efektów toksycznych wciąż nie zostały dokładnie poznane. W ramach publikowanych prac postulowane są różne koncepcje, jednak brak jest dostatecznych dowodów określających biologiczne aspekty oddziaływania nanocząstek platyny na komórki o podwyższonym potencjale oksydacyjnym. Badania nad określeniem mechanizmu biologicznej aktywności Au@Pt i PtNPs obejmowały weryfikację postulowanych koncepcji poprzez analizę markerów stresu oksydacyjnego, internalizacji do jądra komórkowego wskutek rozpuszczania nanocząstek w środowisku silnie utleniającym oraz wieloetapowej analizy i skuteczności cytotoksycznego działania otrzymanych koniugatów i biokoniugatów.

6.4.1. Wstępna ocena cytotoksycznego działania – test MTS

Wstępne badania nad cytotoksycznym działaniem Au@Pt, PtNPs i ich biokoniugatów przeprowadzono z wykorzystaniem komórek SKOV-3 i HepG2. Obydwie te linie komórkowe charakteryzują się podwyższonym (SKOV-3) lub wysokim (HepG2) potencjałem oksydacyjnym [3,104,164,196,197]. Jest to efektem nadprodukcji w cytoplazmie H_2O_2 , a także zwiększonej konsumpcji tlenu, co ma miejsce szczególnie w przypadku HCC i jest związane z anatomiczną funkcją wątroby. Biorąc pod uwagę fakt, że za większość RFT w komórce odpowiada mitochondrialny łańcuch oddechowy, do badania użyto testu MTS weryfikującego prawidłowe działanie mitochondrium poprzez przekształcanie soli tetrazolowej do barwnego formazanu przez dehydrogenazę mitochondrialną.

Przeżywalność komórek SKOV-3 w zakresie stężeń 10-145 $\mu\text{g/mL}$ ($\log \text{Pt} = 1,0-2,16$) nie zmniejszyła się podczas 72-godzinnej inkubacji (rysunek 20A). Nie zaobserwowano żadnego wpływu zarówno samych nanocząstek (stabilizowanych PEG), jak i biokoniugatów z trastuzumabem. Przyjmując, że do indukowania cytotoksyczności wymagany jest wystarczający potencjał oksydacyjny, zdecydowanie większe prawdopodobieństwo uzyskania oczekiwanego efektu było dla nanocząstek skoniugowanych z przeciwciałem, ze względu na ich wewnątrzkomórkową lokalizację. Pomimo tego, nie stwierdzono żadnych symptomów cytotoksyczności, co wskazuje, że potencjał oksydacyjny tych komórek jest zbyt niski, by nanocząstki mogły wykazywać działanie prooksydacyjne.



Rysunek 20. Wpływ zsyntetyzowanych nanocząstek na przeżywalność komórek SKOV-3 (A) oraz HepG2 (B, C). Stężenie Pt dla danych przedstawionych na wykresie C wynosi 145 $\mu\text{g/mL}$ (log Pt = 2,16) (n=4).

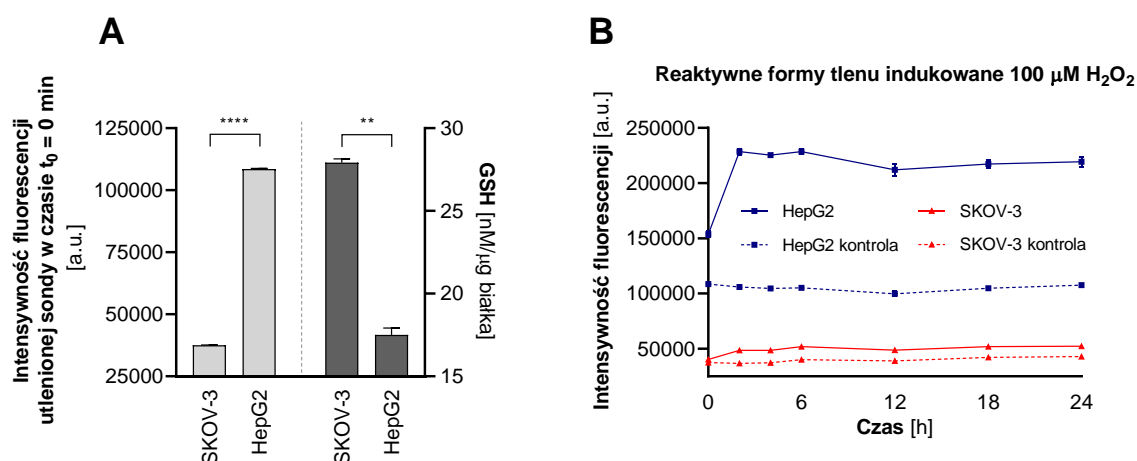
Zastosowane w tym samym zakresie stężeń Au@Pt-PEG-COOH i PtNP-PEG-COOH wykazały wysoką toksyczność, szczególnie po 72-godzinnej inkubacji (rysunek 20B/C). Efekt cytotoksyczny zaobserwowano jedynie przy najwyższym testowanym stężeniu Pt (145 $\mu\text{g/mL}$; log Pt = 2,16), co przełożyło się na wyraźne obniżenie przeżywalności. Pomimo uzyskania zbliżonego efektu, podczas trzydniowej inkubacji zauważono istotne różnice w szybkości zmian indukowanych obydwojema rodzajami nanocząstek (rysunek 19C). Bardzo małe, 2 nm PtNPs, już po 24 h wywołały toksyczny efekt u 40,94 \pm 13,81% komórek indukując zmiany nieznacznie postępujące w czasie (różnica 24 – 72 h na poziomie <10 p.p.). Nanocząstki core-shell powodowały natomiast postępujące w czasie obniżenie przeżywalności komórek. Po 24 h efekt działania Au@Pt był wyraźny ($p \leq 0,01$), lecz znacznie mniejszy niż w przypadku PtNPs. Pomimo mniej intensywnego wpływu w początkowych okresach inkubacji Au@Pt powodowały jedynie nieznacznie słabsze obniżenie przeżywalności komórek HepG2 względem PtNPs. Uzyskane wartości po 72 h wynosiły 49,7 \pm 6,59% i 59,06 \pm 13,81% odpowiednio dla Au@Pt i PtNPs. Obserwowane różnice mogły wynikać ze zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych nanocząstek, zależnych od ich rozmiaru. Znajduje to bezpośrednie przełożenie na reaktywność i możliwość zarówno indukowania stresu oksydacyjnego, jak i potencjalnego rozpuszczania, a wszystkie te czynniki mogą na drodze różnych mechanizmów powodować działanie toksyczne. Badanie kontrolne z użyciem AuNPs wykazało ich neutralny wpływ na aktywność mitochondriów komórek HepG2, co bezpośrednio dowodzi kluczowej roli platyny w indukowaniu cytotoksyczności.

Platyno-zależna toksyczność obserwowana jest przy różnych stężeniach, w zależności od typu nanomateriału, jego rozmiaru, funkcjonalizacji oraz linii komórkowej użytej do badań. Jednym z czynników obniżających efektywność działania jest również tzw. efekt koronowy, polegający na absorpcji białek na powierzchni nanocząstki, osłabiając tym samym interakcje nanocząstka-komórka. W publikowanych pracach poświęconych różnym typom nanocząstek platynowych obserwuje się toksyczność w zakresie stężeń 50 – 400 $\mu\text{g/mL}$ [198]. Almeer i wsp. dla nanocząstek o średnicy <100 nm zaobserwowali prooksydacyjne, cytotoksyczne – względem komórek HEK293 - działanie przy stężeniu Pt = 350 $\mu\text{g/mL}$ [199]. Wartości IC₅₀ uzyskane w pracy Mironawy i wsp. oscylowały w granicach 51 i 124 $\mu\text{g/mL}$ dla nanocząstek o średnicy 2-15 nm dla linii komórkowych nowotworu piersi [200]. Wyniki prezentowanych prac znajdują odzwierciedlenie i potwierdzenie w przeprowadzonych w ramach niniejszej

pracy doświadczeniach i potwierdzają zróżnicowanie wrażliwości komórek nowotworowych na działanie nanocząstek platynowych, zależną w dużej mierze od ich rozmiaru i rodzaju linii komórkowej [201].

6.4.2. Analiza markerów stresu oksydacyjnego – reaktywne formy tlenu (ROS)

Brak efektu cytotoksycznego pomimo potwierdzonej internalizacji względem komórek SKOV-3, a także wykazane testem MTS działanie związków względem komórek HepG2, stanowiły pośrednie potwierdzenie hipotezy mówiącej, że potencjał oksydacyjny jest kluczowym czynnikiem aktywującym działanie Au@Pt i PtNPs. Poza stężeniem H₂O₂ i konsumpcją tlenu, dużą rolę odgrywają też możliwości ochrony antyoksydacyjnej komórki, powodowane głównie – choć oczywiście nie tylko – przez zredukowany glutation (GSH). Za działanie protekcyjne, chroniące komórkę przed stresem oksydacyjnym odpowiedzialny jest szereg enzymatycznych (np. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza) i nieenzymatycznych (np. flawonoidy, karotenoidy) związków. Często jednak, analizując podatność komórki na uleganie stresowi oksydacyjnemu, oceny dokonuje się w oparciu o poziom GSH, jako głównego, nieenzymatycznego przeciwutleniacza. W celu weryfikacji podatności komórek SKOV-3 i HepG2 na zmiany statusu oksydacyjnego porównano poziom fizjologiczny ROS oraz zredukowanego glutationu. Komórki potraktowano także H₂O₂ (100 μM), by zweryfikować ich zdolności ochrony przed nadmiarem wolnych rodników (rysunek 21).



Rysunek 21. Weryfikacja potencjału oksydacyjnego komórek SKOV-3 i HepG2 w warunkach podstawowych (A) oraz ocena zdolności antyoksydacyjnych tych komórek (B) (n = 3).

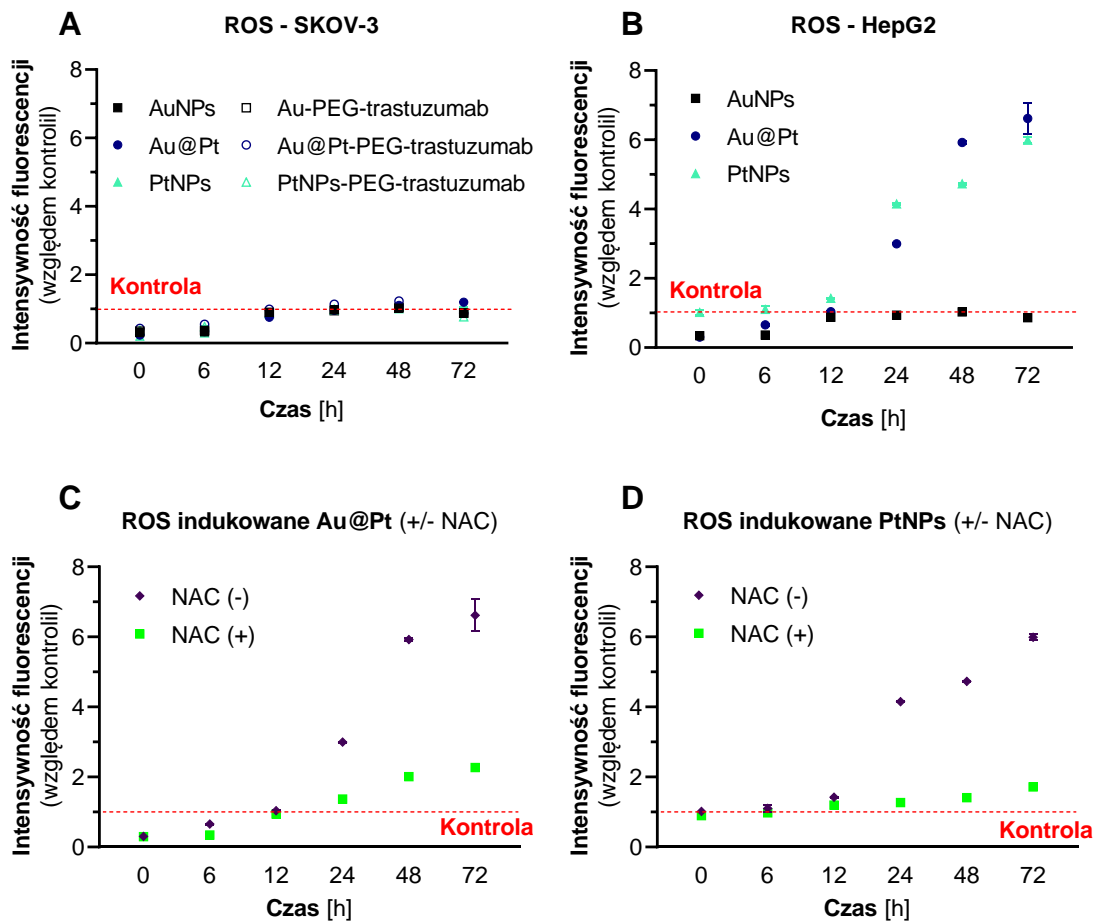
Poziom fluorescencji CM-H₂DCFDA w czasie t₀ = 0 min był w komórkach SKOV-3 trzykrotnie niższy względem wartości zmierzonej w komórkach HepG2 ($p < 0,0001$). Jednocześnie, bazowy poziom GSH w komórkach HepG2 wynosił 28 nM/μg białka, co było wartością 1,6 razy wyższą względem komórek SKOV-3, w cytozolu, których poziom ten wynosił 17,5 nM/μg białka (rysunek 21A). Przełożyło się to bezpośrednio na skuteczniejszą ochronę przed ROS-ami generowanymi z nadtlenku wodoru. Poziom fluorescencji w komórkach SKOV-3 nie zmienił się znacząco pod wpływem traktowania 100 μM H₂O₂, przy jednocześnie blisko dwukrotnym wzroście intensywności fluorescencji w komórkach HepG2 (rysunek 21B). Wyniki te wskazują na zróżnicowaną fizjologię obydwu typów komórek i wyjaśniają, że mniej utleniające środowisko SKOV-3 i ich silniejsze zdolności antyoksydacyjne wpłynęły na aktywność biologiczną i cytotoksyczność nanocząstek platynowych.

Zróznicowane parametry cytozolu obydwu linii komórkowych nie wykluczają możliwości generowania reaktywnych form tlenu pod wpływem nanocząstek. Właściwości komórek SKOV-3 mogą umożliwić szybką i skuteczną neutralizację wolnych rodników, by ochronić komórkę przed groźnymi dla niej następstwami stresu oksydacyjnego. Aby zweryfikować poziom stresu oksydacyjnego wywoływanego traktowaniem komórek nanocząstkami platynowymi dokonano analizy poziomu RFT w funkcji czasu. W celu określenia indukowania RFT pod wpływem nanocząstek, przeprowadzono badania porównawcze uwzględniające preinkubację z N-acetylo-L-cysteiną (NAC), która będąc prekursorem do syntezy GSH w komórce, powoduje wygaszanie reaktywnych form tlenu zwiększając zdolności komórki do ochrony przed długotrwałym stresem oksydacyjnym (rysunek 22).

Pomimo wykazanej internalizacji jedynie dla biokoniugatów sfunkcjonalizowanych trastuzumabem, podczas analizy ROS zdecydowano się przeprowadzić badania także dla nieinternalizujących do komórek SKOV-3 nanocząstek stabilizowanych polimerem. Uzasadnieniem wyboru tych związków jest możliwość indukowania stresu oksydacyjnego, również z przestrzeni pozakomórkowej [202].

Jak przedstawiono na rysunku 22A nie zaobserwowano nadprodukcji ROS w komórkach SKOV-3 traktowanych Au@Pt/PtNPs i ich biokoniugatami. Wyniki te są zgodne z rezultatami testu MTS (rysunek 20), podczas którego nie odnotowano wpływu nanocząstek na przeżywalność tych komórek. Stwierdzono natomiast wyraźne i postępujące z czasem generowanie reaktywnych form tlenu w komórkach HepG2 (rysunek 22B). Maksymalny poziom ROS osiągnięto po 72-godzinnej inkubacji, a jego wartość była blisko sześciokrotnie (PtNPs; $p < 0,0001$) lub ponad sześciokrotnie (6,6 razy) większa (Au@Pt; $p < 0,0001$) względem nietraktowanych komórek kontrolnych. Nanocząstki złota nie powodowały działania prooksydacyjnego, co dowodzi, że platyna pełni kluczową rolę w tym procesie prowadząc do znacznej redukcji przeżywalności komórek.

Podczas badań porównawczych z traktowaniem poprzedzonym preinkubacją z NAC, zauważono wyraźnie zmniejszony poziom fluorescencji utlenionej sondy (rysunek 22C/D) we wszystkich punktach czasowych. Potwierdza to, że mierzony wzrost intensywności fluorescencji jest konsekwencją prooksydacyjnego działania testowanych nanocząstek. Warto podkreślić, że 2 nm PtNPs podobnie jak w przypadku testu MTS szybciej indukowały powstawanie reaktywnych form tlenu, które po 12 h spowodowały 1,4-krotny wzrost intensywności fluorescencji. Może być to związane z wyższą reaktywnością i większą procentową zawartością atomów powierzchniowych, wynikającą ze zwiększonego stosunku powierzchni:objętość w małych nanocząstkach. Obserwacje te są zgodne z danymi poprzednio opublikowanymi przez Almeera i wsp. [199], którzy weryfikowali prooksydacyjne działanie PtNPs o średnicy < 100 nm na komórkach HEK293. Zaobserwowali oni cytotoksyczność związaną z indukowaniem stresu oksydacyjnego i spadkiem podaży GSH. Aktywność prooksydacyjna testowanych w cytowanej pracy nanocząstek była jednak słabsza (122% względem kontroli), co może wynikać z innego rozmiaru nanocząstek i odmiennego modelu *in vitro*.



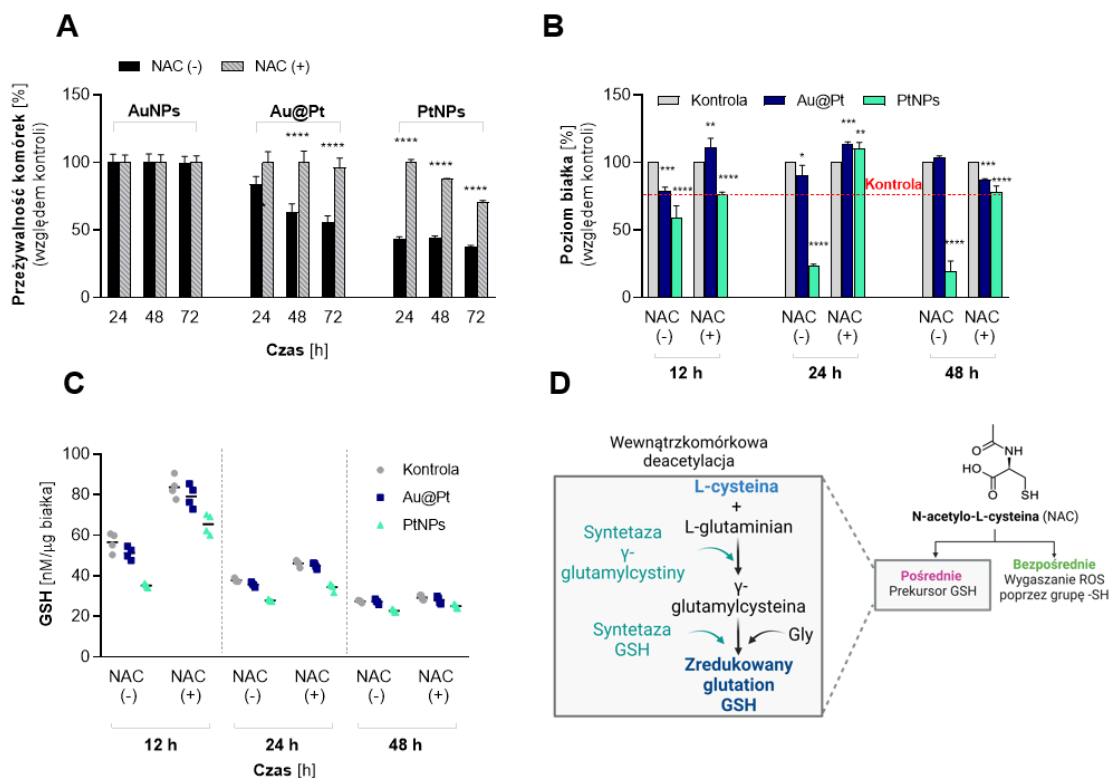
Rysunek 22. Produkcja reaktywnych form tlenu w komórkach SKOV-3 (A) i HepG2 (B). Wpływ preinkubacji z NAC na efektywność generowania RFT w komórkach raka wątrobowokomórkowego pod wpływem Au@Pt (C) i PtNPs (D). Poziom RFT przeliczono z uwzględnieniem spadku liczebności komórek związanych z cytotoksycznym działaniem związków (n=3).

