

UNIwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

ROZPRAWA DOKTORSKA

Marlena Paździor-Heiske



**Wybrane nośniki do sporządzania formułacji terapeutycznej
chemioterapeutyku przydatnego w onkologii**

Promotor:
dr hab. Violetta Kozik, prof. UŚ

KATOWICE 2025

*Pragnę serdecznie podziękować Pani promotor
dr hab. Violetcie Kozik, prof. UŚ za wsparcie merytoryczne,
poświęcony mi czas, życzliwość, wyrozumiałość,
a także motywację do poszerzania wiedzy.*

*Pragnę serdecznie podziękować Pani
dr hab. Danucie Pentak, prof. UO za wszelką pomoc w trakcie
prowadzenia badań, życzliwość i wyrozumiałość.*

*Pragnę serdecznie podziękować Panu
dr hab. n. farm. Andrzejowi Ziębie, prof. SUM za zsyntezowany związek, który
mogłam wykorzystać do badań w niniejszej pracy doktorskiej.*

*Pragnę serdecznie podziękować Panu
prof. dr hab. Andrzejowi Bąkowi za opiekę naukową,
wsparcie i życzliwość.*

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WPROWADZENIE.....	10
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	11
2.1. Leki.....	11
2.1.1. Lek - definicja	11
2.1.2. Farmakokinetyka	11
2.1.3. Podstawowe pojęcia dotyczące kinetyki uwalniania leku	12
2.1.4. Sposoby dostarczania leków.....	13
2.1.5. Projektowanie systemu dostarczania leków	15
2.1.6. Lipofilowość.....	15
2.2. Nanotechnologia.....	16
2.3. Nośniki leków.....	17
2.3.1. Pochodne tlenków grafenu	17
2.3.2. Egzosomy	18
2.3.3. Hydrożele na bazie chitozanu.....	19
2.3.4. Haloizyt	19
2.4. Albumina	19
2.5. Model matematyczny.....	21
2.6. Liposomy	23
2.6.1. Struktura liposomów	23
2.6.2. Rodzaje liposomów	24
2.6.3. Metody otrzymywania liposomów	25
2.6.4. Modyfikacja powierzchni liposomów	26
2.6.5. Wyzwania dla liposomów.....	28
2.6.6. Rodzaje liposomów pod względem składu	29
2.6.7. Lipidy syntetyczne.....	30
2.6.8. Liposomy w zastosowaniach klinicznych	31
2.7. Wybrane substancje chemiczne, biologicznie aktywne w terapii onkologicznej	33
2.7.1. Dokсорubicyna.....	33
2.7.2. Binimetynib	33
2.7.3. Chlorek 9-(N-piperazylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny.....	34
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	35
3.1. CEL I ZAKRES PRACY	35
3.2. METODYKA BADAWCZA.....	36
3.2.1. Synteza pochodnych tlenków grafenu.....	36
3.2.2. Izolacja egzosomów	41
3.2.3. Analiza toksyczności haloizytu	45

3.2.4. Synteza hydrożeli	46
3.2.5. Analiza spektroskopowa IR hydrożeli po liofilizacji.....	50
3.2.6. Synteza 9-PBThACl	51
3.2.7. Preparatyka liposomów	52
3.2.8. Rozkład wielkości cząstek formulacji liposomalnej.....	53
3.2.9. Preparatyka roztworów i próbek	53
3.2.10. Pomiar wielkości liposomów	54
3.2.11. Badanie stabilności	55
3.2.12. Pomiary UV/Vis	55
3.2.13. Wydajność zamykania leku	56
3.2.14. Badanie uwalniania leku i modelowanie matematyczne	57
3.2.15. Analiza statystyczna	57
3.2.16. Rozkład prawdopodobieństwa Weibulla	58
4. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW	58
4.9. Analiza stopnia enkapsulacji.....	58
4.10. Trwałość preparatów liposomalnych na przykładzie $L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX$	63
4.11. Wpływ otaczającego pH na uwalnianie leku/ substancji chemicznej na przykładzie $L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX$. Analiza spektrofotometryczna.....	66
4.12. Ocena uwalniania leku <i>in vitro</i>	69
4.12.1. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz L_{DPPC}/DOX wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	70
4.12.2. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl}$]:HSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	73
4.12.3. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl}$]:dHSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	75
4.12.4. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX$ wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	78
4.12.5. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX$]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	81
4.12.6. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX$]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	83
4.12.7. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}/Binimetynib$ wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	86
4.12.8. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i Binimetynibu z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl}/Binimetynib$]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	88

4.12.9. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i Binimetynibu z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA)[L _{DPPC} /9-PBThACl/Binimetynib]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.	91
4.12.10. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z liposomów [L _{DPPC} /DOX/Binimetynib] wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.	94
4.12.11. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z układów liposom-lek-albumina (HSA) [L _{DPPC} /DOX/Binimetynib]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	96
4.12.12. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z układów liposom-lek-albumina (dHSA) [L _{DPPC} /DOX/Binimetynib]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.....	99
4.12.13. Graficzne podsumowanie procesu uwalniania leków.....	102
4.13. Mikroskopia.....	103
4.14. Lipofilowość.....	105
4.15. Analiza głównych składowych (PCA).....	106
4.16. Metoda klasteryzacji hierarchicznej (HCA)	109
4.17. Jednoczynnikowa analiza wariancji - ANOVA.....	110
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	112
Wykaz stosowanych odczynników	119
Wykaz aparatury pomiarowej oraz użytego oprogramowania	120
REFERENCJE.....	122
WYKAZ RYSUNKÓW	131
WYKAZ TABEL.....	137
DOROBEK NAUKOWY.....	140
6. ANEKS.....	149

WYKAZ SKRÓTÓW

AA	Aminokwasy
ADME	Absorpcja, Dystrybucja, Metabolizm, Eliminacja
AIDS	Zespół nabytego niedoboru odporności
BCS	Biofarmaceutyczny system klasyfikacji
BRAFV600E	Mutacja w genie BRAF, ważny marker diagnostyczny i terapeutyczny
dHSA	Albumina surowicy ludzkiej, wolna od kwasów tłuszczowych
DOX	Doksorubicyna
DPPA	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosforan
DPPC	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DPPE	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DPPG	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoglicerol
DSC	Różnicowa kalorymetria skaningowa
ED50	Dawka skuteczna dla 50% populacji
FDA	Agencja Żywności i Leków (z ang. Food and Drug Administration)
GO	Tlenek grafenu
HCA	Hierarchiczna Analiza Skupień (Hierarchical Cluster Analysis)
HSA	Albumina surowicy ludzkiej
LD50	Dawka śmiertelna dla 50% populacji
LUV	Duże liposomy jednowarstwowe
MEK	Gen, który koduje białko zaangażowane w aktywację kinazy MAPK
MLV	Liposomy wielowarstwowe
MVV	Liposomy wielopęcherzykowe
9-PBThACl	Chlorek 9-(N-piperazylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny
PCA	Analiza Głównych Składowych (Principal Component Analysis)
PEG	Glikol polietylenowy
SUV	Małe liposomy jednowarstwowe
TG	Analiza termograwimetryczna
TI	Indeks terapeutyczny
WP760	Pochodna bisantracykliny, cytotoksyczna szczególnie do komórek czerniaka

1. WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe są jedną z najniebezpieczniejszych grup chorób na świecie. Według przeprowadzonych badań w roku 2030 zachorowalność na nowotwory wzrośnie o 75% [1]. Prawdopodobnych przyczyn powstawania nowotworów jest bardzo wiele, od czynników genetycznych, środowiskowych, poprzez przetworzoną żywność oraz stres. Poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych jest bardzo istotne w aspekcie rozwijających się metod leczenia. Choroby onkologiczne są często określane jako nieuleczalne z powodu braku odpowiedniego leku lub nośnika potrzebnego do dostarczenia leku do ogniska nowotworowego. Toksyczność nowych substancji oraz działania niepożądane występujące po podaniu leku niejednokrotnie opóźniają wprowadzenie nowych pochodnych do terapii. Odkrycie nowej aktywnej struktury, jest pierwszym krokiem badań. Problemem, który opóźnia wprowadzenie nowej substancji lekowej do terapii jest słaba rozpuszczalność i problemy związane z dystrybucją leku. Dlatego też, współczesna nanotechnologia skupia się na poszukiwaniu nowych metod w terapii przeciwnowotworowej i poszukiwaniu takiego rozwiązania, które powiązane są z ukierunkowanym podawaniem leków do komórek nieprawidłowych, a równocześnie ograniczają toksyczność leków względem komórek prawidłowych. Idealny nośnik leku w terapii celowanej powinien spełniać kilka warunków, między innymi: być stabilny chemicznie i fizycznie w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, biochemicznie obojętny, biokompatybilny i biodegradowalny, mieć zdolność transportu odpowiedniej dawki terapeutycznej, a także mieć kontrolowaną i przewidywalną szybkość uwalniania. Typ nośnika determinuje jego kształt, rozmiar, ładunek, efektywność kapsułkowania leku, jak również wpływa na jego uwalnianie. Nowoczesne nośniki stwarzają nowe perspektywy dostarczania chemioterapeutyków bezpośrednio do miejsca zmienionego chorobowo. Poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań dostarczania leków spowodowało badanie inteligentnych nośników, takich jak: liposomy, egzosomy, niosomy, polimery, czy pochodne tlenków grafenu. Pozwalają one na zmniejszenie toksyczności, wzrost biodostępności i akumulacji w obszarze guzów, dlatego też możemy w tym przypadku mówić o terapii celowanej. Zastosowanie nanoformulacji w leczeniu pacjentów onkologicznych, daje duże nadzieje na poprawę czynników rokowniczych w trakcie i po terapii [2, 3].

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Leki

2.1.1. Lek - definicja

Lek zatwierdzony przez FDA (Food and Drug Administration) jest substancją lub połączeniem substancji przeznaczoną do użycia w diagnostyce, łagodzeniu bólu, leczeniu, oraz zapobieganiu chorobom. Lek musi być skuteczny, a zarazem bezpieczny. Odpowiednio dobrana metoda dostarczania leków umożliwia transport do guza, a co za tym idzie zwiększenie stężenia leku w miejscu docelowym [4]. Systemy dostarczania leków mają ograniczyć toksyczność i docierać bezpośrednio do chorej tkanki [5].

System klasyfikacji biofarmaceutycznej (BCS), jest to nowoczesny sposób oceny właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych substancji leczniczych. Dzieli je pod względem rozpuszczalności w wodzie i przenikalności przez bariery biologiczne [6].

- W klasie pierwszej substancje lecznicze wykazują wysoką rozpuszczalność i wysoką przepuszczalność
- W klasie drugiej substancje lecznicze wykazują niską rozpuszczalność i wysoką przepuszczalność
- W klasie trzeciej substancje lecznicze wykazują wysoką rozpuszczalność i niską przepuszczalność
- W klasie czwartej substancje lecznicze wykazują niską rozpuszczalność i niską przepuszczalność

Dawkowanie oraz droga podania substancji leczniczej zależy od rodzaju nowotworu, miejsca docelowego, długości trwania terapii i właściwości fizykochemicznych leku. Najczęściej spotykamy leki w formie tabletek, kapsułek, czopków, ampułek, maści, syropów, kroplówek, plastrów transdermalnych, czy zastrzyków. Preferowana droga podawania leku zależy od trzech głównych czynników: leczonej zmiany chorobowej i stanu pacjenta, sposobu działania leku w organizmie oraz rozpuszczalności i przenikalności leku [7].

2.1.2. Farmakokinetyka

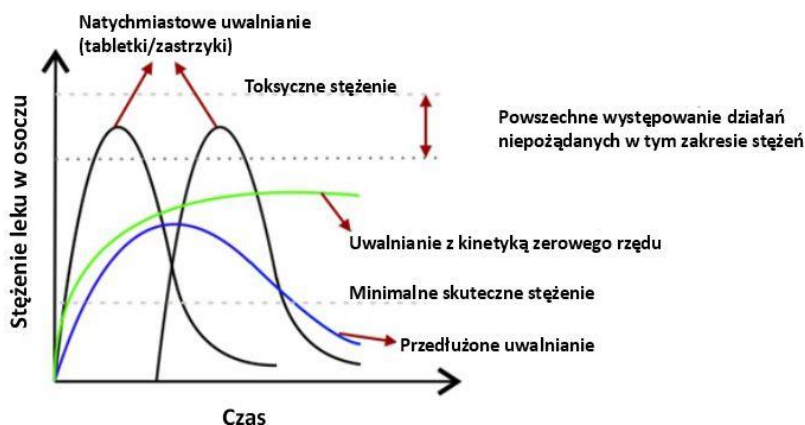
Farmakokinetyka jest dziedziną, która pozwala prowadzić badania w jaki sposób organizm reaguje na kontakt z lekiem. Procesy takie jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie (ADME) określają wpływ leku o danym stężeniu na organizm oraz jego intensywność działania w czasie (Tabela 1) [8].

Tabela 1. Procesy farmakokinetyczne ADME [8].

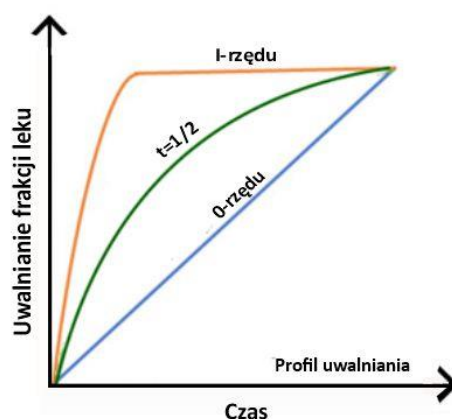
ADME			
Absorpcja	Dystrybucja	Metabolizm	Eliminacja
Sposób przemieszczania się leku z miejsca podania do krwiobiegu	Rozprowadzenie leku w obrębie organizmu, w celu dotarcia do miejsca docelowego	Biochemiczny proces przemiany leku w organizmie	Wydalanie leku/metabolitów z moczem/kałem

2.1.3. Podstawowe pojęcia dotyczące kinetyki uwalniania leku

Profil uwalniania leku jest parametrem określającym stężenie leku w osoczu zależnym od czasu. Utrzymywanie stężenia leku pomiędzy minimalnym skutecznym stężeniem, a minimalnym stężeniem toksycznym ma kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa i skuteczności terapeutycznej. Minimalne skuteczne stężenie to najniższy poziom stężenia leku w organizmie, który wykazuje pożądany efekt terapeutyczny (Rysunek 1). Istnieje kilka rzędów uwalniania leku, które zależą od tempa uwalniania substancji czynnej z preparatu. Uwalnianie rzędu zerowego opisuje ilość leku, która jest stale eliminowana w jednostce czasu, ale szybkość nie jest zależna od stężenia substancji. Kinetyka pierwszego rzędu oznacza, że w jednostce czasu uwalniany jest taki sam ułamek podanego leku. Przedłużone uwalnianie ma na celu osiągnięcie powolnego uwalniania pojedynczej dawki leku przez dłuższy okres czasu od momentu podania (Rysunek 2) [9, 10].



Rysunek 1. Profil uwalniania leku [9].



Rysunek 2. Kinetyka uwalniania leku [9].

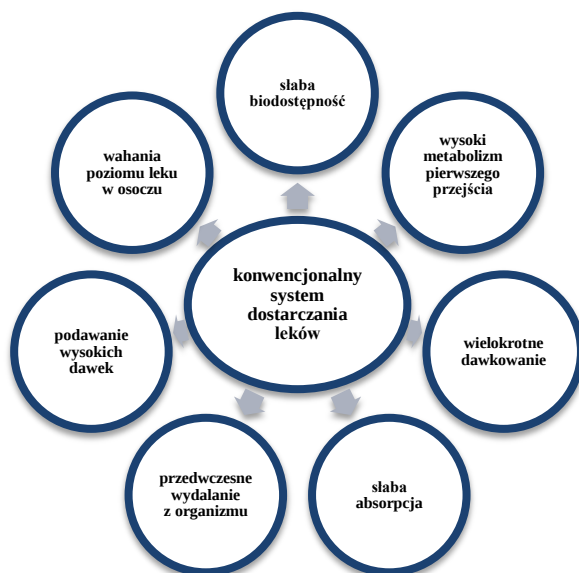
Indeks terapeutyczny (TI), jest współczynnikiem względnego bezpieczeństwa leku. Porównuje on stosunek dawki powodującej toksyczność do dawki środka leczniczego wywołującego efekt terapeutyczny (równanie 1). TI oblicza się ze stosunku dawki powodującej działanie niepożądane (dawka śmiertelna dla 50% pacjentów, LD_{50}) do dawki wywołującej pożądane efekty terapeutyczne (skuteczna dawka u 50% badanych, ED_{50}) [10].

$$TI = LD_{50}/ED_{50} \quad (1)$$

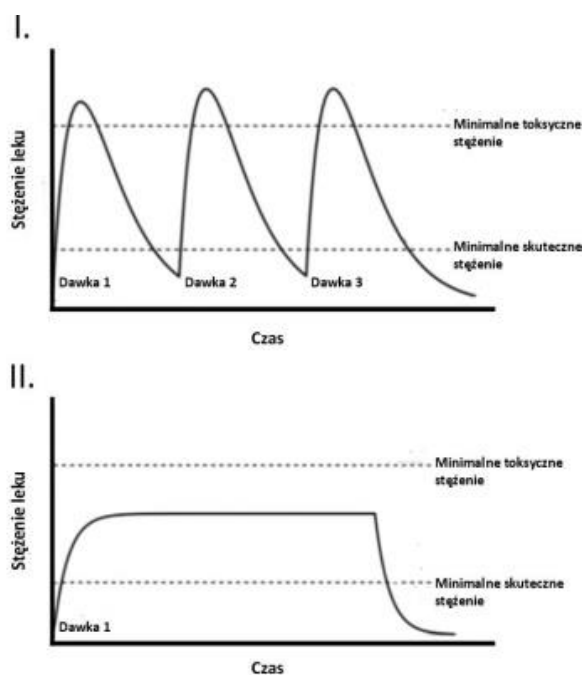
2.1.4. Sposoby dostarczania leków

Wybór odpowiedniego sposobu dostarczania leku umożliwia skuteczne wprowadzenie substancji czynnej do miejsca docelowego. Droga podania powinna być dopasowana do rodzaju leku, celu terapeutycznego i stanu pacjenta. Konwencjonalne podawanie leków powoduje szybkie eliminowanie leku z organizmu, przez co lek nie utrzymuje się w oknie terapeutycznym i niezbędne jest podawanie ciągłe lub zwiększenie stężenia (Rysunek 3). Po przyjęciu pojedynczej dawki, lek jest metabolizowany, poziom stężenia leku wzrasta, a następnie spada wykładniczo. Wielokrotne dawkowanie leku w regularnych odstępach czasu jest alternatywą dla pojedynczego podania. Inną metodą jest zastosowanie dawki pojedynczej o wyższym stężeniu, co może powodować liczne działania niepożądane. Zatem, dla utrzymania odpowiedniego stężenia leku w osoczu korzystne byłoby zastosowanie systemu kontrolowanego dostarczania leków. Umożliwia on uwalnianie leku ze stałą szybkością i zapewnia pożądany efekt terapeutyczny przez dłuższy czas (Rysunek 4) [9, 11, 12].

Innym sposobem na dostarczanie leków jest transdermalne podawanie środków terapeutycznych. Polega na nałożeniu preparatu na skórę i dostarczeniu leku w kontrolowanym tempie miejscowo lub do krążenia ogólnoustrojowego. Mechanizmy związane z transdermalnym podawaniem leków zależą od: składu, ładunku powierzchniowego i wielkości cząstek [13].



Rysunek 3. Ograniczenia konwencjonalnych systemów dostarczania leków (kapsułki, tabletki, czopki, syropy, maści, itd.) [9].



Rysunek 4. Porównanie konwencjonalnego dostarczania leków (I) oraz kontrolowanego uwalniania leków (II) [9].

2.1.5. Projektowanie systemu dostarczania leków

Podczas projektowania systemu dostarczania leków o kontrolowanym uwalnianiu, należy wziąć pod uwagę różne czynniki (Rysunek 5): właściwości biomateriału, drogę podawania leku, farmakokinetykę, poprawę stabilności, a także czynniki związane z lekiem obejmujące skuteczność wiązania leku z białkami osocza, czy też zdolność leku do przechodzenia przez błony biologiczne [14].



Rysunek 5. Działanie systemów dostarczania leków o kontrolowanym uwalnieniu [14].

Ważnym elementem jest określenie właściwości biomateriałów, takich jak: biokompatybilność, toksyczność, hydrofilowość, właściwości mechaniczne i reologiczne. Ponadto, należy ocenić zachowanie biomateriałów przy różnych wartościach pH i w różnych temperaturach. Projektowanie odpowiednich nośników o kontrolowanym uwalnianiu umożliwia zwiększenie stabilności leku w trudnych warunkach. Istnieją biomateriały, które reagują na zmianę pH narządów i powodują uwolnienie leku. Bezpośrednio w jelitach, czy żołądku [15]. Prawidłowe tkanki mają pH pozakomórkowe równe 7,4. W guzach litych, ze względu na wzrost szybkości glikolizy, pH spada do 7,0. Niskie pH guza działa jak bodziec dla systemu kontrolowanego dostarczania leku. Wartość pH można połączyć z innymi bodźcami, np. z temperaturą, najczęściej wyższą w obrębie guza ze względu na występowanie stanu zapalnego, celem osiągnięcia precyzyjnego uwalniania [16].

2.1.6. Lipofilowość

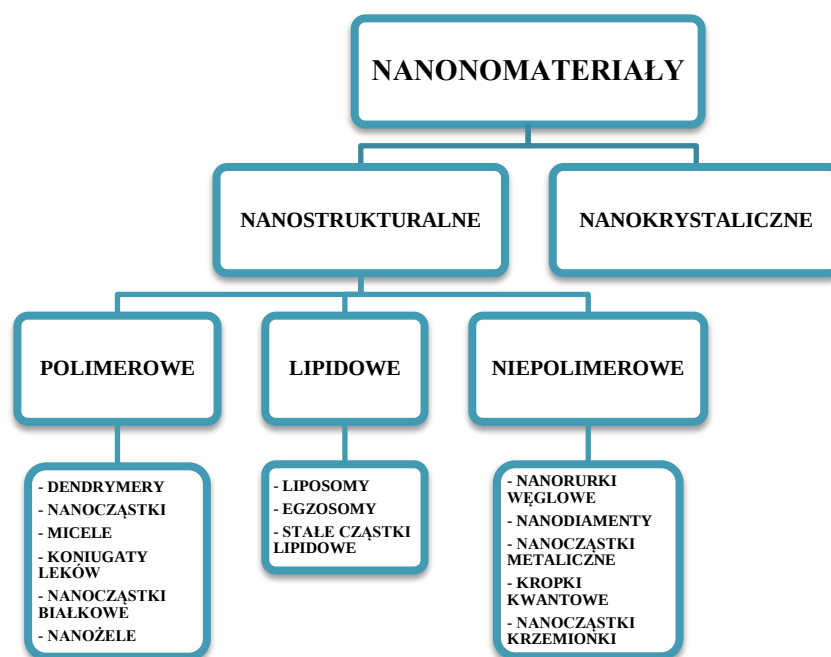
Lipofilowość w odniesieniu do leków jest kluczowym czynnikiem, który wpływa na ich rozpuszczalność, wchłanianie, czy rozkład w organizmie. Odgrywa ważną rolę w określaniu ADME-T (absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, wydalania i toksyczności) [17].

Związki chemiczne można podzielić pod względem lipofilowości na podstawie współczynnika podziału P . Jest to miara lipofilowości, określająca stosunek stężenia substancji w fazie organicznej do stężenia substancji w fazie wodnej. Ze względu na duży zakres wartości współczynnik podziału przedstawia się w postaci logarytmicznej $\log P$. Wyróżniamy związki hydrofilowe, gdzie $\log P < 1$, średnio lipofilowe: $1 < \log P < 3$ oraz wysoko lipofilowe: $\log P > 3$ [18]. Wartość tego parametru może służyć w ocenie przydatności nowego związku jako potencjalnego terapeutycznego. Lipofilowość można wyznaczyć kilkoma metodami: eksperymentalną, teoretyczną i mieszaną. Metody eksperymentalne polegają na wyznaczeniu stężenia związku w układzie dwufazowym n-oktanol/woda, oprócz tego stosuje się technikę wytrząsania (shake-flask) oraz metody chromatograficzne: cienkowarstwową chromatografię z odwróconymi fazami (RP-TLC) i wysokosprawną chromatografię cieczową z odwróconymi fazami (RP-HPLC) [19]. Metody eksperymentalne przyczyniły się do powstania metod teoretycznych, wykorzystujących programy komputerowe. Metoda teoretyczna jest szeroko stosowana w początkowym etapie projektowania nowych leków. Do obliczeń wartości lipofilowości mogą posłużyć następujące programy: MarvinSketch, ChemSketch, HyperChem, AlogPS, Molinspiration, OSIRIS, Sybyl X i wiele innych [20, 21].

2.2. Nanotechnologia

Nanomedycyna jest dziedziną charakteryzującą się nowoczesnym podejściem do wdrażania systemów nanotechnologicznych w terapii [22]. Rozwój innowacyjnych systemów dostarczania leków opartych na biomateriałach może nie tylko zwiększyć stabilność i biodostępność leku, ale także zmniejszyć toksyczność potencjalnego środka farmaceutycznego. Stąd w ostatnim czasie obserwuje się intensywnie rosnące zainteresowanie terapią celowaną z wykorzystaniem nanocząstek jako nośników substancji aktywnych, ułatwiających transport leku z miejsca podania do miejsca działania [23].

Głównym celem skutecznego dostarczania leków jest bezpieczny i docelowy transport leku do narządów, tkanek i komórek. Fizykochemiczne właściwości nanocząstek, jak: rozmiar, ładunek, hydrofilowość, wpływają na: wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i wydalanie dostarczanych substancji. W medycynie nanocząstki są stale ulepszane pod kątem dystrybucji leków [24]. Nanocząstki to cząstki o bardzo małych rozmiarach (1-100 nm). Wykazują duży potencjał w leczeniu i diagnostyce. Mogą być zbudowane z wielu materiałów, m.in.: metalu, węgla, tlenków oraz polimerów. Dzięki swojej różnorodności stają się obiektem intensywnych badań naukowych (Rysunek 6) [25, 26, 27].



Rysunek 6. Nanomateriały wykorzystywane w terapii [28].

2.3. Nośniki leków

Nośniki to cząstki, które dzięki możliwości precyzyjnego dostosowania rozmiaru i ładunku mogą przynieść liczne korzyści w terapii lekowej. Umożliwiają skuteczną kontrolę nad wychwytem, dystrybucją i celowaniem w organizmie [29]. Mogą być podawane różnymi drogami: miejscowo, doustnie, donosowo oraz pozajelitowo i transdermalnie. Można je kierować nie tylko do konkretnego typu komórek, ale nawet do określonych regionów komórki. Stosując nośniki, można osiągnąć zwiększony wewnątrzkomórkowy transport leków [30].

Do enkapsulacji leków przeciwnowotworowych można wykorzystać różnego typu nośniki, w zależności od wymaganych oczekiwań w planowanej terapii [31]. Na wybór odpowiedniego nośnika wpływa wiele czynników, takich jak: toksyczność, hydrofilowość, temperatura, pH oraz sposób podawania leku do miejsca docelowego. W ramach przeprowadzonych badań wybranych nośników do sporządzania formulacji terapeutycznej, analizie poddano: pochodne tlenków grafenu, egzosomy, hydrożele, haloizyt oraz liposomy.

2.3.1. Pochodne tlenków grafenu

Tlenek grafenu powstaje w wyniku chemicznej modyfikacji grafenu poprzez przyłączenie atomów tlenu, wprowadzając różnorodne grupy funkcyjne: epoksydowe, hydroksylowe i karboksylowe. Podczas syntezy, tlenki grafenu mogą zawierać różne kombinacje wspomnianych grup funkcyjnych. Modyfikacje grafenu i tlenku grafenu

pozwalają na tworzenie materiałów hybrydowych o znacznie bardziej interesujących właściwościach niż sam grafen. W tlenkach zachowana jest warstwowa struktura grafenu, gdzie poszczególne warstwy mogą być połączone dzięki siłom Van der Waalsa. Grupy tlenowe wprowadzają pewną polarność do powierzchni tlenków grafenu, co może poprawić ich zdolność do interakcji z różnymi substancjami, np. z cząsteczkami wody, metalami czy cząstkami organicznymi [32, 33]. Tlenki grafenu wykazują zwiększoną reaktywność chemiczną w porównaniu z czystym grafenem. Chemicznie funkcjonalizowane tlenki grafenu mogą być wykorzystywane jako nowe nośniki leków. Wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych nadaje nowe, ulepszone właściwości, takie jak zwiększona rozpuszczalność w określonym typie rozpuszczalnika, czy stabilizacja materiałów o zmiennym stopniu zawartości defektów. Grafen i jego pochodne mogą być wykorzystane jako narzędzia diagnostyczne do wykrywania zmian nowotworowych oraz terapeutyczne do tworzenia nośników leków [33]. Wyniki badań [34] wskazują, że cytotoksyczność nanomateriałów na bazie grafenu jest zależna od funkcjonalizacji i umożliwia wykorzystanie tego materiału w medycynie spersonalizowanej. Największy wpływ na cytotoksyczność ma: morfologia, rozmiar cząstek, zawartość tlenu, stężenie, czy ładunek powierzchniowy. Funkcjonalizacja odgrywa kluczową rolę dla dostępności, biokompatybilności, rozpuszczalności oraz skuteczności uwalniania leku [35].

2.3.2. Egzosomy

Egzosomy to małe pęcherzyki (30-150nm) pochodzące z endosomów, które są wydzielane przez różne komórki eukariotyczne. Ze względu na swoje właściwości i funkcje stały się przedmiotem badań w diagnostyce, terapii i medycynie. Zbudowane są z dwuwarstwowej błony lipidowej, która izoluje ich zawartość od środowiska zewnętrznego. Egzosomy mogą pełnić szereg funkcji od przesyłania sygnałów między komórkami poprzez transport substancji. Nośniki te uważane są za dobry system dostarczania leków ze względu na biokompatybilność i niską immunogenność. Do egzosomów można załadować zarówno leki, białka, jak i materiał genetyczny [36]. Pomimo, iż większość komórek może wytwarzać egzosomy, nie wszystkie nadają się jako nośniki leków. Egzosomy wykazały duży potencjał w terapii nowotworów złośliwych i chorób neurologicznych. Złożoność właściwości biochemicznych egzosomów obejmuje, między innymi: różnorodny skład białkowy, RNA i lipidy. Korzyści związane z zastosowaniem tych nośników zależą od: charakteru chemicznego leku, mechanizmu działania oraz sposobu podawania do miejsca docelowego [37]. Nowe wyniki badań [38] przedstawiają innowacyjną metodę dostarczania leków przez

egzosomy zawarte w mleku. Zaprojektowano specjalne peptydy, które odpowiadają za wydłużony czas życia egzosomów w miejscu zmienionym chorobowo, ułatwią ich skierowanie do tego miejsca oraz tworzą ochronę substancji, która jest transportowana. Naukowcy pracują nad stworzeniem hodowli komórek MAC-T, które wytwarzają egzosomy o właściwościach podobnych do tych, zawartych w mleku. Wykazano, że egzosomy z mleka mogą być wykorzystywane do walki z nowotworami mózgu.