6.4.3. Następstwa stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2

Biorąc pod uwagę fakt, że Au@Pt i PtNPs nie powodują stresu oksydacyjnego i efektu toksycznego na komórkach SKOV-3, dalsze badania nad mechanizmem biologicznej aktywności nanocząstek przeprowadzono wyłącznie na komórkach raka wątrobowokomórkowego. Wiedząc, że NAC wywołuje efekt ochronny obniżając stres oksydacyjny, sprawdzono czy przełoży się to również na zwiększenie przeżywalności tych komórek.

Preinkubacja z NAC wpłynęła na osłabienie cytotoksycznego działania nanocząstek, wykazując działanie ochronne (rysunek 23A). Wynik ten potwierdza korelację pomiędzy występowaniem stresu oksydacyjnego, a cytotoksycznym działaniem otrzymanych koniugatów. Zaobserwowano także zmiany w poziomie białka w komórkach (rysunek 23B), gdzie po 12-godzinnej inkubacji znacząco obniżyła się całkowita zawartość białka, osiągając poziom wynoszący 79% ($p < 0,001$) i 59,1% ($p < 0,0001$) odpowiednio dla Au@Pt i PtNPs. Wybór pierwszego punktu pomiarowego w stosunkowo wczesnej fazie inkubacji (12 h) podyktowany był wykryciem już w tym okresie pierwszej nadpodaży ROS (rysunek 22). Działanie 30 nm i 2 nm nanocząstek przebiegało w nieco inny sposób, gdyż podczas dłuższej inkubacji poziom białka w komórkach traktowanych Au@Pt podwyższył się, powracając do wartości zbliżonej do

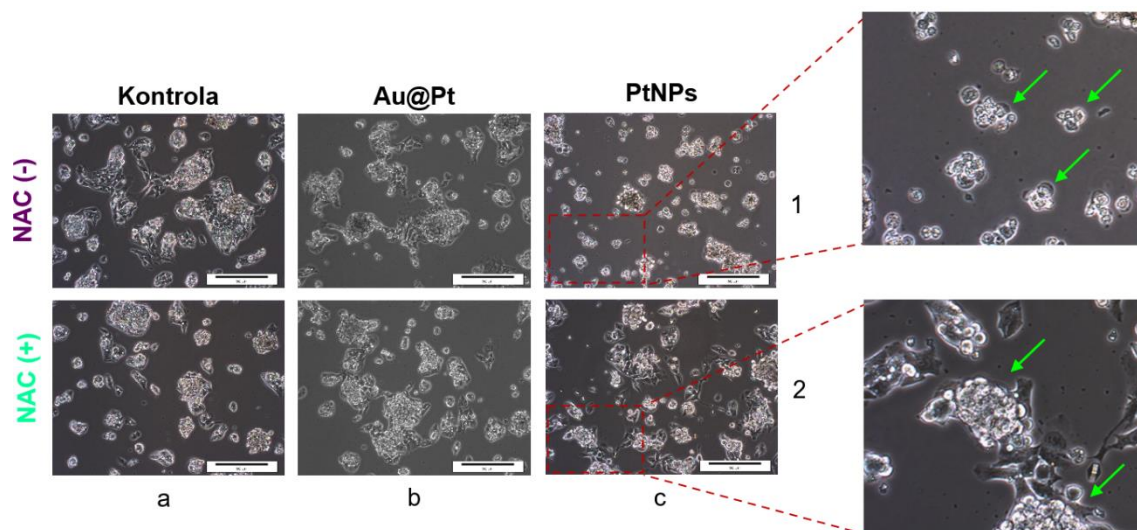
komórek kontrolnych (90,86%; $p < 0,05$). PtNPs powodowały zaś postępujące z czasem obniżenie poziomu białka, którego minimalna wartość wyniosła 19,2% ($p < 0,0001$) po 72 h inkubacji.



Rysunek 23. Zachwianie równowagi redoks w komórkach HepG2 pod wpływem otrzymanych koniugatów. Wpływ ochronnego działania NAC na przeżywalność komórek (A); zmiany w całkowitej zawartości białka (B) i glutationu zredukowanego (C) w komórkach ($n=3$); mechanizm antyoksydacyjnego działania NAC (D). Poziom GSH przeliczono z uwzględnieniem spadku liczbnosci komórek związanych z cytotoksycznym działaniem związków.

W kolejnym kroku sprawdzono, czy wprowadzenie komórki w stan stresu oksydacyjnego związane jest z wyczerpaniem jej zdolności antyoksydacyjnych uwidocznionych spadkiem poziomu GSH (rysunek 23C). Pierwszy spadek poziomu GSH nastąpił po 12 h – PtNPs spowodowały 1,6-krotne obniżenie jego stężenia, natomiast Au@Pt obniżyły poziom glutationu o około 15%. Preinkubacja z NAC wyraźnie zwiększyła zawartość GSH, natomiast pomimo tego poziom przeciwutleniacza nie osiągnął wartości zbliżonej do komórek kontrolnych. Podobnie jak podczas analizy poziomu białka i w tym przypadku stwierdzono analogiczne różnice dla nanocząstek platyny i nanocząstek core-shell. Poziom GSH w komórkach traktowanych Au@Pt NPs powrócił do poziomu kontroli już po 24 h, wykazując różnice jedynie w pierwszym punkcie pomiarowym. Inkubacja z 2 nm nanocząstkami prowadziła zaś do istotnych różnic w stężeniu GSH w całym okresie prowadzenia inkubacji (28 nM/μg białka i 28 nM/μg białka po 24 i 48 h, względem komórek nietraktowanych – 39 nM/μg białka i 31 nM/μg białka po 24 i 48 h).

Działanie protekcyjne NAC znalazło swoje odzwierciedlenie na wielu poziomach fizjologii i morfologii komórki. N-acetylo-L-cysteina poprzez pośrednie lub bezpośrednie działanie antyoksydacyjne (rysunek 23D) przyczyniła się do zwiększonej odporności komórki na stres oksydacyjny. Chroniąc komórkę przed nadmiarem reaktywnych form tlenu, spowodowała osłabienie działania koniugatów, całkowicie (Au@Pt) lub znacząco (PtNPs), obniżając przy tym śmiertelność komórek. Efekt ochronny NAC został również zaobserwowany w mikroskopowej analizie morfologii komórek (rysunek 24).



Rysunek 24. Zmiany morfologiczne w komórkach HepG2 indukowane chemotoksycznym działaniem Au@Pt i PtNPs.

Konsekwencją traktowania komórek HepG2 nanokoniugatami były wyraźne, choć różniące się między sobą zmiany morfologiczne. Nanocząstki core-shell spowodowały zredukowanie liczebności komórek i częściową utratę integralności klastrów, które są charakterystyczną formą wzrostu tej linii komórkowej. Inne zmiany zaobserwowano oceniając wpływ PtNPs na badane komórki, gdzie poza znaczącym spadkiem liczebności, odnotowano również obkurczenie komórek, wyraźną utratę integralności i liczne zmiany w kształcie komórek (rysunek 24, obraz 1/2C). Były to więc zmiany o znacznie większym stopniu intensywności względem tych spowodowanych przez Au@Pt.

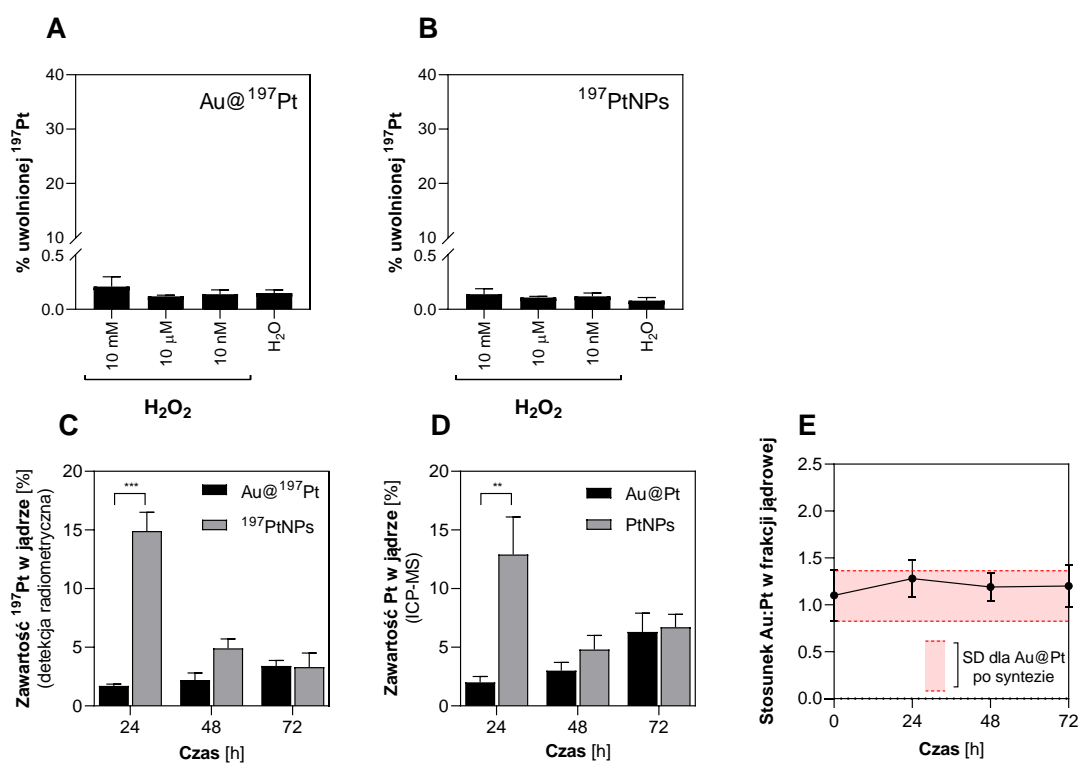
6.4.4. Rozpuszczanie nanocząstek w środowisku silnie utleniającym

Poza działaniem prooksydacyjnym, teorie opisujące mechanizm biologicznej aktywności nanocząstek platyny postulują także ich rozpuszczanie (rysunek 3) w środowisku utleniającym. Proces ten, może zachodzić poprzez dwuelektronową reakcję, której produktami – poza jonem (OH^-) i rodnikiem hydroksylowym ($\cdot OH$) są rozpuszczalne w wodzie kationy Pt^{2+} . Kationy te mogą przenikać do jądra komórkowego i interkalować do DNA, powodując śmierć komórki [3]. Weryfikując tę koncepcję przeprowadzono zarówno analizy chemiczne (rysunek 25A/B), jak i badania w warunkach *in vitro* (rysunek 25C-E).

Stężenie nadtlenu wodoru w warunkach biologicznych jest na poziomie nanomolowym [203] osiągając wartość 10 nM. Weryfikacja interakcji Au@Pt/PtNPs w środowisku utleniającym o tak niskim, z chemicznego punktu widzenia, stężeniu jest znacząco utrudniona. Metody elektrochemiczne, które są standardowo wykorzystywane w tego typu analizach posiadają limity detekcji wykluczające ich wykorzystanie przy tak niskich stężeniach i precyzyjnych pomiarach. Chcąc uzyskać dane w warunkach jak najbardziej zbliżonych do panujących w cytozolu komórek HepG2, pomiary przeprowadzono analizując niezależnie dwa aspekty.

Pierwsza z analiz obejmowała radiometryczną weryfikację rozpuszczania nanocząstek platyny w różnych stężeniach nadtlenu wodoru. W celu określenia ewentualnego wpływu stężenia na wydajność procesu rozpuszczania, poza najbardziej zbliżonym do fizjologicznego (10 nM) do badań wykorzystano także wyższe stężenia. Jak przedstawiono na rysunku 25A/B nie stwierdzono uwalniania platyny

z powierzchni nanocząstek, co świadczyło o braku zajścia reakcji utleniania platyny. Zawartość platyny w roztworze oddzielnym od nanocząstek była poniżej 0,5%, co jednoznacznie wyklucza możliwość wydajnego rozpuszczania obydwu badanych rodzajów nanocząstek.



Rysunek 25. Rozpuszczanie nanocząstek platynowych Au@Pt i PtNPs pod wpływem nadtlenku wodoru. Badania w warunkach chemicznych (A, B) oraz *in vitro* – po wyizolowaniu jądra komórkowego z komórek HepG2 (C, D, E) (n=4).

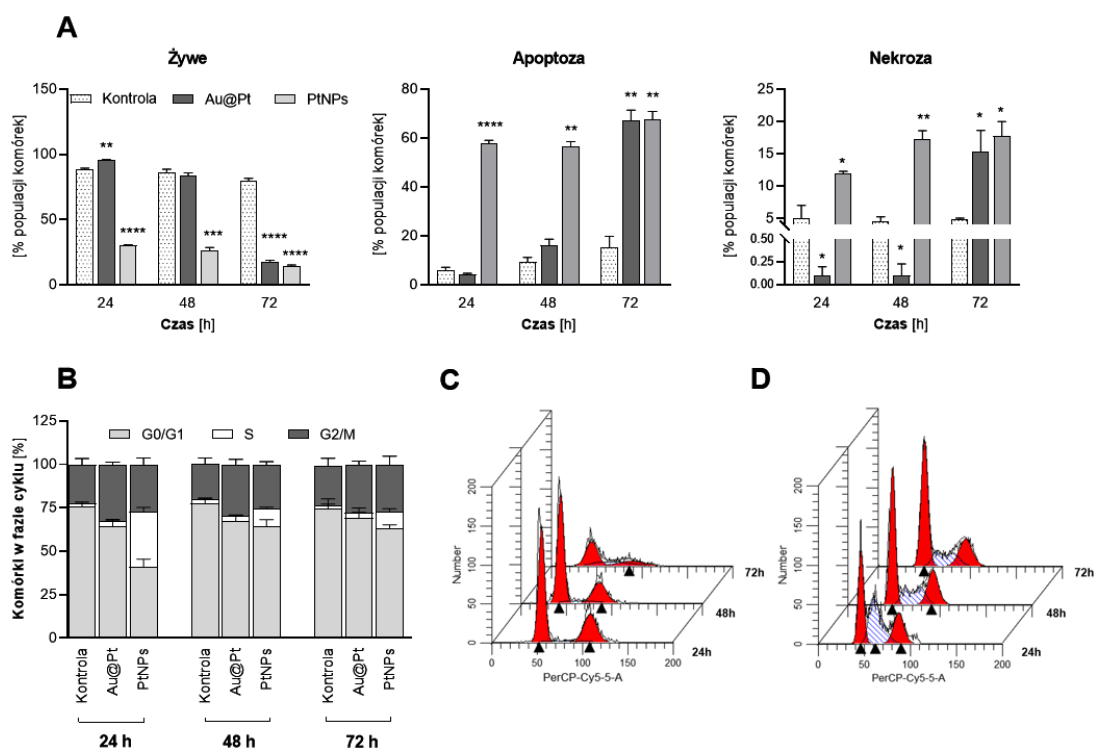
Analizę uwalniania platyny z powierzchni nanocząstek przeprowadzono także w warunkach *in vitro*. Komórki raka wątrobowokomórkowego potraktowano nietoksycznym stężeniem nanocząstek, w celu weryfikacji lokalizacji Pt w jądrze komórkowym. Zawartość radionuklidu (¹⁹⁷Pt w przypadku detekcji radiometrycznej) oraz metalu (w przypadku detekcji ICP-MS) wykazała istotne różnice dla analizowanych typów nanocząstek (rysunek 25, C-E). W przypadku nanocząstek core-shell nie stwierdzono zwiększonego wychwytu w jądrze komórkowym, wykluczając tym samym hipotezę o ich rozpuszczaniu, prowadzącym do formowania kationu Pt²⁺. Obydwie analizy wykazały jedynie śladową zawartość platyny w frakcji jądrowej. Ze względu na zauważalną obecność nanocząstek na zewnętrznej powierzchni jąder komórkowych, podczas procesu frakcjonowania, sprawdzono także stosunek zawartości Au:Pt w analizowanej frakcji (rysunek 25E). Miało to na celu uniknięcie błędu interpretacyjnego związanego z uwzględnieniem Au@Pt NPs zlokalizowanych na zewnętrznej stronie jądra jako internalizowanej frakcji. Analiza spektroskopowa wykazała, że stosunek Au:Pt w badanych frakcjach nie zmienił się względem wartości początkowej (1,1) uzyskanej dla produktu bezpośrednio po syntezie. Rozpuszczenie platynowej powłoki i związana z tym migracja Pt do wnętrza jądra, powinna przyczynić się do obniżenia tego stosunku, co jednoznacznie wykluczyło możliwość zajścia tego procesu.

W przeciwieństwie do Au@Pt NPs, w przypadku PtNPs zaobserwowano zwiększoną lokalizację Pt w jądrze. Wartości te były najwyższe w pierwszej dobie inkubacji i wynosiły 13-15%, jednocześnie nie

wykazując istotnych statystycznie różnic pomiędzy detekcją radiometryczną i ICP-MS. Porównując uzyskane dane eksperymentalne z wynikami opublikowanymi przez Shoshan i wsp. [3], zauważono znacznie niższą zawartość Pt w jądrze. Pomimo tego, otrzymany wynik z pewnością nie jest zdarzeniem incydentalnym, gdyż potwierdzony został analizami przy użyciu dwóch niezależnych technik. Prezentowane wyniki nie mogą stanowić jednak dowodu jednoznacznie potwierdzającego hipotezę o rozpuszczaniu platyny w środowisku silnie utleniającym. Interpretując te dane należy wziąć pod uwagę teoretyczną możliwość pokonywania przez 2 nm nanocząstki podwójnej otoczki jądrowej na drodze dyfuzji przez pory jądrowe. W związku z tym lokalizacja wewnątrzjądrowa w przypadku PtNPs może być następstwem dwóch różnych mechanizmów. Biorąc jednak pod uwagę brak rozpuszczania w przypadku Au@Pt i desorpcji platyny z ich powierzchni, bardziej prawdopodobnym wydaje się zajście tego procesu na drodze dyfuzji nanocząstek do jądra komórkowego.

6.4.5. Badania apoptozy i cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej

Zróznicowany rodzaj indukowanych w komórkach HepG2 zmian pod wpływem Au@Pt i PtNPs może przekładać się nie tylko na szybkość wywoływania efektu cytotoksycznego, ale również na sposób przebiegu śmierci komórki. Samo działanie nanocząstek może inicjować śmierć komórki poprzez aktywację wielu różnych dróg, a występowanie stresu oksydacyjnego związanego z działaniem rodników jest zazwyczaj sprzężone z indukowaniem apoptozy. Pierwsze symptomy programowanej śmierci komórki zauważono już podczas obrazowania na mikroskopie konfokalnym, gdzie ujawniono formowanie się pęcherzyków apoptotycznych (rysunek 19). W celu rozwinięcia tego kierunku poszukiwania odpowiedzi nad biologicznymi aspektami działania nanocząstek platynowych, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (rysunek 26A).



Rysunek 26. Cytometria przepływową w analizie mechanizmu cytotoksycznego działania Au@Pt i PtNPs – procentowy udział komórek żywych, apoptotycznych i martwych (A); dystrybucja faz cyklu komórkowego (B); histogramy przedstawiające zmiany udziału poszczególnych faz cyklu indukowane Au@Pt (C) i PtNPs (D) (n=3).