2.3.3. Hydrożele na bazie chitozanu

Hydrożelowe systemy dostarczania leków oparte na bazie chitozanu są bardzo obiecujące ze względu na biokompatybilność, biodegradowalność, bioadhezyjne właściwości i zwiększony efekt absorpcji. Nanocząstki chitozanu wykazują te same właściwości, co naturalne lub chemicznie modyfikowane polimery. Najczęściej stosowane kształty nanocząstek chitozanu to nanosfery, nanokapsułki i nanowłókna [39]. Nanocząstki chitozanu mogą mieć zastosowanie jako nośniki farmaceutyków stosowanych systemowo na przykład Doksorubicyny. Z uwagi na niewielki rozmiar nanocząstek, który umożliwia wnikanie do komórek i organelli, mogą znaleźć one zastosowanie do ukierunkowanego dostarczania leków. Biodystrybucja może różnić się w zależności od: rozmiaru, ładunku powierzchniowego i hydrofobowości chitozanu oraz jego pochodnych [40].

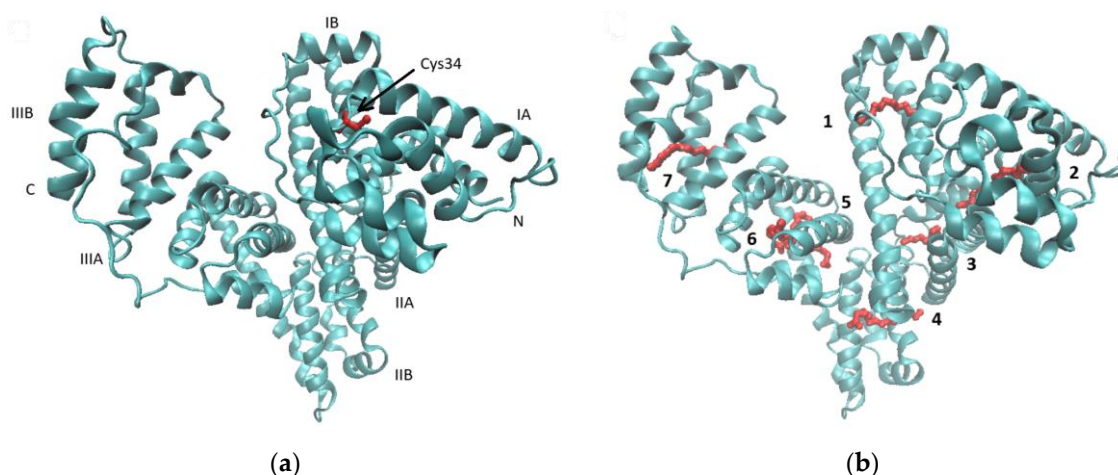
2.3.4. Haloizyt

Naturalna glina haloizytowa jest materiałem, który może stać się potencjalnym nośnikiem leków. Może on występować w postaci nanorurek. Stosunkowo duża średnica haloizytu pozwala na ładowanie nie tylko małych cząsteczek leków, ale także białek i DNA. Enkapsulacja leku do haloizytu może odbywać się na dwa sposoby: poprzez selektywne ładowanie w wewnętrznym świetle kanalików lub wiązanie leku do zewnętrznej powierzchni. Pierwszy sposób jest wykorzystywany w przypadku leków przeciwnowotworowych. Funkcjonalizowane nanorurki haloizytowe mogą uwalniać lek przez 10-200 godzin [41].

2.4. Albumina

Albumina surowicy ludzkiej (HSA) to główny białkowy składnik osocza, pełniący ważną rolę w licznych procesach biologicznych. Jest naturalnym nośnikiem zarówno dla związków endogennych, jak i egzogennych. Wiązanie albuminy może wpływać na ligandy w bardziej indywidualny sposób, skutkując zwiększoną rozpuszczalnością związku w osoczu, zmniejszoną toksycznością lub ochroną liganda przed czynnikami utleniającymi [42]. Albumina posiada wiele specyficznych i niespecyficznych miejsc wiązania cząsteczek

hydrofobowych. Jest pobierana przez proliferujące komórki nowotworowe i ze względu na nieszczelny układ naczyń włosowatych może gromadzić się w tkankach nowotworowych [43, 44, 45]. HSA jest wielofunkcyjnym białkiem syntetyzowanym wyłącznie przez hepatocyty wątroby. Trójwymiarowa struktura pojedynczego łańcucha polipeptydowego i jego rekombinowanej wersji (rHSA) została określona krystalograficznie. Łańcuch polipeptydowy tworzy białko w kształcie serca o przybliżonych wymiarach $80 \times 80 \times 80 \text{ \AA}$ i grubości $30 \text{ \AA}$, a 67% stanowi regularna struktura helisy α . HSA składa się z trzech homologicznych domen (I-III), a każda z nich zbudowana jest z dwóch subdomen: A i B z odpowiednio sześcioma i czterema helisami α połączonymi elastycznymi pętlami. Za tworzenie 17 stabilizujących wiązań disiarczkowych S-S odpowiadają 34 z 35 reszt cysteinowych. Wyjątek stanowi Cys34 (Rysunek 7) [46, 47].



Rysunek 7. Struktura krystaliczna HSA z pozycją Cys34 zaznaczoną na czerwono (a). Podział białka na domeny (I-III) i subdomeny (A, B). Kod identyfikacyjny PDB: 1bm0. Lokalizacje siedmiu (1-7) miejsc wiązania wspólnych dla anionów kwasów tłuszczowych wykorzystujących palmitynian przedstawiono na czerwono (b).
Kod PDB id: 1e7h [108].

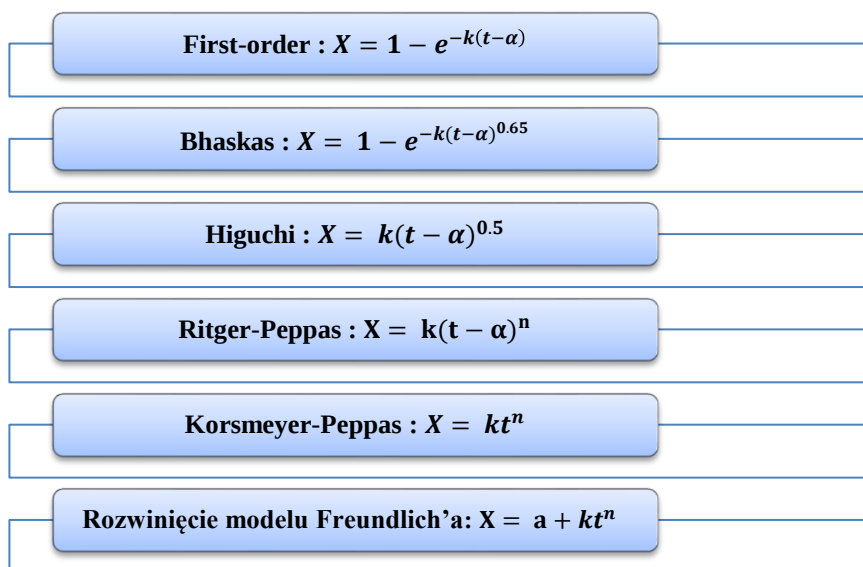
W 2005 roku FDA zatwierdziło pierwszy komercyjny produkt stosowany w onkologii oparty na nośniku białkowym: (Abraxane®) [48]. Wówczas rozpoczęto wytwarzanie kolejnych nośników opartych na albuminie, zawierających: Doksorubicynę [49], Cisplatynę [50], Docetaksel [51], Winkrystynę [52], Mitoksantron [53], Ferulat [54], czy tlenek żelaza [55]. Stosowanie nanocząstek białkowych poprawia parametry farmakodynamiczne i farmakokinetyczne leku, m.in.: biodostępność, czas uwalniania substancji aktywnej oraz wydłużenie czasu działania farmakologicznego. HSA stosuje się: w przemyśle farmaceutycznym i biologicznym, w szczepionkach oraz formulacjach

lekowych. Dzięki temu, że sama albumina zawiera kilka reaktywnych grup (tiolowe, aminowe i karboksylowe), nanocząstki mogą brać udział w elektrostatycznej adsorpcji cząsteczek naładowanych dodatnio lub ujemnie [56]. Ponadto te reaktywne grupy można stosować do modyfikacji powierzchni w celu nadania nanocząstkom albumin różnych funkcji, takich jak: przedłużony okres półtrwania [57], zwiększoną stabilność, powolne uwalnianie leku, czy uwalnianie ukierunkowane [58].

2.5. Model matematyczny

Modelowanie matematyczne to proces tworzenia systemów za pomocą równań matematycznych. Celem tej metody jest prognozowanie działań z uzyskanych danych. Ze względu na znaczny postęp w technologii można przyjąć, że optymalizacja *in silico* nowych systemów dostarczania leków znacząco poprawia dokładność i łatwość ich stosowania [59]. Przewidywania matematyczne umożliwiają: oszacowanie wymaganego składu, geometrii, wymiarów i procedury wytwarzania odpowiednich ilości dawek [60, 61]. Jednym z powodów, dla którego stosuje się modelowanie matematyczne w procesie dostarczania leków jest oszczędność czasu i redukcja kosztów. Dodatkowo zmniejsza liczbę badań eksperymentalnych wymaganych do opracowania nowego lub optymalizacji istniejącego produktu leczniczego. Dotyczy to szczególnie silnych leków o wąskim oknie terapeutycznym [62, 63].

W 1961 roku Takeru Higuchi zwany „ojcem farmacji fizycznej” jako pierwszy opublikował swoje słynne równanie pozwalające na zaskakująco prosty opis uwalniania leku [64]. Od tego czasu zaproponowano różne modele: empiryczne, półempiryczne, i teoretyczne. Model empiryczny opisuje rzeczywiste procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne. Opiera się na zjawiskach, takich jak: dyfuzja, rozpuszczanie, pęcznienie, erozja, wytrącanie lub degradacja [65, 66]. Proces ten umożliwia określenie parametrów specyficznych dla systemu, który może zapewnić głębszy wgląd w podstawowe mechanizmy uwalniania leku. Opracowywane modele matematyczne pozwalają na ilościowe przewidywanie wpływu parametrów formulacji i przetwarzania na kinetykę uwalniania leku. Dokładność teorii matematycznej wzrasta proporcjonalnie do wzrostu złożoności modelu (im więcej zjawisk bierze się pod uwagę, tym bardziej realna staje się ta teoria). Najważniejszym odniesieniem dla określonego systemu dostarczania leku jest porównanie przewidywań teoretycznych i wyników eksperymentalnych. Model opisujący dostarczanie leku jest uproszczeniem rzeczywistego systemu, a jego przydatność jest zawsze ograniczona do określonych przypadków (Rysunek 8) [67, 68, 69, 70]:



Rysunek 8. Wzory modeli matematycznych [68, 69, 70].

Gdzie:

X – procent uwolnienia R(%) z dopasowania danych doświadczalnych do matematycznej formuły

t – czas zwolnienia

k – stała kinetyczna

α – parametr zmodyfikowany

a – współczynnik dopasowania

n – wykładnik opisujący różne mechanizmy uwalniania

Wartość $n < 0,45$ odpowiada dyfuzji Ficka, a pierwiastek kwadratowy wartości czasu jest wówczas proporcjonalny do ilości frakcji uwolnionych z nośnika. Dla $0,45 < n < 0,89$ zachodzi proces inny niż dyfuzja Ficka, a uwalnianie leku następuje zarówno w wyniku mechanizmów dyfuzyjnych, jak i kontrolowanych [68].

Rozkład prawdopodobieństwa Weibulla zastosowany w modelowaniu krzywych uwalniania określono według następującego wzoru (2):

$$m = m_{\infty} \left[1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^{\beta}} \right] \quad (2)$$

Gdzie:

m – procent uwolnienia substancji czynnej w czasie t

m_{∞} – asymptota uwolnienia ($m_{\infty} = 100\%$)

t_d – parametr określający skalę czasową procesu

β – parametr charakteryzujący kształt krzywej uwalniania (jeżeli $\beta=1$ funkcja pokazuje wzrost wykładniczy, $\beta<1$ paraboliczny, $\beta>1$ sigmoidalny)

Parametr β oznacza zdolność modelu do adaptacji niemal wszystkich profili uwalniania leku [69].

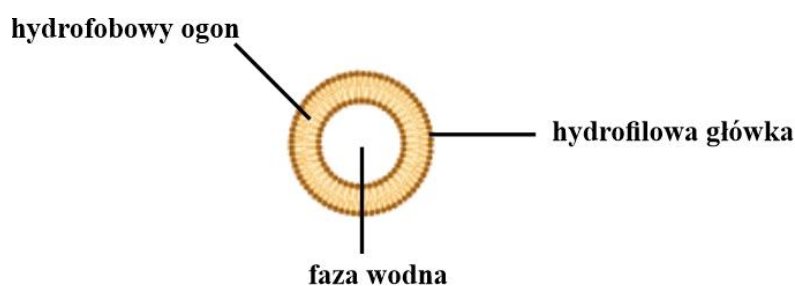
2.6. Liposomy

2.6.1. Struktura liposomów

Liposomy są sferycznymi pęcherzykami zbudowanymi z podwójnej warstwy lipidowej. Składają się z hydrofobowego ogona i hydrofilowej główki [71] (Rysunek 9). Wielkość tych struktur waha się od 0,01 do 1 μm [72]. Otoczka liposomów zbudowana jest podobnie do naturalnych błon biologicznych. Dzięki temu liposomy łatwiej przenikają do wnętrza komórek i mogą służyć jako nośniki substancji aktywnych. Liposomy są: biodegradowalne, biokompatybilne, zwiększają skuteczność terapeutyczną, chronią substancję aktywną leku oraz zmniejszają toksyczność kapsułkowanego leku [73]. W 1974 Gregoriadis zasugerował zastosowanie liposomów w chemioterapii [74]. Od tego czasu zainteresowanie wykorzystaniem liposomów stale rośnie [75, 76, 77].

Skuteczność stosowania liposomów opiera się na trzech podstawowych warunkach:

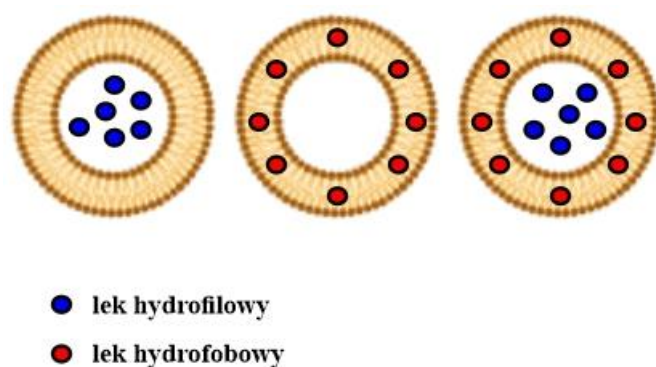
- przedłużony czas krążenia we krwi,
- akumulacja w guzie,
- kontrolowane uwalnianie leku i wychwyt przez komórki nowotworowe [78].



Rysunek 9. Budowa liposomu [79].

Liposomy dzięki swojej budowie są wykorzystywane jako nośniki zarówno leków hydrofobowych jak i dobrze rozpuszczalnych w wodzie (Rysunek 10). Umożliwiają dostarczanie farmaceutyków do określonych miejsc zmienionych chorobowo, poprawiając skuteczność leczenia i minimalizując działania niepożądane. Zamykanie leków

przeciwnowotworowych w liposomach zwiększa stabilność leku oraz umożliwia kontrolowane uwalnianie w miejscu docelowym [79].

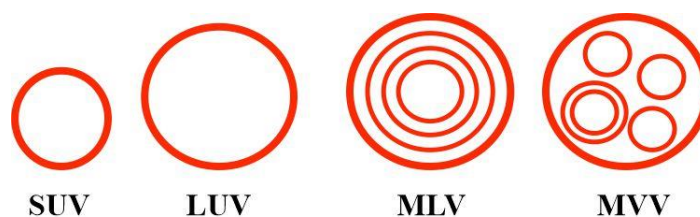


Rysunek 10. Struktura liposomu zawierającego leki hydrofilowe i hydrofobowe [79].

Stan termodynamiczny błony liposomalnej, tj. ruchliwość tworzących go cząsteczek zależy głównie od temperatury. Fosfolipidy charakteryzują się temperaturą przemiany fazowej (T_c), powyżej, której znajduje się dwuwarstwa lipidowa występująca w nieuporządkowanej fazie ciekłokrystalicznej, a poniżej w uporządkowanej fazie żelowej. Zakres T_c fosfolipidów mieści się w przedziale od -20°C do 90°C [80, 81].

2.6.2. Rodzaje liposomów

Liposomy możemy podzielić na kilka typów: ze względu na wielkość oraz liczbę warstw podwójnej błony lipidowej (Rysunek 11).



Rysunek 11. Rodzaje liposomów [82].

SUV - Małe liposomy jednowarstwowe - $0,02\text{-}0,03\ \mu\text{m}$ (small unilamellar vesicles, SUVs). Stosowane są jako nośniki związków hydrofilowych, niestabilne termodynamicznie, wykazujące skłonność do wzajemnej fuzji i łączenia się z dużymi cząstkami.

LUV - Duże liposomy jednowarstwowe - $0,05\text{-}0,1\ \mu\text{m}$ (large unilamellar vesicles, LUVs). Stosowane są jako nośniki substancji hydrofilowych, makromolekuł oraz jako modele błony komórkowej.

MLV - Liposomy wielowarstwowe – 0,4- 10 μm (multilamellar vesicles, MLVs); Wykazują zwiększoną zdolność przyjmowania substancji hydrofobowych.

MVV - Liposomy wielopęcherzykowe - $>1 \mu\text{m}$ (multivesicular vesicles, MVVs); Są produktem ubocznym w trakcie wytwarzania MLV. W tym rodzaju liposomów jedna podwójna błona lipidowa otacza dwa lub więcej mniejszych liposomów [82].

2.6.3. Metody otrzymywania liposomów

Metody otrzymywania liposomów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Przykłady tradycyjnych metod otrzymywania liposomów [83].

Metody	Przygotowanie	Rodzaje liposomów
Hydratacja cienkiego filmu fosfolipidowego	Pierwszym etapem jest rozpuszczanie lipidów i leków hydrofobowych w rozpuszczalniku organicznym. Następnie odparowanie roztworu pod zmniejszonym ciśnieniem, aż do utworzenia się cienkiej warstwy lipidowej na wewnętrznej ścianie kolby. Ostatnim elementem jest uwodnienie otrzymanego filmu wodą lub roztworem buforowym.	MLV LUV
Odparowywanie techniką faz odwróconych	Pierwszym etapem jest rozpuszczanie lipidów w rozpuszczalniku organicznym. Następnie łączenie z wodnym buforem zawierającym lek hydrofilowy. Ostatnim elementem jest odparowanie rozpuszczalnika, co prowadzi do otrzymania cienkowarstwowych struktur lipidowych tworzących liposomy.	LUV
Wstrzykiwanie etanolu	Pierwszym etapem jest rozpuszczanie lipidów w etanolu. Następnie wstrzykiwanie mieszaniny do mieszającej się fazy wodnej	Pęcherzyki jednowarstwowe MLV

	zawierającej lek hydrofilowy. Ostatnim elementem jest odparowanie etanolu i powstanie liposomów.	
Sonikacja	Pierwszym etapem jest rozpuszczanie lipidów w rozpuszczalniku. Następnie poddanie działaniu ultradźwięków.	SUV
Ekstruzja	Otrzymywanie liposomów w wyniku przetłaczania przez filtr o określonej wielkości porów.	MLV Pęcherzyki jednowarstwowe
Homogenizacja wysokociśnieniowa	Homogenizacja przygotowanych liposomów przez wysokociśnieniowy homogenizator.	Pęcherzyki jednowarstwowe
Zamrażanie i rozmrażanie	Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie przygotowanych liposomów.	Pęcherzyki jednowarstwe MLV

2.6.4. Modyfikacja powierzchni liposomów

Modyfikacja powierzchni liposomów może poprawić ich właściwości, takie jak: stabilność, biokompatybilność, czy ulepszyć ukierunkowane dostarczanie leków do miejsca docelowego (Tabela 3). Modyfikacje mogą również zwiększyć skuteczność leczenia oraz zmniejszyć wystąpienie działań niepożądanych [84].

Tabela 3. Rodzaje liposomów i ich reakcje na bodźce [85, 86].

Rodzaje liposomów	Bodźce	Reguła	Lek
Liposomy reagujące na enzymy	Proteaza, amidaza i esteraza	Uwalnianie naładowanych leków (oparte na hydrolizie amidów lub estrów) przez enzymy proteazy lub esterazy.	Oksaliplatyna Winorelbina Dioscorea
Liposomy wrażliwe na pH	Zmiana pH	Liposomy wrażliwe na pH składają się z obojętnych lipidów, zwykle są to pochodne fosfatydylowe	Kurkumina Paklitaksel plazmid DNA

		i słabo kwaśne związki amfifilowe.	
Liposomy reagujące na redoks	Reaktywne formy tlenu (ROS), nadtlenki, grupa hydroksylowa, rodniki, tlen singletowy	Zależy od różnicy potencjałów redoks pomiędzy redukującą przestrzenią wewnątrzkomórkową, a utleniającą zewnątrzkomórkową.	Dokсорubicyna
Liposomy termoczule	Częstotliwość radiowa, mikrofał lub terapia ultradźwiękowa	Przygotowanie termoczulych liposomów z fosfolipidów (temperatura przejścia 40–45°C), jak dipalmitoilofosfatydylocholina jako główny lipid (temperatura przejścia 41°C) wykorzystywanych do wytwarzania tych liposomów.	Dokсорubicyna Kamptotecyna
Liposomy światłoczule	światło ultrafioletowe, widzialne, bliska podczerwień	Modyfikacja łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych fosfolipidów z światłoczułymi grupami funkcyjnymi. Powstałe fosfolipidy dają fotoaktywowane liposomy.	Dokсорubicyna
Liposomy wrażliwe na ultradźwięki	Ultradźwięki/ ultradźwięki o wysokiej intensywności	Liposomy reagujące na ultradźwięki wytwarzane przez zmieszanie nanokropelek. W miarę rozprzestrzeniania się impulsów fal w tkance zachodzą pewne zjawiska fizyczne: kawitacja, hipertermia i strumieniowanie akustyczne.	Winkrystyna Dokсорubicyna

Liposomy magnetyczne	Pole magnetyczne	Jony metali i magnetyczne nanocząsteczki (MNPs) mogą być połączone z liposomami podczas syntezy lub kapsułkowania.	Docetaksel Tegafur Doksorubicyna
-----------------------------	------------------	--	--

2.6.5. Wyzwania dla liposomów

Liposomy jako nośniki leków powinny cechować się stabilnością, która determinuje: enkapsulację, przepuszczalność i szybkość uwalniania leku. Liposomy są podatne na różnorodne czynniki fizyczne i chemiczne, m.in.: skład lipidów, rozmiar, temperaturę, hydrolizę i utlenianie. Bardzo ważne jest zastosowanie metod doskonalenia, które mogą wpłynąć pozytywnie na stabilność chemiczną i fizyczną liposomów (Tabela 4) [87].

Tabela 4. Czynniki wpływające na stabilność fizyczną i chemiczną liposomów [85, 88].

Typ	Czynniki wpływające	Zasada	Metody doskonalenia
Stabilność fizyczna	Skład	Właściwości liposomów zależą od składu lipidów. Liposomy o wysokiej stabilności mogą być utworzone przez fosfolipidy, które nie ulegają utlenianiu i hydrolizie (np. uwodornione fosfolipidy).	Zastąpienie nienasyconych fosfolipidów fosfolipidami nasyconymi. Syntetyczne nasycone lipidy, takie jak: dimirystoilofosfatydylocholina, dipalmitoilofosfatydylocholina oraz distearoilofosfatydylocholina mogą być użyte do przygotowania liposomów, które nie ulegają utlenieniu.
	Rozmiar cząsteczki i dystrybucja	Rozmiar cząstek i dystrybucja liposomów bezpośrednio wpływa na ich stabilność.	Wielkość cząstek liposomów jest zazwyczaj kontrolowana w zakresie 80 ~ 200 nm, optymalnie 100 nm.
	Potencjał zeta	Odpowiedni potencjał zeta zmniejsza agregację i fuzję liposomów.	

Stabilność chemiczna	Temperatura przejścia fazowego	Gdy temperatura osiąga temperaturę przejścia fazowego, następuje zmiana uporządkowania cząsteczek fosfolipidów. Zwiększa się przepuszczalność i następuje uwolnienie zawartości nośnika.	
	Utlenianie	Niektóre substancje utleniające, np. tlen i wolne rodniki, łatwo tworzą wiązania nienasycone kwasów tłuszczowych fosfolipidów.	Dodanie przeciwutleniaczy (np. witamina E, witamina C, flawonoidy itp.), chelatów.
	Hydroliza	Hydroliza liposomów jest procesem spontanicznym. Wzrost wolnych kwasów tłuszczowych w hydrolacie obniża pH. Dalsze działanie hydrolizy prowadzi do produkcji szkodliwych substancji dla organizmu ludzkiego.	Przygotowanie i ochrona przez metodę liofilizacji. Cholesterol spowalnia hydrolizę.

2.6.6. Rodzaje liposomów pod względem składu

Podziału liposomów można również dokonać uwzględniając ich skład. I tak dzielimy liposomy na:

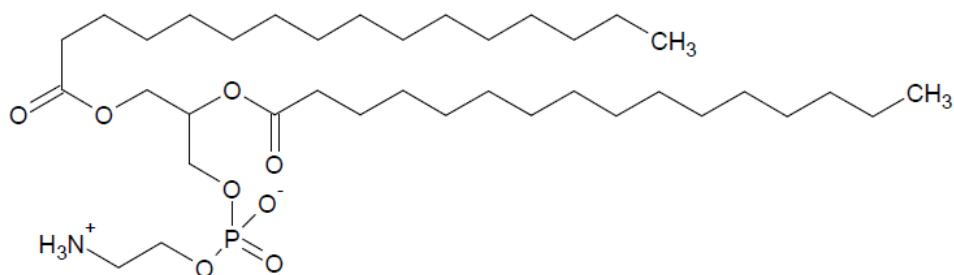
- Konwencjonalne, zbudowane z naturalnych fosfolipidów (neutralne lub anionowe), charakteryzujące się krótkim czasem krążenia w krwiobiegu [89],
- Sferycznie stabilizowane przez przyłączenie do powierzchni zewnętrznej hydrofilowego polimeru [90],

- Immunoliposomy z przyłączonymi przeciwciałami lub ich fragmentami, celem zwiększenia selektywności i dotarcia do miejsca docelowego,
- Kationowe, posiadające substancje amfifilowe z hydrofilową grupą, które wykazują charakter kationowy [91].

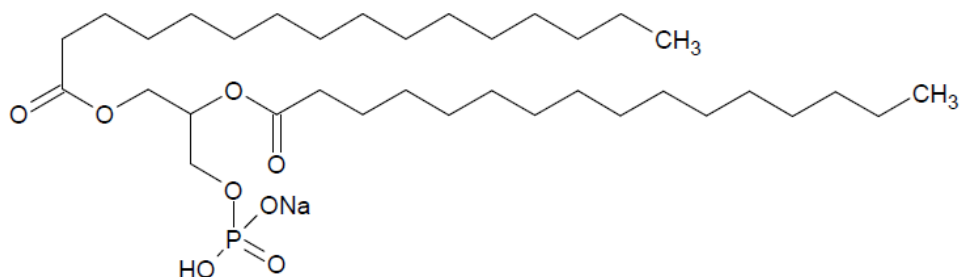
2.6.7. Lipidy syntetyczne

Lipidy syntetyczne są tworzone na wzór lipidów naturalnych. Mogą być przygotowane ze względu na różne właściwości, takie jak: rozpuszczalność, stabilność czy umiejętność do tworzenia nośników. Modyfikacja naturalnych fosfolipidów umożliwia uzyskanie szerokiej gamy związków (Rysunek 12). Syntetyczne fosfolipidy zazwyczaj opierają się na stearynowych i palmitynowych kwasach tłuszczowych [92] np.:

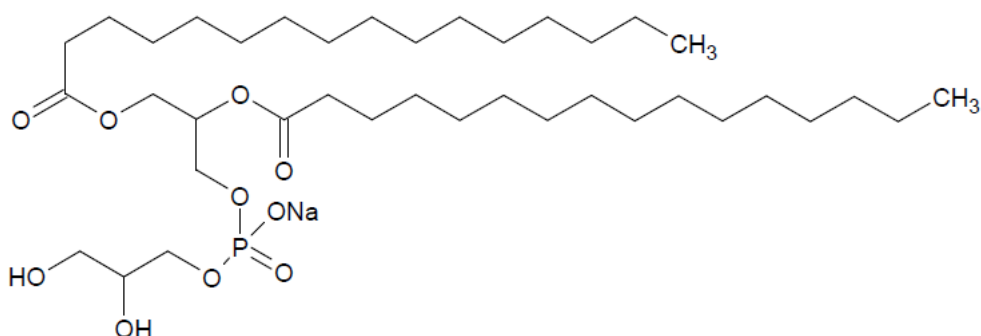
1. (DPPE) 1,2-dipalmitoilo- sn-glicero-3-fosfocholina,



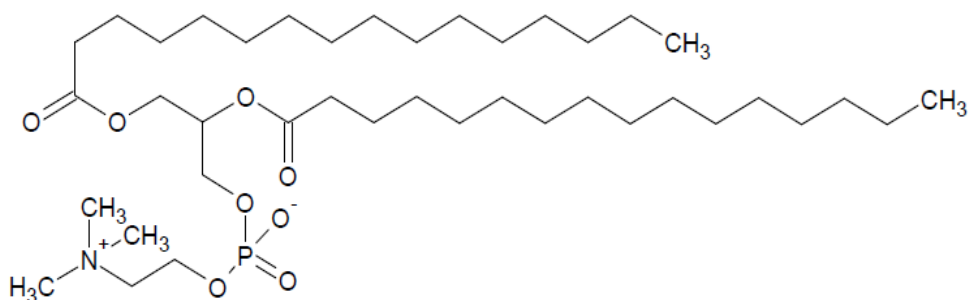
2. (DPPA) 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosforan



3. (DPPG) - 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfoglicerol



4. (DPPC) 1,2-dipalmitoilo- sn-glicero-3-fosfocholina



Rysunek 12. Syntetyczne fosfolipidy na bazie kwasu palmitynowego [92].

2.6.8. Liposomy w zastosowaniach klinicznych

Liposomy wykazują wysoką biokompatybilność, niską toksyczność, łatwą modyfikację powierzchni, możliwość zamykania leków hydrofobowych i hydrofilowych, a także ochronę przed degradacją. Dzięki temu kilka liposomalnych produktów leczniczych zostało pomyślnie zatwierdzonych i zastosowanych klinicznie (Tabela 5). Wśród nich jest między innymi Doxil, który był pierwszym produktem liposomalnym zatwierdzonym przez FDA w 1995 roku. W rzeczywistości postęp w badaniach nanoliposomów ułatwił leczenie pacjentów z chorobami nowotworowymi [93].

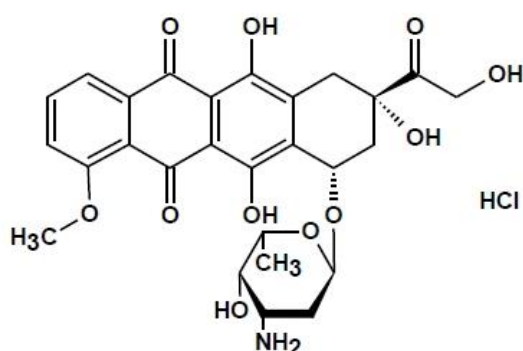
Tabela 5. Preparaty liposomalne stosowane klinicznie i ich zastosowanie [94, 95].

Produkt kliniczny	Substancja czynna	Wskazanie
Doxil[®]	Doksorubicyna	• rak jajnika, • rak piersi, • mięsak Kaposiego
Daunoxome[®]	Daunorubicyna	• mięsak Kaposiego związany z AIDS
Mepact[®]	Mifamurtyd	• resekcyjny kostniakomięsak o wysokim stopniu złośliwości bez przerzutów
Marqibo[®]	Winkrystyna	• ostra białaczka limfoblastyczna
Vyxeos[®]	Daunorubicyna i Cytarabina	• ostra białaczka limfoblastyczna
Depocyt[®]	Cytarabina / Ara-C	• nowotworowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych
Lipusu[®]	Paklitaksel	• rak żołądka
Myocet[®]	Doksorubicyna	• w skojarzeniu z cyklofosfamidem jest wskazany jako lek pierwszego rzutu w leczeniu raka sutka w stadium przerzutów
Onivyde[®]	Irynotekan	• w skojarzeniu z fluorouracylem i leukoworyną w leczeniu gruczolaka trzustki z przerzutami
Ambisome[®]	Amfoterycyna B	• infekcje grzybicze

2.7. Wybrane substancje chemiczne, biologicznie aktywne w terapii onkologicznej

2.7.1. Doksorubicyna

Doksorubicyna (DOX) została wyizolowana w 1969 roku z *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*. Jest jednym z najsilniejszych powszechnie stosowanych środków chemioterapeutycznych w leczeniu różnych rodzajów nowotworów (Rysunek 13). Lek ten należy do antybiotyków z rodziny antracyklin, łącznie z m.in.: Daunorubicyną, Epirubicyną, czy Idarubicyną [96]. Chociaż DOX jest skutecznym lekiem przeciwnowotworowym, jej stosowanie wiąże się z wystąpieniem poważnych działań niepożądanych: kardiotoxycznością, wynaczynieniem, nefrotoksycznością i mielosupresją [97, 98]. Mechanizm działania tego leku nadal nie jest dobrze poznany. Istnieją jednak pewne procesy wiążące się z jego toksycznym działaniem, takie jak: hamowanie aktywności topoizomerazy II, uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, interkalacja do DNA, rozwinięcie cząsteczki DNA, czy powstawanie wolnych rodników prowadzących do stresu oksydacyjnego. Oporność na DOX nie jest dobrze znana, ale może wynikać z zaburzenia procesu apoptozy, hamowania autofagii, zmian w ekspresji topoizomerazy II i mutacji genów. Innym czynnikiem wyzwalającym oporność na Doksorubicynę jest zaburzenie białka p53, odpowiedzialnego za kontrolowanie śmierci komórki oraz podział komórki. DOX ma trudności z przejściem przez barierę krew-mózg, co skutkuje brakiem możliwości dotarcia do komórek guza mózgu. Modyfikacje struktury tego leku oraz terapia skojarzona z innymi lekami mogą przezwyciężyć toksyczność, działania niepożądane oraz lekooporności [99, 100].

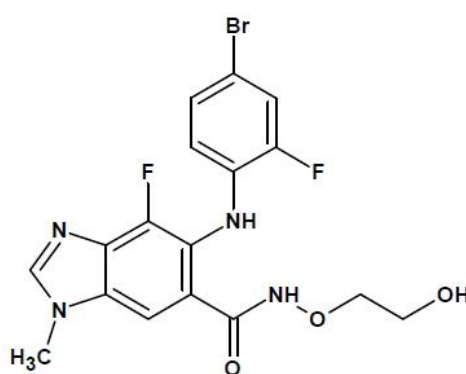


Rysunek 13. Struktura doksorubicyny [97].

2.7.2. Binimetynib

Binimetynib (Mektovi®) (Rysunek 14) jest bezkonkurencyjnym, drobnocząsteczkowym inhibitorem selektywnej kinazy białkowej, aktywowanej mitogenami

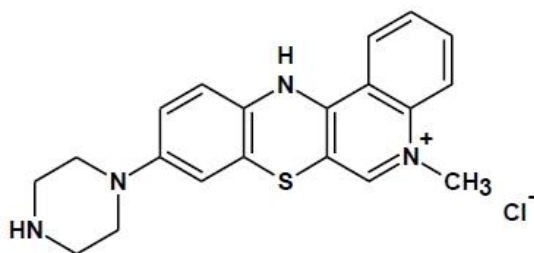
(MEK1 i MEK2). Inhibitor MEK został pierwotnie opracowany przez firmę Array BioPharma Inc. i zastosowany w leczeniu chorób autoimmunologicznych. Lek wyselekcjonowano i przeznaczono do leczenia nowotworów, kończąc wszystkie 3 fazy badań klinicznych. 27 czerwca 2018 roku FDA zatwierdziło Binimetynib w skojarzeniu z Enkorafenibem w leczeniu przerzutowego czerniaka skóry. Dodatkowo udowodniono, że kombinacja tych dwóch leków, zapobiega oporności na leczenie w przeszczepach heterogenicznych z obecnością mutacji BRAF V600E. Binimetynib hamuje wzrost linii komórkowych czerniaka i działa skuteczniej w terapii skojarzonej [101, 102].



Rysunek 14. Struktura binimetynibu [101].

2.7.3. Chlorek 9-(N-piperazyńlo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny

Chlorek 9-(N-piperazyńlo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny 9-PBThACl (Rysunek 15) jest nowym związkiem chemicznym i wykazuje silne właściwości antyproliferacyjne, które są porównywalne z właściwościami Doksorubicyny i Cisplatyny. Podobnie jak działanie antybiotyków antracyklinowych, planarne fragmenty strukturalne analizowanych soli chinobenzotiazyny mogą ułatwić interkalację helisy DNA. Czynniki interkalujące zwiększa stabilność kompleksu DNA-lek i może skutkować zahamowaniem proliferacji komórek. Związek wykazuje działanie neuroleptyczne, przeciwmalaryczne, wzmacniające odporność, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe oraz może mieć znaczenie w odwracaniu oporności wielolekowej [103].



Rysunek 15. Struktura (9-PBThACl) [103].

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1. CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie i wyselekcjonowanie nośników do sporządzenia formułacji terapeutycznej chemioterapeutyku o potencjalnej przydatności w onkologii. W pierwszym etapie badań wykonano syntezy i analizy potencjalnych nośników. Otrzymano w ten sposób pochodne tlenków grafenu (glicynową, iminodioctową, metioninową, cysteinową, izoleucynową, leucynową, serynową itd.), nośniki polimerowe-hydrożele na bazie chitozanu, liposomy. Ponadto, w ramach stażu w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowym Instytucie Badawczym w Gliwicach przeprowadzono próby izolacji egzosomów. Po wstępnych testach do dalszych badań wybrane zostały liposomy jako najbardziej obiecujące nośniki dla wybranych molekuł. W ramach przeprowadzonych badań opracowano osiemnaście nowych układów liposomalnych. Każdy z układów zbadano w zakresie temperatur 37°C i 41°C oraz w czterech środowiskach o różnych wartościach pH (5,50; 6,00; 6,50; 7,40). Do przygotowania formułacji nośnik-lek wykorzystano dwa leki zatwierdzone przez FDA (Doksorubicyna, Binimetynib) oraz nową zsyntezowaną substancję chemiczną o potwierdzonej aktywności biologicznej (Chlorek 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny) oraz działania przeciwnowotworowym. Kolejno do formułacji liposomalnej przyłączono białka HSA i dHSA w celu sprawdzenia ich wpływu na profil uwalniania leków.

Poszczególne etapy przygotowania formułacji liposomalnej obejmowały :

- enkapsulację leków (Doksorubicyna, Binimetynib) oraz substancji chemicznej (Chlorek 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny),
- analizę wpływu temperatury (37°C , 41°C) i pH środowiska (5,50; 6,00; 6,50; 7,40)

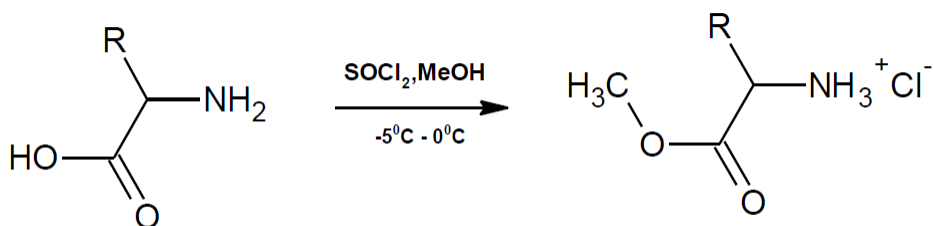
na układy liposomalne,

- zastosowanie dwóch form albuminy surowicy ludzkiej: HSA i dHSA (pozbawiona kwasów tłuszczowych) oraz analizę wpływu ich obecności na wiązanie leków,
- zastosowanie modeli matematycznych do określenia czynników analitycznych, kontrolujących proces uwalniania leków/potencjalnej substancji lekowej,
- analizę statystyczną, w tym PCA i HCA oraz ANOVA.

3.2. METODYKA BADAWCZA

3.2.1. Synteza pochodnych tlenków grafenu

W pierwszym etapie syntezy otrzymano chlorowodorki estrów metylowych wybranych aminokwasów (AA) (Rysunek 16). Estry poddano utworzeniu wiązań amidowych między GO i wybranymi aminokwasami (Rysunek 17). Syntezy przeprowadzono metodą klasyczną oraz z zastosowaniem pola mikrofalowego. Struktury chemiczne konglomeratów GO zostały potwierdzone za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR).



Rysunek 16. Synteza chlorowodorków estrów metylowych aminokwasów.

Metoda I – szczegółowy opis syntezy chlorowodorków estrów metylowych aminokwasów metodą klasyczną:

W trójszyjnej kolbie o pojemności 250 cm³ zaopatrzonej w termometr, wkraplacz i chłodnicę zwrotną, przygotowano zawiesinę 100 mmol wybranego aminokwasu w 90 cm³ bezwodnego metanolu. Zawiesinę mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i chłodzono w łaźni lodowej (lód/chlorek sodu) do temperatury -5⁰C. Po osiągnięciu tej temperatury, do mieszaniny powoli wkraplano 250 mmol świeżo przedestylowanego chlorku tionylu. Kontrolowano szybkość wkraplania tak, aby temperatura roztworu nie przekroczyła 0⁰C. Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową, a roztwór mieszał się przez 12 h w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym

ciśnieniem, otrzymując (w zależności od stosowanego aminokwasu) krystaliczny osad lub gęstą, oleistą ciecz. Otrzymany chlorowoderek estru metylowego wybranego aminokwasu przemywano eterem dietylowym, a następnie odsączono. Z uwagi na dużą higroskopijność, chlorowodorki estrów metylowych aminokwasów przechowywano w eksykatorze nad substancją suszącą. Otrzymane chlorowodorki estrów metylowych aminokwasów rekrystalizowano z bezwodnego metanolu.

Metoda II – szczegółowy opis syntezy chlorowodorków estrów metylowych aminokwasów w polu mikrofalowym:

W kolbie o pojemności 100 cm³ przygotowano zawiesinę 100 mmol wybranego aminokwasu w 90 cm³ bezwodnego metanolu. Zawiesinę chłodzono w łaźni lodowej (lód/chlorek sodu) do temperatury -5°C. Do mieszaniny powoli wkraplano 250 mmol świeżo przedestylowanego chlorku tionylu. Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową, a roztwór ogrzewano w polu mikrofalowym w czterech cyklach [30°C, 15 min]. Rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując (w zależności od stosowanego aminokwasu) krystaliczny osad lub gęstą, oleistą ciecz. Otrzymany chlorowoderek estru metylowego wybranego aminokwasu przemywano eterem dietylowym i odsączono. Otrzymane chlorowodorki estrów metylowych aminokwasów przechowywano w eksykatorze nad substancją suszącą. Otrzymane chlorowodorki estrów metylowych aminokwasów rekrystalizowano z bezwodnego metanolu.

Według opisanych procedur syntez, otrzymano chlorowodorki estrów metylowych aminokwasów oraz kwasu iminodioctowego. Poddano je analizie NMR, określono ich temperaturę topnienia oraz obliczono wydajność reakcji. W poniższej tabeli porównano wydajności syntez (metodą klasyczną i mikrofalową) wybranych chlorowodorków estrów metylowych.

Tabela 6. Porównanie wydajności chlorowodorków estrów metylowych wybranych aminokwasów.

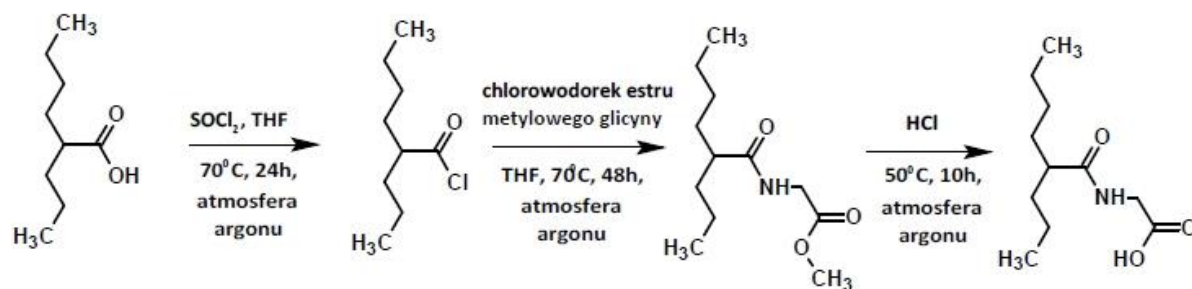
Nazwa chlorowodorku	Rodzaj metody	Wydajność	T.t	Analiza NMR
Chlorowoderek estru metylowego kwasu	Metoda tradycyjna	96,9%	180°C	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.28 (s, 1H), 4.31 (d, <i>J</i> = 37.2 Hz, 1H), 3.81 (d, <i>J</i> = 12.6 Hz, 1H), 2.19 (s, 1H), 1.57 (s, 1H).

iminodiocetowego				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.33 (s), 79.74 (s), 53.10 (s), 46.79 (s), 40.75 – 39.23 (m), 31.15 (s).
Chlorowodorek estru metylowego kwasu iminodiocetowego	Metoda mikrofalowa	95,7%	180 ⁰ C	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (s, 1H), 4.31 (d, <i>J</i> = 37.2 Hz, 1H), 3.81 (d, <i>J</i> = 12.5 Hz, 1H), 2.19 (s, 1H), 1.59 (s, 1H).
				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.32 (s), 53.11 (s), 46.78 (s), 40.02 (dp, <i>J</i> = 41.9, 21.1 Hz).
Chlorowodorek estru metylowego glicyny	Metoda tradycyjna	98,4%	176 ⁰ C	¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.45 (s, 1H), 3.77 (d, <i>J</i> = 21.3 Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.17 (s, 1H), 2.51 (s, 1H).
				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.55 (s), 52.95 (s), 40.00 (dp, <i>J</i> = 41.9, 21.0 Hz).
Chlorowodorek estru metylowego glicyny	Metoda mikrofalowa	95%	176 ⁰ C	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (s, 2H), 4.09 – 3.96 (m, 1H), 3.84 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 1.57 (s, 5H), 1.27 (s, 1H).
				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.44 (s), 52.92 (s), 40.81 – 39.27 (m).
Chlorowodorek estru metylowego metioniny	Metoda tradycyjna	84%	177 ⁰ C	¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.10 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 1H), 3.33 (s, 2H), 2.51 (s, 1H), 2.06 (s, 1H).
				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.06 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz), 53.31 (s), 51.33 (d, <i>J</i> = 9.4 Hz), 40.01 (dp, <i>J</i> = 42.0, 21.0 Hz), 29.89 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz), 28.92 (d, <i>J</i> = 24.5 Hz), 14.71 (s).
Chlorowodorek estru metylowego metioniny	Metoda mikrofalowa	56,5%	177 ⁰ C	¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.64 (s, 1H), 4.11 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 1H), 3.76 (s, 1H), 3.33 (s, 1H), 2.51 (s, 1H), 2.08 (dd, <i>J</i> = 13.2, 6.6 Hz, 1H).
				¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.09 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz), 53.34 (s), 51.30 (s), 40.01 (dp, <i>J</i> = 42.0, 21.0 Hz), 29.83 (s), 28.78 (s), 14.71 (s).

Chlorowodorek estru metylowego cysteiny	Metoda tradycyjna	64,3%	158 ⁰ C	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.93 (s, 2H), 4.35 (s, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.51 – 3.22 (m, 3H), 2.51 (s, 1H), 2.09 (s, 1H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.82 (s), 53.41 (t, J = 8.0 Hz), 51.78 – 51.33 (m), 39.99 (dp, J = 42.0, 21.0 Hz).
Chlorowodorek estru metylowego cysteiny	Metoda mikrofalowa	64%	158 ⁰ C	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.93 (s, 2H), 4.35 (s, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.51 – 3.22 (m, 3H), 2.51 (s, 1H), 2.09 (s, 1H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.82 (s), 53.41 (t, J = 8.0 Hz), 51.78 – 51.33 (m), 39.99 (dp, J = 42.0, 21.0 Hz).

Metoda I – szczegółowy opis syntezy tlenku grafenu metodą klasyczną:

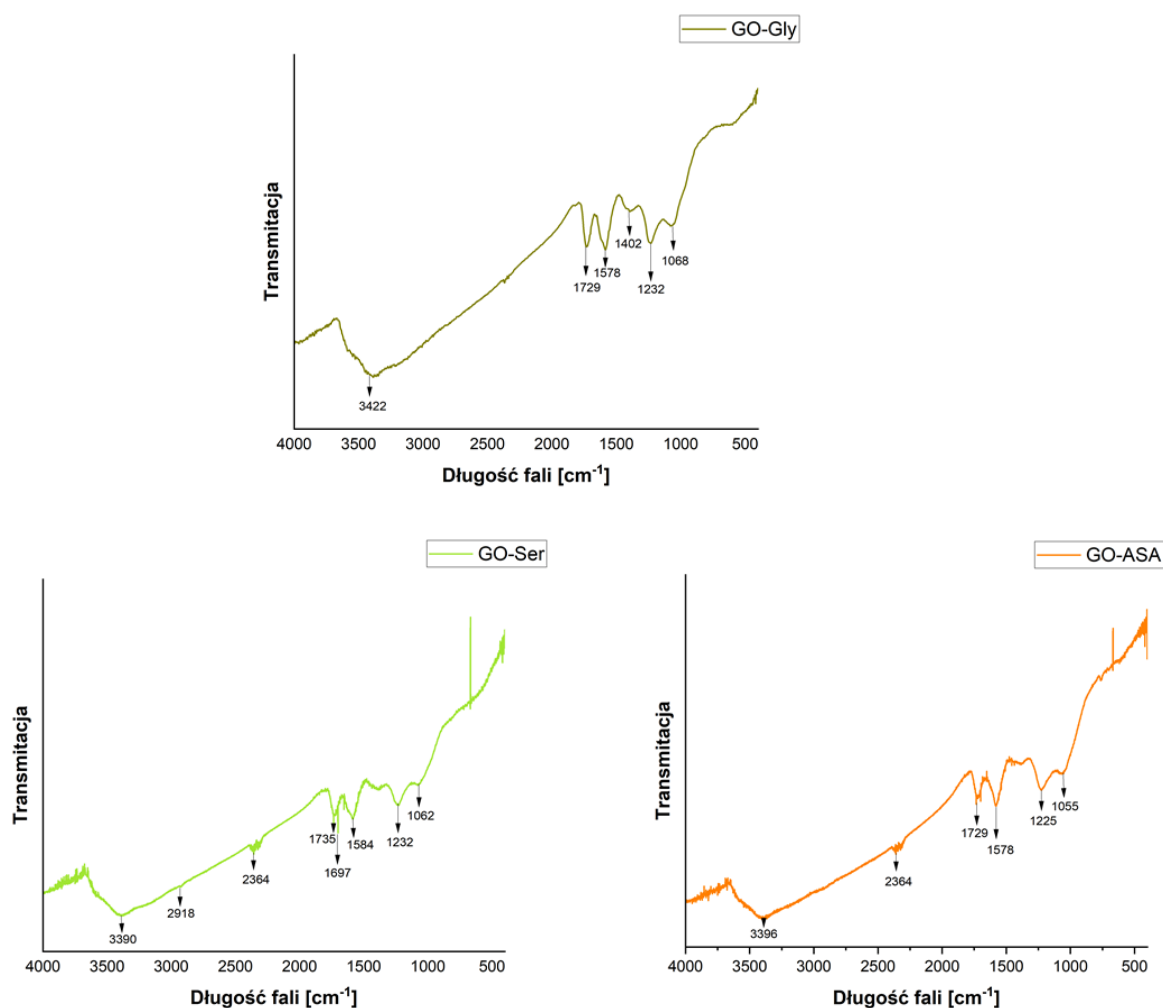
W kolbie o pojemności 50 cm³ przygotowano mieszaninę 0,05 g tlenku grafenu (GO), 8 ml chlorku tionylu oraz 0,25 ml tetrahydrofuranu. Całość mieszano w temperaturze 70⁰C w atmosferze argonu przez 24 h. Następnie usunięto nadmiar tetrahydrofuranu pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50⁰C. Otrzymany produkt zmieszano z 0,05g chlorowodoru estru metylowego wybranego aminokwasu w tetrahydrofuranie (20 ml) w temperaturze 70⁰C i pozostawiono w atmosferze argonu przez 48 h. Po wysuszeniu otrzymanego produktu, przeprowadzono hydrolizę 2 M HCl (20 ml). Zawiesinę mieszano w atmosferze argonu w temperaturze 50⁰C przez 10 h. Zsyntezowany tlenek grafenu odwirowano, przemyto wodą i wysuszono. Produkt potwierdzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR).

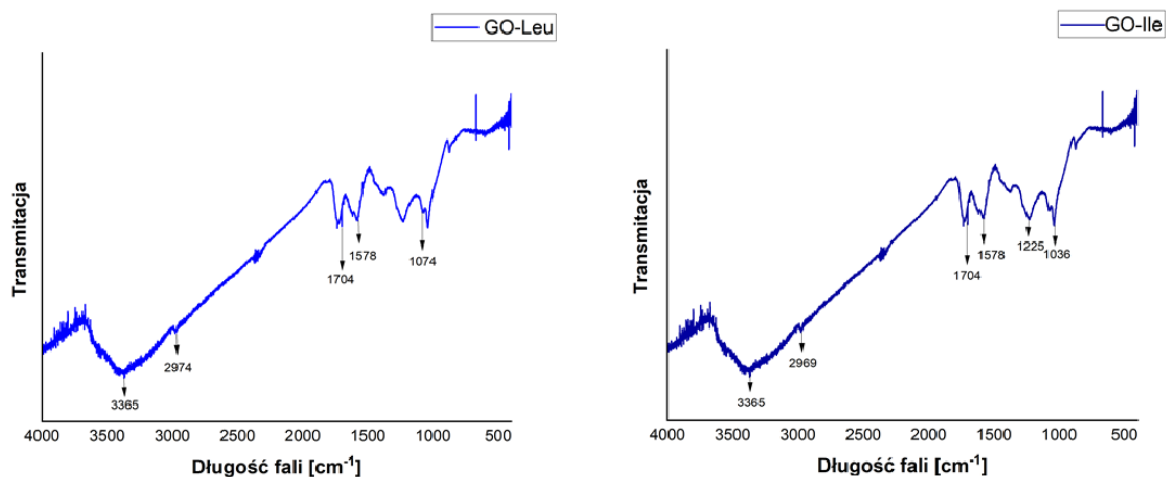


Rysunek 17. Synteza na przykładzie GO-Gly [32].

Metoda II – szczegółowy opis syntezy tlenku grafenu w polu mikrofalowym:

W kolbie sercowej o pojemności 50 cm³ przygotowano mieszaninę 0,05 g tlenku grafenu (GO), 8 ml chlorku tionylu oraz 0,25 ml tetrahydrofuranu. Całość ogrzewano w polu mikrofalowym, w trzech cyklach [300 W, 30⁰C, 5 min]. Po każdym cyklu odczekano 10 min na ochłodzenie roztworu. Następnie roztwór ogrzewano w dwóch cyklach [500 W, 30⁰C, 5 min]. Po odparowaniu rozpuszczalnika dodano 20 cm³ świeżego tetrahydrofuranu oraz uzyskany w pierwszym etapie chlorowodorek estru metylowego (0,5 g). Całość ogrzewano w polu mikrofalowym w czterech cyklach [300 W, 30⁰C, 5 min]. Produkt przesączono pod ciśnieniem na lejku szklanym z dnem porowatym, z zastosowaniem filtra membranowego z octanu celulozy typu ME 25/21 ST. Otrzymane pochodne tlenków grafenu poddano analizie spektroskopii w podczerwieni (IR) w celu identyfikacji grup funkcyjnych i potwierdzenia ich struktury.





Rysunek 18. Przykładowe widma IR dla tlenku grafenu i jego pochodnych (GO - Gly: tlenek grafenu-chlorowodorek glicyny; GO-Ser: tlenek grafenu – chlorowodorek seryny; GO -ASA: tlenek grafenu – chlorek aspiryny; GO - Leu: tlenek grafenu - chlorowodorek leucyny; GO-Ile: tlenek grafenu – chlorowodorek izoleucyny).

Dzięki zastosowanej metodzie spektroskopii IR otrzymujemy informacje o grupach funkcyjnych w analizowanych związkach. Porównując ze sobą widma IR pochodnych tlenków grafenu w temperaturze pokojowej uzyskujemy zmianę intensywności zarejestrowanych pików w zakresie $700 - 1800 \text{ cm}^{-1}$. W przedziale $2000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ następuje spadek transmitacji. Wartości te są przypisane drganiom N-H, pochodzącym od aminokwasów. Zmiana absorpcji w widmie wynika z przyłączenia różnych grup funkcyjnych do tlenku grafenu, pojawienie się nowych drgań grup C-C, C-O, C-H, C=O, O-H, C=C, które wynikają ze struktury aminokwasów dołączonych do tlenku grafenu.

3.2.2. Izolacja egzosomów

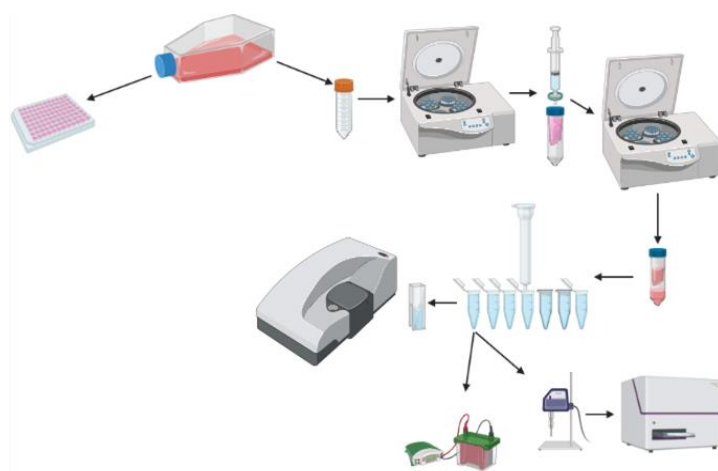
Egzosomy izolowano z komórek nowotworowych czerniaka metodą chromatografii wykluczenia (SEC). Surowica została wstępnie oczyszczona przez serię wirowań. Następnie supernatant przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Wzbogacenie egzosomów uzyskano przy użyciu koncentratora odśrodkowego Vivacell (100 kDa). Pierwszą frakcję zebrano zaraz po załadowaniu próbki, a następnie kolejne frakcje eluowano przy użyciu PBS. Profil rozkładu wielkości frakcji określono przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła (instrument Zetasizer).

Szczegółowy opis procedury izolacji egzosomów:

Komórki czerniaka (B16-F10, 451Lu, WM35, WM793B, 1205Lu) hodowano w butelkach T175. 24 godziny przed zbiorem egzosomów, medium zastąpiono świeżą pożywką zawierającą 5% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej pozbawionej egzosomów (ED FBS). Następnego dnia zebrano pożywkę zawierającą uwolnione egzosomy, oczyszczono z pozostałych martwych komórek przez serię wirowań przy prędkościach $200 \times g$, $2000 \times g$ przez 10 min i $10\,000 \times g$ przez 30 min. Supernatant przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego $0,22\ \mu\text{m}$. Wzbogacenie egzosomów uzyskano przy użyciu koncentratora odśrodkowego Vivacell (100 kDa). Próbkę egzosomów (1 ml) została załadowana na gotowe do użycia kolumny do chromatografii wykluczania (SEC). Frakcje (1 ml) były eluowane PBS bez kationów dwuwartościowych (Mg^{2+} i Ca^{2+}). Profil rozkładu wielkości eluowanych frakcji określono przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła (instrument Zetasizer). Frakcje sprawdzono metodą Western blot na obecność egzosomalnego białka markerowego TSG101.