Podczas analizy rozrózniono trzy populacje komórek, które sklasyfikowano jako: żywe, apoptotyczne (wczesna i późna apoptoza) i nekrotyczne. Udział procentowy poszczególnych populacji zmieniał się w zależności od czasu, jednak ogólna tendencja była zgodna z wynikami uzyskanymi podczas testu MTS. Zaobserwowano zróżnicowane tempo zmian indukowanych Au@Pt i PtNPs przy $C_{Pt} = 145 \mu\text{g/mL}$. Po krótkiej, 24-godzinnej inkubacji nie zidentyfikowano komórek wykazujących apoptozę lub nekrozę, a tym samym obniżonej przeżywalności komórek HepG2 traktowanych Au@Pt. Wydłużenie inkubacji do 72 h przełożyło się na istotny wzrost populacji komórek apoptotycznych (Annexin-V+/PI- oraz Annexin-V+/PI+) lub nekrotycznych (Annexin-V-/PI+), przy jedynie 17,1% ($p < 0,0001$) komórek o nienaruszonej integralności błony komórkowej.

Toksyczność indukowana nanocząstkami o średnicy 2 nm wystąpiła zdecydowanie szybciej, uwiadczniając już po 24 h zmiany proapoptotyczne, przy pozostawieniu jedynie 30% komórek żywych ($p < 0,0001$). Populacja komórek apoptotycznych wzrastała wraz z upływem czasu – od wartości 58% po 24 h, do poziomu 67,8% po 72 h ($p < 0,01$). Podobny kierunek zmian zauważono w przypadku populacji komórek nekrotycznych, których liczebność stanowiła od 12 do 17,4% populacji ($p < 0,05$).

Pomimo istotnych różnic w tempie indukowanych zmian oraz dystrybucji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w okresie do 48 h, efekty wywołane Au@Pt i PtNPs po 72 h traktowaniu były zbliżone. Przeżywalność komórek po zakończeniu inkubacji była w zakresie 14-17%, a procentowy udział apoptozy i nekrozy w analizowanych populacjach nie różnił się istotnie ($p > 0,05$).

Pośrednim potwierdzeniem efektywnej lokalizacji wewnątrzjądrowej PtNPs były również wyniki uzyskane podczas analizy cyklu komórkowego (rysunek 26B-D). Zgodnie z danymi literaturowymi nanocząstki metali szlachetnych mogą powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach G_0/G_1 i G_2/M [198,204]. Barwienie DNA jodkiem propidyny wykazało zróżnicowany udział poszczególnych faz, w jakich doszło do zahamowania cyklu. Zarówno dla Au@Pt i PtNPs nie odnotowano blokowania w fazie G_2/M , co jest zgodne z obserwacjami opisanymi w pracy Li i wsp. [205]. Jak przedstawiono, 50 $\mu\text{g/mL}$ porowatych PtNPs nie powodowało zatrzymania cyklu w fazie G_2/M , ale przyczyniło się do uwrażliwienia komórek NCIH460 (nowotwór płuc) na działanie promieniowania X.

Analizując dystrybucję poszczególnych faz cyklu zauważono zaskakująco duży udział fazy S po 24 h traktowania komórek HepG2 PtNPs (31,9%). Po upływie 48 h wartość ta znacząco zmniejszyła się, oscylując na poziomie 9-10% do zakończenia eksperymentu, przy jednoczesnym wzroście udziału fazy G_0/G_1 (od 40,9% do 63% po 72 h). Wyniki te ściśle korelują ze zmianami poziomu białka, ponieważ podczas fazy G_1 komórka gromadzi duże pokłady białka, by następnie - po przejściu punktu kontrolnego G_1/S - nastąpiło zużycie nagromadzonych białek dla zaspokojenia potrzeb związanych z replikacją DNA (faza S). Wyjaśnia to różnice pomiędzy działaniem Au@Pt i PtNPs, objawiające się w szybkości wywoływania zmian, dystrybucją faz cyklu oraz zróżnicowaniu w całkowitej zawartości białka. Potwierdza to pośrednio, choć jednoznacznie również brak rozpuszczania Au@Pt i związanej z tym jedynie pozajądrowej lokalizacji.

Blokowanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁ sugeruje występowanie stresu oksydacyjnego, podczas gdy zatrzymanie w fazie S jest typowo obserwowane dla PtNPs o małej średnicy i zmian proporcjonalnych [206–208]. Wyniki te dowodzą ścisłej zależności pomiędzy ~13% zawartością Pt w jądrze, a zatrzymaniem cyklu w fazie S widocznym po 24 h. Do podobnych wniosków doszli Wang i wsp. [209], którzy analizując działanie *cis*-platyny wykazali, że związek ten powoduje zatrzymanie podziału komórkowego w fazie S komórek HepG2. Ponadto, zauważyli występowanie tego zjawiska głównie w początkowych okresach inkubacji, co zaobserwowano także w prezentowanych na rysunku 26 wynikach.

Analiza cyklu komórkowego dostarczyła wielu istotnych odpowiedzi dowodząc silnej zależności pomiędzy syntezą białek, a obecnością PtNPs w komórce. Wysoce prawdopodobnym jest, że dotarcie Pt do jądra komórkowego powoduje zatrzymanie cyklu w fazie S. Może to bezpośrednio wyjaśniać różnice w rodzaju i poziomie zmian fizjologicznych i morfologicznych indukowanych przez Au@Pt i PtNPs [210,211].

6.5. Addytywność łączonej chemo- i radioterapii w leczeniu nowotworów wątroby

Brak możliwości wykorzystania radionuklidów ^{193m}Pt/^{195m}Pt skutkowało koniecznością poszukiwania alternatywnych metod dla zastosowania opracowanej koncepcji terapii kombinowanej. Analizując możliwości implementacji w pracach badawczych innych emiterów elektronów Augera, zdecydowano się na zmianę koncepcji zastosowania nanocząstek platynowych i wykorzystania ich jako nośnika dla ¹²⁵I. Wysoka efektywność terapeutyczna jodu-125 powinna być następstwem przyjętej dla tego radionuklidu zasady, że na jeden jego rozpad przypada jedno dwuniciowe uszkodzenie DNA [212,213]. W celu weryfikacji prezentowanej koncepcji przeprowadzono badania chemisorpcji radionuklidu jodu-125 na powierzchni nanocząstek, sprawdzono możliwość desorpcji ¹²⁵I w środowisku silnie utleniającym i oceniono efektywność terapeutyczną otrzymanych radiokoniugatów.

6.5.1. Radiokoniugaty ^{125,131}I-Au@Pt i ^{125,131}I-PtNP

Platyna i złoto, jako metale szlachetne, charakteryzują się bardzo podobnymi właściwościami chemicznymi, takimi jak promień kowalencyjny, energia jonizacji czy elektroujemność, które bezpośrednio determinują siłę i typ wiązań chemicznych. Jedną z cech tych metali jest formowanie silnych wiązań kowalencyjnych z ciężkimi halogenkami, takimi jak I czy At [81,88,214]. Szacowana długość wiązania Pt-I wynosi 261 pm i jest nieznacznie krótsza niż Au-I (277 pm), co sugeruje tworzenie silniejszego i trwalszego związku z Pt. Postulowany mechanizm oddziaływania platyna-jod opisywany jest następująco (równanie 1):



Do immobilizacji jodu po raz pierwszy wykorzystano Au@Pt oraz PtNPs porównując dane eksperymentalne z otrzymanymi w ramach niniejszej pracy AuNPs, których radiokoniugaty z ¹²⁵I kilkakrotnie już opisywano [82,176,215]. Część prac badawczych wykonano z jodem-131 ze względu na jego łatwiejszą dostępność, niższą cenę i możliwość użycia w badaniach chemicznych jako substytutu jodu-125. Jak przedstawiono w tabeli 8, ¹³¹I został efektywnie zaadsorbowany na powierzchni nanocząstek z ponad 85% wydajnością. Późniejsze PEG-owanie nie wpłynęło istotnie na całkowitą wydajność reakcji, gdyż odnotowano jedynie znikome spadki radioaktywności związanej z nanocząstkami.

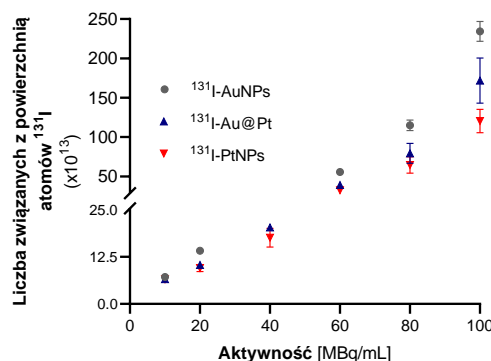
Tabela 8. Wydajność chemisorpcji ^{131}I na powierzchni AuNPs, Au@Pt i PtNPs bezpośrednio po syntezie oraz po przyłączeniu PEG.

	Adsorpcja [%]	
	Nanocząstki	PEGowane nanocząstki
AuNPs	93.46 ± 4.90	88.45 ± 0.69
Au@Pt	86.17 ± 4.75	85.26 ± 0.14
PtNPs	85.0 ± 4.3	81.82 ± 1.97

Obliczono, że powierzchnia zewnętrzna 2 nm PtNP wynosiła 12,5 nm², podczas gdy 30 nm Au@Pt 2,8 x 10³ nm² w przeliczeniu na jedną nanocząstkę. Biorąc pod uwagę użycie liczby nanocząstek zapewniającej zbliżoną powierzchnię zewnętrzną AuNPs, Au@Pt i PtNPs (w ujęciu całkowitym) na 1 nm² powierzchni przypadają 0,9 atomów jodu, co stanowi 20-krotnie niższą wartość od teoretycznie obliczonej wartości maksymalnej. W obliczeniach przyjęto powierzchnię przekroju atomu jodu ~0,0556 nm², dla przyjętego promienia kowalencyjnego 133 pm. Miało to na celu zapobiegnięcie potencjalnemu przesyconiu powierzchni i związanego z tym znaczącego obniżenia wydajności reakcji.

Warto zauważyć, że wydajność sorpcji na AuNPs, stosowanych w badaniu jako próba kontrolna była wyraźnie wyższa (>93%) w porównaniu do nanocząstek zawierających platynę (~85%). Może być to efektem zróżnicowania czynników stabilizujących bezpośrednio, związanych z powierzchnią nanocząstki. Każdy rodzaj stosowanych nanomateriałów stabilizowany jest przez inny związek - cytrynian sodu (AuNPs); kwas askorbinowy (Au@Pt) oraz rodizonian sodu (PtNPs). Chemisorpcja jodu może następować po utlenieniu I⁻ (z Na¹³¹I_{aq.}) do I⁰ (zgodnie z równaniem 1) lub poprzez zastąpienie czynników stabilizujących nanocząstkę [176]. Sprawia to, że nie należy marginalizować roli czynników stabilizujących jako przynajmniej pośrednich przyczyn zróżnicowanej wydajności chemisorpcji jodu.

Jedną z kluczowych kwestii dla rozważania otrzymanych radiokoniugatów jako potencjalnych radiofarmaceutyków było zmaksymalizowanie aktywności właściwej na nanocząstkach. Wysoka aktywność właściwa jest szczególnie ważna przy koncepcji terapii elektronami Augera, gdyż w związku z ich krótkim zasięgiem w tkance, konieczne jest stosowanie dużych aktywności. W tym celu zbadano przy jakiej aktywności ^{131}I nastąpi wysycenie powierzchni, poszukując w ten sposób warunków granicznych syntezy dla przyszłych badań *in vitro* (rysunek 27).

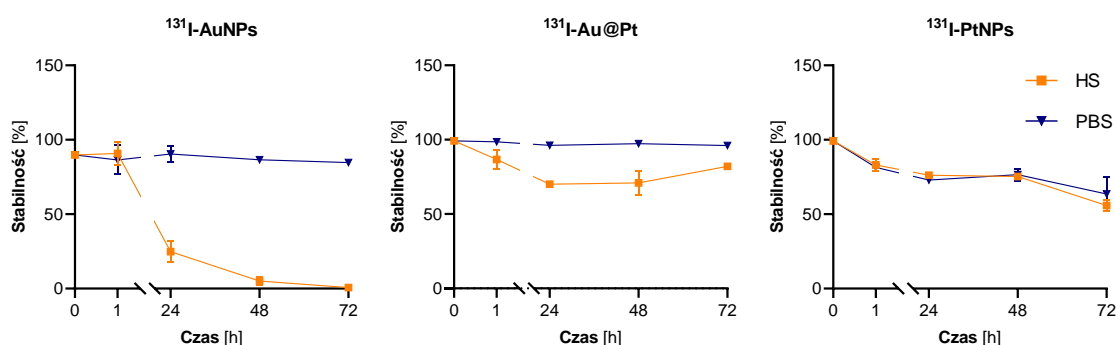


Rysunek 27. Analiza stopnia wysycenia powierzchni nanocząstek w zależności od aktywności radionuklidu użytej do reakcji (n=6).

Wydajność sorpcji w zakresie stężeń 12,5-100 MBq na 1 mL roztworu nanocząstek zgodnie z przewidywaniami najefektywniej zachodziła na powierzchni AuNPs. Nawet przy najwyższym testowanym stężeniu ^{131}I ponad 90% radionuklidu ulegało sorpcji się na powierzchni nanocząstki. Nieco gorzej proces przebiegał na Au@Pt i PtNPs. Jako możliwą przyczynę z pewnością można wykluczyć różnice w dostępności powierzchni, ponieważ ilości nanocząstek dobrano w sposób zapewniający zbliżoną całkowitą powierzchnię zewnętrzną. Nie zauważono również wysycania powierzchni i związanego z tym spadku wydajności przy wyższych stężeniach. Zaobserwowano natomiast formowanie się stanu równowagi objawiającego się wzrostem związanej z nanocząstkami aktywności występującym wraz ze wzrostem stężenia jodu-131, przy jednocześnie nieznacznych różnicach w wydajności reakcji. W zakresie 20-100 MBq/mL wydajność syntezy ^{131}I -Au@Pt i ^{131}I -PtNP oscylowała w okolicach 55-65%, co jest wartością zdecydowanie niższą niż obliczona dla AuNPs. Prawdopodobną przyczyną przedstawionych różnic może być wpływ czynnika stabilizującego nanocząstki, co odnotowano także we wstępnych badaniach chemisorpcji (tabela 8).

6.5.2. Badania stabilności radiokoniugatów

Stabilność otrzymanych radiokoniugatów: ^{131}I -AuNP, ^{131}I -Au@Pt oraz ^{131}I -PtNP w mediach biologicznych różniła się w zależności od rodzaju nanocząstek i środowiska (rysunek 28). Podczas badań stabilności radiokoniugatów zaobserwowano wyraźne zróżnicowanie pomiędzy testowanymi związkami. Prawie całkowitą desorpcję jodu (>90%) z AuNPs pokrytych PEG zauważono podczas inkubacji w surowicy ludzkiej krwi w ciągu pierwszych 24 h. Nanocząstki zawierające platynę wykazały zdecydowanie lepszą stabilność w tym medium, osiągając około 70% retencji radionuklidu w analogicznym okresie. PBS nie wywołał żadnego wpływu na stabilność ^{131}I -AuNPs i ^{131}I -Au@Pt NPs, natomiast w przypadku ^{131}I -PtNPs po początkowym spadku, zaobserwowano ustabilizowanie się tego parametru w przedziale 24-72 h na poziomie 75%.



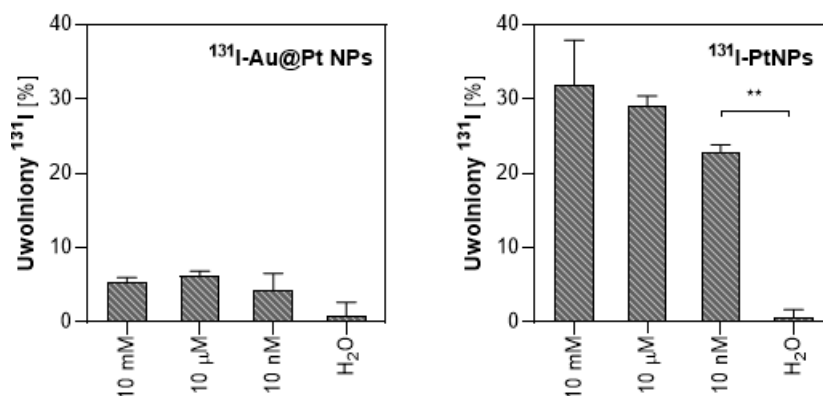
Rysunek 28. Badania stabilności radiokoniugatów w mediach biologicznych (n=3).

Wpływ surowicy na częściową lub całkowitą desorpcję jodu może być następstwem obecności licznych grup tiolowych w białkach czy glutationie i konkurencyjnego wypierania radionuklidu z powierzchni nanocząstki. Odniesienie otrzymanych wyników do danych literaturowych jest trudne ze względu na fakt, że opublikowano tylko jedną pracę, w której przeprowadzono badanie stabilności dla ^{131}I -AuNPs. W opisaney publikacji zaobserwowano jednak postępujący z czasem spadek stabilności w FBS [153],

co jest zgodne z danymi uzyskanymi w przedstawionym doświadczeniu. Stabilność badanych układów platynowych nie była natomiast obiektem żadnych opublikowanych prac, ponieważ niniejsza praca jest pierwszą, w której zdecydowano się zsyntetyzować taki radiokoniugat. Należy przypuszczać, że za lepszy niż dla AuNP efekt w HS odpowiedzialne jest, zgodnie z przewidywaniami, silniejsze niż Au-I wiązanie Pt-I. Otwiera to duże możliwości dla weryfikacji *in vitro* tego typu związków, szczególnie że podczas badań nie zaobserwowano utraty stabilności samych nanocząstkowych nośników, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi [82,214,216,217].

6.5.3. Uwalnianie radionuklidu ^{125}I w środowisku silnie utleniającym

Weryfikując proponowaną koncepcję, przeprowadzono szereg badań, których dobór stanowił pochodną wyników uzyskanych podczas analiz poświęconych określeniu mechanizmu biologicznego działania nanocząstek platynowych. Wprowadzenie ^{125}I w pobliże DNA stanowiłoby doskonałą podstawę dla racjonalnego oczekiwania silnych i skutecznych efektów terapii. Wiedząc, że proponowana przez Shoshana i wsp. [3] reakcja rozpuszczania nanocząstek na drodze reakcji redoks nie zachodzi dla Au@Pt, a w przypadku PtNPs niemożliwe jest jednoznaczne potwierdzenie lub wykluczenie tego mechanizmu, znacząco trudniejsze stało się dostarczenie radionuklidów jodu do jądra komórkowego. Jedną z możliwości jest wprowadzenie ^{125}I -PtNPs, których obecność we frakcji jądrowej potwierdzono eksperymentalnie (rysunek 25 C/D). Drugą, alternatywną i nieco bardziej uniwersalną możliwością jest uwolnienie ^{125}I pod wpływem nadtlenu wodoru na drodze różnych procesów chemicznych. Prowadzą one do bezpośredniego wytworzenia HOI i innych produktów, poprzez nietrwałe produkty pośrednie. Uniwersalny charakter tej drogi polega na możliwości jej wystąpienia nawet dla Au@Pt, których niewątpliwą wadą jest brak lokalizacji wewnątrzjądrowej. Proces ten jest doskonale poznany i wielokrotnie opisywany w literaturze [154,155,218]. W tym celu zweryfikowano zdolność jodu-125 do desorpcji z powierzchni nanocząstek pod wpływem różnych stężeń H_2O_2 (rysunek 29). Mając na uwadze bardzo słabą stabilność w mediach biologicznych ^{125}I -AuNPs używanych uprzednio jako związek referencyjny, w badaniach *in vitro*, nie zdecydowano się na zastosowanie tego radiokoniugatu jako związku kontrolnego.



Rysunek 29. Desorpcja radionuklidu ^{131}I z powierzchni Au@Pt (A) i PtNPs (B) pod wpływem nadtlenu wodoru (n=4).

W każdym z analizowanych stężeń nadtlenu wodoru zauważono efektywną desorpcję radionuklidu z powierzchni radiokoniugatu ^{131}I -PtNPs, przy około 20% wydajności pod wpływem 10 nM H_2O_2 . Zaobserwowano zależność ilości uwolnionego radionuklidu od stężenia nadtlenu wodoru, co potwierdza istotność wpływu tego czynnika na inicjowanie lub pośredniczenie w reakcji desorpcji. W przeciwieństwie do PtNPs, nieznaczną wydajność desorpcji (~5%) zaobserwowano dla ^{131}I -Au@Pt. Jak przedstawiono na rysunku 29, do uwolnienia radionuklidu nie dochodziło podczas inkubacji w wodzie, użytej w tym eksperymencie jako medium referencyjne. Wyraźna i znacząca różnica pomiędzy stopniem desorpcji z powierzchni Au@Pt i PtNPs jest prawdopodobnie wynikiem ich zróżnicowanego charakteru fizykochemicznego, jednakże trudne w warunkach laboratoryjnych jest dokładne określenie chemicznego podłoża opisywanych różnic. Zróżnicowanie stopnia desorpcji może być wynikiem częściowego rozpuszczania PtNPs, natomiast jest to teoria mało prawdopodobna w świetle uzyskanych danych eksperymentalnych. Drugim wytłumaczeniem zaobserwowanego zjawiska może być zdecydowanie większa reaktywność PtNPs (tabela 8) związana z większą liczbą atomów powierzchniowych. Pomimo braku jednoznacznej odpowiedzi, tak wydajnie przebiegające uwolnienie ^{131}I z powierzchni PtNPs otwiera duże możliwości związane z proponowaniem nowoczesnych strategii terapeutycznych.

Należy również podkreślić zaletę proponowanego systemu względem stosowanych w badaniach radiokoniugatów jodu-125 z 5-jodo-2'-deoksyurydyną (^{125}I UdR). Jest to najczęściej wykorzystywany koniugat w przypadku prowadzenia terapii, przy braku dostępności wektorów ukierunkowanych na receptory transbłonowe. Niska selektywność działania ^{125}I UdR powoduje występowanie licznych skutków ubocznych związanych z toksycznością systemową. Proponowane w niniejszej pracy rozwiązanie pozwala pokonać te ograniczenia, zapewniając działanie jedynie w środowisku utleniającym, co powinno znacząco poprawić selektywność.

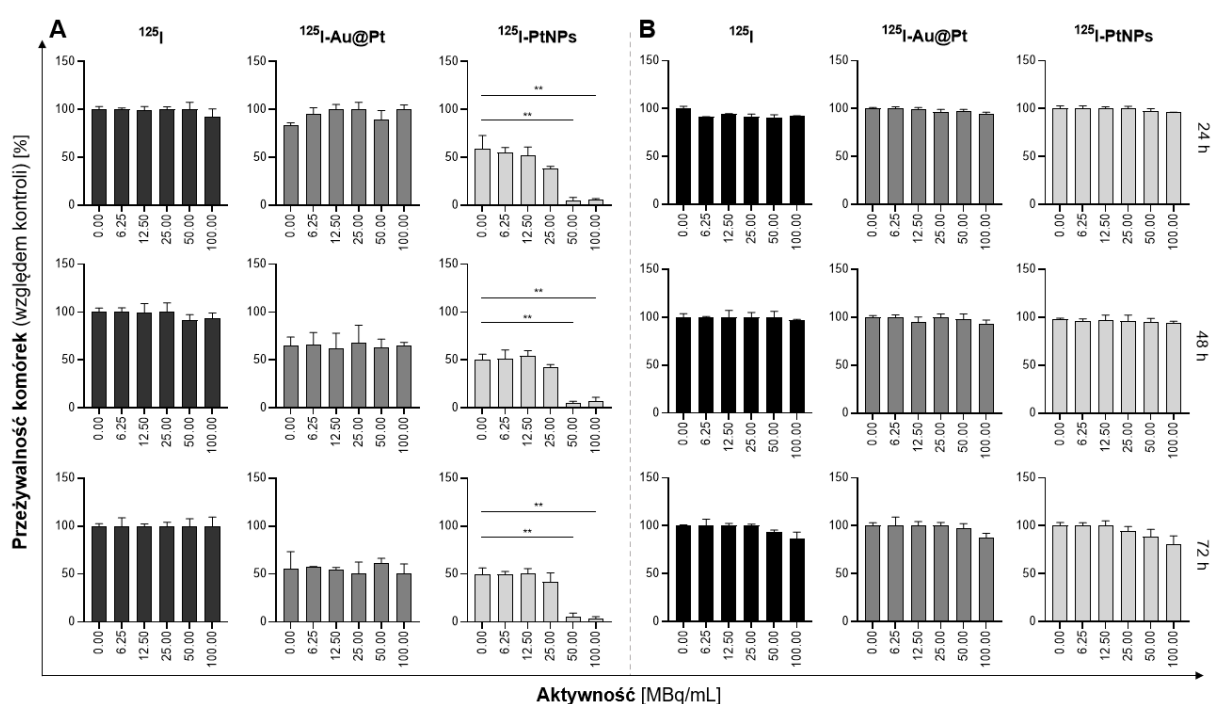
6.5.4. Efekt addytywny łączonej chemo- i radioterapii

Znając możliwości chemotoksycznego działania nieradioaktywnych nanocząstek, badania *in vitro* nad skutecznością łączonej chemo- i radioterapii przeprowadzono z wykorzystaniem komórek HepG2. Jako linię kontrolną w opisywanym eksperymencie użyto komórki HeLa (gruczolakorak), które posiadają niski potencjał oksydacyjny cytozolu. Linia komórkowa HeLa pomimo swojego nowotworowego charakteru, jest jedną z najbardziej zbliżonych do zdrowych komórek, co stanowiło ważny aspekt odpowiedniego doboru linii kontrolnej. Do badań wykorzystano radiokoniugaty o stężeniu Pt 145 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i aktywnościach w zakresie 0-100 MBq/mL.

Przeżywalność komórek HepG2 nie zmieniła się, gdy traktowano je 6,25-100 MBq/mL ^{125}I i ^{125}I -Au@Pt (rysunek 30A). Postępująca z czasem redukcja aktywności mitochondriów w przypadku ^{125}I -Au@Pt związana jest z chemotoksycznym działaniem samych nanocząstek, gdyż nie ujawniono istotnego ($p > 0,05$) wzmocnienia efektu przy obecności radioaktywnego jodu. Jest to konsekwencją lokalizacji radionuklidu w cytozolu, gdyż jak wykazano, nie zachodzą procesy mogące powodować występowanie radiokoniugatu lub uwolnionego jodu w jądrze komórkowym. Niska energia emitowanych elektronów nie faworyzuje pozajądrowej lokalizacji, w przypadku użycia jodu-125. Emitowane 23 elektrony Augera o energii 0,07-30 keV oraz około 7,3 elektrony konwersji o energii maksymalnej 35 keV

nie stanowią dostatecznie dużej siły uderzeniowej, niwelującej ograniczenia związane z lokalizacją pozajądrową [111].

Znaczący spadek aktywności mitochondriów i przeżywalności komórek zaobserwowano już po 24 h inkubacji z 50 i 100 MBq/mL ^{125}I -PtNPs ($p \leq 0,01$). Nanocząstki bez radioaktywności powodowały śmiertelność na poziomie około 50% w pierwszej dobie traktowania, podczas gdy radiokoniugaty wzmocniły efekt do ~90%. Nieznacznie addytywny efekt zauważono również przy 25 MBq/mL, przekładający się na 60% śmiertelność komórek w badanej próbie. Wyniki te dokładnie obrazują, jak ważne jest wprowadzenie emiterów elektronów Augera w pobliże materiału genetycznego komórki. Zastosowanie PtNPs umożliwia dostarczenie radionuklidu w pobliże jądra komórkowego dzięki wewnątrzjądrowej lokalizacji tych nanomateriałów (~13-15%) i efektywnej desorpcji jodu w środowisku utleniającym (~20%).



Rysunek 30. Przeżywalność komórek HepG2 (A) oraz HeLa (B) traktowanych radiokoniugatami ^{125}I -Au@Pt i ^{125}I -PtNPs ($n=3$).

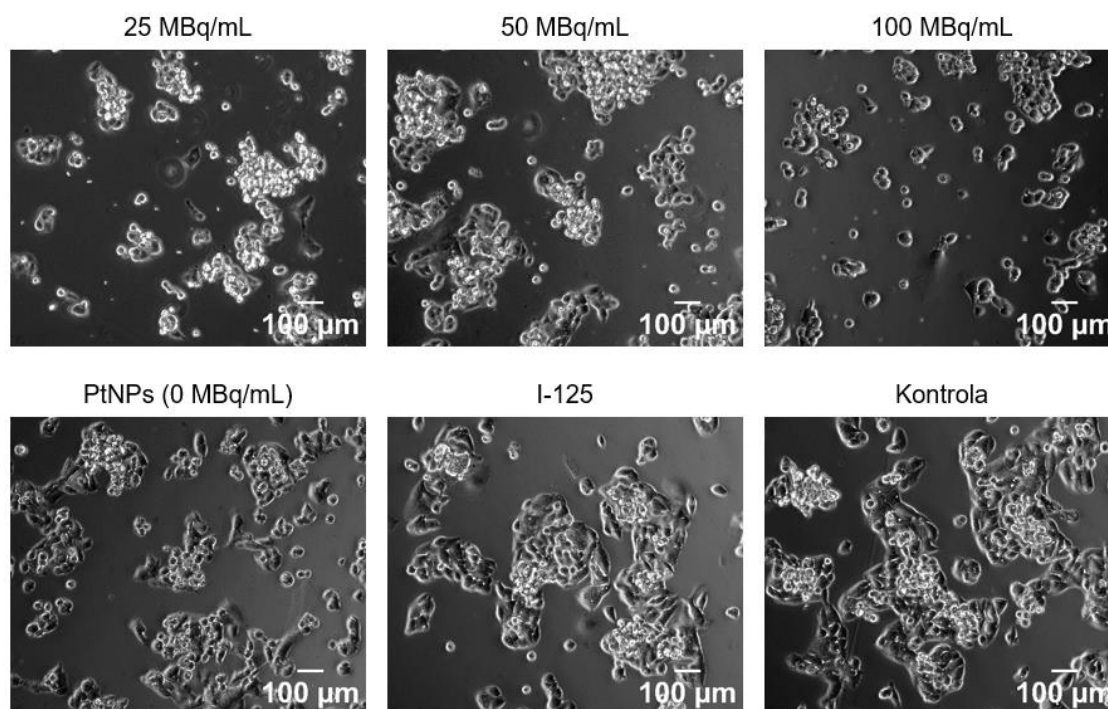
Jak przedstawiono na rysunku 30B, przeżywalność komórek HeLa nie obniżyła się pod wpływem nieradioaktywnych Au@Pt i PtNPs, co potwierdziło wysoką selektywność chemotoksycznego działania nanocząstek, silnie zależną od potencjału oksydacyjnego. Właściwość ta może być w przyszłości wykorzystana do planowania procesów terapeutycznych w oparciu o ukierunkowanie na inne niż białka transbłonowe cele, takie jak np. fizjologia i mikrośrodowisko guza.

Neutralny wpływ na aktywność mitochondrium zanotowano także dla ^{125}I w pełnym zakresie stężeń. Wyniki te są zgodne z przewidywaniami, ponieważ ze względu na krótki zasięg elektrony Augera nie są w stanie indukować odpowiedzi terapeutycznej bez precyzyjnego celowania na konkretne cele molekularne lub specyficznych warunków środowiska guza. Ocenie poddano także toksyczność radiokoniugatów ^{125}I -Au@Pt i ^{125}I -PtNPs w stosunku do komórek HeLa, nie znajdując w większości znaczących

różnic w przeżywalności podczas całego okresu inkubacji z aktywnościami w zakresie 6,25-100 MBq/mL. Zaobserwowano jedynie dwie istotne statystycznie ($p \leq 0.05$) przy 50 i 100 MBq/mL ^{125}I -PtNPs w ostatniej dobie inkubacji. Należy jednak podkreślić, że tak niewielkie rozbieżności (oscylujące w granicy 15%) w aktywności mitochondriów mogą być efektem zróżnicowanego etapu cyklu komórkowego i nie powinny być interpretowane jako wywołany efekt biologiczny przy odchyleniu standardowym wynoszącym ~8% i stosunkowo niskiej dokładności testu MTS.

Badania cytotoksyczności wykazały także, że obecność jodu na powierzchni nanocząstek nie upośledza chemotoksycznego oddziaływania tych nanocząstek, utrzymując ich zdolności do prooksydacyjnego działania. Addytywne działanie względem komórek HCC było następstwem chemotoksycznego działania PtNPs, wzmocnionego radiotoksycznym działaniem elektronów emitowanych podczas przemian ^{125}I . Przełożenie tych efektów do poziomu *in vivo* i dalszych etapów badań wymaga odpowiedzi na pytanie odnośnie bezpiecznego limitu tolerancji PtNPs. Używane w przeprowadzonych badaniach stężenie Pt (145 $\mu\text{g/mL}$) jest stosunkowo niskie w porównaniu do danych publikowanych przez inne zespoły. Ogromną zaletą proponowanego rozwiązania jest imponująca selektywność, gdyż czynnikiem aktywującym chemo- i radiotoksyczne działanie jest utleniające mikrośrodowisko guza, utrzymując tym samym neutralność związku w innych warunkach. Ponadto, zdolność do uzyskania dużych aktywności właściwych i zróżnicowanych dróg podania, otwiera możliwości personalizacji leczenia.

Traktowanie komórek HepG2 radiokoniugatami wpłynęło nie tylko na aktywność mitochondriów i przeżywalność, lecz znalazło odzwierciedlenie w istotnych zmianach morfologicznych (rysunek 31). Obrazowanie mikroskopowe przeprowadzone po 24 h inkubacji wykazało liczne zmiany morfologiczne, których nie obserwowano w przypadku traktowania nieradioaktywnymi nanocząstkami, jodem-125 (100 MBq/mL) i w komórkach kontrolnych. Wzrastające stężenia radiokoniugatu powodowały coraz intensywniejsze zmiany morfologiczne. Komórki HepG2 w swoim typowym wzroście tworzą wielowarstwowe klastry, a traktowanie ich radiokoniugatami powodowało uszkodzenie (25 MBq/mL) lub całkowite zniszczenie (50 i 100 MBq/mL) integralności tych struktur. Ponadto obserwowano także kurczenie się błony komórkowej i wyraźny spadek liczebności komórek. Niewielkie zmiany zauważono również w komórkach inkubowanych z nieradioaktywnymi PtNPs, charakteryzujące się głównie niewielką redukcją liczebności komórek i częściowym odłączaniem się pojedynczych komórek od klastrów.



Rysunek 31. Obrazy mikroskopowe pokazujące zakres i intensywność zmian morfologii komórek HepG2 traktowanych radiokoniugatem ^{125}I -PtNPs.

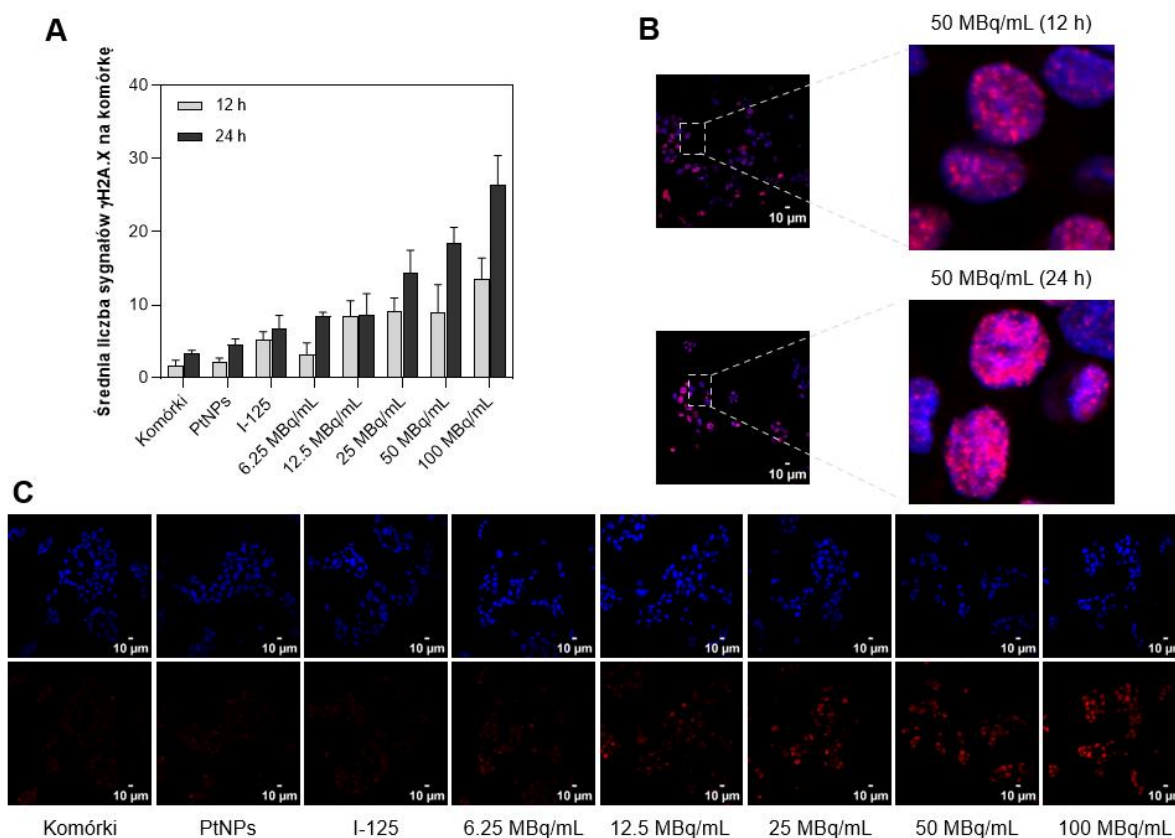
6.5.5. Dwuniciowe uszkodzenia DNA

Postępująca z czasem dysfunkcja mitochondriów powodująca także istotne zmiany morfologiczne są istotnym, aczkolwiek nie najważniejszym skutkiem terapeutycznego działania otrzymanych radiokoniugatów. Z punktu widzenia radiofarmacji, dwuniciowe uszkodzenia DNA są najbardziej pożądanym rezultatem przeciwnowotworowego działania radiofarmaceutyków. Wykrywanie tego typu uszkodzeń najczęściej wykonywane jest poprzez analizę zmian w obrębie histonu H2A.X [219]. Dwuniciowe uszkodzenie DNA powoduje bowiem fosforylację H2A.X (Ser 139), prowadząc do powstania $\gamma\text{H2A.X}$. Detekcja fosforylowanej formy tego histonu metodami immunocytochemicznymi jest złotym standardem charakteryzującym się wysoką czułością, pozwalającą wykrywać nawet pojedyncze dwuniciowe pęknięcia DNA DSB (*ang. double-strand breaks*) [220].

Analizując uszkodzenia DNA w komórkach HepG2 traktowanych ^{125}I -PtNPs zaobserwowano zależny od dawki wzrost DSB DNA w zakresie stężeń 12,5-100 MBq/mL (rysunek 32). Średnia liczba fosforylowanych histonów H2A.X generowanych pod wpływem 100 MBq/mL wynosiła 14 i 26 po upływie odpowiednio 12 i 24 h. Stwierdzono także obecność pojedynczych sygnałów w komórkach kontrolnych, jednak ich nieznaczna liczba jest naturalnym zjawiskiem, często obserwowanym w tego typu analizach. Krótka, 12-godzinna inkubacja nie skutkowała znaczącym wzrostem sygnału pochodzącego od $\gamma\text{H2A.X}$ względem próbki kontrolnej zawierającej sam ^{125}I (100 MBq/mL) bez nanocząstek. Dłuższa inkubacja (24 h) ujawniła natomiast silną zależność liczby dwuniciowych uszkodzeń DNA od stężenia radiokoniugatu, wykazując znaczący wzrost dla dawek 25 MBq/mL, 50 MBq/mL oraz 100 MBq/mL. Wyniki te są zgodne z otrzymanymi podczas analizy cytotoksyczności przy użyciu testu MTS, gdyż jedynie dla tych

stężen zaobserwowano radiotoksyczny efekt pochodzący od ^{125}I -PtNPs. Biorąc pod uwagę prooksydacyjne działanie samych nanocząstek, spodziewano się również indukowania dwuniciowych pęknięć DNA w wyniku działania wolnych rodników [221]. Uzyskane wyniki nie wykazały jednak powstania uszkodzeń DNA, co prawdopodobnie wynika z dobrego do eksperymentu okresu inkubacji. Jak wykazano, pierwsze symptomy stresu oksydacyjnego zauważalne są po 12 h, natomiast wyraźna nadpodaż RFT występuje po około 24 h inkubacji. Prowadzi to do konkluzji, iż czas analizowania detekcji uszkodzeń DNA był zbyt krótki, by zaobserwować skutki działania RFT na DNA.