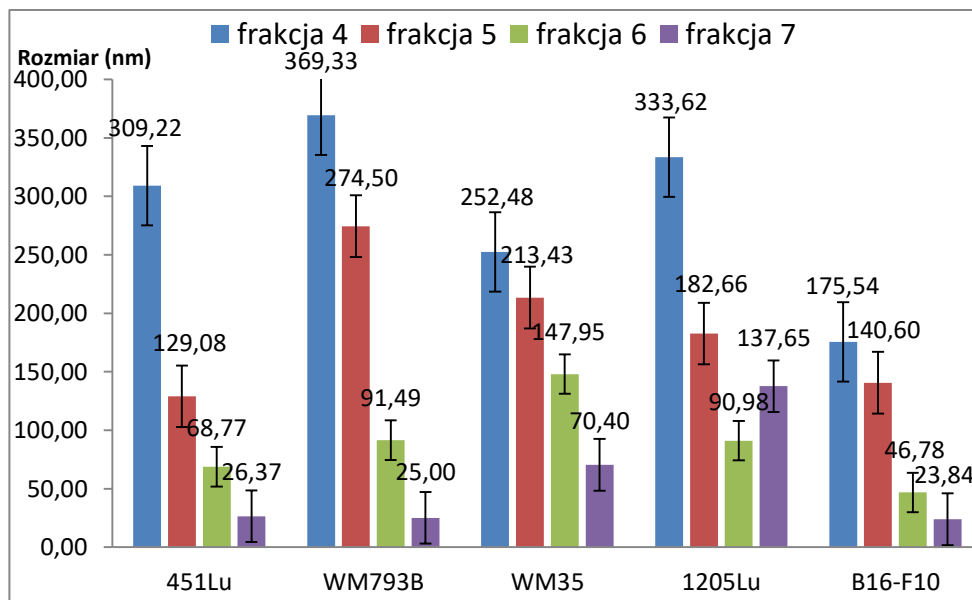
Przygotowanie Sepharose Cl-2B do upakowania kolumny:

Przeniesiono 20 ml złoży do falkonu o pojemności 50 ml i dodano równoważną ilość PBS (bez jonów wapnia i magnezu). Następnie wirowano Sepharose (1 min $200 \times g$). Znad osadu zlano supernatant, wleto równoważną ilość PBS i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Wykonano łącznie 4 płukania. Po ostatnim płukaniu i zlanie supernatantu zawieszono osad w ilości PBS równoważnej ilości Sepharose. Umieszczono kolumnę Bio-Rad na statywie, przepłukano 5 ml PBS i nałożono powoli 10 ml uzyskanego złoży. Sprawdzone, czy upakowana kolumna nie zawiera żadnych pęcherzyków powietrza. Gotową kolumnę przepłukano 5 ml PBS. Następnie nałożono na górny dysk 1 ml supernatantu, zbierając pierwszą spływającą frakcję. W chwili, kiedy przestała spływać pierwsza frakcja, nakładano 1 ml PBS. Analogicznie postępowano z kolejnymi frakcjami.



Rysunek 19. Proces izolacji egzosomów. Grafika wykonana w programie BioRender.

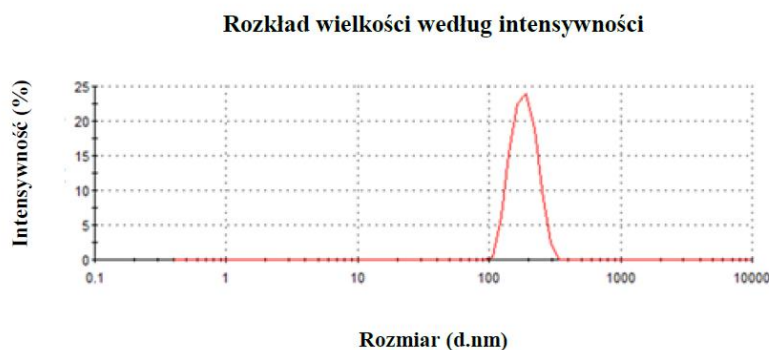
Egzosomy były obecne we frakcji 5 i 6 eluowanej (z użyciem kolumn SEC) z pożywki hodowlanej komórek czerniaka. Profil rozkładu wielkości egzosomów określono za pomocą spektroskopii korelacji fotonowej (aparat Zetasizer). Wydajność obciążenia egzosomów lekami badano za pomocą sonikacji i określano ilościowo przez pomiary absorbancji. Preparaty egzosomalne wykorzystano do sprawdzenia toksyczności przenoszonych leków w hodowli komórek czerniaka.



Rysunek 20. Charakterystyka mikropęcherzyków w rozdzielonych frakcjach medium hodowlanego.

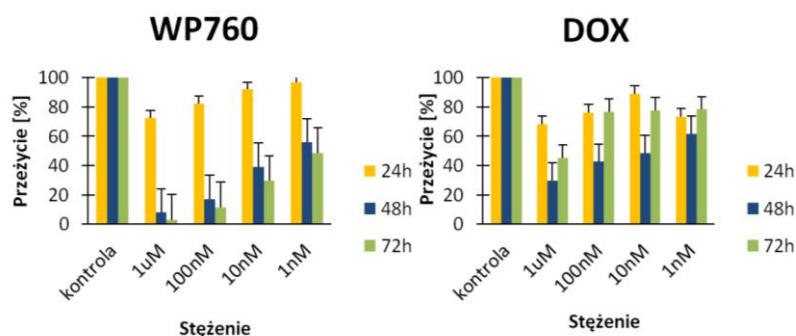
Powyższy wykres przedstawia wyniki pomiaru wielkości cząstek uzyskane po izolacji egzosomów z podanych linii komórkowych czerniaka. Egzosomy mieszczą się w zakresie 30 – 150 nm. Porównując ze sobą różne linie komórkowe, można zaobserwować, że w przypadku linii komórkowej ludzkiego czerniaka 451Lu oraz linii komórkowej mysiego

czerniaka B16-F10 egzosomy występują we frakcji 5 i 6, w przypadku linii komórkowej ludzkiego czerniaka WM793B jest to frakcja 6, w przypadku linii komórkowej ludzkiego czerniaka WM35 jest to frakcja 7, a w przypadku linii komórkowej ludzkiego czerniaka 1205Lu jest to frakcja 6 i 7.



Rysunek 21. Rozkład wielkości cząstek.

Rozkład wielkości cząstek przedstawiony na rysunku 21 przedstawia pomiar wyizolowanych egzosomów z linii komórkowej mysiego czerniaka (frakcja 5). Jeden pik w zakresie 100-150 nm oznacza dobrze wyizolowane egzosomy. Strome opadanie krzywej świadczy o próbce jednorodnej z dobrze rozproszonymi cząstkami.



Rysunek 22. Cytotoksyczność egzosomów zawierających leki na komórki czerniaka B16-F10.

WP 760 to bisantracyklina zsyntezowana przez prof. Waldemara Priebego w Centrum MD Andersona w Huston w Teksasie. Jest silnie toksyczna w stosunku do komórek nowotworowych czerniaka. Posiada unikalny profil aktywności i unikalny sposób działania [104]. Na podstawie wykresów można stwierdzić, że egzosomy

zawierające WP760 działają efektywniej po dłuższym czasie, natomiast Doksorubicyna działa szybciej, jednak jej działanie z upływem czasu stopniowo słabnie.

3.2.3. Analiza toksyczności haloizytu

Na płytkę 96-dołkową posiano komórki nowotworowe czerniaka B16-F10 i inkubowano przez określony czas w temperaturze 37°C, przy 5% CO₂. Następnie dodano po 100 uL świeżej pożywki zawierającej nośnik haloizytowy o odpowiednim stężeniu oraz kontrolę. Po inkubacji pożywki zawierającej nośnik haloizytowy, dodano barwnik Alamar Blue i inkubowano przez 2 h w 37°C. Następnie dokonano pomiaru absorbancji przy pomocy czytnika mikropłytek.

Szczegółowy opis testu cytotoksyczności nośnika (haloizytu)

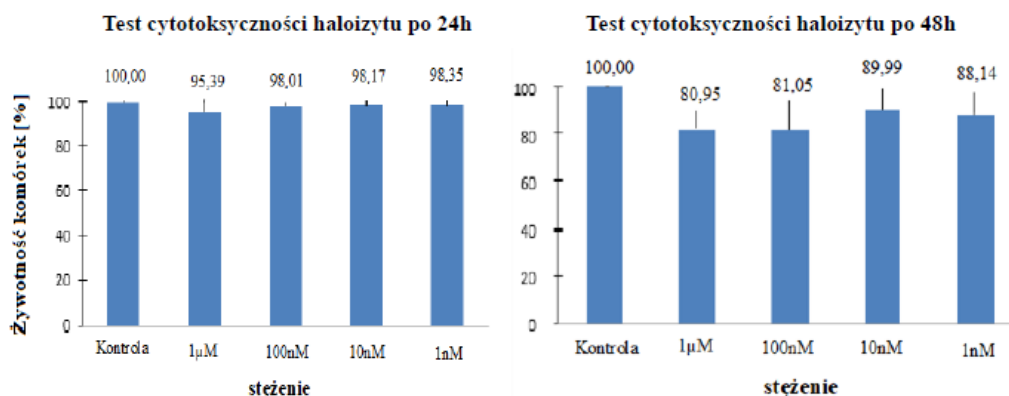
Dzień 1: Posiano komórki czerniaka (B16-F10) na płytkę 96-dołkową w ilości 10 tysięcy komórek w 100 uL pożywki (RPMI + 5% FBS + 1% P/S) na jeden dołek. Następnie inkubowano przez 24 h w 37°C, 5% CO₂.

Dzień 2: Po osiągnięciu 75-80% konfluencji odciągnięto medium znad komórek i dodano po 100 uL świeżej pożywki zawierającej nośnik o odpowiednim stężeniu (1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM) oraz kontrolę zawierającą tylko komórki czerniaka w pożywce RPMI (5% FBS i 1% P/S). Inkubowano 24 h i 48 h w 37°C, 5% CO₂.

Dzień 3: Po 24 h od dodania pożywki zawierającej nośnik o odpowiednim stężeniu dodano Alamar Blue (10 μl na dołek) i inkubowano przez 2 h w 37°C, 5% CO₂. Następnie zmierzono natężenie fluorescencji spektrofotometrem (długość fali wzbudzenia: 560 nm, długość fali emisji: 590 nm). Przeprowadzono analizę danych.

Dzień 4: Po 48h od dodania pożywki zawierającej nośnik o odpowiednim stężeniu dodano Alamar Blue (10 μL na dołek) i inkubowano przez 2 h w 37°C, 5% CO₂. Następnie zmierzono natężenie fluorescencji spektrofotometrem (długość fali wzbudzenia: 560 nm, długość fali emisji: 590 nm).

Analiza cytotoksyczności haloizytu pozwala ocenić jego wpływ na żywotność komórek, określając bezpieczeństwo i potencjalne zastosowanie tego minerału w biologii, medycynie czy farmacji. Badania cytotoksyczności przeprowadzono za pomocą testu Alamar Blue, który umożliwia ocenę przeżywalności, czy proliferacji w obecności nośnika haloizytowego.



Rysunek 23. Wykresy przedstawiające wyniki testu cytotoksyczności haloizytu po 24 i 48h.

Wykresy przedstawiają procentową zależność przeżywalności komórek do stężenia użytego potencjalnego nośnika. Na podstawie danych można potwierdzić brak toksyczności haloizytu. W przypadku pomiarów po 24 h przy najwyższym stężeniu potencjalnego nośnika przeżywalność wynosi 95,39%, a przy najniższym 98,35%. Po 48 h przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosi 80,95%, a najniższym 88,14%. Różnice w grupach pomiędzy zastosowanymi stężeniami (1 nM - 1 µM), a kontrolą nietraktowaną potencjalnym nośnikiem są znikome. Z powyższego badania wynika, że haloizyt może być stosowany w terapii celowanej jako potencjalny nośnik leków przeciwnowotworowych.

3.2.4. Synteza hydrożeli

Przeprowadzono syntezy na bazie naturalnego polimeru (chitozanu) oraz modyfikacje z różnymi monomerami syntetycznymi (glikolem polietylenowym, kwasem metakrylowym), polimerem (żelatyną) oraz z żelem krzemionkowym. Roztwory mieszano i ogrzewano w temperaturze 60°C. Do roztworu dodawano małymi porcjami chitozan, a po jego rozpuszczeniu w proporcji 1:1 dodawano w zależności od syntezy: glikol polietylenowy, kwas metakrylowy, żelatynę lub żel krzemionkowy. Po ustaleniu pH 8,5-9, otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i nośniki poddano analizie FT-IR.

Opisy syntez nośników na bazie chitozanu:

1. Chitozan

Do zlewki o pojemności 50 mL wiano 25 mL 0,05 M kwasu octowego. Zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i ogrzano do temperatury 60°C. Następnie do roztworu wprowadzano małymi porcjami 0,25 g chitozanu. Po rozpuszczeniu chitozanu dodano wodorotlenek sodu w celu ustalenia pH 8,5-9. Otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i poddano analizie FT-IR.

2. Chitozan – Glikol polietylenowy

Do zlewki o pojemności 50 mL wiano 25 mL 0,05 M kwasu octowego. Zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i ogrzano do temperatury 60°C. Następnie do roztworu wprowadzano małymi porcjami 0,25 g chitozanu, a po jego rozpuszczeniu dodano 0,25 g glikolu polietylenowego. Po 20 minutach dodano wodorotlenek sodu w celu ustalenia pH 8,5-9. Otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i poddano analizie FT-IR.

3. Chitozan – Żelatyna

Do zlewki o pojemności 50 mL wiano 25 mL 0,05 M kwasu octowego. Zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i ogrzano do temperatury 60°C. Następnie do roztworu wprowadzano małymi porcjami 0,25 g chitozanu, a po jego rozpuszczeniu dodano 0,25 g sproszkowanej żelatyny. Po 20 minutach dodano wodorotlenek sodu w celu ustalenia pH 8,5-9. Otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i poddano analizie FT-IR.

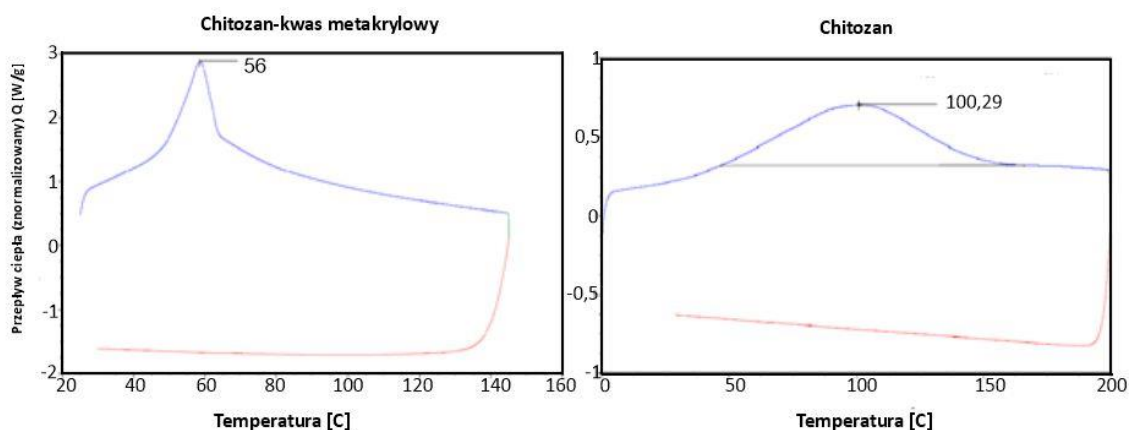
4. Chitozan – kwas metakrylowy

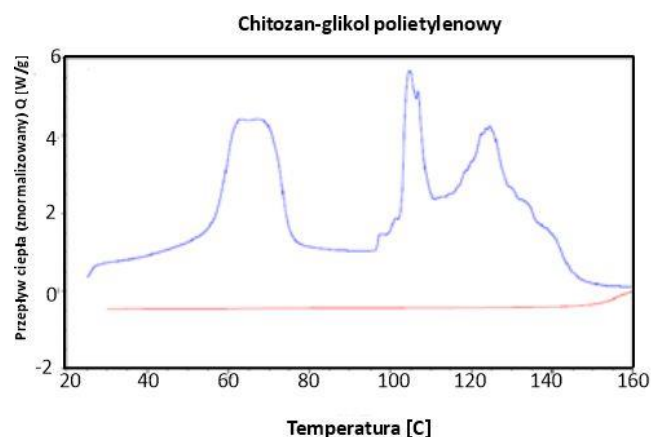
Do zlewki o pojemności 50 mL wiano 25 mL 0,05 M kwasu octowego. Zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i ogrzano do temperatury 60°C. Następnie do roztworu dodawano małymi porcjami 0,25 g chitozanu. W drugiej zlewce o pojemności 50 mL przygotowano roztwór 0,5 mL kwasu metakrylowego z 0,5 M kwasem octowym (2,5 mL). Zawartość drugiej zlewki przelano do pierwszej zawierającej chitozan. Po 20 minutach dodano wodorotlenek sodu w celu ustalenia pH 8,5-9. Otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i poddano analizie FT-IR.

5. Chitozan– żel krzemionkowy

Do zlewki o pojemności 50 mL wiano 25 mL 0,05 M kwasu octowego. Zawartość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i ogrzano do temperatury 60°C. Następnie do roztworu dodawano małymi porcjami 0,25 g chitozanu. W drugiej zlewce o pojemności 50 mL przygotowano roztwór 0,25 g żelu krzemionkowego z 50 mL wody destylowanej. Zawartość drugiej zlewki przelano do pierwszej zawierającej chitozan. Roztwór mieszano przez 30 min. Następnie dodano wodorotlenek sodu w celu ustalenia pH 8,5-9. Otrzymany hydrożel poddano badaniu DSC i TG. Dodatkowo przeprowadzono proces liofilizacji i poddano analizie FT-IR.

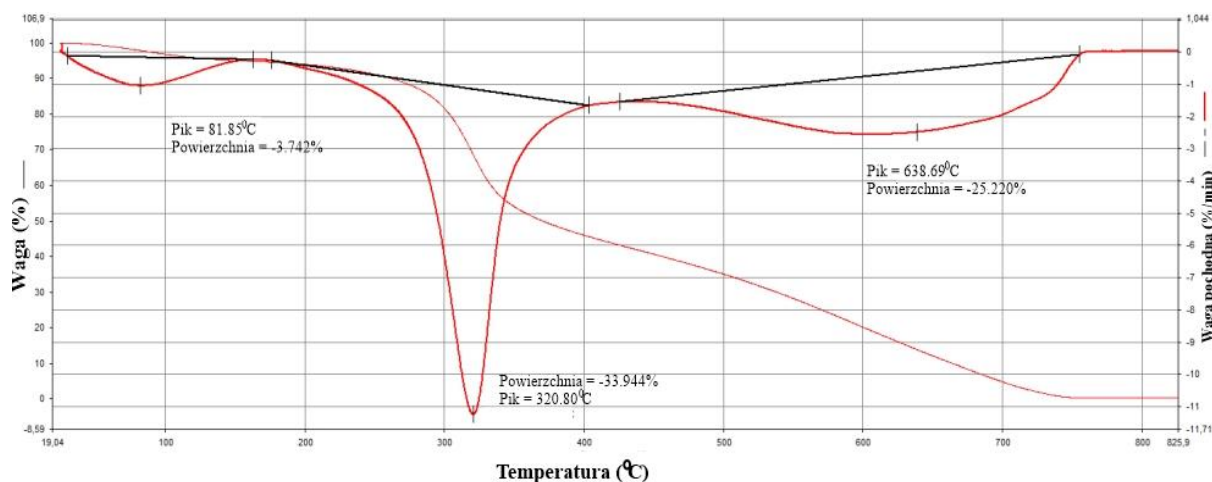
DSC jest cennym narzędziem w termodynamice służącym do bezpośredniej oceny poboru energii cieplnej, która zachodzi w próbce w ramach regulowanego wzrostu lub spadku temperatury. Kalorymetria jest szczególnie stosowana do monitorowania zmian przejść fazowych. Temperatury przejścia termicznego (T_t ; temperatury topnienia) próbek są oznaczane: w roztworze, fazie stałej lub fazie mieszanej, takiej jak zawiesiny [105]. Skaningowa kalorymetria różnicowa jest ściśle powiązana z termogravimetrią, ponieważ zmiany masy próbki podczas ogrzewania mogą wpływać na przebieg procesów termicznych rejestrowanych w DSC. Termogravimetria (TG) opiera się na ciągłej rejestracji zmian masy próbki w funkcji temperatury i czasu. Próbkę umieszcza się na ramieniu mikrowagi rejestrującej, po czym to ramię wraz z próbką umieszcza się w piecu. Temperatura pieca jest kontrolowana według zaprogramowanego profilu temperatura/czas [106].





Rysunek 24. Termogramy przedstawiające hydrożele na bazie chitozanu.

Na podstawie przedstawionych termogramów, można określić właściwości termiczne, takie jak krystalizacja, topnienie, czy przejścia szkliste badanego nośnika. W przypadku chitozanu występuje jeden pik o wartości 100,29⁰C. Hydrożel jest stabilny termicznie w zakresie temperatur od 0-200⁰C. Termogram chitozan - kwas metakrylowy przedstawia pik o wartości 56⁰C, oznacza to, że następuje uporządkowanie struktury hydrożelu. W przypadku hydrożelu Chitozan - glikol polietylenowy występuje kilka pików, pierwszy jest w przedziale 55-75⁰C, co świadczy również o uporządkowaniu struktury hydrożelu, jednak ze względu na większą intensywność pików można wnioskować, że glikol polietylenowy powoduje silniejsze uporządkowanie. W przedziale 95 – 110⁰C jest odwodnienie częściowe hydrożelu, a 125⁰C – 140⁰C częściowe parowanie glikolu polietylenowego. Uzyskane informacje przedstawiają analizę pomiarów zmian ciepła, ułatwiającą obserwację zachowania danego materiału.

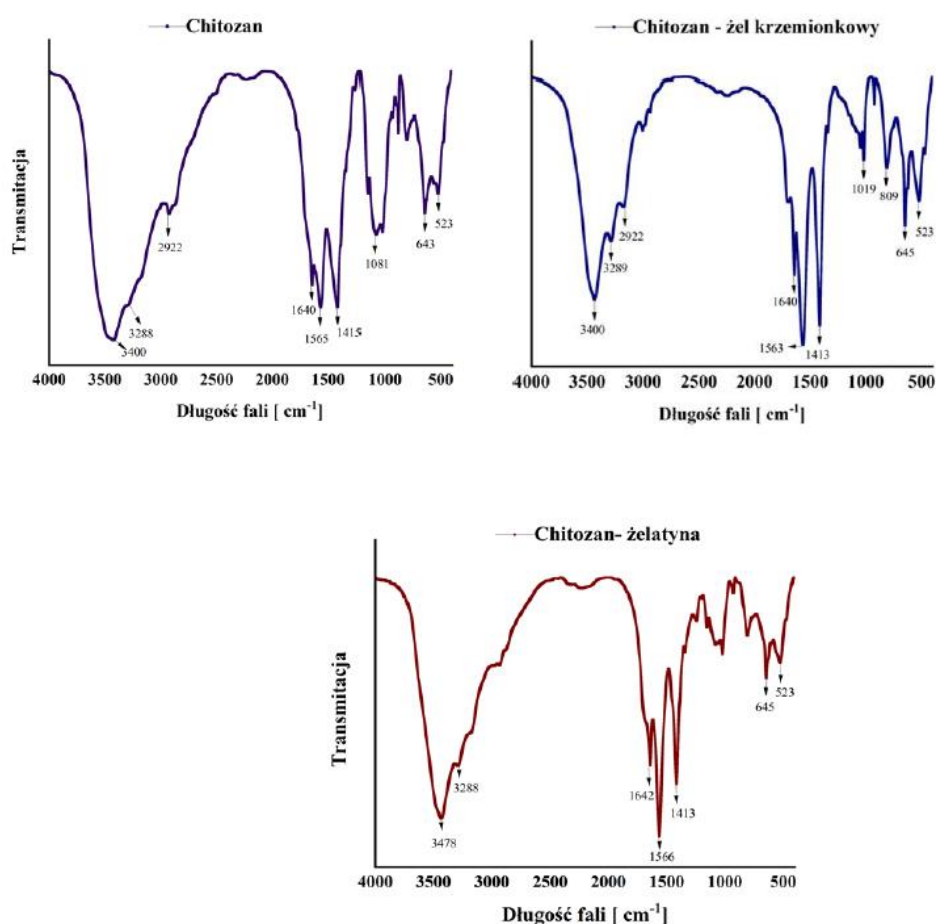


Rysunek 25. Termogram TGA przedstawiający hydrożel na bazie chitozanu.

Analiza termogramu TGA pozwala określić stabilność termiczną otrzymanego hydrożelu. Na początku widoczna minimalna zmiana masy próbki (spadek masy o 3,74%). Brak znaczącej utraty masy świadczy o stabilności termicznej próbki. Jednoetapowa degradacja świadczy o jednorodnym składzie substancji. Analiza TG potwierdza uzyskane wyniki metodą DSC. Otrzymane hydrożele mogą być potencjalnymi nośnikami leków przeciwnowotworowych.

3.2.5. Analiza spektroskopowa IR hydrożeli po liofilizacji

Analiza spektroskopowa IR hydrożeli po liofilizacji pozwala na identyfikację grup funkcyjnych oraz ocenę ewentualnych zmian w strukturze chemicznej, jakie zaszły w wyniku procesu liofilizacji.



Rysunek 26. Przykładowe widma IR dla hydrożeli po liofilizacji (Chitozan, Chitozan – żel krzemionkowy, Chitozan – żelatyna).

Analiza widm IR hydrożeli określa położenie grup funkcyjnych. Zakres absorpcji dla wartości: $3500\text{--}3000\text{cm}^{-1}$ (O-H), $3000\text{--}2850\text{cm}^{-1}$ (C-H), $1870\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ (C=O), $1650\text{--}1500\text{cm}^{-1}$ (N-H), $1450\text{--}1200\text{cm}^{-1}$ (O-H), $1430\text{--}1050\text{cm}^{-1}$ (-COO-). Uzyskane wartości potwierdzają obecność grup, które są charakterystyczne dla danych modyfikacji (Rysunek 26).

3.2.6. Synteza 9-PBThACI

W pracy wykorzystano tetracykliczną pochodną chinobenzotiazyny zsyntezowaną przez Pana dr hab. n. farm. Andrzeja Ziębę, prof. ŚUM w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, w Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach. Synteza oparta jest na cyklizacji układów betainowych o strukturze 1-alkilo-4-(aryloamino)chinolino-3-tiolanów poprzez nukleofilowe podstawienie atomu wodoru lub halogenu w pierścieniu fenyłowym atomem siarki pochodzącym z tiolanu (Rysunek 27).

W pierwszym etapie syntezy przez 15 min w temperaturze pokojowej przepuszczano argon przez zawiesinę bischlorku (0,419 g, 1 mmol) w pirydynie (15 ml). Następnie dodano aminę (2,5 mmol) i mieszaninę reakcyjną barbotowano argonem przez kolejne 15 minut. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Produkt (1-metylo-4-(4-(N-piperazynylo)fenylamino)chinolino-3-tiolan) odsączono i przemyto eterem, a następnie oczyszczono poprzez rekrytalizację z etanolu.

1-metylo-4-(4-(N-piperazynylo)fenylamino)chinolino-3-tiolan; Wydajność: 86%; t.t. $137\text{ }^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ (ppm): 3.05–3.35 (m, 8H, $\text{H}_{\text{piperazynylo}}$), 4.17 (s, 3H, NCH_3), 4.69 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{piperazynylo}}$), 6.96–7.02 (m, 2H, H_{arom}), 7.06–7.10 (m, 2H, H_{arom}), 7.25–7.30 (m, 1H, H_{arom}), 7.51–7.55 (m, 1H, H_{arom}), 7.58–7.64 (m, 1H, H_{arom}), 7.90–7.96 (m, 1H, H_{arom}), 8.70 (s, 1H, $\text{H}_{2\text{chinoliny}}$), 10.01 (s, 1H, NH); EI-MS (70 eV) (m/z): 350 (M^+ , 100%); analiza obliczeniowa dla $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{S}$: C, 68.54; H, 6.33; N, 15.99; S, 9.15. wartości procentowe: C, 68.49; H, 6.25; N, 15.90; S, 9.10 [103].

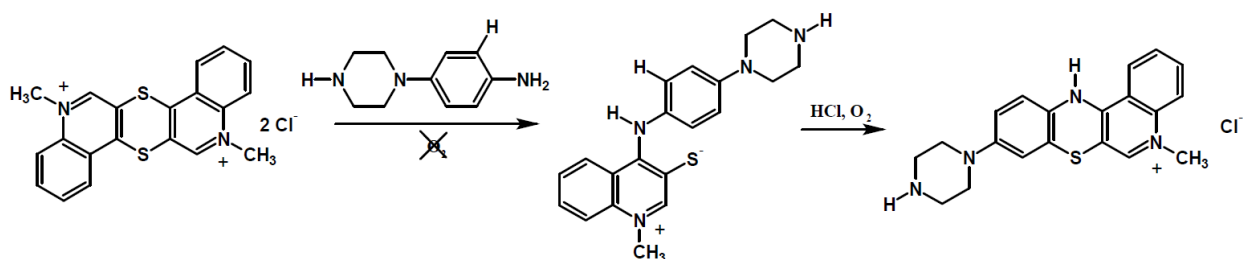
Chlorek 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny można otrzymać dwoma metodami:

Procedura 1: Do mieszaniny 1-metylo-4-(4-(N-piperazynylo)fenylamino)chinolino-3-tiolanu (1 mmol) w 10 ml pirydyny dodano chlorowodorek aniliny (0,155 g, 1,2 mmol) i całość mieszano w temperaturze $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 12 godzin. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, powstały osad odsączono i przemyto eterem. Produkt rekrytalizowano z etanolu.

Procedura 2: Chlorek 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny otrzymano bezpośrednio z bischlorku (0,419 g, 1 mmol) w 10 ml pirydyny, dodając aminę (2,5 mmol). Całość mieszano w temperaturze 70 °C przez 12 godzin. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a powstały osad odsączono i przemyto eterem. Produkt oczyszczono poprzez rekrytalizację z etanolu.

Chlorek 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny

Wydajność: Procedura (1) 66%, Procedura (2) 74%; ^1H NMR (DMSO-d_6 , 600 MHz) δ (ppm): 3.28–3.32 (m, 4H, $\text{H}_{\text{piperazynylo}}$), 3.34–3.39 (m, 4H, $\text{H}_{\text{piperazynylo}}$), 4.11 (s, 3H, NCH_3) 6.65–6.69 (d, $4J = 3$ Hz, 1H, H8), 6.72–6.77 (d, $3J = 9$ Hz, 1H, H11), 6.77–6.82 (d.d, $3J = 9$ Hz, $4J = 3$ Hz, 1H, H10), 7.75–7.83 (m, 1H, H_{arom}), 7.97–8.04 (m, 2H, H_{arom}), 8.26 (s, 1H, H6), 8.48–8.53 (m, 1H, H_{arom}); analiza obliczeniowa dla $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{S}$: C, 62.41; H, 5.50; N, 14.56; S, 8.33. wartości procentowe: C, 62.32; H, 5.44; N, 14.47; S, 8.28 [103].



Rysunek 27. Synteza chlorku 9-(N-piperazynylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny [103].