Ważną obserwacją było również dostrzeżenie stosunkowo homogenicznego rozmieszczenia sygnałów w obserwowanych jądrach komórkowych. Potwierdza to, że sygnały pochodzące od $\gamma\text{H2A.X}$ nie są przypadkowe i nie występują jedynie lokalnie, na obszarze pojedynczych jąder komórkowych. Otrzymane wyniki są zgodne z poprzednio opublikowanymi pracami, wedle których dostarczenie emiterów elektronów Augera do jądra komórkowego jest kluczowe dla uzyskania wysokiego stopnia uszkodzeń DNA. Tłumaczy to także dlaczego ^{125}I -Au@PtNPs okazały się być nieskuteczne. Było to związane brakiem lokalizacji radiokoniugatu w jądrze komórkowym, a brak desorpcji jodu w cytozolu nie umożliwił potencjalnej penetracji błony jądrowej przez sam radionuklid [222–224].

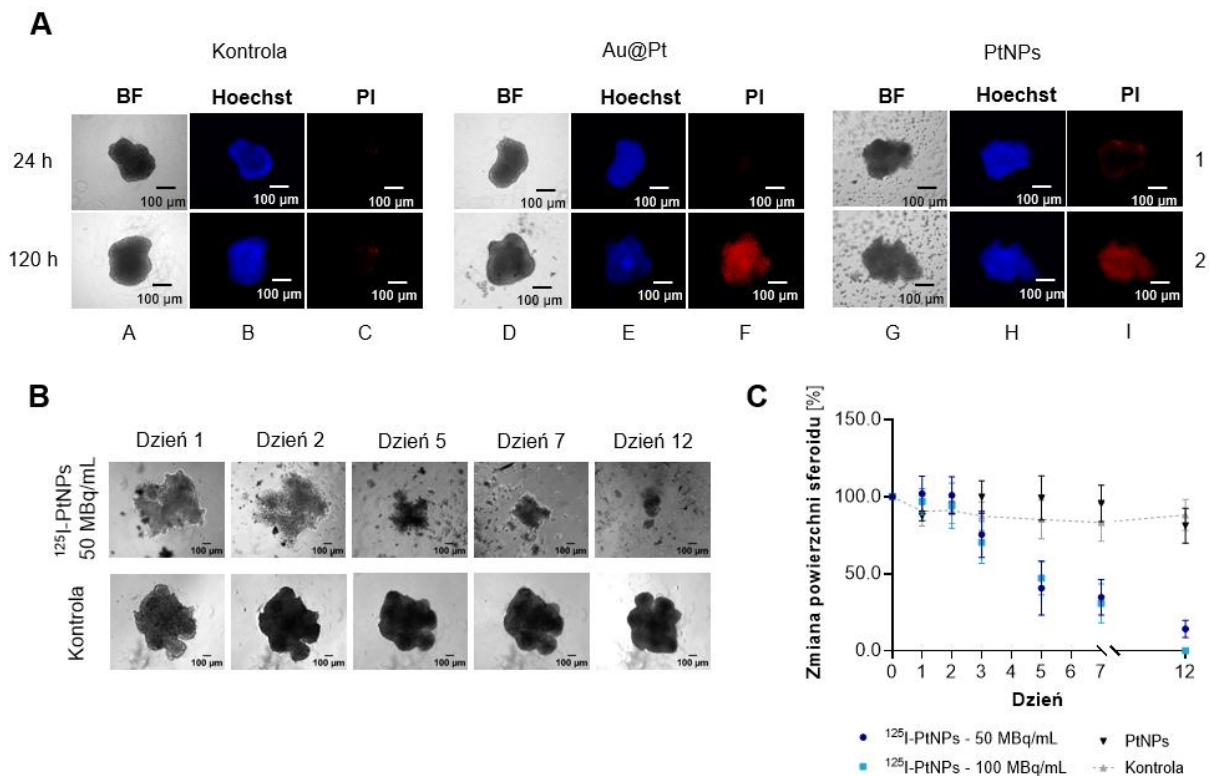


Rysunek 32. Dwuniciowe uszkodzenia DNA pod wpływem traktowania komórek HepG2 radiokoniugatem ^{125}I -PtNPs. Zależność częstości występowania uszkodzeń w funkcji stężenia (A); zdjęcia z obrazowania mikroskopem konfokalnym (B, C). Niebieski sygnał odpowiada całemu materiałowi genetycznemu komórki, podczas gdy czerwony punktowy sygnał pochodzi od fosforylowanego histonu H2A.X

6.5.6. Hodowle komórkowe 3D

Ocenę chemo- i radiotoksycznego działania otrzymanych związków przeprowadzono w sposób umożliwiający określenie wpływu poszczególnego typu działania na trójwymiarowy model guza. W tym celu wykonano osobne eksperymenty poświęcone chemo- i radiotoksycznym efektom działania otrzymanych związków. W pierwszym z nich weryfikacji poddano jedynie nieradioaktywne nanocząstki Au@Pt i PtNPs. Celem tej części prac badawczych było określenie siły chemotoksycznego działania nanocząstek i porównanie otrzymanych danych z wykonanymi uprzednio testami MTS i analizą markerów stresu oksydacyjnego.

Jak przedstawiono na rysunku 33A, inkubacja sferoidów z Au@Pt i PtNPs ($C_{Pt} = 145 \mu\text{g/mL}$) nie spowodowała ich naruszenia lub utraty integralności ani żadnych zmian w ich morfologii. Była to o tyle zaskakująca obserwacja, że podczas zastosowania hodowli 2D stwierdzono liczne zmiany w morfologii komórek. Barwienie fluorescencyjne ujawniło jednak postępującą z czasem toksyczność w obrębie sferoidu, charakteryzującą się rosnącą intensywnością sygnału od jodku propidyny (rysunek 33A). Zmiany te postępowały jednak wolniej niż stwierdzono to w przypadku testu MTS, gdyż wówczas, znaczący efekt cytotoksyczny zaobserwowano już po 24-godzinnym traktowaniu komórek PtNPs. Otrzymane wyniki potwierdziły, że obydwa typy badanych nanocząstek są zdolne do penetrowania guza i wykazywały działanie cytotoksyczne, pomimo braku jego zmian morfologicznych. Zaobserwowane różnice należy tłumaczyć zupełnie odmienną strukturą trójwymiarowego modelu guza względem hodowli 2D. Zastosowanie modelu 3D pozwala uzyskać bardziej wiarygodne dane, gdyż dużego znaczenia w funkcjonowaniu komórek nabierają mechanizmy oddziaływania komórka-komórka, stanowiące jedną z podstawowych przyczyn pierwotnej lub nabytej lekooporności w warunkach klinicznych [225]. Należy również mieć na uwadze brak możliwości dokładnej weryfikacji głębokości, na jaką nanocząstki w użytym stężeniu są w stanie przenikać w głąb guza.



Rysunek 33. Badania cytotoksyczności z wykorzystaniem sferoidów 3D – komórki traktowane nieradioaktywnymi nanocząstkami (A) oraz radiokoniugatem ^{125}I -PtNPs (B); zależność zmian powierzchni sferoidu w funkcji czasu (C) (n=3).

Druga część badań z wykorzystaniem modeli 3D obejmowała traktowanie komórek radiokoniugatem ^{125}I -PtNPs o stężeniach 50 i 100 MBq/mL. Wyboru stężeń dokonano w oparciu o wyniki testu MTS i detekcji H2A.X. Na rysunku 33B/C przedstawiono zmiany powierzchni sferoidu podczas 12-dniowej obserwacji.

Pierwsze efekty cytotoksycznego działania zaobserwowano w trzeciej dobie, odnotowując ~10% i ~15% redukcję rozmiaru sferoidu w przypadku 50 i 100 MBq/mL. Zmiany te, zgodnie z oczekiwaniami, następowały wolniej niż miało to miejsce w przypadku hodowli 2D. W tym okresie sferoidy zachowały swój pierwotny kształt i integralność struktury. Pierwsze znaczące zmiany w ich morfologii stwierdzono piątego dnia, wykazując około ~50% zmniejszenie rozmiaru sferoidu względem komórek kontrolnych. W końcowym punkcie eksperymentu osiągnięto całkowitą dezintegrację sferoidu przy traktowaniu go dawką 100 MBq/mL, podczas gdy dawka dwukrotnie niższa doprowadziła do blisko 7-krotnej redukcji jego rozmiaru względem dnia „0”. Podczas eksperymentu stwierdzono jedynie nieznaczne obniżenie rozmiaru sferoidów traktowanych PtNPs (0 MBq/mL) względem komórek kontrolnych. Potwierdza to znacznie silniejsze działania otrzymanych radiokoniugatów, wykazując tym samym przewagę działania addytywnego (radio i chemotoksycznego) względem chemotoksycznego efektu pochodzącego od nieradioaktywnych nanocząstek.

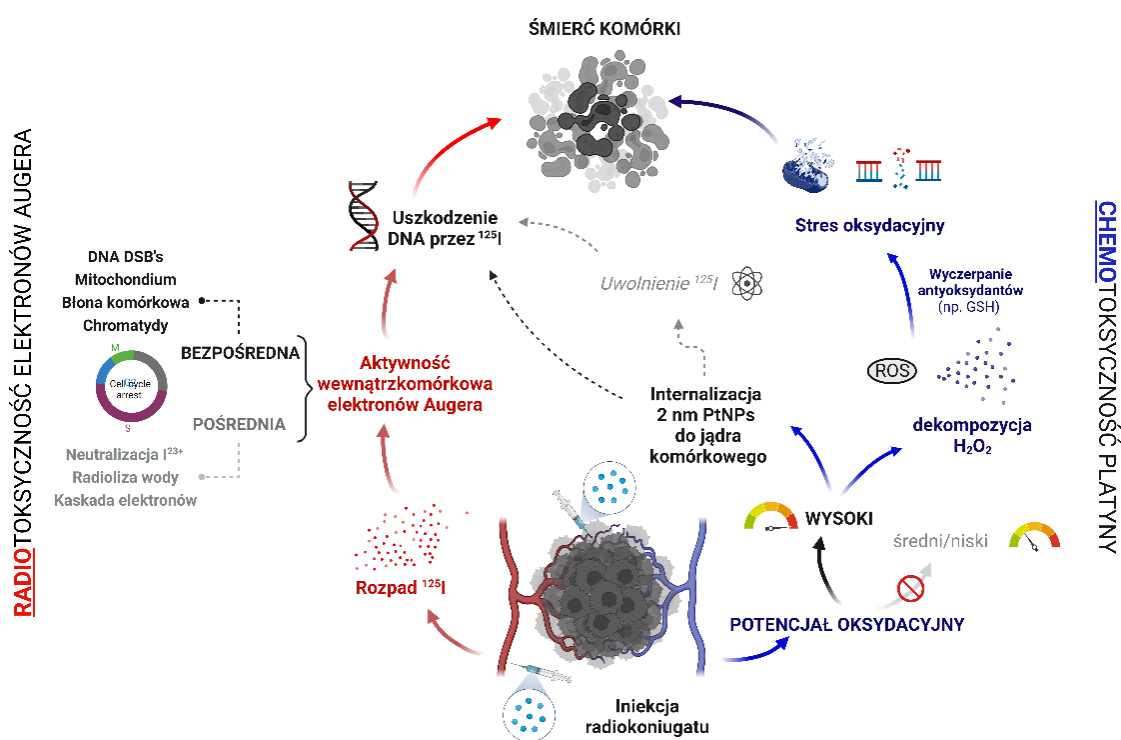
7. Podsumowanie i wnioski

Celem niniejszej pracy była synteza oraz określenie chemo- i radiotoksyczności radioaktywnych nanostruktur opartych na emiterach elektronów Augera ($^{193\text{m}},^{195\text{m}}\text{Pt}$ oraz ^{125}I) do terapii HER2-pozytywnego nowotworu piersi i raka wątrobowokomórkowego. Przed rozpoczęciem badań sformułowany cel ograniczał się do badań z radionuklidami $^{193\text{m}}\text{Pt}$ i $^{195\text{m}}\text{Pt}$. Jednak pierwsze nasze badania wykazały, że aktualnie nie ma możliwości otrzymania aktywności $^{193\text{m}}\text{Pt}$ lub $^{195\text{m}}\text{Pt}$, które pozwalałyby na pełne przeprowadzenie badań. Także w przyszłości nie widać perspektyw otrzymania aktywności wystarczających do przeprowadzenia terapii na grupie pacjentów. Rozszerzono więc badania o nanocząstki platyny znakowane łatwo dostępnym emiterem elektronów Augera, ^{125}I .

W ramach przedstawionej rozprawy skupiono się na syntezie nanocząstkowych nośników, ich funkcjonalizacji oraz poznaniu biologicznych aspektów przeciwnowotworowej aktywności otrzymanych radiokoniugatów. Pomimo przeprowadzenia wielu różnorodnych badań chemicznych i biologicznych, część otrzymanych wyników nie może być uznana za jednoznaczne. Kwestią otwartą pozostaje określenie w jaki sposób nanocząstki platynowe (głównie PtNPs) zachowują się w cytozolu o właściwościach silnie utleniających. Otrzymane i zaprezentowane wyniki dostarczyły ważnych i potrzebnych wskazówek dla znalezienia odpowiedzi na to pytanie, jednak nie umożliwiły jednoznacznego rozwiązania przedstawionego problemu badawczego. Drugim zagadnieniem, na które nie udało się znaleźć odpowiedzi jest kwestia zróżnicowanej wydajności chemisorpcji dla poszczególnych rodzajów badanych nanocząstek. Ważnym zagadnieniem pozostaje także kwestia mechanizmu desorpcji radionuklidów jodu z po-

wierzchni Au@Pt i PtNPs. Zaprezentowane wyniki umożliwiają powiązanie opisanych różnic z reaktywnością badanych materiałów będącą następstwem ich fizykochemicznych właściwości, jednak nie jest to poparte danymi eksperymentalnymi. Warto wspomnieć również o braku addytywnego efektu w przypadku ^{125}I -Au@Pt. Analizując wewnątrzkomórkową lokalizację tych nanocząstek i ich gromadzenie w okolicy jądra komórkowego, należało oczekiwać silnego efektu cytotoksycznego związanego z uszkodzeniem błony jądrowej. Otrzymane wyniki nie potwierdziły jednak tej hipotezy. Jako jedno z możliwych wyjaśnień może posłużyć zbyt niska energia emitowanych z rozpadu ^{125}I elektronów, niezdolnych do uszkodzenia podwójnej otoczki jądrowej.

Pomimo wymienionych aspektów, na podstawie uzyskanych danych doświadczalnych, realizując cel pracy zaproponowano mechanizm cytotoksycznego działania łączonej terapii „chemo-Auger” (rysunek 34).



Rysunek 34. Proponowany mechanizm biologicznej aktywności radiokoniugatu ^{125}I -PtNPs na podstawie zebranych danych eksperymentalnych.

Najważniejsze wnioski z przeprowadzonych prac badawczych podzielono na kategorie odnoszące się do najważniejszych punktów rozprawy:

a) w aspekcie badań radiochemicznych:

- istotnym ograniczeniem dla zastosowania radionuklidów $^{193\text{m}},^{195\text{m}}\text{Pt}$ w badaniach poświęconych terapii elektronami Augera jest ich znikoma dostępność i ograniczone możliwości produkcyjne,
- niska dostępność wzbogaconej izotopowo tarczy ^{194}Pt do aktywacji neutronowej, niski przekrój czynny reakcji n,γ oraz niewielka liczba wysokostrumieniowych reaktorów (strumień $>10^{15}$ n cm^{-2} s^{-1}) sprawiają, że ta droga produkcji nie może być wykorzystywana,

- przekrój czynny dla reakcji jądrowej $^{192}\text{Os}(\alpha,3n)^{193}\text{Pt}$ jest zbyt mały aby otrzymać odpowiednio do badań aktywności $^{193\text{m}}\text{Pt}$,
 - dwuetapowa aktywacja tarczy irydowej jest procesem trudnym do realizacji, ze względu na zbyt niskie przekroje czynne reakcji jądrowych, obecność wysokoradioaktywnych produktów ubocznych (głównie ^{192}Ir) utrudniających przerób tarczy oraz inertnym chemicznie charakterem irydu utrudniającym rozpuszczenie i przerób tarczy;
- b) w aspekcie badań chemicznych:
- depozycja platyny na powierzchni nanocząstkowego rdzenia jest procesem, który może podlegać ścisłej regulacji, dzięki czemu możliwe jest otrzymanie produktu o wysoce sprecyzowanej charakterystyce,
 - niezależnie od średnicy nanocząstek i wynikających z tego zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych, funkcjonalizacja wektorem zapewnia szybkie, wydajne i selektywne oddziaływanie biokoniuugat-receptor wraz z późniejszą internalizacją,
 - niestety nie potwierdzono efektywnego rozpuszczania platyny w środowisku utleniającym, co stanowiłoby ważną zaletę istotnie wzmacniającą działanie cytotoksyczne,
 - bardzo małe PtNPs o średnicy 2 nm wykazują szereg korzyści w porównaniu z większymi (30 nm) nanocząstkami, do których zalicza się większa reaktywność i lokalizacja wewnątrzjądrowa,
 - dzięki tworzeniu silnego wiązania z jodem nanocząstki Pt mogą być dobrym nośnikiem radionuklidów ^{125}I i ^{131}I ,
 - immobilizacja radionuklidów $^{125,131}\text{I}$ na powierzchni nanocząstek nie upośledza reaktywności nanocząstek i związanych z tym efektów terapeutycznych,
 - selektywne uwalnianie radionuklidów ^{125}I stanowi ważną zaletę prezentowanej koncepcji wydajnej terapii elektronami Augera;
- c) w aspekcie badań biologicznych:
- wykazano, że platyna pełni kluczową rolę w indukowaniu stresu oksydacyjnego w komórkach raka wątrobowokomórkowego, a zaburzenie równowagi redoks związane jest z wyczerpaniem zdolności antyoksydacyjnych komórki, pod wpływem działania badanych nanocząstek,
 - stres oksydacyjny indukowany Au@Pt NPs i PtNPs powoduje istotne zmiany w komórkach na wielu poziomach molekularnych, co powoduje zmiany w ich morfologii, jak i fizjologii,
 - brak efektów w komórkach o nieznacznie podwyższonym (SKOV-3) lub niskim (HeLa) potencjale osydacyjnym dowodzi wysokiej selektywności terapii zarówno pod kątem chemotoksyczności jak i radiotoksyczności,
 - działanie cytotoksyczne potwierdzono dla monowarstwowych i trójwymiarowych hodowli komórkowych, wykazując przy tym różnice w tempie i sposobie wywoływanych zmian,
 - pomimo braku wektora naprowadzającego, zaobserwowano selektywne i addytywne działanie radiokoniuगतu ^{125}I -PtNPs poprzez połączenie efektu chemo- i radiotoksycznego występującego jedynie w komórkach o określonym mikrośrodowisku.

Przeprowadzone prace badawcze dostarczyły wielu odpowiedzi, w tym - poprzez dobór nanomateriałów o zróżnicowanych właściwościach – pokazały rolę i znaczenie właściwości fizykochemicznych nanocząstek oraz ich przełożenie na aktywność biologiczną. Brak możliwości terapeutycznego wykorzystania radionuklidów $^{193m,195m}\text{Pt}$ jest dużym rozczarowaniem, gdyż wykorzystanie tych radionuklidów stanowiłoby wartościowy i oryginalny wkład nie tylko w prezentowaną pracę, lecz także możliwości zaprojektowania bardzo skutecznych radiokoniugatów dla terapii elektronami Augera. Pomimo tego, przedstawiona koncepcja łączonej chemo- i radioterapii wydaje się być bardzo obiecującym wstępem do rozwoju tego typu strategii terapeutycznych. Otrzymane wyniki mogą stać się dobrym punktem wyjściowym dla prowadzenia dalszych badań *in vivo*. Z punktu widzenia aplikacyjnego, ciekawą koncepcją wykorzystania otrzymanych radiokoniugatów jest ich użycie poprzez zawieszenie w lipiodolu powodującego embolizację naczyń krwionośnych w okolicy guza, jako nowej strategii opracowywania multimodalnych radiofarmaceutyków ukierunkowanych na mikrośrodowisko nowotworu.

8. Bibliografia

1. Shannon, A.H.; Ruff, S.M.; Pawlik, T.M. Expert Insights on Current Treatments for Hepatocellular Carcinoma: Clinical and Molecular Approaches and Bottlenecks to Progress. *J Hepatocell Carcinoma* **2022**, *9*, 1247–1261.
2. Yin, X.; Wu, T.; Lan, Y.; Yang, W. Current Progress of Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Biosci Rep* **2022**, *42*.
3. Shoshan, M.S.; Vonderach, T.; Hattendorf, B.; Wennemers, H. Peptide-Coated Platinum Nanoparticles with Selective Toxicity against Liver Cancer Cells. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 4901–4905.
4. Gavas, S.; Quazi, S.; Karpiński, T.M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Res Lett* **2021**, *16*.
5. Olusanya, T.O.B.; Ahmad, R.R.H.; Ibegbu, D.M.; Smith, J.R.; Elkordy, A.A. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules* **2018**, *23*.
6. Iravani, S.; Varma, R.S. Nanosponges for Drug Delivery and Cancer Therapy: Recent Advances. *Nanomaterials* **2022**, *12*.
7. Bayón-Cordero, L.; Alkorta, I.; Arana, L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. *Nanomaterials* **2019**, *9*.
8. Parveen, S.; Sahoo, S.K. Polymeric Nanoparticles for Cancer Therapy. *J Drug Target* **2008**, *16*, 108–123.
9. Sánchez-López, E.; Guerra, M.; Dias-Ferreira, J.; Lopez-Machado, A.; Ettcheto, M.; Cano, A.; Espina, M.; Camins, A.; Garcia, M.L.; Souto, E.B. Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics. *Nanomaterials* **2019**, *9*.
10. Chen, J.; Tan, Q.; Yang, Z.; Jin, Y. Engineered Extracellular Vesicles: Potentials in Cancer Combination Therapy. *J Nanobiotechnology* **2022**, *20*.
11. Baker, J.R. Dendrimer-Based Nanoparticles for Cancer Therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2009**, 708–719.
12. Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, R.L. A Brief Review on Solid Lipid Nanoparticles: Part and Parcel of Contemporary Drug Delivery Systems. *RSC Adv* **2020**, *10*, 26777–26791.
13. Tang, L.; Xiao, Q.; Mei, Y.; He, S.; Zhang, Z.; Wang, R.; Wang, W. Insights on Functionalized Carbon Nanotubes for Cancer Theranostics. *J Nanobiotechnology* **2021**, *19*.
14. Păduraru, D.N.; Ion, D.; Niculescu, A.G.; Mușat, F.; Andronic, O.; Grumezescu, A.M.; Bolocan, A. Recent Developments in Metallic Nanomaterials for Cancer Therapy, Diagnosing and Imaging Applications. *Pharmaceutics* **2022**, *14*.
15. Khalifehzadeh, R.; Arami, H. Biodegradable Calcium Phosphate Nanoparticles for Cancer Therapy. *Adv Colloid Interface Sci* **2020**, *279*.
16. Gao, Y.; Gao, D.; Shen, J.; Wang, Q. A Review of Mesoporous Silica Nanoparticle Delivery Systems in Chemo-Based Combination Cancer Therapies. *Front Chem* **2020**, *8*.
17. Mukherjee, S.; Liang, L.; Veisheh, O. Recent Advancements of Magnetic Nanomaterials in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*.
18. Devi, S.; Kumar, M.; Tiwari, A.; Tiwari, V.; Kaushik, D.; Verma, R.; Bhatt, S.; Sahoo, B.M.; Bhattacharya, T.; Alshehri, S.; et al. Quantum Dots: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Front Mater* **2022**, *8*.

19. Rzeszutek, J.; Matysiak, M.; Czajka, M.; Sawicki, K.; Rachubik, P.; Kruszewski, M.; Kapka-Skrzypczak, L. Zastosowanie Nanocząstek i Nanomateriałów w Medycynie Application of Nanoparticles and Nanomaterials in Medicine. *Hygeia Public Health* **2014**, *49*, 449–457.
20. Błaszczak-Świątkiewicz, K.; Olszewska, P.; Mikiciuk-Olasik, E. Zastosowanie Nanocząsteczek w Leczeniu i Diagnostyce Nowotworów. *Nowotwory* **2013**, *63*, 320–330.
21. Cai, Z.; Yook, S.; Lu, Y.; Bergstrom, D.; Winnik, M.A.; Pignol, J.P.; Reilly, R.M. Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ¹⁷⁷Lu. *Pharm Res* **2017**, *34*, 579–590.
22. de Kruijff, R.M.; Wolterbeek, H.T.; Denkova, A.G. A Critical Review of Alpha Radionuclide Therapy-How to Deal with Recoiling Daughters? *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 321–336.
23. 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*.
24. Swartz, M.A.; Fleury, M.E. Interstitial Flow and Its Effects in Soft Tissues. *Annu Rev Biomed Eng* **2007**, *9*, 229–256.
25. Clemons, T.D.; Singh, R.; Sorolla, A.; Chaudhari, N.; Hubbard, A.; Iyer, K.S. Distinction between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy. *Langmuir* **2018**, *34*, 15343–15349.
26. Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27*.
27. Judson, I.; Radford, J.A.; Harris, M.; Blay, J.-Y.; Van Hoesel, Q.; Le Cesne, A.; Van Oosterom, A.T.; Clemons, M.J.; Kamby, C.; Hermans, C.; et al. Randomised Phase II Trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin (DOXIL 1 /CAELYX 1) versus Doxorubicin in the Treatment of Advanced or Metastatic Soft Tissue Sarcoma: A Study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* **2001**, *37*, 870–877.
28. Leonard, R.C.F.; Williams, S.; Tulpule, A.; Levine, A.M.; Oliveros, S. Improving the Therapeutic Index of Anthracycline Chemotherapy: Focus on Liposomal Doxorubicin (Myocet™). *Breast* **2009**, *18*, 218–224.
29. Vallis, K.; Reilly, R.; Scollard, D.; Merente, P. A Phase I Dose-Escalating Study of Daunoxome, Liposomal Daunorubicin, in Metastatic Breast Cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, *87*, 15–20.
30. Tzogani, K.; Penttilä, K.; Lapveteläinen, T.; Hemmings, R.; Koenig, J.; Freire, J.; Márcia, S.; Cole, S.; Coppola, P.; Flores, B.; et al. EMA Review of Daunorubicin and Cytarabine Encapsulated in Liposomes (Vyxeos, CPX-351) for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed, Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia or Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes. *Oncologist* **2020**, *25*, e1414–e1420.
31. Fritze, A.; Hens, F.; Kimpfler, A.; Schubert, R.; Peschka-Süss, R. Remote Loading of Doxorubicin into Liposomes Driven by a Transmembrane Phosphate Gradient. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2006**, *1758*, 1633–1640.
32. Carnevale, J.; Ko, A.H. MM-398 (Nanoliposomal Irinotecan): Emergence of a Novel Therapy for the Treatment of Advanced Pancreatic Cancer. *Future Oncology* **2016**, *12*, 453–464.
33. Ando, K.; Mori, K.; Corradini, N.; Redini, F.; Heymann, D. Mifamurtide for the Treatment of Nonmetastatic Osteosarcoma. *Expert Opin Pharmacother* **2011**, *12*, 285–292.
34. Silverman, J.A.; Deitcher, S.R. Marqibo® (Vincristine Sulfate Liposome Injection) Improves the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol* **2013**, *71*, 555–564.

35. Miele, E.; Spinelli, G.P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. Albumin-Bound Formulation of Paclitaxel (Abraxane ® ABI-007) in the Treatment of Breast Cancer. *Int J Nanomedicine* **2009**, 4–99.
36. Bonvalot, S.; Rutkowski, P.L.; Thariat, J.; Carrère, S.; Ducassou, A.; Sunyach, M.P.; Agoston, P.; Hong, A.; Mervoyer, A.; Rastrelli, M.; et al. NBTXR3, a First-in-Class Radioenhancer Hafnium Oxide Nanoparticle, plus Radiotherapy versus Radiotherapy Alone in Patients with Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma (Act.In.Sarc): A Multicentre, Phase 2–3, Randomised, Controlled Trial. *Lancet Oncol* **2019**, 20, 1148–1159.
37. Grauer, O.; Jaber, M.; Hess, K.; Weckesser, M.; Schwindt, W.; Maring, S.; Wölfer, J.; Stummer, W. Combined Intracavitary Thermotherapy with Iron Oxide Nanoparticles and Radiotherapy as Local Treatment Modality in Recurrent Glioblastoma Patients. *J Neurooncol* **2019**, 141, 83–94.
38. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update. *Bioeng Transl Med* **2019**, 4.
39. Subhan, M.A.; Yalamarty, S.S.K.; Filipczak, N.; Parveen, F.; Torchilin, V.P. Recent Advances in Tumor Targeting via Epr Effect for Cancer Treatment. *J Pers Med* **2021**, 11.
40. Sindhvani, S.; Syed, A.M.; Ngai, J.; Kingston, B.R.; Maiorino, L.; Rothschild, J.; MacMillan, P.; Zhang, Y.; Rajesh, N.U.; Hoang, T.; et al. The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours. *Nat Mater* **2020**, 19, 566–575.
41. Challenging Paradigms in Tumour Drug Delivery. *Nat Mater* **2020**, 19, 477.
42. Fan, W.; Tang, W.; Lau, J.; Shen, Z.; Xie, J.; Shi, J.; Chen, X. Breaking the Depth Dependence by Nanotechnology-Enhanced X-Ray-Excited Deep Cancer Theranostics. *Adv. Mater.* **2019**, 31.
43. Howard, D.; Sebastian, S.; Le, Q.V.C.; Thierry, B.; Kempson, I. Chemical Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization and Radioprotection: A Review of Structure-Function Relationships Influencing Reactive Oxygen Species. *Int J Mol Sci* **2020**, 21.
44. Chen, F.; Zhang, X.H.; Hu, X.D.; Liu, P.D.; Zhang, H.Q. The Effects of Combined Selenium Nanoparticles and Radiation Therapy on Breast Cancer Cells in Vitro. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2018**, 46, 937–948.
45. Lacombe, S.; Porcel, E.; Scifoni, E. Particle Therapy and Nanomedicine: State of Art and Research Perspectives. *Cancer Nanotechnol* **2017**, 8.
46. Beik, J.; Abed, Z.; Ghoreishi, F.S.; Hosseini-Nami, S.; Mehrzadi, S.; Shakeri-Zadeh, A.; Kamrava, S.K. Nanotechnology in Hyperthermia Cancer Therapy: From Fundamental Principles to Advanced Applications. *J. Control. Releas.* **2016**, 235, 205–221.
47. Kafrouni, L.; Savadogo, O. Recent Progress on Magnetic Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *Prog Biomater* **2016**, 5, 147–160.
48. Sharma, S.K.; Shrivastava, N.; Rossi, F.; Tung, L.D.; Thanh, N.T.K. Nanoparticles -Based Magnetic and Photo Induced Hyperthermia for Cancer Treatment. *Nano Today* **2019**, 29.
49. Sidoff, L.; Dupuy, D.E. Clinical Experiences with Microwave Thermal Ablation of Lung Malignancies. *International Journal of Hyperthermia* **2017**, 33, 25–33.
50. Chu, X.; Mao, L.; Johnson, O.; Li, K.; Phan, J.; Yin, Q.; Li, L.; Zhang, J.; Chen, W.; Zhang, Y. Exploration of TiO₂ Nanoparticle Mediated Microdynamic Therapy on Cancer Treatment. *Nanomedicine* **2019**, 18, 272–281.
51. Tan, L.; Tang, W.; Liu, T.; Ren, X.; Fu, C.; Liu, B.; Ren, J.; Meng, X. Biocompatible Hollow Polydopamine Nanoparticles Loaded Ionic Liquid Enhanced Tumor Microwave Thermal Ablation in Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, 8, 11237–11245.

52. Kim, M.; Lee, J.H.; Nam, J.M. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Science* **2019**, *6*.
53. Algorri, J.F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J.M. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*.
54. Mallidi, S.; Anbil, S.; Bulin, A.L.; Obaid, G.; Ichikawa, M.; Hasan, T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2458–2487.
55. Yi, C.; Yu, Z.; Ren, Q.; Liu, X.; Wang, Y.; Sun, X.; Yin, S.; Pan, J.; Huang, X. Nanoscale ZnO-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2020**, *30*.
56. Izadifar, Z.; Babyn, P.; Chapman, D. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. *Ultrasound Med Biol* **2017**, *43*, 1085–1104.
57. Racca, L.; Limongi, T.; Vighetto, V.; Dumontel, B.; Ancona, A.; Canta, M.; Canavese, G.; Garino, N.; Cauda, V. Zinc Oxide Nanocrystals and High-Energy Shock Waves: A New Synergy for the Treatment of Cancer Cells. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*.
58. Bonvalot, S.; Rutkowski, P.L.; Thariat, J.; Carrère, S.; Ducassou, A.; Sunyach, M.P.; Agoston, P.; Hong, A.; Mervoyer, A.; Rastrelli, M.; et al. NBTXR3, a First-in-Class Radioenhancer Hafnium Oxide Nanoparticle, plus Radiotherapy versus Radiotherapy Alone in Patients with Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma (Act.In.Sarc): A Multicentre, Phase 2–3, Randomised, Controlled Trial. *Lancet Oncol* **2019**, *20*, 1148–1159.
59. Chowdhury, P.; Roberts, A.M.; Khan, S.; Hafeez, B.B.; Chauhan, S.C.; Jaggi, M.; Yallapu, M.M. Magnetic Nanoformulations for Prostate Cancer. *Drug Discov Today* **2017**, *22*, 1233–1241.
60. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update. *Bioeng Transl Med* **2019**, *4*.
61. Racca, L.; Cauda, V. Remotely Activated Nanoparticles for Anticancer Therapy. *Nanomicro Lett* **2021**, *13*.
62. Seniwal, B.; Thipe, V.C.; Singh, S.; Fonseca, T.C.F.; Freitas de Freitas, L. Recent Advances in Brachytherapy Using Radioactive Nanoparticles: An Alternative to Seed-Based Brachytherapy. *Front Oncol* **2021**, *11*.
63. Liu, L.; Xu, X.; Liang, X.; Zhang, X.; Wen, J.; Chen, K.; Su, X.; Ma, Y.; Teng, Z.; Lu, G.; et al. Periodic Mesoporous Organosilica-Coated Magnetite Nanoparticles Combined with Lipiodol for Transcatheter Arterial Chemoembolization to Inhibit the Progression of Liver Cancer. *J Colloid Interface Sci* **2021**, *591*, 211–220.
64. Ma, P.; Mumper, R.J. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nano-med Nanotechnol* **2013**, *4*, 6.
65. Kubota, T.; Kuroda, S.; Kanaya, N.; Morihiro, T.; Aoyama, K.; Kakiuchi, Y.; Kikuchi, S.; Nishizaki, M.; Kagawa, S.; Tazawa, H.; et al. HER2-Targeted Gold Nanoparticles Potentially Overcome Resistance to Trastuzumab in Gastric Cancer. *Nanomedicine* **2018**, *14*, 1919–1929.
66. Schmidt, R.M.; Hara, D.; Vega, J.D.; Abuhaija, M.B.; Tao, W.; Dogan, N.; Pollack, A.; Ford, J.C.; Shi, J. Quantifying Radiosensitization of PSMA-Targeted Gold Nanoparticles on Prostate Cancer Cells at Megavoltage Radiation Energies by Monte Carlo Simulation and Local Effect Model. *Pharmaceutics* **2022**, *14*.
67. Dai, L.; Shen, G.; Wang, Y.; Yang, P.; Wang, H.; Liu, Z. PSMA-Targeted Melanin-like Nanoparticles as a Multifunctional Nanoplatfor for Prostate Cancer Theranostics. *J Mater Chem B* **2021**, *9*, 1151–1161.

68. Zhang, X.; Qi, S.; Liu, D.; Du, J.; Jin, J. PSMA-Targeted Supramolecular Nanoparticles Prepared From Cucurbit[8]Uril-Based Ternary Host–Guest Recognition for Prostate Cancer Therapy. *Front Chem* **2022**, *10*.
69. Varshosaz, J.; Ghassami, E.; Noorbakhsh, A.; Minaiyan, M.; Jahanian-Najafabadi, A. Trastuzumab-Conjugated Nanoparticles Composed of Poly(Butylene Adipate-Co-Butylene Terephthalate) Prepared by Electro spraying Technique for Targeted Delivery of Docetaxel. *IET Nanobiotechnol* **2019**, *13*, 829–833.
70. Haghghi, A.H.; Khorasani, M.T.; Faghhi, Z.; Farjadian, F. Effects of Different Quantities of Antibody Conjugated with Magnetic Nanoparticles on Cell Separation Efficiency. *Heliyon* **2020**, *6*.
71. Juan, A.; Cimas, F.J.; Bravo, I.; Pandiella, A.; Ocaña, A.; Alonso-Moreno, C. Antibody Conjugation of Nanoparticles as Therapeutics for Breast Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1–21.
72. Bejarano, L.; Jordão, M.J.C.; Joyce, J.A. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov* **2021**, *11*, 933–959.
73. Roma-Rodrigues, C.; Mendes, R.; Baptista, P. V.; Fernandes, A.R. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.
74. Tiwari, A.; Trivedi, R.; Lin, S.Y. Tumor Microenvironment: Barrier or Opportunity towards Effective Cancer Therapy. *J Biomed Sci* **2022**, *29*.
75. Vilchis-Juárez, A.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Morales-Avila, E.; Ocampo-García, B.; Díaz-Nieto, L.; Luna-Gutiérrez, M.; Jiménez-Mancilla, N.; Pedraza-López, M.; Gómez-Oliván, L. Molecular Targeting Radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to ¹⁷⁷Lu-Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice. *J Biomed Nanotechnol* **2014**, *10*, 393–404.
76. Gibbens-Bandala, B.; Morales-Avila, E.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Luna-Gutiérrez, M.; Ramírez-Nava, G.; Ocampo-García, B. Synthesis and Evaluation of ¹⁷⁷Lu-DOTA-DN(PTX)-BN for Selective and Concomitant Radio and Drug-Therapeutic Effect on Breast Cancer Cells. *Polymers (Basel)* **2019**, *11*.
77. Holzwarth, U.; Ojea Jimenez, I.; Calzolari, L. A Random Walk Approach to Estimate the Confinement of α -Particle Emitters in Nanoparticles for Targeted Radionuclide Therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem* **2018**, *3*.
78. Majkowska-Pilip, A.; Gawęda, W.; Żelechowska-Matysiak, K.; Wawrowicz, K.; Bilewicz, A. Nanoparticles in Targeted Alpha Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–25.
79. Toro-González, M.; Peacock, A.; Miskowicz, A.; Cullen, D.A.; Copping, R.; Mirzadeh, S.; Davern, S.M. Tailoring the Radionuclide Encapsulation and Surface Chemistry of La(²²³Ra)VO₄ Nanoparticles for Targeted Alpha Therapy. *J. Nanotheranostics* **2021**, *2*, 33–50.
80. Gawęda, W.; Pruszyński, M.; Cędrowska, E.; Rodak, M.; Majkowska-Pilip, A.; Gawęł, D.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Bilewicz, A. Trastuzumab Modified Barium Ferrite Magnetic Nanoparticles Labeled with Radium-223: A New Potential Radiobioconjugate for Alpha Radioimmunotherapy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–20.
81. Ostrowski, S.; Majkowska-Pilip, A.; Bilewicz, A.; Dobrowolski, J.C. On Au_nAt Clusters as Potential Astatine Carriers. *RSC Adv* **2017**, *7*, 35854–35857.
82. Clanton, R.; Gonzalez, A.; Shankar, S.; Akabani, G. Rapid Synthesis of ¹²⁵I Integrated Gold Nanoparticles for Use in Combined Neoplasm Imaging and Targeted Radionuclide Therapy. *App. Rad. Isotop.* **2018**, *131*, 49–57.
83. Czerwińska, M.; Fracasso, G.; Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Kruszewski, M.; Majkowska-Pilip, A.; Lankoff, A. Design and Evaluation of ²²³Ra-Labeled and Anti-PSMA Targeted NaA Nanozeolites for Prostate Cancer Therapy-Part I. *Materials* **2020**, *13*.