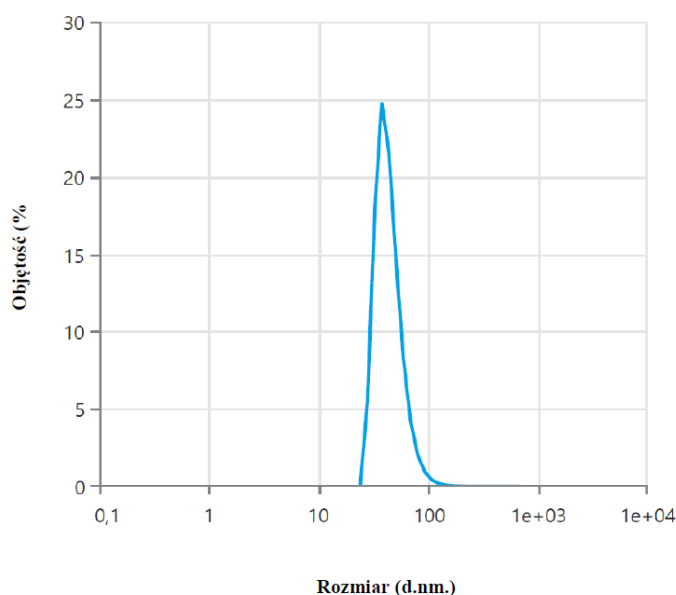
3.2.7. Preparatyka liposomów

Zastosowane w pracy liposomy przygotowano we współpracy z dr hab. Danutą Pentak, prof. Uniwersytetu Opolskiego. Liposomy ($\text{L}_{\text{DPPC/DOX}}$; $\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl}}$; $\text{L}_{\text{DPPC/Binimetynib}}$; $\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$; $\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}}$; $\text{L}_{\text{DPPC/DOX/Binimetynib}}$) otrzymano metodą odparowywania przy użyciu techniki faz odwróconych mREV (Modified Reverse Evaporation Method) [107], zachowując molowy stosunek DPPC:lek 30:1 i DPPC:lek:lek 30:1:1. Technika mREV polega na ciągłym mieszaniu określonych objętości roztworów fosfolipidów z nadmiarem rozpuszczalników organicznych. W procedurze zastąpiono ultradźwiękową dyspersję fazy wodnej w fazie organicznej dyspersją mechaniczną, która umożliwia całkowitą przemianę fosfolipidów do liposomów. Dyspersję lipidów (końcowe stężenie wynosiło $2,64 \times 10^{-2}$ M) zmniejszano z 0,34 ml 5×10^{-3} M Doksorubicyny ($\text{L}_{\text{DPPC/DOX}}$); 0,34 ml 5×10^{-3} M 9-PBThACl ($\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl}}$); 0,34 ml 5×10^{-3} M Binimetynibu ($\text{L}_{\text{DPPC/Binimetynib}}$); 0,34 ml 5×10^{-3} M Doksorubicyny i 9-PBThACl ($\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$); 0,34 ml 5×10^{-3} M 9-PBThACl i Binimetynibu ($\text{L}_{\text{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}}$); 0,34 ml 5×10^{-3} M

Dokсорubicyny i Binimetynibu ($L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$). Następnie dodano 2 ml buforu PBS o odpowiednim pH (5,50; 6,00; 6,50; 7,40) oraz 4 ml roztworu organicznego przygotowanego z dichlorometanu i chloroformu (3:1). W celu ujednolicenia wymiarowości analizowanych struktur zastosowano standardową metodę homogenizacji przy użyciu miniwytłaczarki Avanti z filtrem 100 nm. Średni czas potrzebny do przygotowania liposomów nie przekroczył 12 min.

3.2.8. Rozkład wielkości cząstek formulacji liposomalnej

Pomiary wielkości cząstek wykonano przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła (DLS) na urządzeniu Zetasizer Advance Malvern Panalytical.



Rysunek 28. Rozkład wielkości cząstek formulacji liposomalnej.

Widmo (Rysunek 28) określa wielkość cząsteczek. Widoczny jest wąski pojedynczy pik poniżej 100 nm (ok. 70 nm). Świadczy o dobrze zdyspergowanej próbce. Rozkład według objętości jest bardziej reprezentatywny dla rzeczywistego składu mieszaniny, ponieważ redukuje wpływ dużych cząstek.

3.2.9. Preparatyka roztworów i próbek

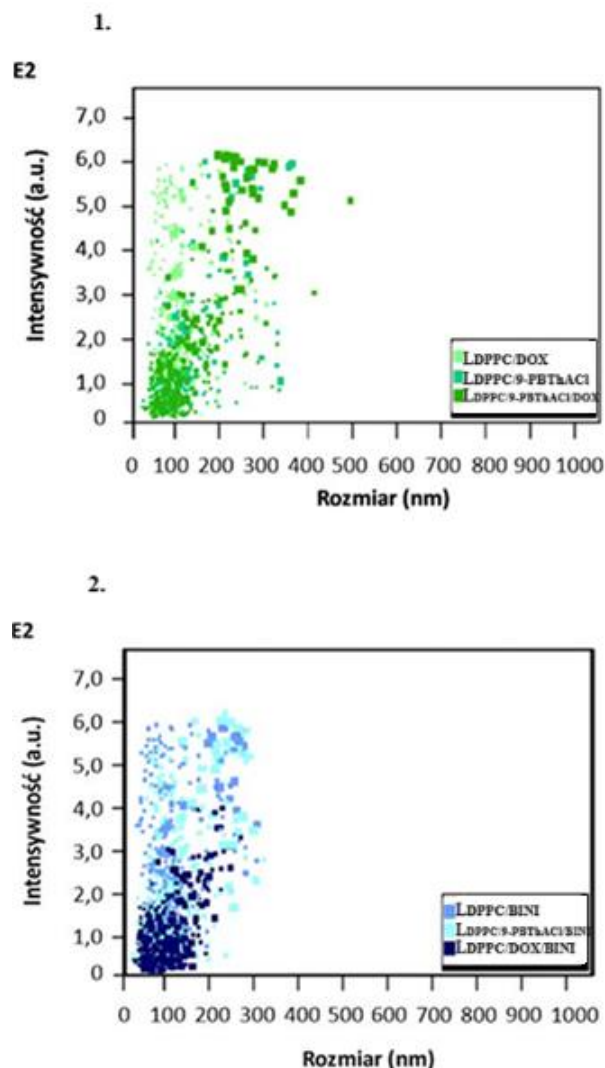
Do pomiarów UV/Vis przygotowano 0,05 M buforu fosforanowe (PBS) o pH: 5,50 (0,17 g K_2HPO_4 i 6,75 g NaH_2PO_4), 6,00 (0,055 g K_2HPO_4 i 6,85 g NaH_2PO_4), 6,50 (1,45 g K_2HPO_4 i 5,75 g NaH_2PO_4) 7,40 (2,5 g K_2HPO_4 i 1 g NaH_2PO_4)

z odpowiednią ilością wody destylowanej, dodanej w celu uzyskania 500 ml całkowitej objętości. Do analizy interakcji albuminy zawierającej kwasy tłuszczowe (HSA) i pozbawionej kwasów tłuszczowych (dHSA) z L_{DPPC}/DOX , $L_{DPPC}/9-PBThACl$, $L_{DPPC}/Binimetynib$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib$, $L_{DPPC}/DOX/Binimetynib$ (5×10^3 M), zastosowano roztwory podstawowe o stężeniu 1×10^{-3} M w roztworze buforu PBS. Wszystkie mieszaniny użyte w reakcjach przygotowano w trzech powtórzeniach, umożliwiając przeprowadzenie analizy statystycznej.

3.2.10. Pomiar wielkości liposomów

Średnice liposomów L_{DPPC}/DOX , $L_{DPPC}/9-PBThACl$, $L_{DPPC}/Binimetynib$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib$, $L_{DPPC}/DOX/Binimetynib$ zmierzono w temperaturze pokojowej za pomocą instrumentu NanoSight NS300 (NanoSight, Malvern, Wielka Brytania) i poddano analizie śledzenia nanocząstek (NTA), uzyskując rozkład wielkości i stężenie (cząstki/ml). Sprzęt był wyposażony w kamerę CMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) i laser o długości fali 488 nm. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach, umożliwiając przeprowadzenie analizy statystycznej. Do analizy wykorzystano oprogramowanie NTA 3.2 Dev Build 3.2.16.

Analiza śledzenia nanocząstek (NTA) jest metodą powszechnie stosowaną do oznaczania ilościowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w próbkach biologicznych w zakresie od 10 do 1000 nm w oparciu o analizę ruchów Browna. Krytyczną ocenę L_{DPPC}/DOX , $L_{DPPC}/9-PBThACl$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX$, $L_{DPPC}/Binimetynib$, $L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib$, $L_{DPPC}/DOX/Binimetynib$ przeprowadzono w celu określenia rozkładu wielkości badanych kompleksów liposomalnych jako potencjalnych nośników leków. Ograniczona liczba ogromnych agregatów liposomalnych (wielkość > 300 nm) nie wpływa na średni rozkład wielkości analizowanych kompleksów (Rysunek 29).



Rysunek 29. Rozkład wielkości w liposomach $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$ i $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ (1.). Rozkład wielkości w liposomach $L_{DPPC/Binimetynib}$, $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$ i $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ (2.).

3.2.11. Badanie stabilności

Do analizy stabilności przygotowanych mieszanin liposomalnych wybrano okres pięciu tygodni, podczas którego próbki przechowywano w temperaturze 4°C.

3.2.12. Pomiary UV/Vis

Widma absorpcji 9-PBThACl, Doksorubicyny, Binimetynibu, liposomalnej postaci $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$, $L_{DPPC/Binimetynib}$, $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$, $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ oraz układów liposom-lek-albumina (HSA/dHSA) $[L_{DPPC/DOX}]:HSA$, $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA$, $[L_{DPPC/Binimetynib}]:HSA$, $[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA$, $[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:HSA$, $[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA$, $[L_{DPPC/DOX}]:dHSA$, $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA$, $[L_{DPPC/Binimetynib}]:dHSA$.

PBThACl]:dHSA, [L_{DPPC}/Binimetynib]:dHSA, [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:dHSA, [L_{DPPC}/PBThACl/Binimetynib]:dHSA, [L_{DPPC}/DOX/Binimetynib]:dHSA, rejestrowano za pomocą spektrometru Lambda Bio 40 (Per-kin Elmer, Walthman, MA, USA), wyposażonego w automatyczny regulator temperatury PTP-1 (Perkin Elmer, Walthman, MA, USA). Utrzymywano temperaturę $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ i $41 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Wszystkie widma rejestrowano po ustabilizowaniu próbek za pomocą automatycznego regulatora temperatury. Analizę spektralną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania UV WinLab Perkin Elmer.

3.2.13. Wydajność zamykania leku

Po przygotowaniu liposomów, poddano je dializie w celu oddzielenia kapsułkowanego leku od jego niekapsułkowanej formy. Alikwoty (8 ml) liposomalnej formy dyspersji analizowanego leku umieszczono w rurce dializacyjnej Float-A-Lyzer G2 (Spectra/Por) z estru celulozy (Spectra/Por®, 8-10 kilodaltonów MWCO, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA), zanurzonej w 50 ml buforu w temperaturze 4°C z mieszaniem magnetycznym przy 360 obr./min. Następnie próbki pobrane z roztworu odbierającego zastąpiono takimi samymi objętościami świeżego buforu i oznaczono spektrofotometrycznie przy długościach fal: 233 nm dla DOX, 488 nm dla 9-PBThACl i przy 257 nm dla Binimetynibu. Do analizy stężenia zamkniętego leku zastosowano krzywą standardową leku, mierząc maksymalną absorbancję DOX (λ_{max} 233 nm), 9-PBThACl (λ_{max} 488 nm) i Binimetynibu (λ_{max} 257 nm). Wydajności kapsułkowania (EE%) 9-PBThACl, DOX i Binimetynibu zamkniętych w liposomach obliczono zgodnie z równaniem 3:

$$EE\% = \frac{C_{\text{całkowite}} - C_{\text{wolne}}}{C_{\text{całkowite}}} \times 100 \quad (3)$$

Na podstawie równania 4 obliczono obciążenie lekiem (DL%)

$$DL\% = \frac{C_{\text{całkowite}} - C_{\text{wolne}}}{C_{\text{całkowite lipidu}}} \times 100 \quad (4)$$

Gdzie:

$C_{\text{całkowite}}$ – całkowite stężenie leku

C_{wolne} – stężenie leku (w wolnej postaci) w supernatancie

$C_{\text{całkowite lipidu}}$ – całkowite stężenie lipidów

3.2.14. Badanie uwalniania leku i modelowanie matematyczne

Badanie uwalniania 9-PBThACl, DOX i Binimetynibu z liposomów ($L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$; $L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}$; $L_{DPPC/DOX/binimetynib}$) i kompleksów z albuminą [$L_{DPPC/DOX}$]:HSA, [$L_{DPPC/9-PBThACl}$]:HSA, [$L_{DPPC/Binimetynib}$]:HSA, [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:HSA, [$L_{DPPC/PBThACl/Binimetynib}$]:HSA, [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]:HSA, [$L_{DPPC/DOX}$]:dHSA, [$L_{DPPC/9-PBThACl}$]:dHSA, [$L_{DPPC/Binimetynib}$]:dHSA, [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:dHSA, [$L_{DPPC/PBThACl/Binimetynib}$]:dHSA, [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]:dHSA, przeprowadzono w temperaturze 37°C i 41°C przez 5 godzin. Do określenia stopnia uwalniania leku z liposomów wykorzystano spektrofotometrię. Podczas pierwszych 60 minut eksperymentu, pomiary rejestrowano w odstępach 5-minutowych. Następnie pomiary były rejestrowane co 15 minut. Uwalnianie leku (R%) obliczono zgodnie z równaniami 5 i 6:

$$R(\%) = \frac{([x]_f - [x]_{fo})}{([x]_t \times EE\%)} \times 100 \quad (5)$$

Gdzie:

R(%) – procent uwolnienia kapsułkowanego leku

$[x]_f$ – stężenie uwolnionego leku

$[x]_{fo}$ – początkowe stężenie leku niekapsułkowanego

EE% – procent kapsułkowania leku

$$[x]_t = \frac{[x]_{to}}{\beta} \quad (6)$$

Gdzie:

$[x]_{to}$ – oznacza stężenie całkowite leku w liposomach

β – rozcieńczenie

3.2.15. Analiza statystyczna

Wszystkie eksperymenty i pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a dane przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania OriginPro 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Obliczenia PCA, HCA i ANOVA [108] przy użyciu programu MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA) zostały wykonane przez prof. dr hab. Andrzeja Bąka z Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach.

3.2.16. Rozkład prawdopodobieństwa Weibulla

Rozkład prawdopodobieństwa Weibulla zastosowany w modelowaniu krzywych uwalniania określono według następującego wzoru 7:

$$m = m_{\infty} [1 - e^{-(\frac{t}{t_d})^{\beta}}] \quad (7)$$

Gdzie:

m – procent uwolnienia substancji czynnej w czasie t

m_{∞} – asymptota uwolnienia ($m_{\infty} = 100\%$)

t_d – parametr określający skalę czasową procesu

β – parametr charakteryzujący kształt krzywej uwalniania (jeżeli $\beta=1$ funkcja pokazuje wzrost wykładniczy, $\beta<1$ paraboliczny, $\beta>1$ sigmoidalny)

4. ANALIZA I DYSKUSJA WYNIKÓW

4.9. Analiza stopnia enkapsulacji

Analizę stopnia enkapsulacji 9-PBThACl, Doksorubicyny i Binimetynibu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną dla układów liposomalnych, o pH środowiska zmieniającym się w zakresie od 5,50 do 7,40. Pomiar absorpcji przeprowadzono odpowiednio przy długościach fal: 488 nm dla 9-PBThACl, 233 nm dla DOX oraz 257 nm dla Binimetynibu. Wykreślono krzywe absorpcji w funkcji stężenia. W tabelach (7-10) przedstawiono wydajność enkapsulacji (EE%) odpowiednio: 9-PBThACl, DOX i Binimetynibu w liposomach. Na podstawie równania (4) określono obciążenie lekiem (DL%) dla wartości pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 (Tabele 11-15). Uzyskane wyniki potwierdziły wpływ pH buforu na stopień kapsułkowania badanych związków.

Tabela 7. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACl, DOX, Binimetynibu w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl, L_{DPPC}/DOX, L_{DPPC}/Binimetynib dla różnych wartości pH.

pH	Wydajność kapsułkowania ($\pm$ std) ^a [%]		
	9-PBThACl w L _{DPPC} /9-PBThACl	DOX w L _{DPPC} /DOX	Binimetynib w L _{DPPC} /Binimetynib
5,50	100,00 $\pm$ 0,00	76,06 $\pm$ 1,92	74,00 $\pm$ 1,90
6,00	81,28 $\pm$ 2,43	92,74 $\pm$ 2,20	51,52 $\pm$ 2,10
6,50	74,69 $\pm$ 1,96	95,50 $\pm$ 2,35	51,74 $\pm$ 2,21
7,40	91,96 $\pm$ 2,15	100,00 $\pm$ 0,00	54,09 $\pm$ 1,98

^a Odchylenie standardowe

Najwyższą wydajność kapsułkowania związku chemicznego 9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl}$, wynoszącą 100%, osiągnięto przy pH=5,50. Taki sam wynik uzyskano dla DOX w $L_{DPPC/DOX}$ przy pH=7,40. W przypadku Binimetynibu w $L_{DPPC/Binimetynib}$ maksymalna wydajność wyniosła 74% i wystąpiła przy pH=5,50. Najniższą wydajność kapsułkowania 9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl}$ na poziomie 74,69% odnotowano przy pH=6,50. Dla DOX w $L_{DPPC/DOX}$ minimalna wydajność wyniosła 76,06% i wystąpiła przy pH=5,50. Natomiast najniższa wydajność dla Binimetynibu w $L_{DPPC/Binimetynib}$, wynosząca 51,52% została uzyskana przy pH=6,00. Podsumowując, najwyższe wydajności kapsułkowania osiągnięto przy różnych wartościach pH w zależności od rodzaju leku, jednak 9-PBThACl i DOX uzyskały maksymalny poziom 100%, a Binimetynib 74%. Najniższe wartości kapsułkowania również były zależne od pH. Wyniki te wskazują, że efektywność kapsułkowania jest uzależniona od pH środowiska.

Tabela 8. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACl i DOX w liposomach $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ dla różnych wartości pH.

pH	Wydajność kapsułkowania ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$	DOX w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$
5,50	75,96 $\pm$ 3,11	69,55 $\pm$ 3,40
6,00	53,00 $\pm$ 2,80	77,37 $\pm$ 3,79
6,50	22,16 $\pm$ 1,17	40,37 $\pm$ 1,97
7,40	44,88 $\pm$ 2,37	52,48 $\pm$ 2,57

Najwyższą wydajność kapsułkowania 9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$, wynoszącą 75,96%, osiągnięto przy pH=5,50. W przypadku DOX w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ na poziomie 77,37% przy pH=6,00. Najniższą wydajność kapsułkowania 9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ na poziomie 22,16% odnotowano przy pH=6,50. Dla DOX w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ minimalna wydajność wyniosła 40,37% i wystąpiła przy pH=6,50. Podsumowując, najwyższe wydajności kapsułkowania osiągnięto przy różnych wartościach pH w zależności od rodzaju związku. Najniższe wartości kapsułkowania również były zależne od pH. Wyniki te potwierdzają, że efektywność kapsułkowania jest uzależniona od pH środowiska.

Tabela 9. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACI i Binimetynibu w liposomach L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib} dla różnych wartości pH.

pH	Wydajność kapsułkowania ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACI w L _{DPPC/9-}	Binimetynib w L _{DPPC/9-}
	PBThACI/Binimetynib	PBThACI/Binimetynib
5,50	63,08 $\pm$ 2,36	11,49 $\pm$ 2,15
6,00	92,32 $\pm$ 2,28	37,22 $\pm$ 2,62
6,50	99,84 $\pm$ 2,02	56,11 $\pm$ 2,50
7,40	98,10 $\pm$ 2,42	55,77 $\pm$ 2,69

Najwyższą wydajność kapsułkowania 9-PBThACI w L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}, wynoszącą 99,84%, osiągnięto przy pH=6,50. W takim samym pH maksymalną wydajność dla Binimetynibu w L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib} uzyskano na poziomie 56,11%. Najniższą wydajność kapsułkowania 9-PBThACI w L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib} na poziomie 63,08% odnotowano przy pH=5,50. W takim samym pH dla Binimetynibu w L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib} uzyskano minimalną wydajność na poziomie 11,49%. Podsumowując, najwyższe i najniższe wydajności kapsułkowania osiągnięto przy takich samych wartościach pH w zależności od rodzaju związku.

Tabela 10. Wydajność procentowa kapsułkowania DOX i Binimetynibu w liposomach L_{DPPC/DOX/Binimetynib} dla różnych wartości pH.

pH	Wydajność kapsułkowania ($\pm$ std) ^a [%]	
	DOX w L _{DPPC/DOX/Binimetynib}	Binimetynib w L _{DPPC/DOX/Binimetynib}
5,50	69,24 $\pm$ 2,82	20,47 $\pm$ 3,30
6,00	69,78 $\pm$ 3,05	21,28 $\pm$ 3,25
6,50	60,22 $\pm$ 2,75	1,52 $\pm$ 0,25
7,40	45,18 $\pm$ 2,31	43,51 $\pm$ 1,52

Najwyższą wydajność kapsułkowania DOX w L_{DPPC/DOX/Binimetynib}, wynoszącą 69,78%, osiągnięto przy pH=6,00. W pH=7,40 maksymalną wydajność dla Binimetynibu w L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib} uzyskano na poziomie 43,51%. Najniższą wydajność kapsułkowania DOX w L_{DPPC/DOX/Binimetynib} na poziomie 45,18% odnotowano przy pH=7,40. W pH=6,50 dla Binimetynibu w L_{DPPC/DOX/Binimetynib} uzyskano minimalną wydajność na poziomie 1,52%. Podsumowując, najwyższe i najniższe wydajności kapsułkowania osiągnięto przy różnych wartościach pH w zależności od rodzaju związku. Wyniki te potwierdzają, że efektywność kapsułkowania jest uzależniona od pH środowiska.

Tabela 11. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i DOX liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ i $L_{DPPC/DOX}$ dla różnych wartości pH.

pH	Ładowność leku ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl}$	DOX w $L_{DPPC/DOX}$
5,50	6,53 $\pm$ 0,35	6,56 $\pm$ 0,39
6,00	6,50 $\pm$ 0,33	6,58 $\pm$ 0,34
6,50	6,49 $\pm$ 0,33	6,59 $\pm$ 0,32
7,40	6,51 $\pm$ 0,28	6,60 $\pm$ 0,44

Najwyższe obciążenie liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ związkiem chemicznym 9-PBThACl wynoszące 6,53%, uzyskano przy pH=5,50, natomiast najniższą wartość na poziomie 6,49% odnotowano przy pH=6,50. W przypadku DOX maksymalne obciążenie liposomów $L_{DPPC/DOX}$, wynoszące 6,60%, osiągnięto przy pH=7,40, podczas gdy najniższe, na poziomie 6,56%, wystąpiło przy pH=5,50. Obciążenie lekiem jest zależne od pH środowiska, co może wskazywać na różnice w interakcji liposom-lek.

Tabela 12. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i DOX liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ dla różnych wartości pH.

pH	Ładowność leku ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$	DOX w $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$
5.50	6,58 $\pm$ 0,36	6,57 $\pm$ 0,39
6.00	6,55 $\pm$ 0,38	6,59 $\pm$ 0,46
6.50	6,49 $\pm$ 0,31	6,52 $\pm$ 0,32
7.40	6,53 $\pm$ 0,37	6,54 $\pm$ 0,39

Najwyższe obciążenie liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ związkiem chemicznym 9-PBThACl wynoszące 6,58%, uzyskano przy pH=5,50, natomiast najniższą wartość na poziomie 6,49% odnotowano przy pH=6,50. W przypadku DOX maksymalne obciążenie liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$, wynoszące 6,59%, osiągnięto przy pH=6,00, podczas gdy najniższe, na poziomie 6,52%, wystąpiło przy pH=6,50. Obciążenie lekiem jest zależne od pH środowiska.

Tabela 13. Obciążenie lekiem (DL%) Binimetynibem liposomów L_{DPPC}/Binimetynib dla różnych wartości pH.

pH	Ładowność leku ($\pm$ std) ^a [%]
	Binimetynib w L _{DPPC} /Binimetynib
5,50	6,51 $\pm$ 0,27
6,00	6,47 $\pm$ 0,29
6,50	6,48 $\pm$ 0,25
7,40	6,47 $\pm$ 0,28

Najwyższe obciążenie liposomów L_{DPPC}/Binimetynib Binimetynibem wynoszące 6,51%, uzyskano przy pH=5,50, natomiast najniższą wartość na poziomie 6,47% odnotowano przy pH=6,00 oraz pH=7,40. Obciążenie lekiem jest zależne od pH środowiska.

Tabela 14. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i Binimetynibem liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib dla różnych wartości pH.

pH	Ładowność leku ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl w L _{DPPC} /9-	Binimetynib w L _{DPPC} /9-
	PBThACl/Binimetynib	PBThACl/Binimetynib
5.50	6,61 $\pm$ 0,24	6,49 $\pm$ 0,29
6.00	6,66 $\pm$ 0,26	6,53 $\pm$ 0,35
6.50	6,67 $\pm$ 0,27	6,56 $\pm$ 0,24
7.40	6,67 $\pm$ 0,27	6,56 $\pm$ 0,24

Najwyższe obciążenie liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib związkiem chemicznym 9-PBThACl wynoszące 6,67%, uzyskano przy pH=6,50 i pH=7,40, natomiast najniższą wartość na poziomie 6,61% odnotowano przy pH=5,50. W takich samych warunkach pH otrzymano maksymalne i minimalne obciążenia liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib Binimetynibem, wynoszącym kolejno dla maksymalnego obciążenia 6,56%, a najniższego na poziomie 6,49%. Obciążenie lekiem było zależne od pH, jednak zarówno maksymalne, jak i minimalne wartości każdego związku występowały w tych samych warunkach pH. Wyniki te wskazują na istotną rolę pH w procesie kapsułkowania, jednak każdy związek wykazuje specyficzne właściwości w określonym zakresie.

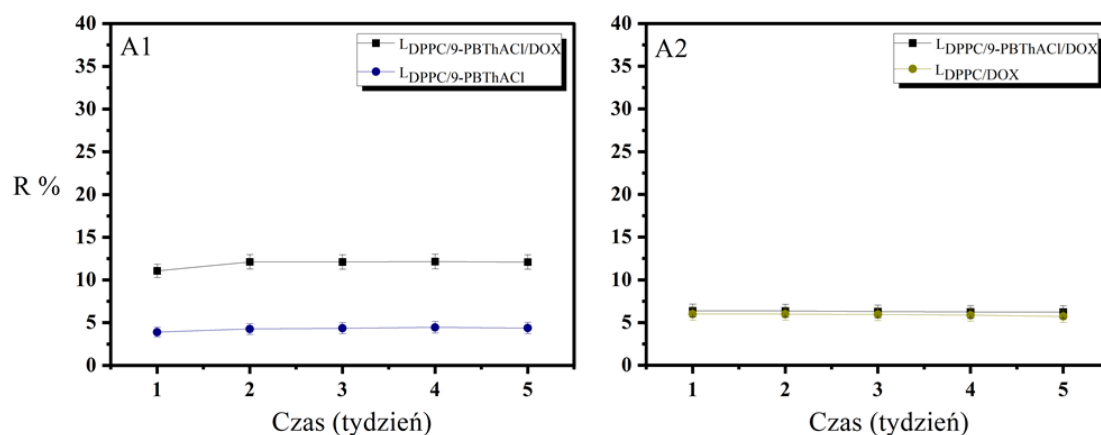
Tabela 15. Obciążenie lekiem (DL%) DOX i Binimetynibem liposomów $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ dla różnych wartości pH.

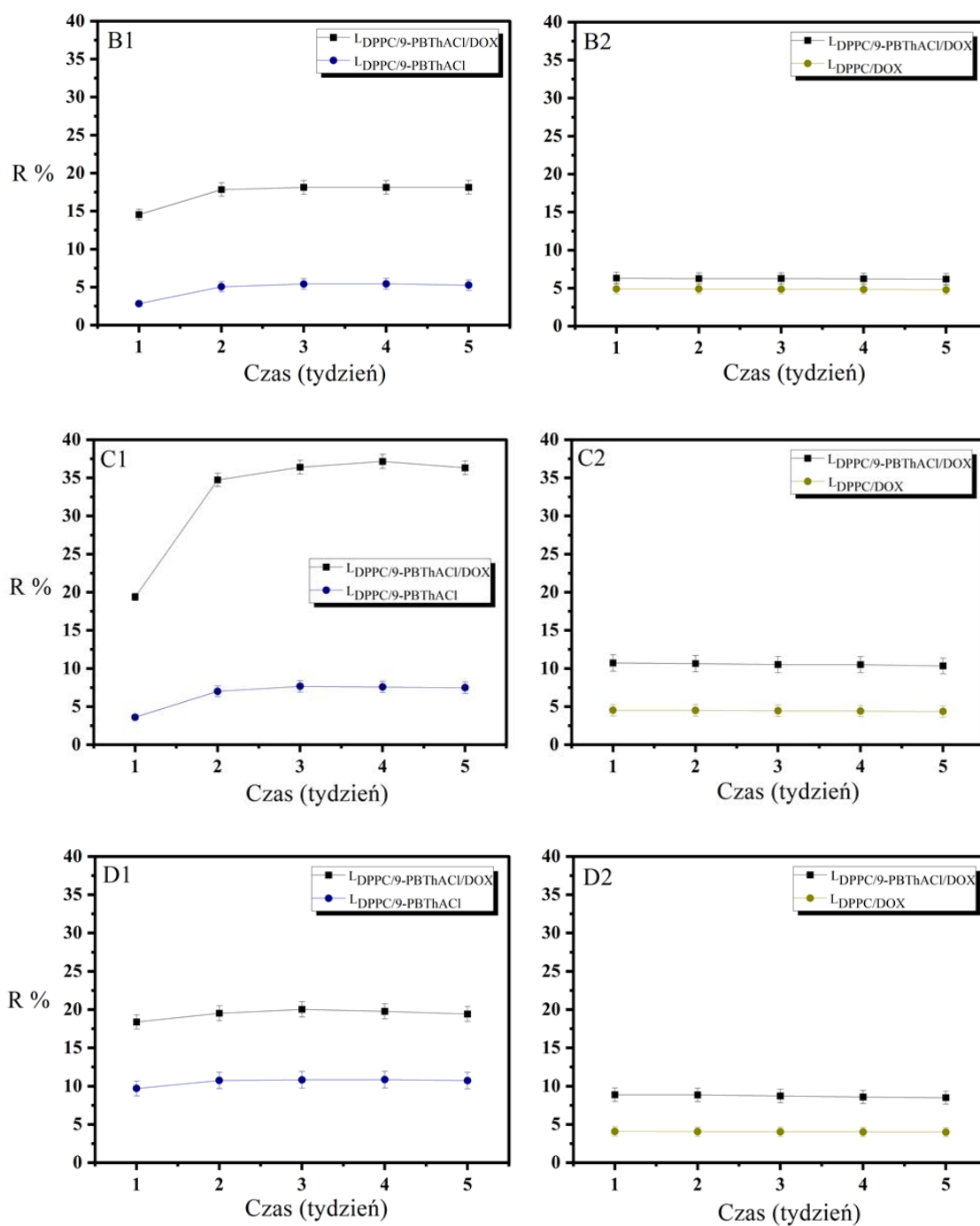
pH	Ładowność leku ($\pm$ std) ^a [%]	
	DOX w $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$	Binimetynib w $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$
5.50	6,59 $\pm$ 0,25	6,55 $\pm$ 0,28
6.00	6,59 $\pm$ 0,25	6,55 $\pm$ 0,26
6.50	6,58 $\pm$ 0,26	6,52 $\pm$ 0,25
7.40	6,55 $\pm$ 0,29	6,59 $\pm$ 0,27

Najwyższe obciążenie liposomów $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ DOX wynoszące 6,59%, uzyskano przy pH=5,50 i pH=6,00, natomiast najniższą wartość na poziomie 6,55% odnotowano przy pH=7,40. W przypadku Binimetynibu maksymalne obciążenie liposomów $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$, wynoszące 6,59%, osiągnięto przy pH=7,40, podczas gdy najniższe, na poziomie 6,52%, wystąpiło przy pH=6,50. Obciążenie lekiem jest zależne od pH środowiska.