84. Vasiliev, A.N.; Severin, A.; Lapshina, E.; Chernykh, E.; Ermolaev, S.; Kalmykov, S. Hydroxyapatite Particles as Carriers for ^{223}Ra . *J Radioanal Nucl Chem* **2017**, *311*, 1503–1509.
85. Piotrowska, A.; Leszczuk, E.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Bilewicz, A. Functionalized NaA Nanozeolites Labeled With $^{224,225}\text{Ra}$ for Targeted Alpha Therapy. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*.
86. Guérard, F.; Gestin, J.F.; Brechbiel, M.W. Production of ^{211}At -Astatinated Radiopharmaceuticals and Applications in Targeted α -Particle Therapy. *Cancer Biother Radiopharm* **2013**, *28*, 1–20.
87. Shi, X.; Li, Q.; Zhang, L.; Hanyu, M.; Xie, L.; Hu, K.; Nagatsu, K.; Zhang, C.; Wu, Z.; Wang, F.; et al. ^{211}At -Labeled Polymer Nanoparticles for Targeted Radionuclide Therapy of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor (GIPR)-Overexpressed Cancer. *Bioconjug Chem* **2021**, *32*, 1763–1772.
88. Dziawer, Ł.; Majkowska-Pilip, A.; Gawęł, D.; Godlewska, M.; Pruszyński, M.; Jastrzębski, J.; Wąs, B.; Bilewicz, A. Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ^{211}At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomaterials* **2019**, *9*.
89. Fach, M.; Fliedner, F.P.; Kempen, P.J.; Melander, F.; Hansen, A.E.; Bruun, L.M.; Köster, U.; Sporer, E.; Kjær, A.; Andresen, T.L.; et al. Effective Intratumoral Retention of ^{103}Pd AuPd Alloy Nanoparticles Embedded in Gel-Forming Liquids Paves the Way for New Nanobrachytherapy. *Adv Healthc Mater* **2021**, *10*.
90. Wu, S.; Helal-Neto, E.; Matos, A.P. dos S.; Jafari, A.; Kozempel, J.; Silva, Y.J. de A.; Serrano-Larrea, C.; Alves Junior, S.; Ricci-Junior, E.; Alexis, F.; et al. Radioactive Polymeric Nanoparticles for Biomedical Application. *Drug Deliv* **2020**, *27*, 1544–1561.
91. Black, K.C.L.; Wang, Y.; Luehmann, H.P.; Cai, X.; Xing, W.; Pang, B.; Zhao, Y.; Cutler, C.S.; Wang, L. V.; Liu, Y.; et al. Radioactive ^{198}Au -Doped Nanostructures with Different Shapes for in Vivo Analyses of Their Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution. *ACS Nano* **2014**, *8*, 4385–4394.
92. Żuk, M.; Gawęda, W.; Majkowska-Pilip, A.; Osial, M.; Wolski, M.; Bilewicz, A.; Krysiński, P. Hybrid Radiobioconjugated Superparamagnetic Iron Oxide-Based Nanoparticles for Multimodal Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
93. Gierałtowska, J.; Gharibkandi, N.A.; Majkowska, A.; Wawrowicz, K.; Bilewicz, A. Bioconjugates of $^{103}\text{Pd}/^{103m}\text{Rh}$ in-Vivo Generator for Targeted Auger Electron Therapy. *Nucl Med Biol* **2022**, *108*, 188–189.
94. Żuk, M.; Podgórski, R.; Ruszczyńska, A.; Ciach, T.; Majkowska-Pilip, A.; Bilewicz, A.; Krysiński, P. Multifunctional Nanoparticles Based on Iron Oxide and Gold- ^{198}Au Designed for Magnetic Hyperthermia and Radionuclide Therapy as a Potential Tool for Combined HER2-Positive Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2022**, *14*.
95. Aranda-Rivera, A.K.; Cruz-Gregorio, A.; Arancibia-Hernández, Y.L.; Hernández-Cruz, E.Y.; Pedraza-Chaverri, J. RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen* **2022**, *2*, 437–478.
96. Purohit, V.; Simeone, D.M.; Lyssiotis, C.A. Metabolic Regulation of Redox Balance in Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*.
97. Perillo, B.; Di Donato, M.; Pezone, A.; Di Zazzo, E.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in Cancer Therapy: The Bright Side of the Moon. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 192–203.
98. Ścibior-Bentkowska, D.; Czeczot Katedra Zakład Biochemii, H. Komórki Nowotworowe a Stres Oksydacyjny Cancer Cells and Oxidative Stress. *Postepy Hig Med Dosw* **2009**, *63*, 58–72.

99. Marnett, L.J.; Riggins, J.N.; West, J.D. Endogenous Generation of Reactive Oxidants and Electrophiles and Their Reactions with DNA and Protein. *Journal of Clinical Investigation* **2003**, *111*, 583–593.
100. Beckman, K.B.; Ames, B.N. Endogenous Oxidative Damage of MtDNA. *Mutat Res* **1999**, *424*, 51–58.
101. Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P. Molecular Effectors of Multiple Cell Death Pathways Initiated by Photodynamic Therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **2007**, *1776*, 86–107.
102. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biol* **2017**, 613–619.
103. Jungermann, K.; Kietzmann, T. Oxygen: Modulator of Metabolic Zonation and Disease of the Liver. *Hepatology* **2000**, *31*, 255–260.
104. Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res* **1991**, *51*, 794–798.
105. Wlassoff, W.A.; Albright, C.D.; Sivashinski, M.S.; Ivanova, A.; Appelbaum, J.G.; Salganik, R.I. Hydrogen Peroxide Overproduced in Breast Cancer Cells Can Serve as an Anticancer Prodrug Generating Apoptosis-Stimulating Hydroxyl Radicals under the Effect of Tamoxifen-Ferrocene Conjugate. *J. Pharm Pharmacol.* **2010**, *59*, 1549–1553.
106. Liu, Y.; Wu, H.; Li, M.; Yin, J.J.; Nie, Z. PH Dependent Catalytic Activities of Platinum Nanoparticles with Respect to the Decomposition of Hydrogen Peroxide and Scavenging of Superoxide and Singlet Oxygen. *Nanoscale* **2014**, *6*, 11904–11910.
107. Vetter, T.A.; Colombo, D.P. Kinetics of Platinum-Catalyzed Decomposition of Hydrogen Peroxide. *J Chem Educ* **2003**, *80*, 788–789.
108. Lundqvist, H.; Stenerlöv, B.; Gedda, L. The Auger Effect in Molecular Targeting Therapy. In *Targeted Radionuclide Tumor Therapy*; 2008; pp. 195–214.
109. Gharibkandi, N.A.; Gierałowska, J.; Wawrowicz, K.; Bilewicz, A. Nanostructures as Radionuclide Carriers in Auger Electron Therapy. *Materials* **2022**, *15*.
110. Buchegger, F.; Perillo-Adamer, F.; Dupertuis, Y.M.; Bischof Delaloye, A. Auger Radiation Targeted into DNA: A Therapy Perspective. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2006**, *33*, 1352–1363.
111. Ku, A.; Facca, V.J.; Cai, Z.; Reilly, R.M. Auger Electrons for Cancer Therapy – a Review. *EJNMMI Radiopharm Chem* **2019**, *4*.
112. Pirovano, G.; Wilson, T.C.; Reiner, T. Auger: The Future of Precision Medicine. *Nucl Med Biol* **2021**, *96–97*, 50–53.
113. Filosofov, D.; Kurakina, E.; Radchenko, V. Potent Candidates for Targeted Auger Therapy: Production and Radiochemical Considerations. *Nucl Med Biol* **2021**, *94–95*, 1–19.
114. Idrissou, M.B.; Pichard, A.; Tee, B.; Kibedi, T.; Poty, S.; Pouget, J.P. Targeted Radionuclide Therapy Using Auger Electron Emitters: The Quest for the Right Vector and the Right Radionuclide. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
115. Choppin, G.; Liljenzin, J.-O.; Rydberg, J.; Ekberg, C. Unstable Nuclei and Radioactive Decay. *Radiochemistry and Nuclear Chemistry* **2013**, 85–123.
116. Pronschinske, A.; Pedevilla, P.; Murphy, C.J.; Lewis, E.A.; Lucci, F.R.; Brown, G.; Pappas, G.; Michaelides, A.; Sykes, E.C.H. Enhancement of Low-Energy Electron Emission in 2D Radioactive Films. *Nat Mater* **2015**, *14*, 904–907.

117. Vallis, K.; Reilly, R.; Scollard, D. Phase I Trial to Evaluate the Tumor and Normal Tissue Uptake, Radiation Dosimetry and Safety of ¹¹¹In-DTPA-Human Epidermal Growth Factor in Patients with Metastatic EGFR-Positive Breast Cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2002**, 15–20.
118. Konijnenberg, M.W.; Bijster, M.; Krenning, E.P.; De Jong, M. A Stylized Computational Model of the Rat for Organ Dosimetry in Support of Preclinical Evaluations of Peptide Receptor Radionuclide Therapy with ⁹⁰Y, ¹¹¹In, or ¹⁷⁷Lu. *Journal of Nuclear Medicine* **2004**, *45*, 1260–1269.
119. Valkema, R.; De Jong, M.; Bakker, W.H.; Breeman, W.A.P.; Kooij, P.P.M.; Lugtenburg, P.J.; De Jong, F.H.; Christiansen, A.; Kam, B.L.R.; De Herder, W.W.; et al. Phase I Study of Peptide Receptor Radionuclide Therapy With [¹¹¹In-DTPA~ The Rotterdam Experience. *Semin Nucl Med* **2002**, 110–122.
120. Rebeschung, C.; Hoffmann, D.; Stéfani, L.; Desruet, M.D.; Wang, K.; Adelstein, S.J.; Artignan, X.; Vincent, F.; Gauchez, A.S.; Zhang, H.; et al. First Human Treatment of Resistant Neoplastic Meningitis by Intrathecal Administration of MTX Plus ¹²⁵IuDR. *Int J Radiat Biol* **2008**, *84*, 1123–1129.
121. Bodnar, E.N.; Dikiy, M.P.; Medvedeva, E.P. Photonuclear Production and Antitumor Effect of Radioactive Cisplatin (^{195m}Pt). *J Radioanal Nucl Chem* **2015**, *305*, 133–138.
122. Nadar, R.A.; Franssen, G.M.; Van Dijk, N.W.M.; Codee-van der Schilden, K.; de Weijert, M.; Oosterwijk, E.; Iafisco, M.; Margiotta, N.; Heskamp, S.; van den Beucken, J.J.J.P.; et al. Bone Tumor-Targeted Delivery of Theranostic ^{195m}Pt-Bisphosphonate Complexes Promotes Killing of Metastatic Tumor Cells. *Mater Today Bio* **2021**, *9*.
123. Dykiy, M.P.; Dovbnya, A.N.; Lyashko, Y. V.; Medvedeva, E.P.; Medvedev, D. V.; Uvarov, V.L. Photonuclear Production of ^{193m},^{195m}Pt and Synthesis of Radioactive Cisplatin. *J Labelled Comp Radiopharm* **2007**, *50*, 480–482.
124. Fourie, H.; Nair, S.; Miles, X.; Rossouw, D.; Beukes, P.; Newman, R.T.; Zeevaart, J.R.; Vandevoorde, C.; Slabbert, J. Estimating the Relative Biological Effectiveness of Auger Electron Emitter ¹²³I in Human Lymphocytes. *Front Phys* **2020**, *8*.
125. Pouget, J.P.; Santoro, L.; Raymond, L.; Chouin, N.; Bardiès, M.; Bascoul-Mollevis, C.; Huguet, H.; Azria, D.; Kotzki, P.O.; Pèlerin, M.; et al. Cell Membrane Is a More Sensitive Target than Cytoplasm to Dense Ionization Produced by Auger Electrons. *Radiat Res* **2008**, *170*, 192–200.
126. Idrissou, M.B.; Pichard, A.; Tee, B.; Kibedi, T.; Poty, S.; Pouget, J.P. Targeted Radionuclide Therapy Using Auger Electron Emitters: The Quest for the Right Vector and the Right Radionuclide. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
127. Borgna, F.; Haller, S.; Rodriguez, J.M.M.; Ginj, M.; Grundler, P. V.; Zeevaart, J.R.; Köster, U.; Schibli, R.; van der Meulen, N.P.; Müller, C. Combination of Terbium-161 with Somatostatin Receptor Antagonists—a Potential Paradigm Shift for the Treatment of Neuroendocrine Neoplasms. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2022**, *49*, 1113–1126.
128. Biricová, V.; Lázníčková, A.; Lázníček, M.; Polášek, M.; Hermann, P. Radiolabeling of PAMAM Dendrimers Conjugated to a Pyridine-N-Oxide DOTA Analog with ¹¹¹In: Optimization of Reaction Conditions and Biodistribution. *J Pharm Biomed Anal* **2011**, *56*, 505–512.
129. Lesniak, W.G.; Azad, B.B.; Chatterjee, S.; Lisok, A.; Pomper, M.G. An Evaluation of CXCR4 Targeting with PAMAM Dendrimer Conjugates for Oncologic Applications. *Pharmaceutics* **2022**, *14*.
130. Elghobary, M.E.N.; Munekane, M.; Mishiro, K.; Fuchigami, T.; Ogawa, K. Preparation and Evaluation of Thermosensitive Liposomes Encapsulating I-¹²⁵-Labeled Doxorubicin Derivatives for Auger Electron Therapy. *Molecules* **2023**, *28*.

131. Owen, J.; Thomas, E.; Menon, J.; Gray, M.; Skaripa-Koukelli, I.; Gill, M.R.; Wallington, S.; Miller, R.L.; Vallis, K.; Carlisle, R. Indium-111 Labelling of Liposomal HEGF for Radionuclide Delivery via Ultrasound-Induced Cavitation. *J. Control. Rel.* **2020**, *319*, 222–233.
132. Fondell, A.; Edwards, K.; Unga, J.; Kullberg, E.; Park, J.W.; Gedda, L. In Vitro Evaluation and Biodistribution of HER2-Targeted Liposomes Loaded with an 125I-Labelled DNA-Intercalator. *J Drug Target* **2011**, *19*, 846–855.
133. Hoang, B.; Reilly, R.M.; Allen, C. Block Copolymer Micelles Target Auger Electron Radiotherapy to the Nucleus of HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 455–465.
134. Ngo Ndjock Mbong, G.; Lu, Y.; Chan, C.; Cai, Z.; Liu, P.; Boyle, A.J.; Winnik, M.A.; Reilly, R.M. Trastuzumab Labeled to High Specific Activity with 111In by Site-Specific Conjugation to a Metal-Chelating Polymer Exhibits Amplified Auger Electron-Mediated Cytotoxicity on HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Mol Pharm* **2015**, *12*, 1951–1960.
135. Wang, Y.; Liu, X.; Chen, L.; Cheng, D.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D.J. Tumor Delivery of Antisense Oligomer Using Trastuzumab within a Streptavidin Nanoparticle. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2009**, *36*, 1977–1986.
136. Liu, X.; Nakamura, K.; Wang, Y.; Cheng, D.; Liang, M.; Xiao, N.; Chen, L.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D.J. Auger-Mediated Cytotoxicity of Cancer Cells in Culture by an 125I-Antisense Oligomer Delivered as a Three-Component Streptavidin Nanoparticle. *J Biomed Nanotechnol* **2010**, *6*, 153–157.
137. Qin, Y.; Shen, M.; Liu, X.; Gu, J.; Zhu, M.; Yi, X. Photo-Driven Delivery of 125I-Labeled Nanomicelles for Nucleus-Targeted Internal Conversion Electron-Based Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2021**, *13*, 49671–49681.
138. Chattopadhyay, N.; Cai, Z.; Pignol, J.P.; Keller, B.; Lechtman, E.; Bendayan, R.; Reilly, R.M. Design and Characterization of HER-2-Targeted Gold Nanoparticles for Enhanced X-Radiation Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *Mol Pharm* **2010**, *7*, 2194–2206.
139. Cai, Z.; Chattopadhyay, N.; Yang, K.; Kwon, Y.L.; Yook, S.; Pignol, J.P.; Reilly, R.M. 111In-Labeled Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Are Cytotoxic in Vitro to HER2-Positive Breast Cancer Cells and Arrest Tumor Growth in Vivo in Athymic Mice after Intratumoral Injection. *Nucl Med Biol* **2016**, *43*, 818–826.
140. Cai, Z.; Chattopadhyay, N.; Yang, K.; Kwon, Y.L.; Yook, S.; Pignol, J.-P.; Reilly, R.M. In Vitro to HER2-Positive Breast Cancer Cells and Arrest Tumor Growth In Vivo in Athymic Mice After Intratumoral Injection. *Nucl Med Biol* **2016**, 818–826.
141. Pronschinske, A.; Pedevilla, P.; Murphy, C.J.; Lewis, E.A.; Lucci, F.R.; Brown, G.; Pappas, G.; Michaelides, A.; Sykes, E.C.H. Enhancement of Low-Energy Electron Emission in 2D Radioactive Films. *Nat Mater* **2015**, *14*, 904–907.
142. Chao, Y.; Liang, C.; Yang, Y.; Wang, G.; Maiti, D.; Tian, L.; Wang, F.; Pan, W.; Wu, S.; Yang, K.; et al. Highly Effective Radioisotope Cancer Therapy with a Non-Therapeutic Isotope Delivered and Sensitized by Nanoscale Coordination Polymers. *ACS Nano* **2018**, *12*, 7519–7528.
143. Guo, T. Physical, Chemical and Biological Enhancement in X-Ray Nanochemistry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 15917–15931.
144. Su, W.; Wang, H.; Wang, T.; Li, X.; Tang, Z.; Zhao, S.; Zhang, M.; Li, D.; Jiang, X.; Gong, T.; et al. Auger Electrons Constructed Active Sites on Nanocatalysts for Catalytic Internal Radiotherapy. *Adv. Science* **2020**, *7*.
145. Li, C.; Baek, J.B. Recent Advances in Noble Metal (Pt, Ru, and Ir)-Based Electrocatalysts for Efficient Hydrogen Evolution Reaction. *ACS Omega* **2020**, *5*, 31–40.