4.10. Trwałość preparatów liposomalnych na przykładzie $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$

Badania nad nowymi potencjalnymi nośnikami leków skupiają się głównie na ocenie stabilności fizycznej i chemicznej. Dane stanowią podstawę do określenia warunków opracowywania formuły leków i ich przechowywania. Czynniki fizykochemiczne mają istotny wpływ na trwałość samych substancji lekowych oraz struktury ich transportu. Analiza stabilności otrzymanego preparatu liposomalnego została przeprowadzona przez okres 5 tygodni. W trakcie trwania pomiarów, próbki były przechowywane w temperaturze 4°C, co pozwoliło na dokładną ocenę stabilności. Wyniki badań oparte na cotygodniowym rejestrowaniu szybkości uwalniania leku i substancji chemicznej (R%) obliczone zgodnie z równaniami (5) i (6) przedstawione na rysunku 30 (A1-D2).





Rysunek 30. Profil uwalniania leku i substancji lekowej (R%) 9-PBThACl, DOX z DPPC/lek/lek i DPPC/kompleksy lekowe dla różnych wartości pH: (A1-2: pH=5,50), (B1-2: pH=6,00), (C1-2: pH= 6,50), (D1-2 pH=7,40).

Największe różnice podczas uwalniania analizowanych związków zaobserwowano przy pH 6,5 dla kompleksów liposomalnych $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ vs $L_{DPPC/9-PBThACl}$ i $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ vs $L_{DPPC/DOX}$, osiągając średnio ~28–30% odpowiednio dla 9-PBThACl i ~5% dla DOX. Przy tej samej wartości pH procent kapsułkowania DOX i 9-PBThACl w formulacji

liposomalnej $L_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$ był również mniejszy (Tabela 8), osiągając 22,16% dla 9-PBThACl 40,37% dla DOX.

Z badań wynika, że procent uwalniania leków z liposomów zależy zarówno od otaczającego pH, jak i umiejscowienia w nanonośnikach. Generalnie związki hydrofilowe zlokalizowane są w centralnej strefie liposomów, natomiast hydrofobowe są wbudowane w dwuwarstwę fosfolipidową. W konsekwencji samo ułożenie leku w strukturze liposomu determinuje stopień jego uwolnienia. W rzeczywistości cząsteczki zamknięte w strefie hydrofilowej muszą przedostać się przez dwuwarstwę fosfolipidową, dlatego błona liposomalna musi znajdować się w fazie ciekłej, która jest nieuporządkowana i nieszczelna. Płynność dwuwarstwy jest związana z wieloma czynnikami takimi jak:

- charakter i wartość ładunków elektrostatycznych „głów” fosfolipidów tworzących strukturę liposomalną,
- długość łańcuchów kwasów tłuszczowych obecnych w fosfolipidach,
- liczba wiązań nienasyconych w fosfolipidach,
- stężenie cząsteczek cholesterolu i białka.

Ze względu na brak wiązań kowalencyjnych, dwuwarstwa liposomalna nie jest strukturą sztywną. W rzeczywistości obserwuje się dwojakie interakcje pomiędzy elementami budulcowymi membrany, które wyznaczają obszar powierzchniowy (polarny) oraz strefę wewnętrzną (hydrofobową). W cząsteczkach pozbawionych trwałego momentu dipolowego może wystąpić przypadkowa fluktuacja gęstości elektronowej, powodująca pojawienie się chwilowego momentu dipolowego. Pojawiające się pole siłowe otaczające cząsteczkę może wywołać polaryzację sąsiedniej cząsteczki wraz z wygenerowaniem kolejnego momentu dipolowego. Powyższe zjawisko może zachodzić w obrębie całej dwuwarstwy. Siła oddziaływań dyspersyjnych osiąga maksymalne wartości dla cząsteczek ustawionych równolegle do siebie. W związku z tym siły Van der Waalsa dążą do równoległego ułożenia łańcuchów węglowodorowych – im bliżej, tym lepiej, ponieważ energia dyspersji jest odwrotnie proporcjonalna do odległości (r) pomiędzy oddziałującymi cząsteczkami (r^{-6}). Ponadto gęstość upakowania fosfolipidów zależy od proporcji pomiędzy wielkością „głowy”, a pozostałą częścią hydrofobową cząsteczki. Hydrofilowe obszary dwuwarstwy fosfolipidowej stanowią polarne lipidy, oddziałujące jako jon-jon, jon-dipol, dipol-dipol lub wiązania wodorowe. Ponadto granica międzyfazowa z zaabsorbowanymi cząsteczkami wody

jest również istotnym składnikiem dwuwarstwy fosfolipidowej, szczególnie w przypadku glikolipidów tworzących barierę energetyczną dla transportu cząsteczek hydrofobowych. Silne właściwości adsorpcyjne jonów wielowartościowych odgrywają istotną rolę w tworzeniu polarnych (szczególnie zjonizowanych) części fosfolipidów znajdujących się na granicy błony (tzw. sieciowaniu „głowy” fosfolipidów). Dokсорubicyna, podobnie jak 9-PBThACl jest cząsteczką hydrofilową. Wydaje się, że DOX jest prawdopodobnie związana z dwuwarstwą polarną poprzez stosunkowo słabe oddziaływania. Powstała dezorganizacja obszaru polarnego błony ułatwia uwalnianie cząsteczek 9-PBThACl, które są zlokalizowane w centralnej hydrofilowej części liposomu. Każda modyfikacja struktury dwuwarstwowej polegająca na wprowadzeniu kolejnego składnika błony, nawet zlokalizowanego na powierzchni, bezpośrednio wpływa na proces uwalniania leku. Niewątpliwie zwiększa się powierzchnia dwuwarstwy, co powoduje zmiany właściwości fizykochemicznych membrany.

4.11. Wpływ otaczającego pH na uwalnianie leku/ substancji chemicznej na przykładzie $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$. Analiza spektrofotometryczna.

Procedury przygotowawcze układów liposomalnych prowadzono tak, aby zachować stały stosunek analizowanych związków do fosfolipidów wynoszący 30:1:1 dla $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$, 30:1 dla $L_{DPPC/DOX}$ i $L_{DPPC/9-PBThACl}$. Szczegółowa analiza widm absorpcyjnych uzyskanych dla $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ pozwoliła na ocenę zmian zachodzących w kompleksie liposomalnym z dwiema cząsteczkami w tandemie ($L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$) (Rysunki 31 i 32).

Przyjęto następujące założenia:

a) $\Delta A = 0$,

Jeśli w przypadku odejmowania widm: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ od $L_{DPPC/9-PBThACl}$ lub $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ od $L_{DPPC/DOX}$; uzyskuje się zerową absorbancję, oznacza to brak interakcji pomiędzy analizowanymi związkami;

b) $\Delta A \neq 0$,

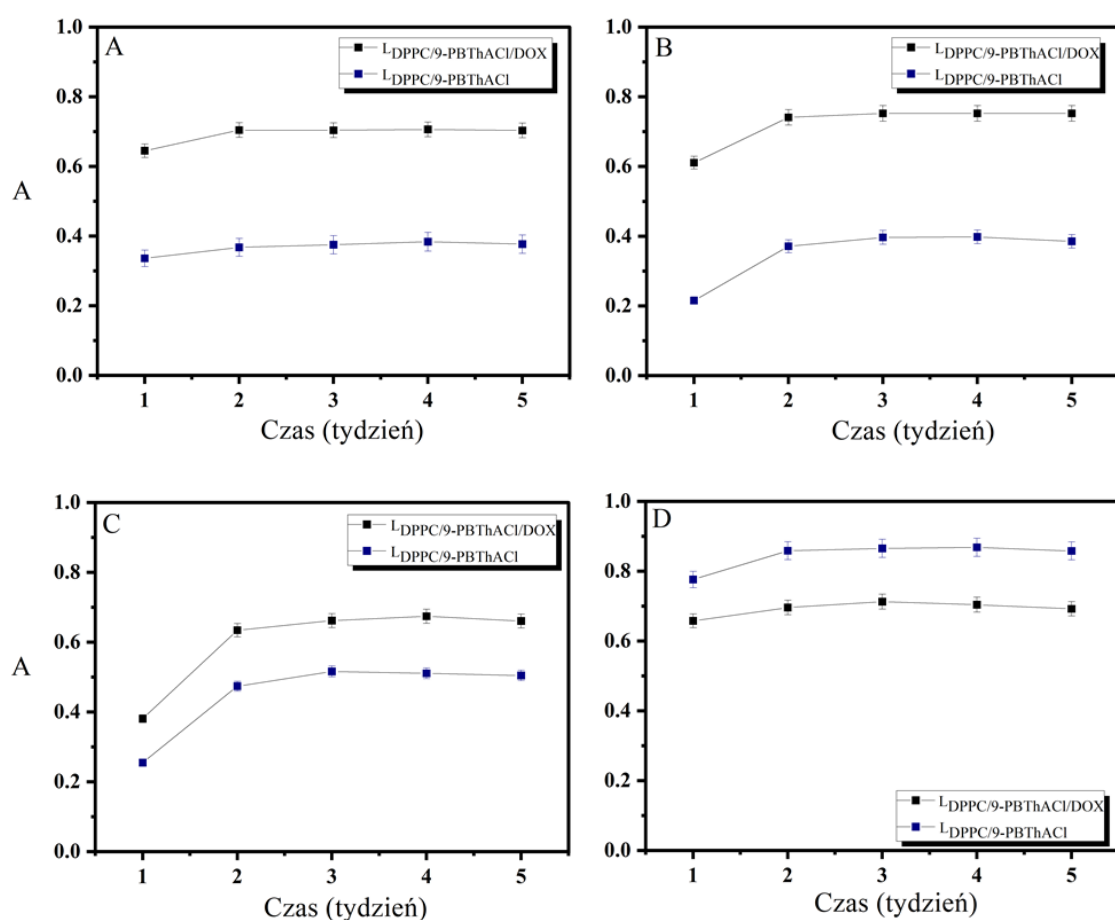
Jeśli w przypadku odejmowania widm: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ od $L_{DPPC/9-PBThACl}$ lub $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ od $L_{DPPC/DOX}$; uzyskuje się niezerową absorbancję, oznacza to interakcję w obrębie badanego kompleksu;

c) $\Delta A > 0$ and $\Delta A < 0$ są szczególnie istotne, ponieważ:

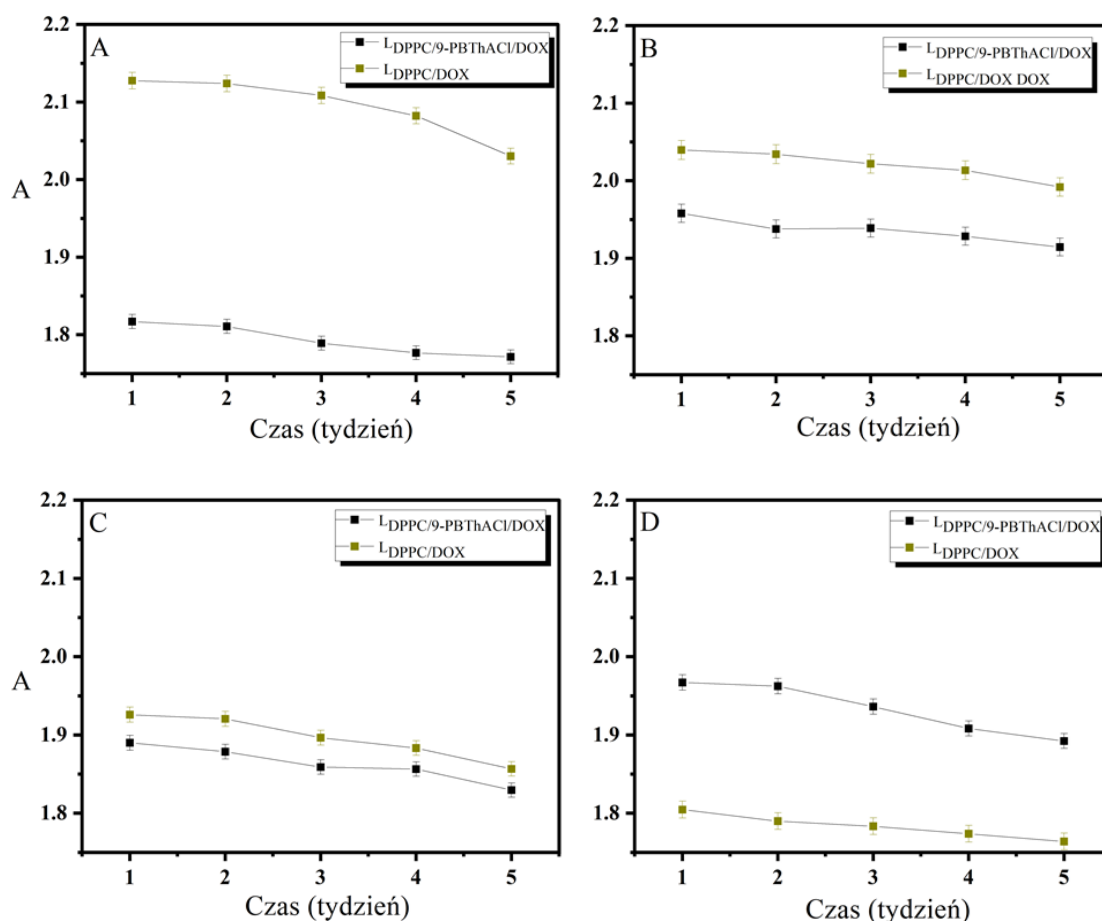
- $\Delta A > 0$, gdy absorbancja cząsteczki X w tandemie jest wyższa niż absorbancja samego X traktowanego jako wartość referencyjna. Wówczas wzrost absorbancji jest wynikiem zwiększonego stopnia uwalniania cząsteczki X, na który wpływa obecność związku Y.

- $\Delta A < 0$, gdy absorbancja cząsteczki X w kompleksie binarnym jest niższa w porównaniu z odpowiednią wartością A obserwowaną dla pojedynczego kompleksu traktowanego jako odniesienie. W tym przypadku spadek absorbancji wynika ze zmniejszonego stopnia uwalniania X, na który wpływa pojawienie się cząsteczki Y w tandemie.

Założenia wyjaśniają efekt konkurencyjny, podczas gdy 9-PBThACl jest zamykany, a następnie uwalniany z nanonośników fosfolipidowych.



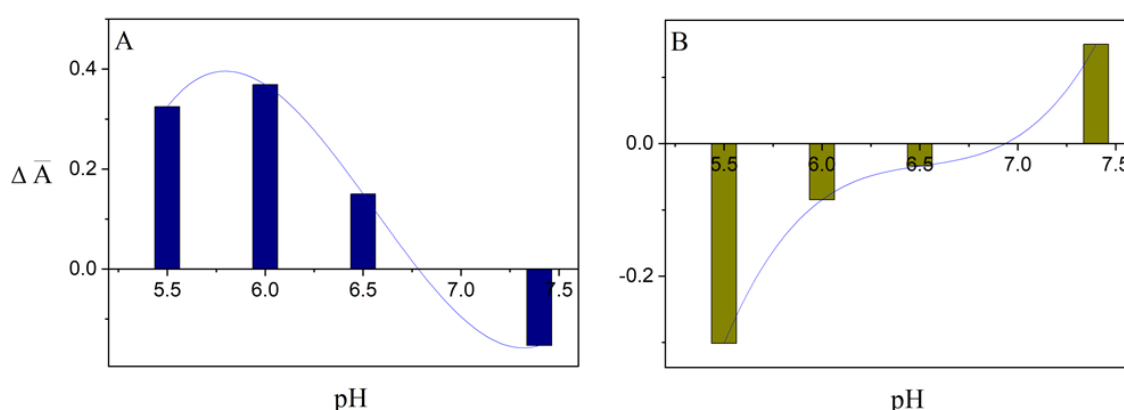
Rysunek 31. Wpływ 5-tygodniowej inkubacji kompleksów liposomalnych: L-DPPC/9-PBThACl/DOX; L-DPPC/9-PBThACl na absorbancję A ($A_{\lambda_{\max}}$ 9-PBThACl = 488nm); (A: pH=5,50) (B: pH=6,00), (C: pH=6,50), (D: pH=7,40).



Rysunek 32. Wpływ 5-tygodniowej inkubacji kompleksów liposomalnych: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$; $L_{DPPC/DOX}$ na absorbancję A ($A_{\lambda_{max}}$ DOX = 233nm); (A: pH=5,50), (B: pH=6,00), (C: pH=6,50), (D: pH=7,40).

Płynność dwuwarstwy fosfolipidowej wzrasta wraz ze wzrostem otaczającego pH. Wiązania wodorowe powstają prawdopodobnie pomiędzy atomem tlenu grupy fosforanowej wbudowanej w fosfolipidy, a atomem wodoru grupy hydroksylowej obecnej w cząsteczce DPPC. Jeśli pH środowiska przekroczy wartość 7,40, wówczas wiązania wodorowe istniejące w środowisku kwaśnym ulegają rozerwaniu, a w konsekwencji obserwuje się wzrost płynności dwuwarstwy. W badanym zakresie wartości pH (od 5,50 do 7,40) zauważalna regulacja płynności błony wpływa bezpośrednio na proces uwalniania leku i substancji chemicznej. Matematyczne dopasowanie funkcji do średnich wyników absorbancji rejestrowanych w kolejnych tygodniach inkubacji liposomów, różniących się od wartości pH (Rysunek 33.), jest porównywalne z krzywą ilustrującą wpływ pH na wartość parametru n . W zakresie pH 5,50–6,50 płynność dwuwarstwy fosfolipidowej jest niższa niż w pH=7,40. Przepływ 9-PBThACl w kierunku powierzchni membrany wzdłuż alifatycznych łańcuchów fosfolipidowych jest możliwy dzięki ewoluującemu upakowaniu fosfolipidów oraz

rosnącej relaksacji dwuwarstwy związanej ze wzrostem pH otoczenia. Ponadto obecność DOX w dwuwarstwie może bezpośrednio wpływać na przenikanie 9-PBThACI do otaczającego środowiska, a także odpowiednio wzmacniać lub osłabiać proces jego uwalniania. Prawdopodobnie DOX jest częściowo unieruchomiona w strefie hydrofilowej dwuwarstwy za pomocą wiązań wodorowych utworzonych z cząsteczkami DPPC. Konsekwencją takiego umiejscowienia jest zauważalne zaburzenie zwartej struktury dwuwarstwy, co ułatwia przenikanie przez niezwiązane cząsteczki 9-PBThACI. Na wykresach przedstawione są zarejestrowane zmiany charakterystyki uwalniania 9-PBThACI i DOX przy potencjalnej wartości odcięcia pH ($\text{pH} \approx 6,8$).



Rysunek 33. Wpływ otaczającego pH na średnią wartość absorbancji; (A: $L_{\text{DPPC/9-PBThACI/DOX}} - L_{\text{DPPC/9-PBThACI}}$, $A_{\lambda_{\text{max}}}=488\text{nm}$), (B: $L_{\text{DPPC/9-PBThACI/DOX}} - L_{\text{DPPC/DOX}}$, $A_{\lambda_{\text{max}}}=233\text{nm}$).

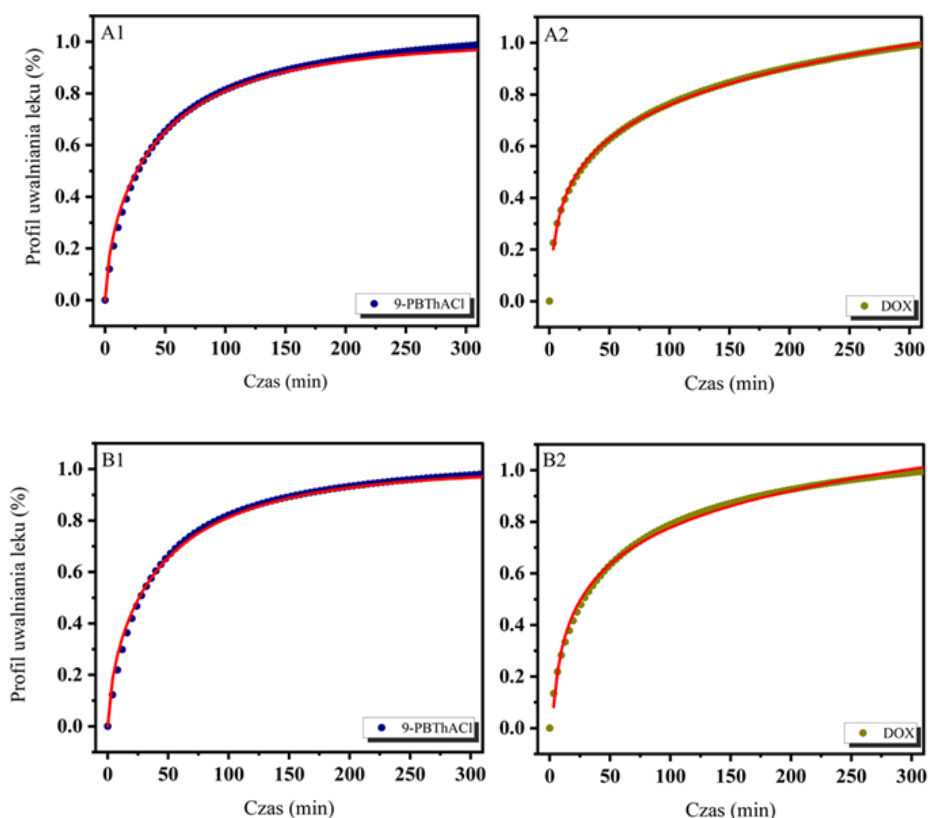
4.12. Ocena uwalniania leku *in vitro*

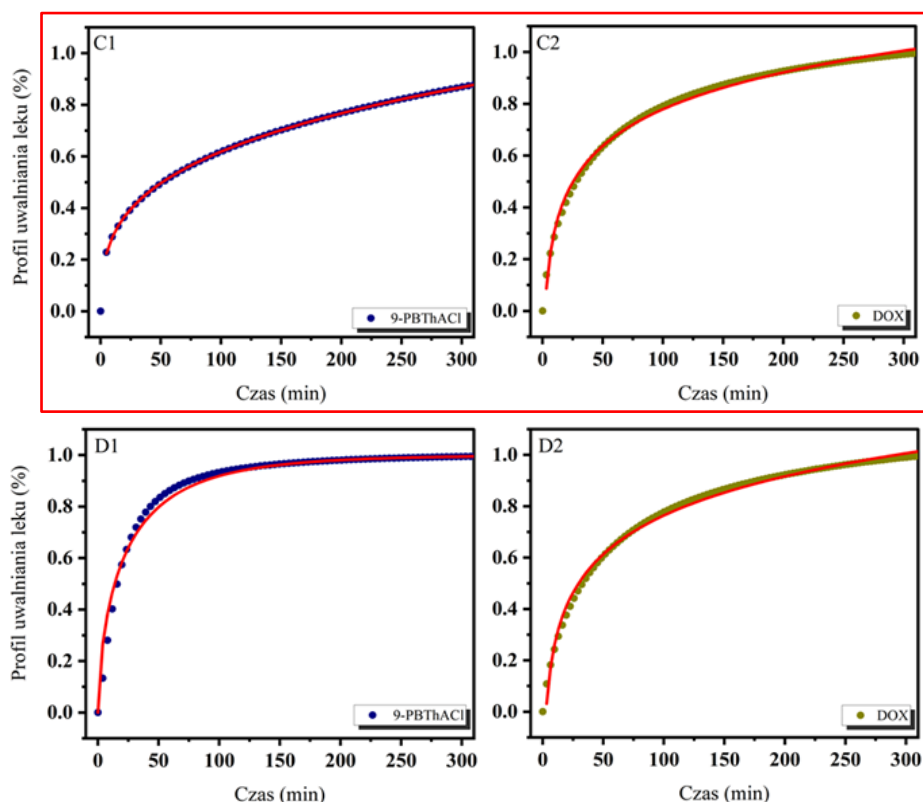
Proces uwalniania leku *in vitro* polega na określeniu, jak substancja czynna wydostaje się z nośnika w kontrolowanych warunkach. Umożliwia to prognozowanie jej dostępności biologicznej i skuteczności terapeutycznej. Celem takiego badania jest ocena szybkości i stopnia uwalniania leku oraz przewidywanie jego zachowania w organizmie. Czynniki, które mogą wpływać na uwalnianie leku, to między innymi: pH, temperatura, rozpuszczalność, lipofilowość, a także rodzaj nośnika. W celu analizy procesu uwalniania kapsułkowanych związków z liposomów składających się z dipalmitoilofosfatydylocholiny, jako głównego składnika błony, zastosowano sześć modeli matematycznych: First-Order, Bhaskas, Higuchi, Ritger-Peppas, Korsmeyer-Peppas oraz rozszerzenie klasycznego modelu Freundlicha (Rysunek 8). Badania szybkości uwalniania przeprowadzono w temperaturze 37°C i 41°C i w pH środowiska (5,50; 6,00; 6,50; 7,40). Dodatkowo procedura została rozszerzona o zastosowanie dwóch form albumin surowicy ludzkiej: HSA i dHSA. Kinetykę uwalniania powstałych kompleksów przedstawiono graficznie w funkcji czasu (1-300 min) (Rysunki 34-57). Zastosowanie modeli matematycznych do opisu procesu uwalniania badanych związków

pozwoiliło na wyznaczenie wartości liczbowych charakteryzujacych dany proces (Tabele A1-A12).

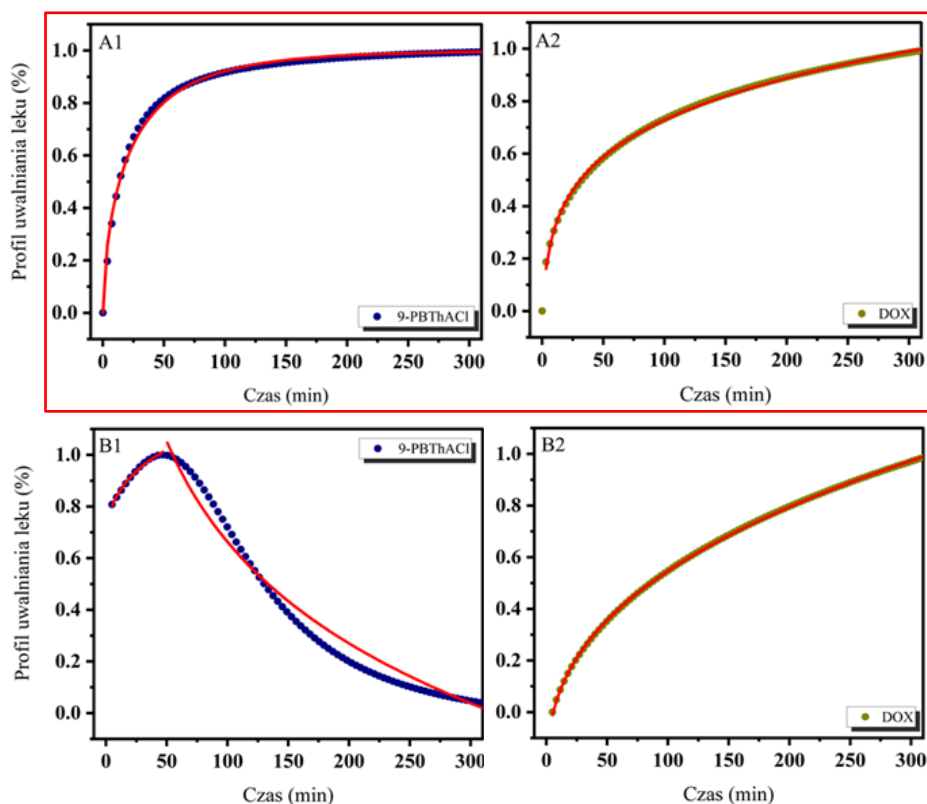
4.12.1. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ wraz z dopasowaniem parametrów do rónnych modeli kinetycznych.

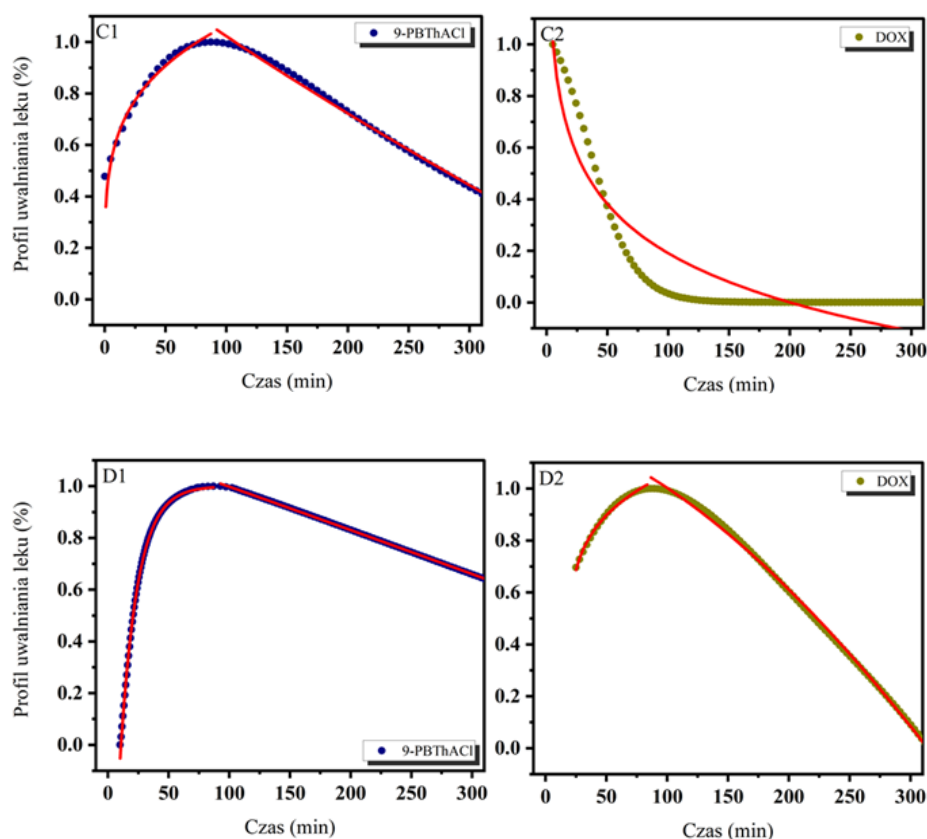
Profile uwalniania leku przedstawiaj¹ dynamikê uwalniania substancji aktywnej w czasie. Umożliwia to ocenê biodostêpnoœci, skutecznoœci oraz okreœla mechanizm uwalniania zwi¹zku z noœnika. Zwykle gdy liposomy s¹ stosowane do celów terapeutycznych lub diagnostycznych, sk³ad błony jest g³ównie dostosowany tak aby wykazywa³ zwiêkszon¹ przepuszczalnoœæ dla substancji otoczonych liposomami przy pH 5,00-6,50 (pH w tkankach nowotworowych mieœci siê w tym zakresie).





Rysunek 34. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThAcI}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThAcI, A2 – pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThAcI, B2 – pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThAcI, C2 – pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThAcI, D2 – pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

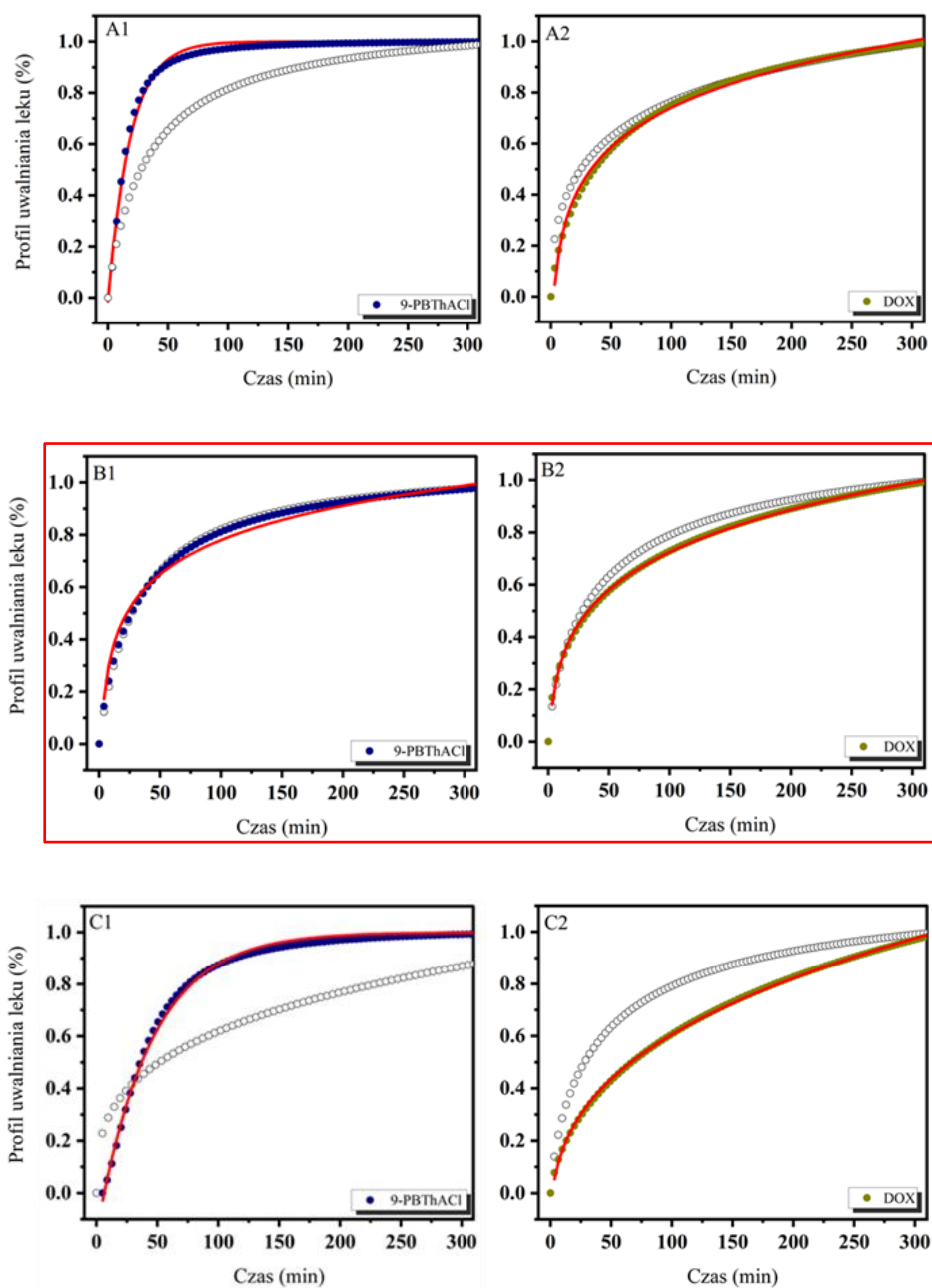


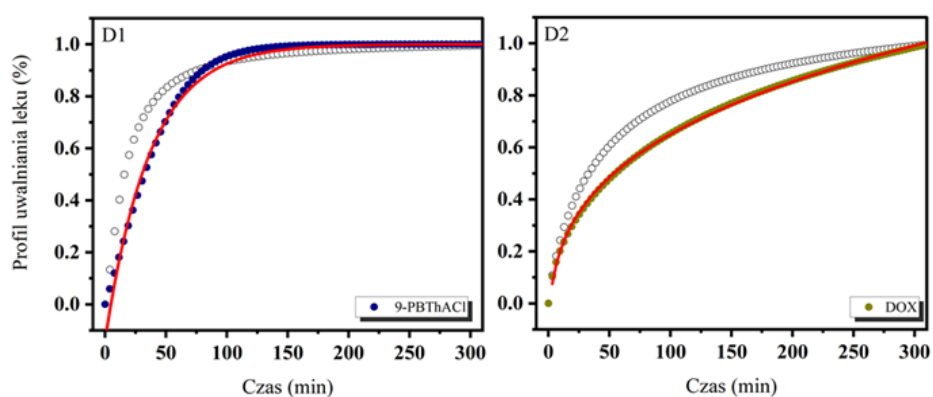


Rysunek 35. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThAcI}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThAcI, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThAcI, B2 - pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThAcI, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThAcI, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C.

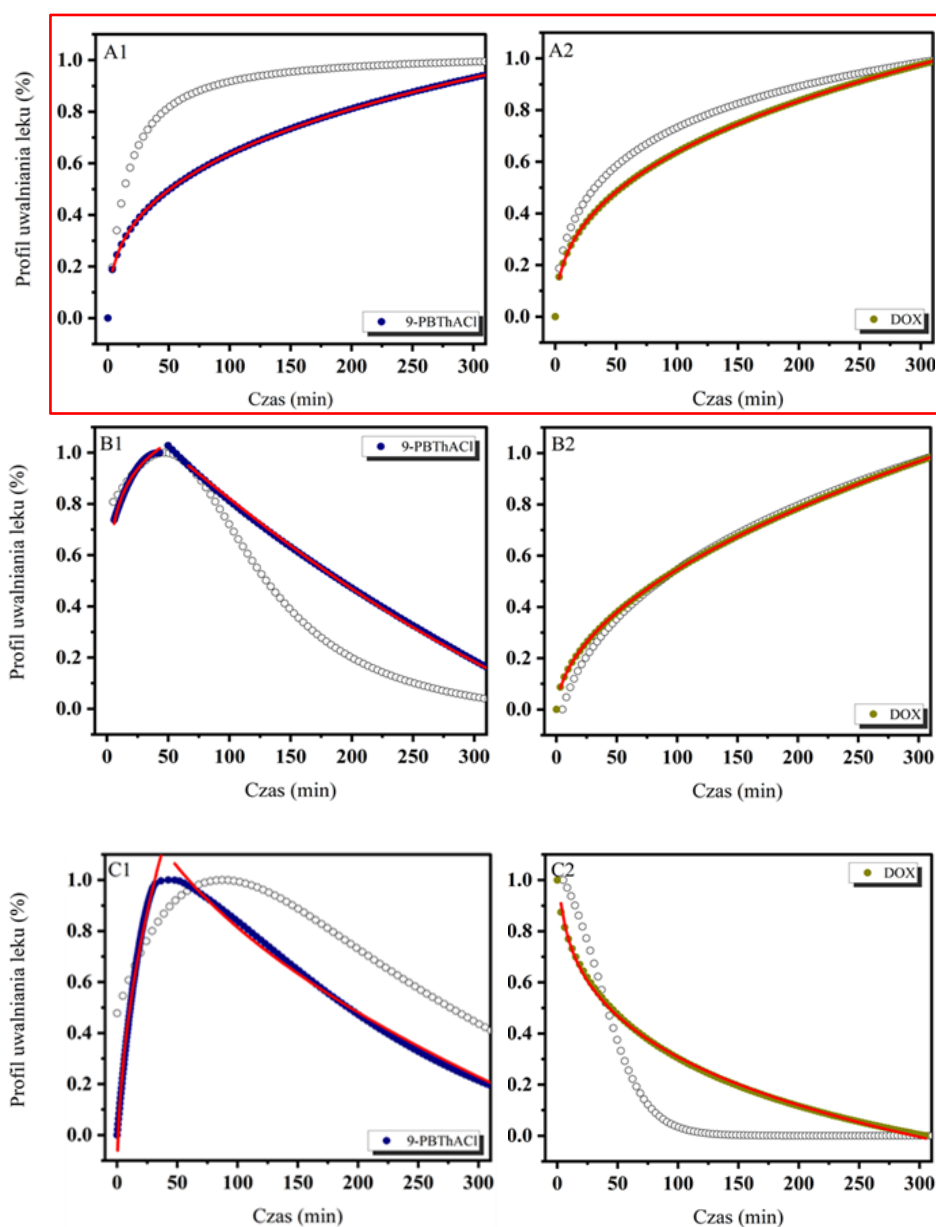
Wyniki badań przedstawiają wpływ pH i temperatury na otrzymane profile uwalniania leku i związku chemicznego o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym z liposomów. Przebieg profili uzyskanych w temperaturze 37°C i otaczającym pH równym 5,50; 6,00; 7,40 był przybliżony funkcją wykładniczą (tabela A1). W przypadku pH 6,50 proces uwalniania 9-PBThAcI najlepiej opisuje zależność liniowa, ponieważ dla rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha współczynnik R^2_{adj} był równy 0,99998. W przypadku funkcji w temperaturze 41°C zastosowano rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Najlepsze dopasowanie modelu do wyników eksperymentalnych otrzymano dla 9-PBThAcI w pH 7,40 (R^2_{adj} był równy 0,99989), a dla DOX pH 6,00 (R^2_{adj} był równy 0,99991). Profile uwalniania leków są funkcjonalnie zależne od procesów dyfuzji, degradacji nośnika, pęcznienia materiału i parametrów środowiskowych.

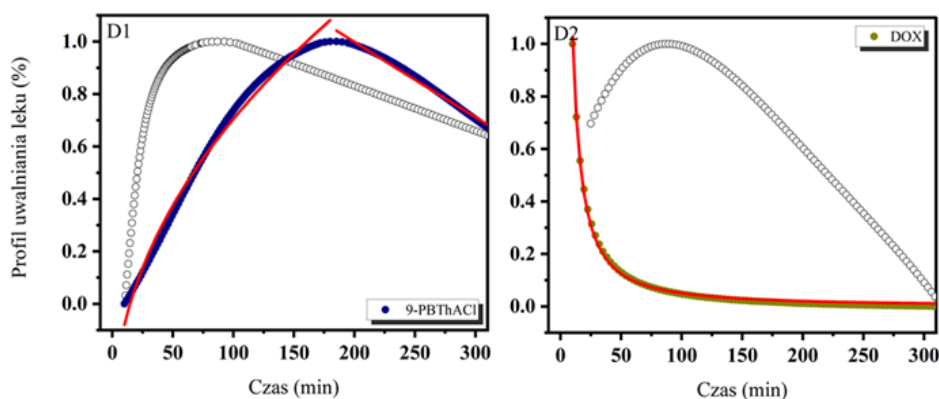
4.12.2. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





Rysunek 36. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:HSA$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThAcI, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThAcI, B2 - pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThAcI, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThAcI, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

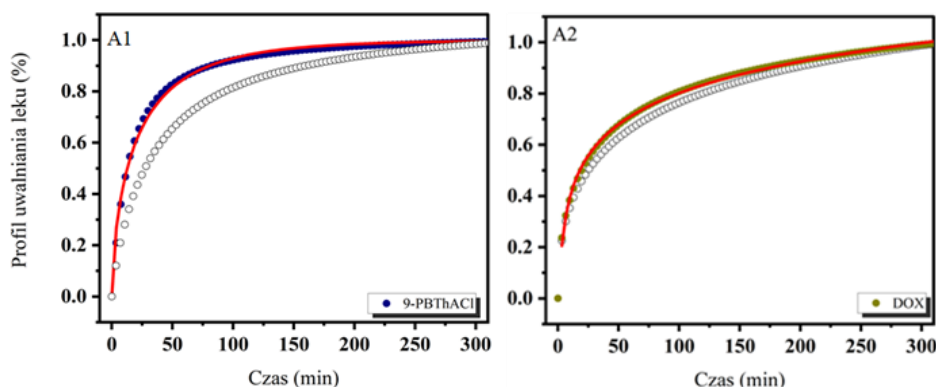


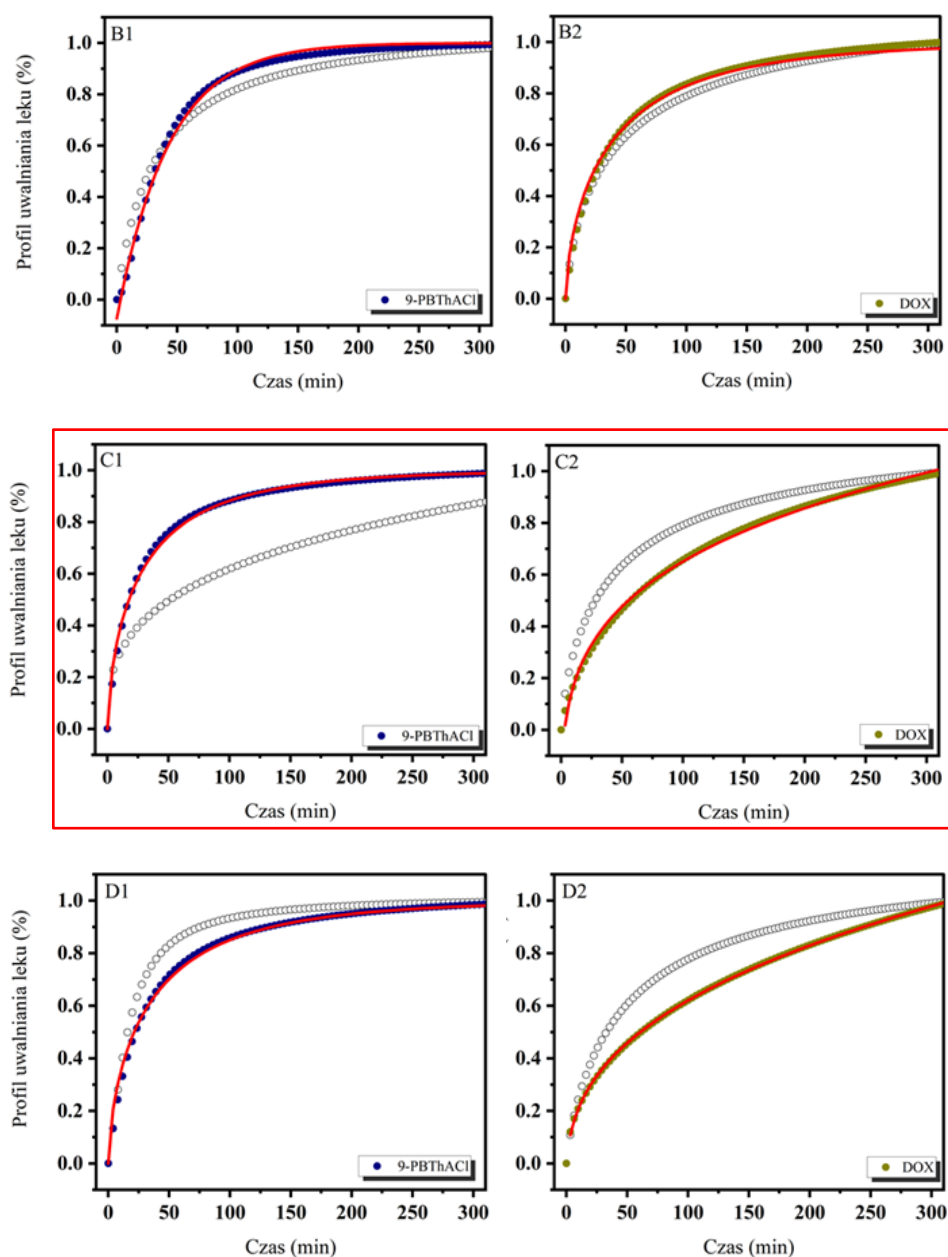


Rysunek 37. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:HSA$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C.

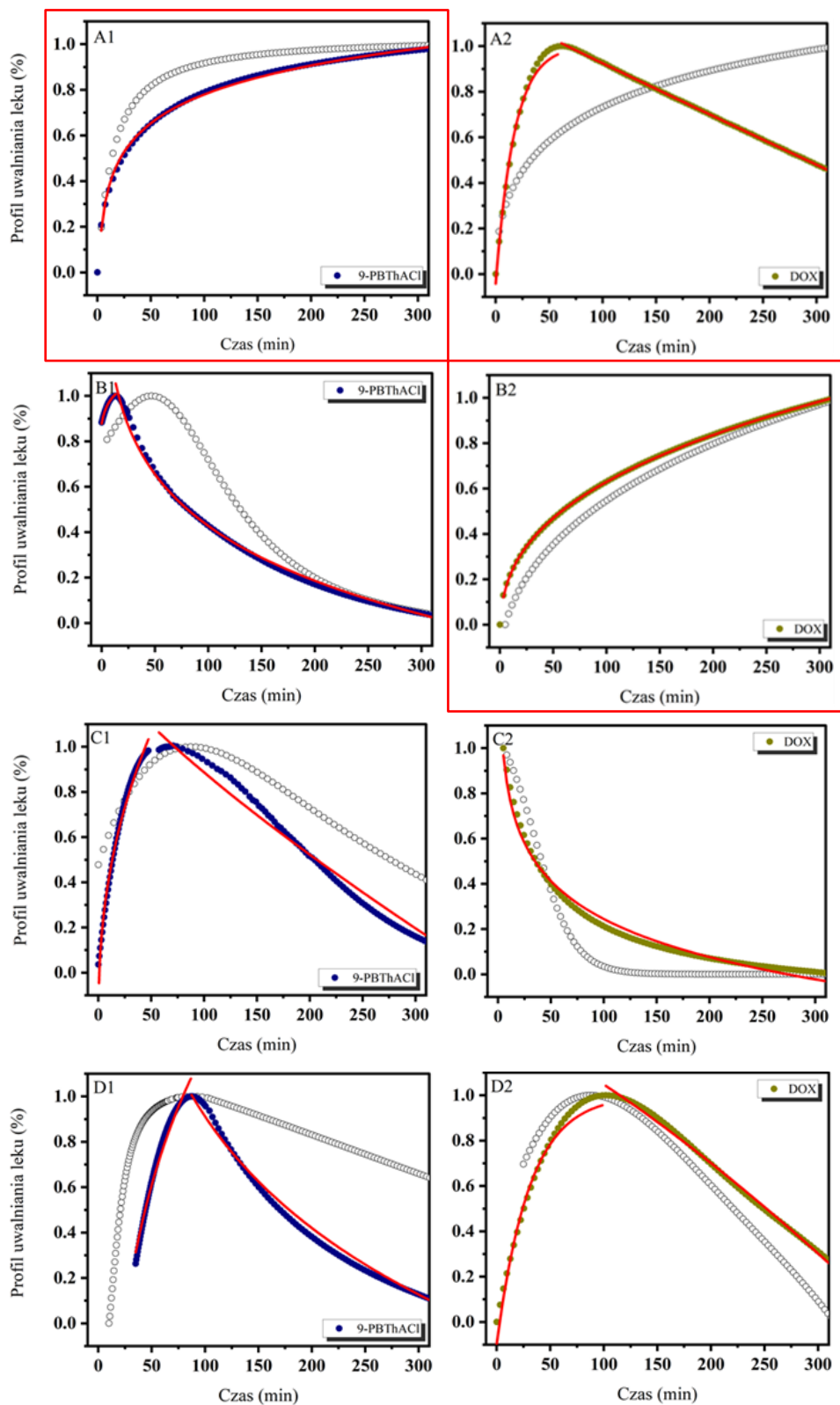
Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturach 37°C i 41°C, przy wartościach pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 z białkiem HSA, zostały oszacowane za pomocą funkcji wykładniczej (tabela A2). Niewątpliwie najlepsze dopasowanie dla HSA uzyskano przy użyciu rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha. W przypadku funkcji w temperaturze 41°C również zastosowano rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Ponadto, charakterystyka termiczna uwalniania leku dla kompleksów liposomalnych $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:HSA$, przygotowanych w temperaturze 41°C i w buforach o pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 była opisana przez $R^2_{adj} \approx 1$, jednak zarejestrowany profil uwalniania leku przy pH=5,50 znacząco różnił się od pozostałych. Jest to dowód, że pH warunkuje konfigurację fosfolipidów, co przekłada się na kinetykę uwalniania związków zamkniętych w liposomach.

4.12.3. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA) $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:dHSA$ wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





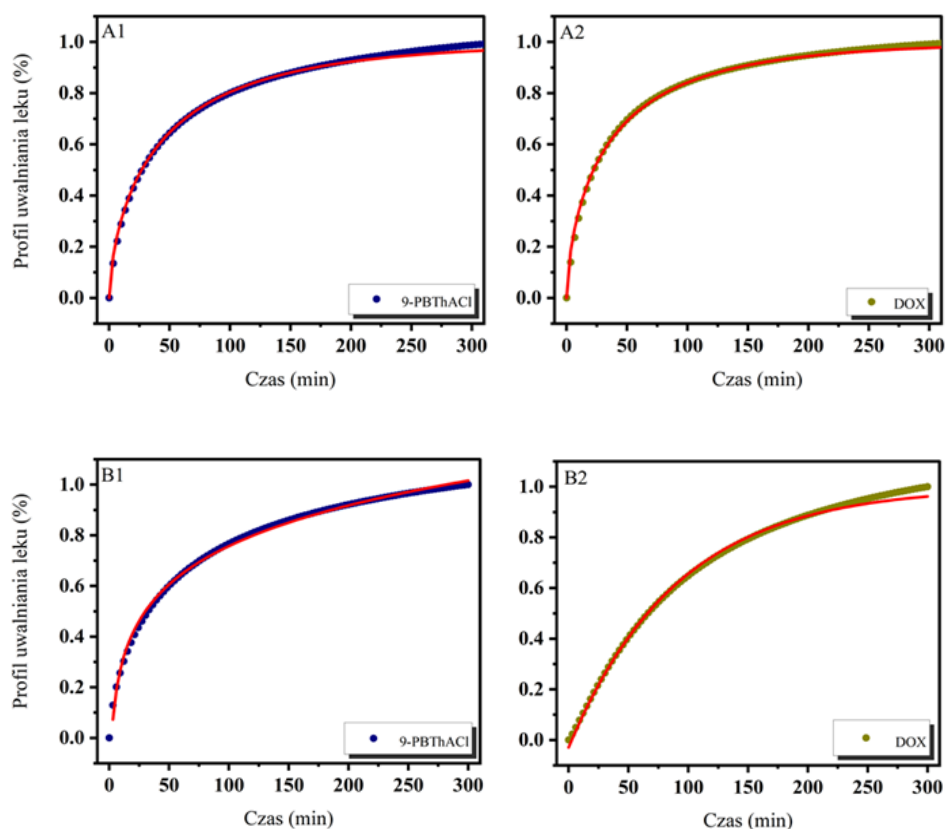
Rysunek 38. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl}] : dHSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}] : dHSA$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: $37^{\circ}C$.

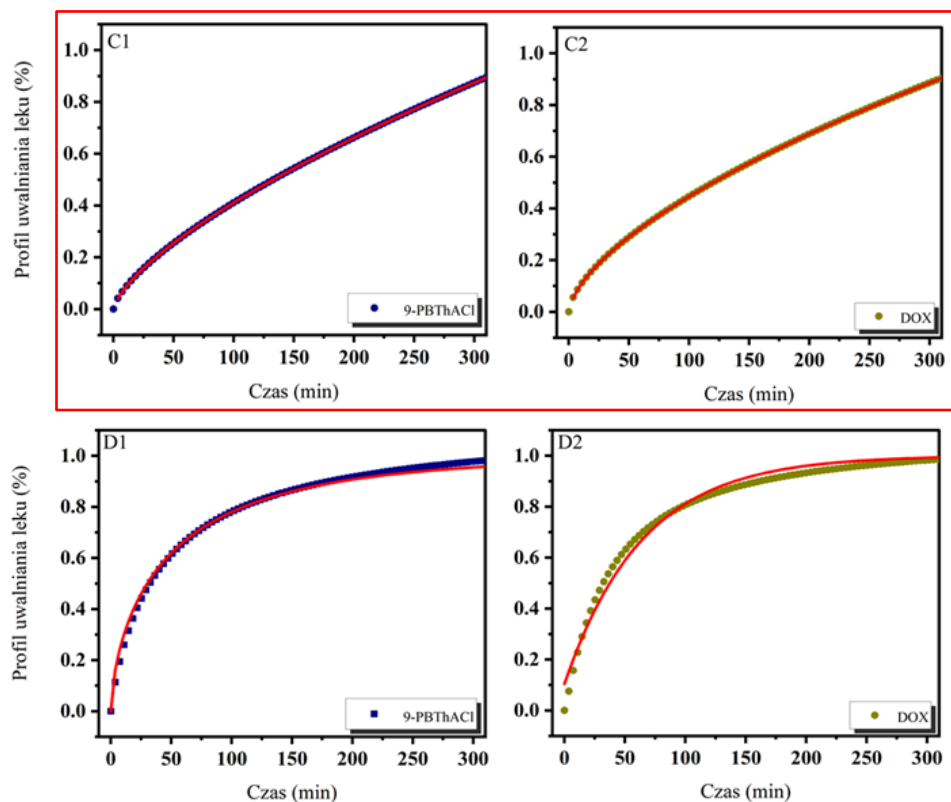


Rysunek 39. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{\text{DPPC/9-PBThACl}}]:\text{dHSA}$ oraz $[L_{\text{DPPC/DOX}}]:\text{dHSA}$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C .

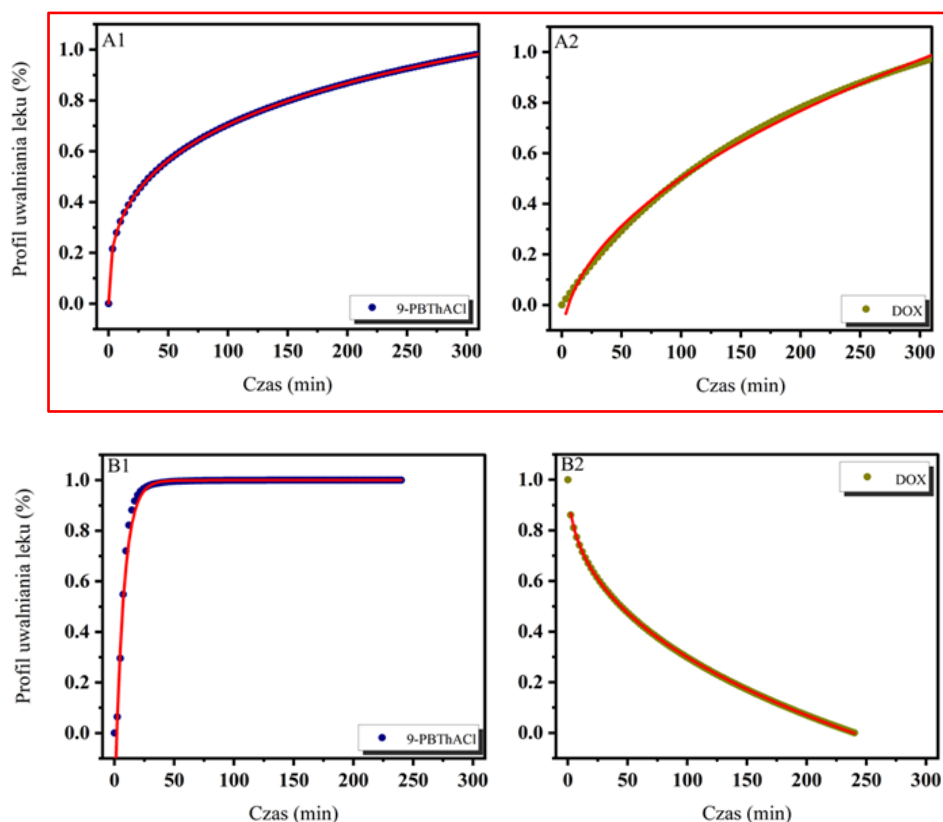
Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturach 37⁰C i 41⁰C, przy wartościach pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 z białkiem dHSA, zostały oszacowane za pomocą funkcji wykładniczej (tabela A3). Najlepsze dopasowanie dla dHSA uzyskano dla 9-PBThACl w pH=6,50 przy użyciu modelu Bhaskas ($R^2_{adj}= 0,99684$), a w przypadku DOX, w pH=7,40 rozszerzenia klasycznego modelu Freundlicha ($R^2_{adj}= 0,99985$). Ponadto, podobnie jak w przypadku kompleksów z białkiem HSA, charakterystyka termiczna uwalniania leku dla kompleksów liposomalnych [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:dHSA przygotowanych w temperaturze 41⁰C i w buforach o pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 była opisana przez $R^2_{adj}= \sim 1$. Jednak zarejestrowane profile uwalniania leku znacząco różnią się od siebie. Można przypuszczać, że w temperaturze 41⁰C najbardziej korzystny profil uwalniania 9-PBThACl występuje w pH=5,50, a profil uwalniania DOX występuje w pH=6,00. Jest to potwierdzenie, że pH i temperatura istotnie wpływają na kinetykę uwalniania leków.