146. Hilgers, K.; Coenen, H.H.; Qaim, S.M. Production of the Therapeutic Radionuclides ^{193}mPt and ^{195}mPt with High Specific Activity via α -Particle-Induced Reactions on ^{192}Os . *Applied Radiation and Isotopes* **2008**, *66*, 545–551.
147. Uddin, M.S.; Scholten, B.; Hermanne, A.; Sudár, S.; Coenen, H.H.; Qaim, S.M. Radiochemical Determination of Cross Sections of α -Particle Induced Reactions on ^{192}Os for the Production of the Therapeutic Radionuclide ^{193}mPt . *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, *68*, 2001–2006.
148. Uddin, M.S.; Hermanne, A.; Scholten, B.; Spellerberg, S.; Coenen, H.H.; Qaim, S.M. Small Scale Production of High Purity ^{193}mPt by the $^{192}\text{Os}(\alpha, 3n)$ -Process. *Radiochim Acta* **2011**, *99*, 131–135.
149. Zeevaart, J.R.; Wagener, J.; Marjanovic-Painter, B.; Sathekge, M.; Soni, N.; Zinn, C.; Perkins, G.; Smith, S. V. Production of High Specific Activity ^{195}mPt cisplatinum at South African Nuclear Energy Corporation for Phase 0 Clinical Trials in Healthy Individual Subjects. *J Labelled Comp Radiopharm* **2013**, *56*, 495–503.
150. Knapp, R.; Mirzadeh, S.; Beets, A.L.; Du, M. Production of Therapeutic Radioisotopes in the ORNL High Flux Isotope Reactor (HFIR) for Applications in Nuclear Medicine, Oncology and Interventional Cardiology. *J Radioanal Nucl Chem* **2005**, *263*, 503–509.
151. Ambur Sankaranarayana, R.; Florea, A.; Allekotte, S.; Vogg, A.T.J.; Maurer, J.; Schäfer, L.; Bolm, C.; Terhorst, S.; Classen, A.; Bauwens, M.; et al. PARP Targeted Auger Emitter Therapy with ^{125}I PARPi-01 for Triple-Negative Breast Cancer. *EJNMMI Res* **2022**, *12*.
152. Madsen, K.L.; Therkelsen, A.S.N.; Langkjær, N.; Olsen, B.B.; Thisgaard, H. Auger Electron Therapy of Glioblastoma Using ^{125}I 5-Iodo-2'-Deoxyuridine and Concomitant Chemotherapy – Evaluation of a Potential Treatment Strategy. *Nucl Med Biol* **2021**, *96–97*, 35–40.
153. Su, N.; Dang, Y.; Liang, G.; Liu, G. Iodine-125-Labeled CRGD-Gold Nanoparticles as Tumor-Targeted Radiosensitizer and Imaging Agent. *Nanoscale Res Lett* **2015**, *10*.
154. Lagorce, J.F.; Thomes, J.C.; Catanzano, G.; Buxeraud, J.; Raby, M.; Raby, C. Formation of Molecular Iodine during Oxidation of Iodide by the Peroxidase/ H_2O_2 System. Implications for Antithyroid Therapy. *Biochem Pharmacol* **1991**, *42*, 0–3.
155. Ball, J.M.; Hnatiw, J.B. The Reduction of I_2 by H_2O_2 in Aqueous Solution. *Can J Chem* **2001**, *79*, 304–311.
156. Patel, A. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol* **2020**, *6*, 1488.
157. McGranahan, N.; Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **2017**, *168*, 613–628.
158. Ayoub, N.M. Editorial: Novel Combination Therapies for the Treatment of Solid Cancers. *Front Oncol* **2021**, *11*.
159. Mokhtari, R.B.; Homayouni, T.S.; Baluch, N.; Morgatskaya, E.; Kumar, S.; Das, B.; Yeger, H. Combination Therapy in Combating Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 38022–38043.
160. Kumari, R.; Sahu, M.K.; Tripathy, A.; Uthansingh, K.; Behera, M. Hepatocellular Carcinoma Treatment: Hurdles, Advances and Prospects. *Hepat Oncol* **2018**, *5*, HEP08.
161. Fan, G.; Wei, X.; Xu, X. Is the Era of Sorafenib over? A Review of the Literature. *Ther Adv Med Oncol* **2020**, *12*.
162. Zhu, A.X.; Duda, D.G.; Sahani, D. V.; Jain, R.K. Development of Sunitinib in Hepatocellular Carcinoma: Rationale, Early Clinical Experience, and Correlative Studies. *Cancer Journal* **2009**, *15*, 263–268.

163. Gao, Y.; Lyu, L.; Feng, Y.; Li, F.; Hu, Y. A Review of Cutting-Edge Therapies for Hepatocellular Carcinoma (Hcc): Perspectives from Patents. *Int J Med Sci* **2021**, *18*, 3066–3081.
164. Jo, M.; Nishikawa, T.; Nakajima, T.; Okada, Y.; Yamaguchi, K.; Mitsuyoshi, H.; Yasui, K.; Minami, M.; Iwai, M.; Kagawa, K.; et al. Oxidative Stress Is Closely Associated with Tumor Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol* **2011**, *46*, 809–821.
165. Benfeitas, R.; Bidkhor, G.; Mukhopadhyay, B.; Klevstig, M.; Arif, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Cinar, R.; Nielsen, J.; Uhlen, M.; et al. Characterization of Heterogeneous Redox Responses in Hepatocellular Carcinoma Patients Using Network Analysis. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 471–487.
166. Maeda, A.; Bu, J.; Chen, J.; Zheng, G.; DaCosta, R.S. Dual in Vivo Photoacoustic and Fluorescence Imaging of HER2 Expression in Breast Tumors for Diagnosis, Margin Assessment, and Surgical Guidance. *Mol Imaging* **2014**, *13*.
167. Hodgson, A.P.J.; Jarvis, K.E.; Grimes, R.W.; Marsden, O.J. Advances in the Development of a Dissolution Method for the Attribution of Iridium Source Materials. *J Radioanal Nucl Chem* **2017**, *311*, 1193–1199.
168. Hodgson, A.P.J.; Jarvis, K.E.; Grimes, R.W.; Marsden, O.J. Development of an Iridium Dissolution Method for the Evaluation of Potential Radiological Device Materials. *J Radioanal Nucl Chem* **2016**, *307*, 2181–2186.
169. Arblaster, J.W. The Discoverers of the Platinum Isotopes THE DISCOVERY OF THE THIRTY SEVEN KNOWN PLATINUM ISOTOPES BETWEEN 1935 AND 1996. *Platin Met Rev* **2000**, *44*.
170. Breeman, W.A.P.; De Jong, M.; Visser, T.J.; Erion, J.L.; Krenning, E.P. Optimising Conditions for Radiolabelling of DOTA-Peptides with ⁹⁰Y, ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu at High Specific Activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2003**, *30*, 917–920.
171. Rahme, K.; Holmes, J.D. Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioconjugation. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Third Edition* **2014**.
172. Annur, S.; Santosa, S.J.; Aprilita, N.H. PH Dependence of Size Control in Gold Nanoparticles Synthesized at Room Temperature. *Oriental Journal of Chemistry* **2018**, *34*, 2305–2312.
173. Gao, Z.; Ye, H.; Tang, D.; Tao, J.; Habibi, S.; Minerick, A.; Tang, D.; Xia, X. Platinum-Decorated Gold Nanoparticles with Dual Functionalities for Ultrasensitive Colorimetric in Vitro Diagnostics. *Nano Lett* **2017**, *17*, 5572–5579, doi:10.1021/acs.nanolett.7b02385.
174. Paso, E.L.; Ricardo, C.; Arana, S. Green Synthesis of Gold, Silver, Platinum, and Palladium Nanoparticles Reduced and Stabilized by Sodium Rhodizonate and Their Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol and Methyl Orange. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42*, 6472–6478.
175. Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B.J.; Dixon, D. Polyethylene Glycol Functionalized Gold Nanoparticles: The Influence of Capping Density on Stability in Various Media. *Gold Bull* **2011**, *44*, 99–105.
176. Kim, S.H.; Kim, E.M.; Lee, C.M.; Kim, D.W.; Lim, S.T.; Sohn, M.H.; Jeong, H.J. Synthesis of PEG-Iodine-Capped Gold Nanoparticles and Their Contrast Enhancement in in Vitro and in Vivo for X-Ray/CT. *J Nanomater* **2012**, *2012*.
177. Dziawer, L.; Koźmiński, P.; Męczyńska-Wielgosz, S.; Pruszyński, M.; Łyczko, M.; Wąs, B.; Celi-chowski, G.; Grobelny, J.; Jastrzębski, J.; Bilewicz, A. Gold Nanoparticle Bioconjugates Labeled with ²¹¹At for Targeted Alpha Therapy. *RSC Adv* **2017**, *7*, 41024–41032.
178. Wardman, P. Fluorescent and Luminescent Probes for Measurement of Oxidative and Nitrosative Species in Cells and Tissues: Progress, Pitfalls, and Prospects. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43*, 995–1022.

179. Szwed, M.; Torgersen, M.L.; Kumari, R.V.; Yadava, S.K.; Pust, S.; Iversen, T.G.; Skotland, T.; Giri, J.; Sandvig, K. Biological Response and Cytotoxicity Induced by Lipid Nanocapsules. *J Nanobiotechnology* **2020**, *18*.
180. Senft, A.P.; Dalton, T.P.; Shertzer, H.G. Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe O-Phthalaldehyde. *Anal Biochem* **2000**, *280*, 80–86.
181. Ma, J.; Goryaynov, A.; Sarma, A.; Yang, W. Self-Regulated Viscous Channel in the Nuclear Pore Complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 7326–7331.
182. Barhoum, A.; García-Betancourt, M.L.; Rahier, H.; Van Assche, G. Physicochemical Characterization of Nanomaterials: Polymorph, Composition, Wettability, and Thermal Stability. In *Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures: Current Prospects and Future Trends*; Elsevier Inc., 2018; pp. 255–278 ISBN 9780128135167.
183. Chattopadhyay, N.; Fonge, H.; Cai, Z.; Scollard, D.; Lechtman, E.; Done, S.J.; Pignol, J.P.; Reilly, R.M. Role of Antibody-Mediated Tumor Targeting and Route of Administration in Nanoparticle Tumor Accumulation in Vivo. *Mol Pharm* **2012**, *9*, 2168–2179.
184. Zhao, J.; Mohan, N.; Nussinov, R.; Ma, B.; Wu, W.J. Trastuzumab Blocks the Receiver Function of HER2 Leading to the Population Shifts of HER2-Containing Homodimers and Heterodimers. *Antibodies* **2021**, *10*.
185. Wymant, J.M.; Sayers, E.J.; Muir, D.; Jones, A.T. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breastcancer. *J Cancer* **2020**, *11*, 3288–3302.
186. Cheng, J.; Liang, M.; Carvalho, M.F.; Tigue, N.; Faggioni, R.; Roskos, L.K.; Vainshtein, I. Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. *Antibodies* **2020**, *9*, 1–21.
187. Onsum, M.D.; Geretti, E.; Paragas, V.; Kudla, A.J.; Moulis, S.P.; Luus, L.; Wickham, T.J.; McDonagh, C.F.; Macbeath, G.; Hendriks, B.S. Single-Cell Quantitative HER2 Measurement Identifies Heterogeneity and Distinct Subgroups within Traditionally Defined HER2-Positive Patients. *American Journal of Pathology* **2013**, *183*, 1446–1460.
188. Huang, A.; Yang, X.R.; Chung, W.Y.; Dennison, A.R.; Zhou, J. Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*.
189. Li, J.; Huang, Q.; Long, X.; Zhang, J.; Huang, X.; Aa, J.; Yang, H.; Chen, Z.; Xing, J. CD147 Reprograms Fatty Acid Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Cells through Akt/MTOR/SREBP1c and P38/PPAR α Pathways. *J Hepatol* **2015**, *63*, 1378–1389.
190. Reghupaty, S.C.; Sarkar, D. Current Status of Gene Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*.
191. Syed, Y.Y. Ramucirumab: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs* **2020**, *80*, 315–322.
192. Jiang, B.; Zhang, R.; Zhang, J.; Hou, Y.; Chen, X.; Zhou, M.; Tian, X.; Hao, C.; Fan, K.; Yan, X. GRP78-Targeted Ferritin Nanocaged Ultra-High Dose of Doxorubicin for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Theranostics* **2019**, *9*, 2167–2182.
193. Li, Y.; Hu, Y.; Xiao, J.; Liu, G.; Li, X.; Zhao, Y.; Tan, H.; Shi, H.; Cheng, D. Investigation of SP94 Peptide as a Specific Probe for Hepatocellular Carcinoma Imaging and Therapy. *Sci Rep* **2016**, *6*.
194. Luo, C.; Xiong, H.; Chen, L.; Liu, X.; Zou, S.; Guan, J.; Wang, K. GRP78 Promotes Hepatocellular Carcinoma Proliferation by Increasing FAT10 Expression through the NF-KB Pathway. *Exp Cell Res* **2018**, *365*, 1–11.
195. Wawrowicz, K.; Majkowska-Pilip, A.; Gawel, D.; Chajduk, E.; Pieńkowski, T.; Bilewicz, A. Au@Pt Core-Shell Nanoparticle Bioconjugates for the Therapy of HER2+ Breast Cancer and

- Hepatocellular Carcinoma. Model Studies on the Applicability of ^{193m}Pt and ^{195m}Pt Radionuclides in Auger Electron Therapy. *Molecules* **2021**, *26*.
196. Marra, M.; Sordelli, I.M.; Lombardi, A.; Lamberti, M.; Tarantino, L.; Giudice, A.; Stiuso, P.; Abbruzzese, A.; Sperlongano, R.; Accardo, M.; et al. Molecular Targets and Oxidative Stress Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: An Overview. *J Transl Med* **2011**, *9*.
 197. Guo, Y.; Xiao, Z.; Yang, L.; Gao, Y.; Zhu, Q.; Hu, L.; Huang, D.; Xu, Q. Hypoxia-Inducible Factors in Hepatocellular Carcinoma (Review). *Oncol Rep* **2020**, *43*, 3–15.
 198. Bendale, Y.; Bendale, V.; Paul, S. Evaluation of Cytotoxic Activity of Platinum Nanoparticles against Normal and Cancer Cells and Its Anticancer Potential through Induction of Apoptosis. *Integr Med Res* **2017**, *6*, 141–148.
 199. Almeer, R.S.; Ali, D.; Alarifi, S.; Alkahtani, S.; Almansour, M. Green Platinum Nanoparticles Interaction With HEK293 Cells: Cellular Toxicity, Apoptosis, and Genetic Damage. *Dose-Response* **2018**, *16*, 1–11.
 200. Mironava, T.; Simon, M.; Rafailovich, M.H.; Rigas, B. Platinum Folate Nanoparticles Toxicity: Cancer vs. Normal Cells. *Toxicology in Vitro* **2013**, *27*, 882–889.
 201. Wang, L.; Zhang, Y.; Cheng, C.; Liu, X.; Jiang, H.; Wang, X. A Highly Sensitive Electrochemical Biosensor for Evaluation of Oxidative Stress Based on the Nano-Interface of Graphene Nanocomposites Blended with Au, Fe_3O_4 and Pt Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 18441–18449.
 202. Huang, H.; Du, W.; Brekken, R.A. Extracellular Matrix Induction of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal* **2017**, *27*, 774–784.
 203. Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biol* **2017**, *11*, 613–619.
 204. Li, Q.; Huang, C.; Liu, L.; Hu, R.; Qu, J. Effect of Surface Coating of Gold Nanoparticles on Cytotoxicity and Cell Cycle Progression. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 1–13.
 205. Li, Y.; Yun, K.H.; Lee, H.; Goh, S.H.; Suh, Y.G.; Choi, Y. Porous Platinum Nanoparticles as a High-Z and Oxygen Generating Nanozyme for Enhanced Radiotherapy in Vivo. *Biomaterials* **2019**, *197*, 12–19.
 206. Ghosh, N.; Das, A.; Chaffee, S.; Roy, S.; Sen, C.K. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support* **2017**, 45–55.
 207. Zhang, Q.; Lou, Y.; Bai, X.L.; Liang, T.B. Intratumoral Heterogeneity of Hepatocellular Carcinoma: From Singlecell to Population-Based Studies. *World J Gastroenterol* **2020**, *26*, 3720–3736.
 208. Valiyaveetil, S.; Asharani, P.; Prakash Hande, M.; Xinyi, N. DNA Damage and P53-Mediated Growth Arrest in Human Cells Treated with Platinum Nanoparticles. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 51–64.
 209. Wang, P.; Cui, J.; Wen, J.; Guo, Y.; Zhang, L.; Chen, X. Cisplatin Induces HepG2 Cell Cycle Arrest through Targeting Specific Long Noncoding RNAs and the P53 Signaling Pathway. *Oncol Lett* **2016**, *12*, 4605–4612.
 210. Wawrowicz, K.; Majkowska-Pilip, A.; Szwed, M.; Żelechowska-Matysiak, K.; Chajduk, E.; Bilewicz, A. Oxidative Status as an Attribute for Selective Antitumor Activity of Platinum-Containing Nanoparticles against Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.
 211. Smith, J.A.; Martin, L. Do Cells Cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 1263–1267.

212. Kassis, A.I.; Harapanhalli, R.S.; Adelstein, S.J. Strand Breaks in Plasmid DNA after Positional Changes of Auger Electron-Emitting Iodine-125: Direct Compared to Indirect Effects. *Radiat Res* **1999**, *152*, 530–538.
213. Elmroth, K.; Stenerlöv, B. DNA-Incorporated ¹²⁵I Induces More than One Double-Strand Break per Decay in Mammalian Cells. *Radiat Res* **2005**, *163*, 369–373.
214. Walsh, A.A. Chemisorption of Iodine-125 to Gold Nanoparticles Allows for Real-Time Quantitation and Potential Use in Nanomedicine. *Journal of Nanoparticle Research* **2017**, *19*.
215. Unverricht-Yeboah, M.; Holtmann, K.; Kriehuber, R. Comet Assay Analysis of DNA Strand Breaks after Exposure to the DNA-Incorporated Auger Electron Emitter Iodine-125. *Int J Radiat Biol* **2020**.
216. Jan, H.; Gul, R.; Andleeb, A.; Ullah, S.; Shah, M.; Khanum, M.; Ullah, I.; Hano, C.; Abbasi, B.H. A Detailed Review on Biosynthesis of Platinum Nanoparticles (PtNPs), Their Potential Antimicrobial and Biomedical Applications. *Journal of Saudi Chemical Society* **2021**, *25*.
217. Sangwan, S.; Seth, R. Synthesis, Characterization and Stability of Gold Nanoparticles (AuNPs) in Different Buffer Systems. *J Clust Sci* **2022**, *33*, 749–764.
218. Medrano-Macías, J.; Leija-Martínez, P.; Juárez-Maldonado, A.; Rocha-Estrada, A.; Benavides-Mendoza, A. Efecto de La Aplicación de Yodo Sobre Antioxidantes En Plántulas de Jitomate. *Rev Chapingo Ser Hortíc* **2016**, *22*, 133–143.
219. Collins, P.L.; Purman, C.; Porter, S.I.; Nganga, V.; Saini, A.; Hayer, K.E.; Gurewitz, G.L.; Sleckman, B.P.; Bednarski, J.J.; Bassing, C.H.; et al. DNA Double-Strand Breaks Induce H2Ax Phosphorylation Domains in a Contact-Dependent Manner. *Nat Commun* **2020**, *11*.
220. Podhorecka, M. GH2AX Jako Marker Dwuniciowych Pęknięć DNA* GH2AX in the Recognition of DNA Double-Strand Breaks. *Postepy Hig Med Dosw* **2009**, *63*.
221. Srinivas, U.S.; Tan, B.W.Q.; Vellayappan, B.A.; Jeyasekharan, A.D. ROS and the DNA Damage Response in Cancer. *Redox Biol* **2019**, *25*, 101084.
222. Sankaranarayanan, R.A.; Peil, J.; Vogg, A.T.J.; Bolm, C.; Terhorst, S.; Classen, A.; Bauwens, M.; Maurer, J.; Mottaghy, F.; Morgenroth, A. Auger Emitter Conjugated PARP Inhibitor for Therapy in Triple Negative Breast Cancers: A Comparative In-Vitro Study. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*.
223. Moradi, M.S.; Bidabadi, B.S. Assessment of Single-and Double-Strand Breaks in DNA Induced by Auger Electrons of Radioisotopes Used in Diagnostic and Therapeutic Applications. *J Med Phys* **2020**, *45*, 240–248.
224. Di Maria, S.; Belchior, A.; Pereira, E.; Quental, L.; Oliveira, M.C.; Mendes, F.; Lavrado, J.; Paulo, A.; Vaz, P. Dosimetry Assessment of DNA Damage by Auger-Emitting Radionuclides: Experimental and Monte Carlo Studies. *Radiation Physics and Chemistry* **2017**, *140*, 278–282.
225. Kapalczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different. *Archives of Medical Science* **2016**, *14*, 910–919.