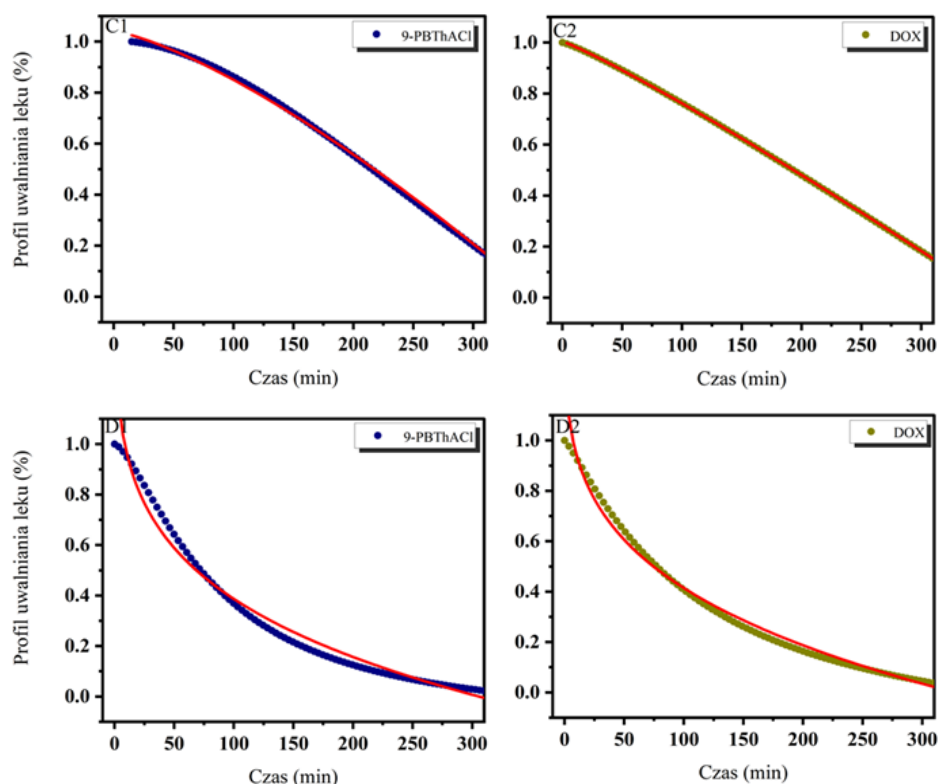
4.12.4. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





Rysunek 40. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThAcI/DOX}$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThAcI, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThAcI, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThAcI, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThAcI, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

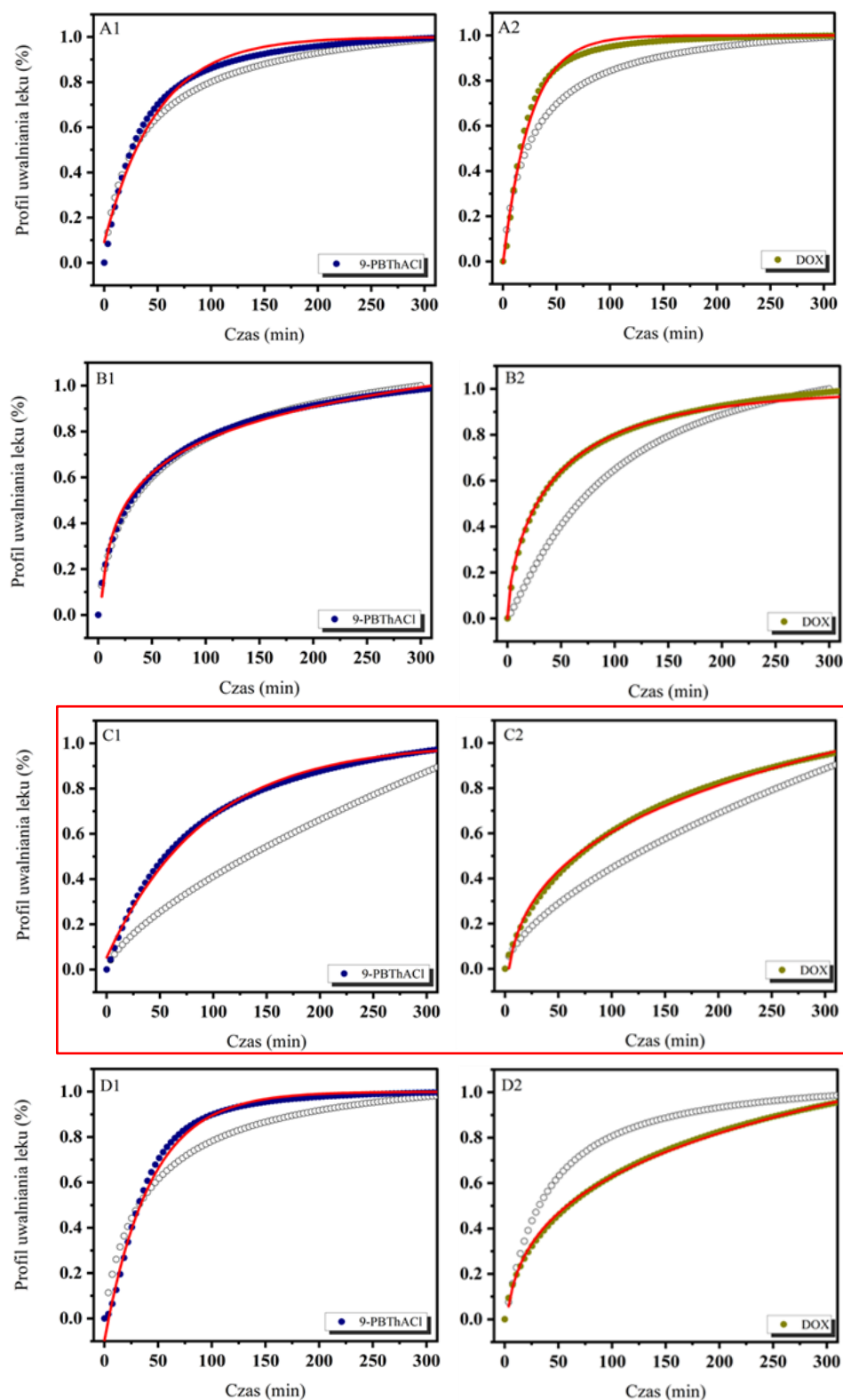




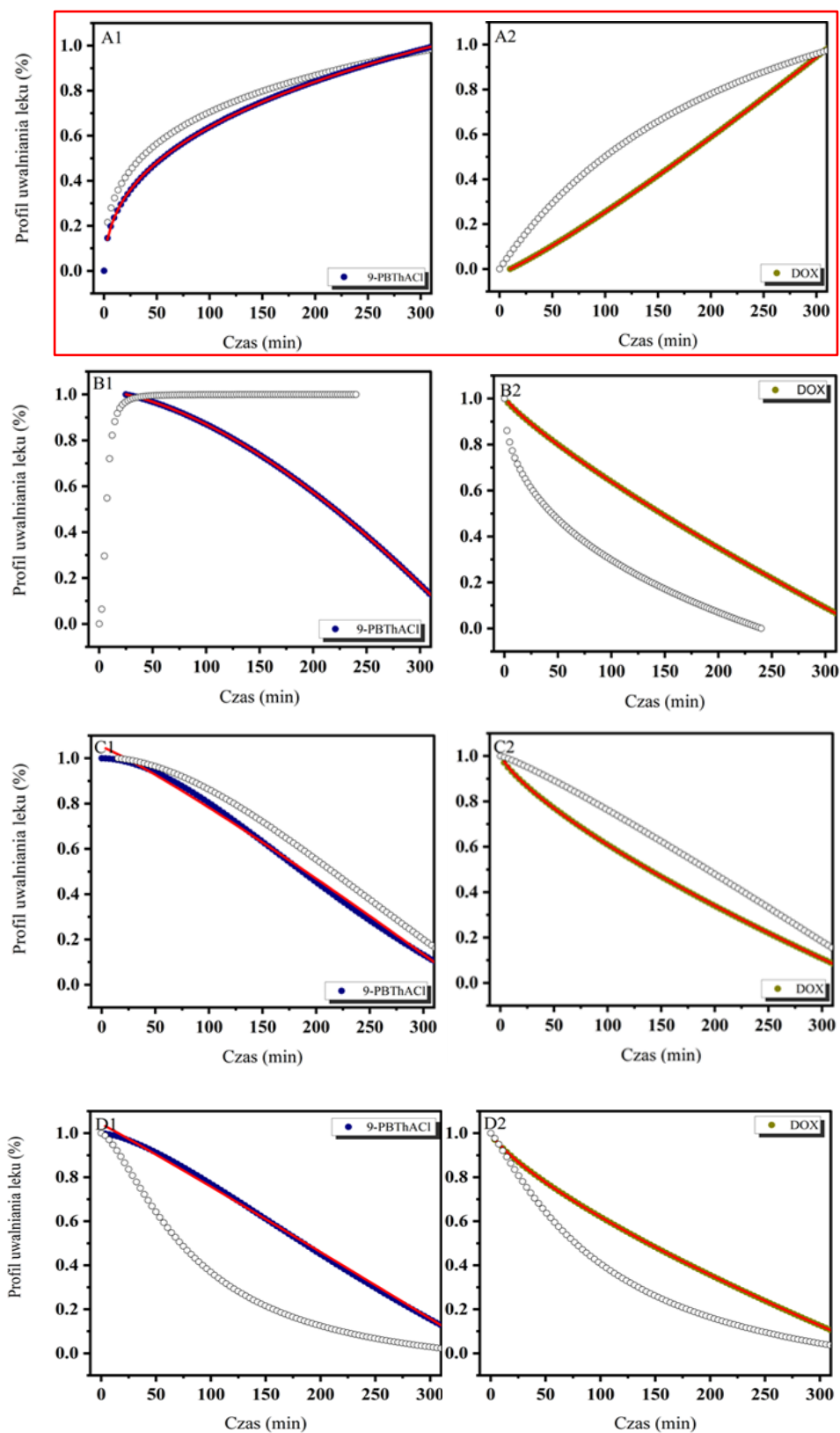
Rysunek 41. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C.

Na podstawie przedstawionych wyników obserwuje się bezpośredni wpływ pH i temperatury na profile uwalniania leku z liposomów. Przebieg profili uzyskanych w temperaturze 37°C i otaczającym pH równym 5,50; 6,00; 7,40 był przybliżony wykładniczo (tabela A4). W przypadku pH 6,50 proces uwalniania leku najlepiej opisuje zależność liniowa, ponieważ dla 3 z 5 modeli (Ritgera-Peppasa, Kosmeyer-Peppasa i rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha) współczynnik R^2_{adj} był równy 1. Dla malejących funkcji w temperaturze 41°C, zastosowano rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Wzrost temperatury do punktu przejścia fazowego DPPC destabilizuje badane układy liposomalne. Wydaje się, że pH otoczenia może bezpośrednio zmieniać właściwości termiczne kompleksów leków otoczonych liposomami. Profile uwalniania leków są funkcjonalnie zależne od procesów dyfuzji, degradacji nośnika, pęcznienia materiału i parametrów środowiskowych.

4.12.5. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.



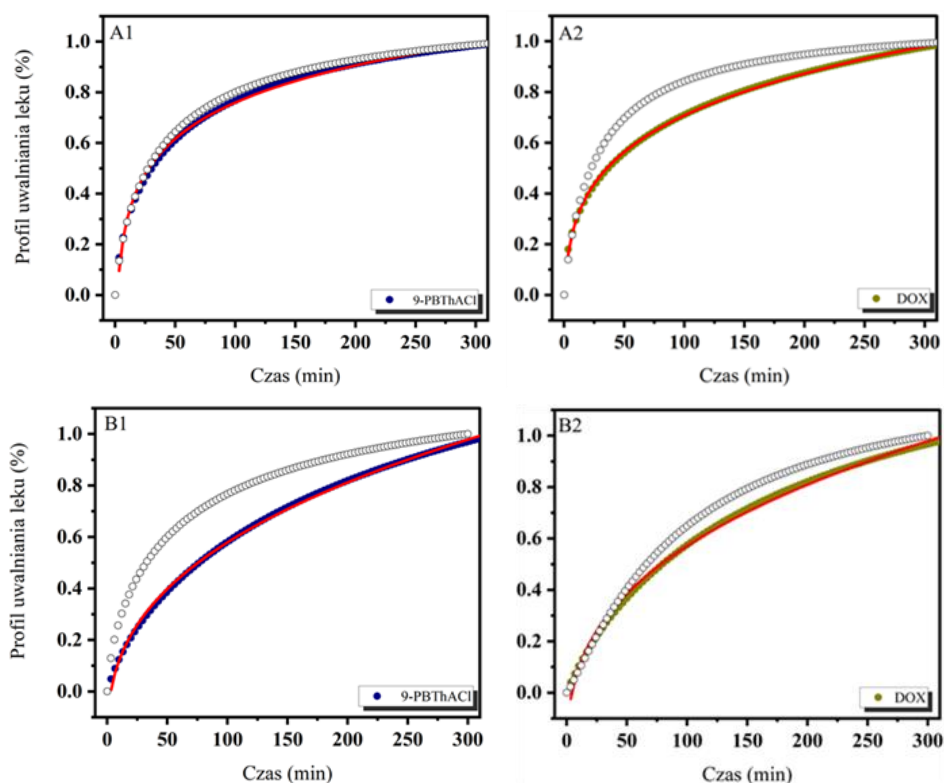
Rysunek 42. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

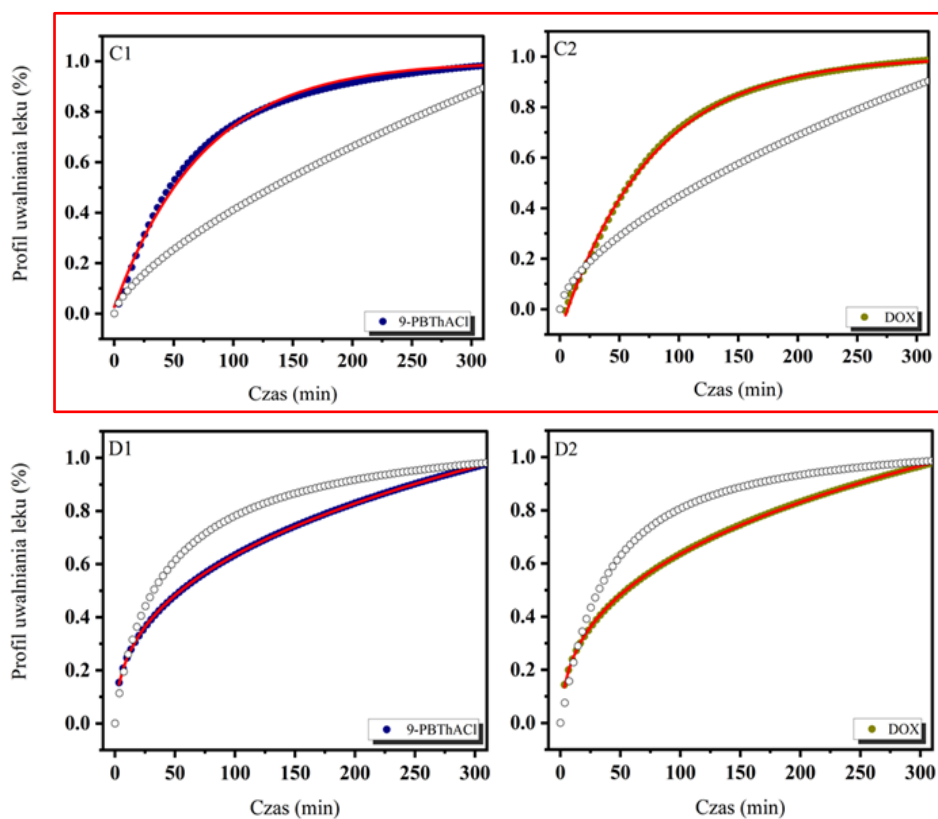


Rysunek 43. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThAcI/DOX}$]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThAcI, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThAcI, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThAcI, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThAcI, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C.

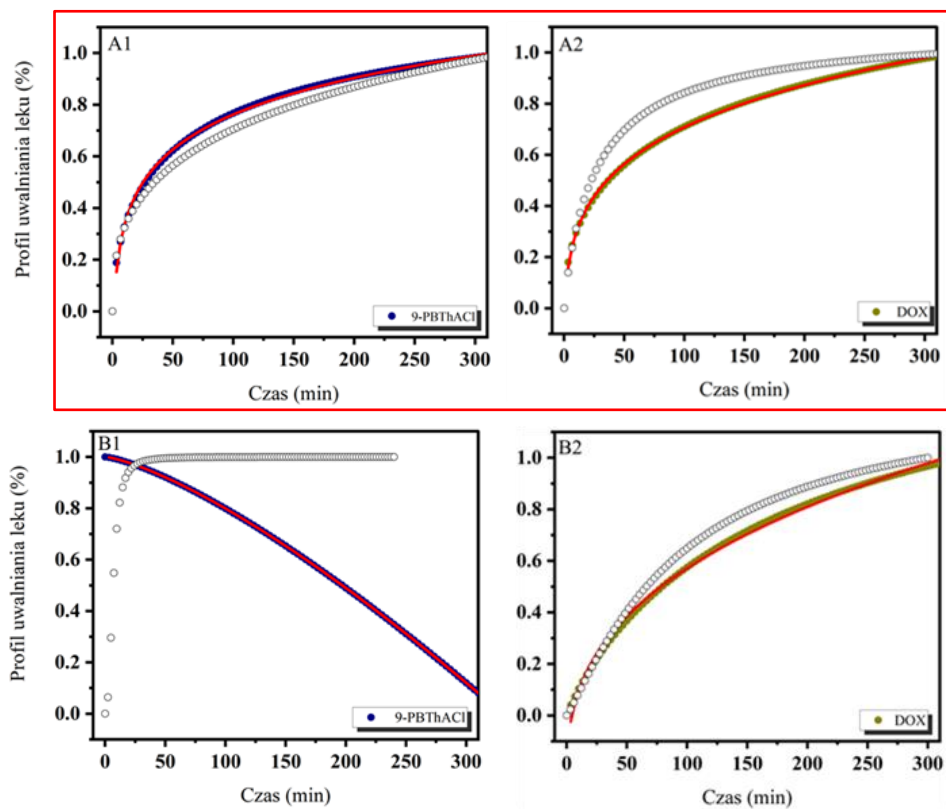
Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37⁰C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 były aproksymowane funkcją wykładniczą (tabela A5). Najlepsze dopasowanie zaobserwowano przy pH 6,50, stosując rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Ten sam model zastosowano do funkcji malejących w temperaturze 41⁰C. Wydaje się, że pH otoczenia może bezpośrednio wpływać na profile leków zamkniętych w liposomach z białkiem HSA. Charakterystyka termiczna uwalniania leku dla kompleksu liposomalnego [L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX]:HSA, przygotowanego w temperaturze 41⁰C i w buforach o pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 były opisane przez $R^2_{adj}=1$. Zarejestrowany profil uwalniania leku przy pH=5,50 znacząco różnił się od pozostałych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że pH środowiska istotnie wpływa na profil uwalniania leku.

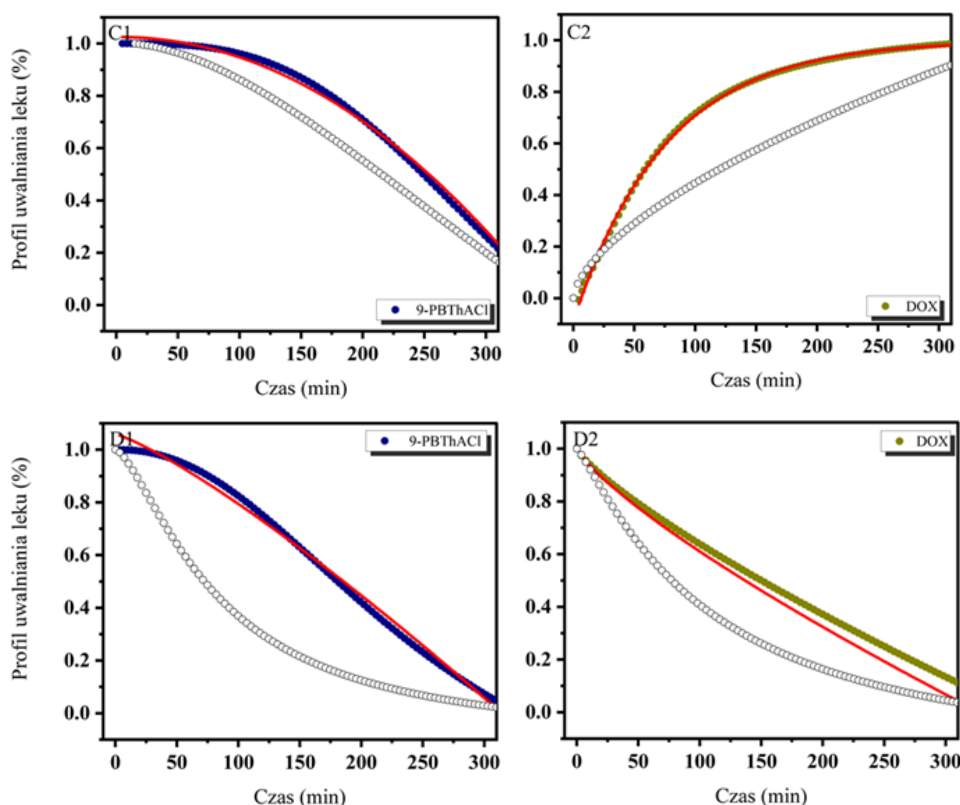
4.12.6. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i DOX z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA) [L_{DPPC/9-PBThACl}/DOX]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





Rysunek 44. Kinetyka uwalniania 9-PBThAcI i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThAcI/DOX]:dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThAcI, A2 – pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThAcI, B2 – pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThAcI, C2 – pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThAcI, D2 – pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

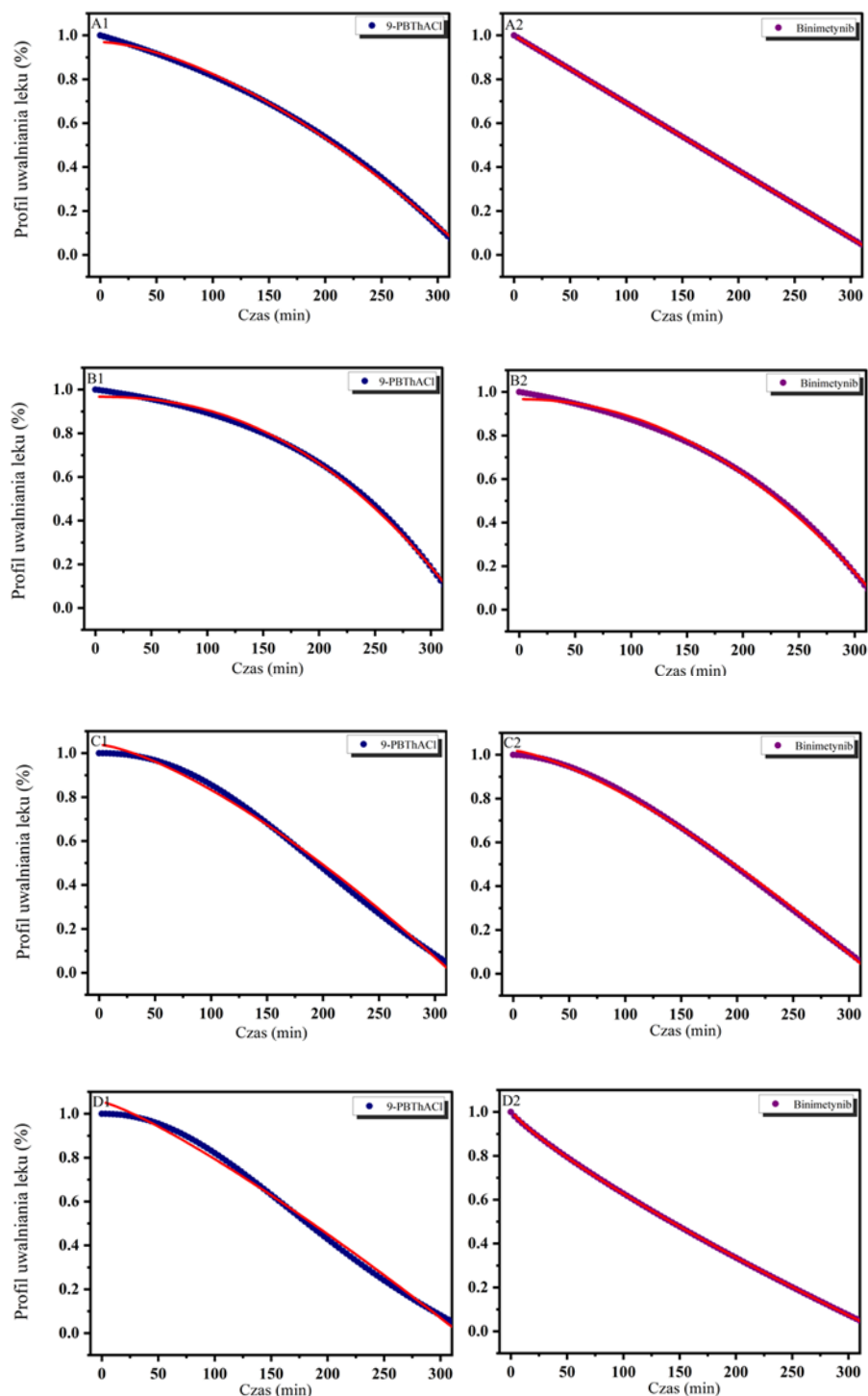




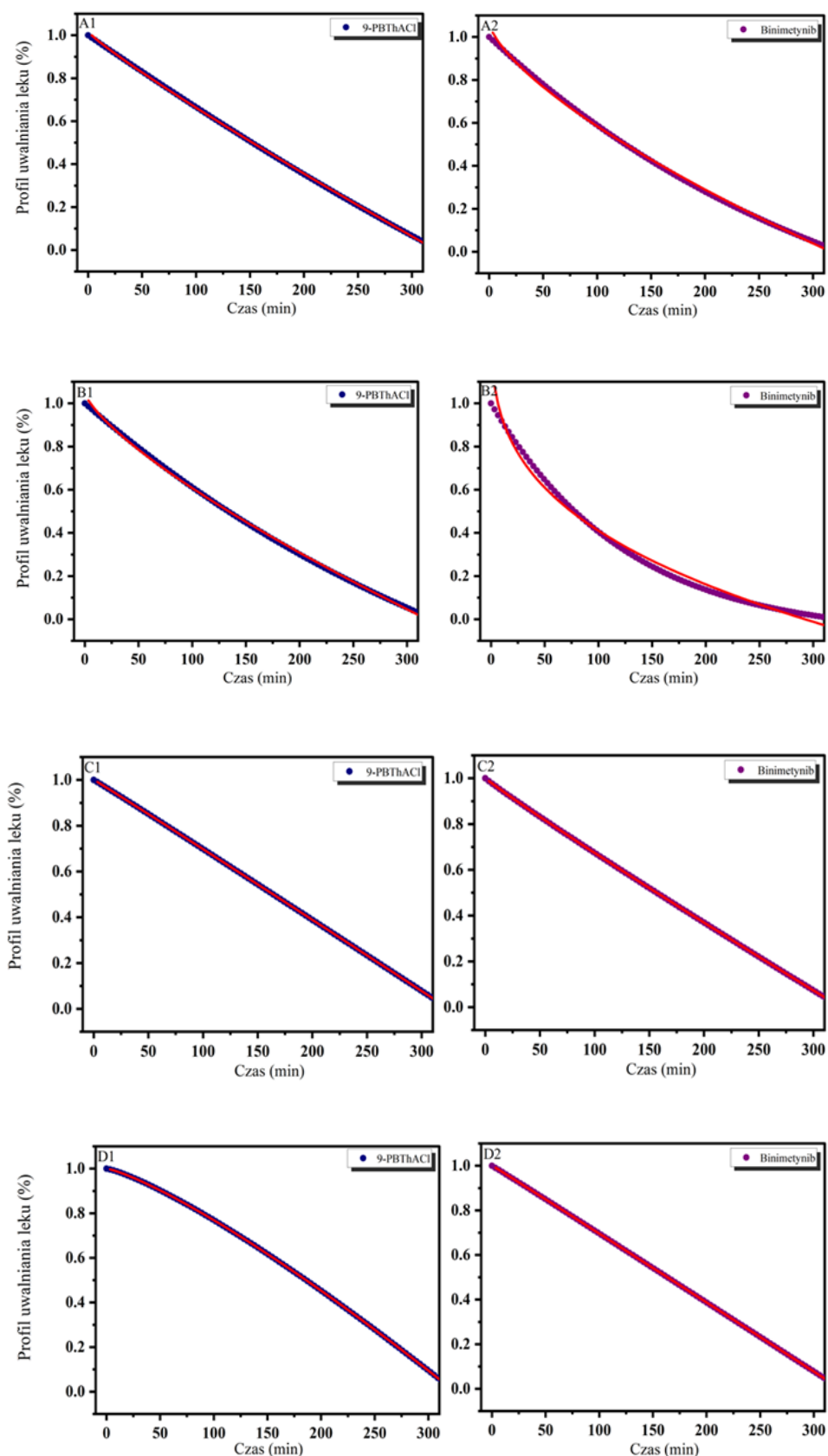
Rysunek 45. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}] : dHSA$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41°C.

Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37°C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 zostały opisane modelem wykładniczym (tabela A). Najlepsze dopasowanie z danymi eksperymentalnymi dla dHSA uzyskano przy użyciu rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha. Podobnie ten sam model został wykorzystany do funkcji malejących w temperaturze 41°C. Dodatkowo, wpływ temperatury na uwalnianie leku dla kompleksu liposomalnego $[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}] : dHSA$ przygotowanego w temperaturze 41°C oraz w buforach 6,00; 6,50; 7,40 był opisany przez $R^2_{adj}=1$. Jednak zarejestrowany wzorzec uwalniania leku znacznie różnił się od układu generowanego przy pH=5,50. Jest to kolejny dowód na to, że pH odgrywa kluczową rolę w procesie uwalniania leku, a najkorzystniejsze warunki stwierdzono przy pH=6,50.

4.12.7. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$ wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.



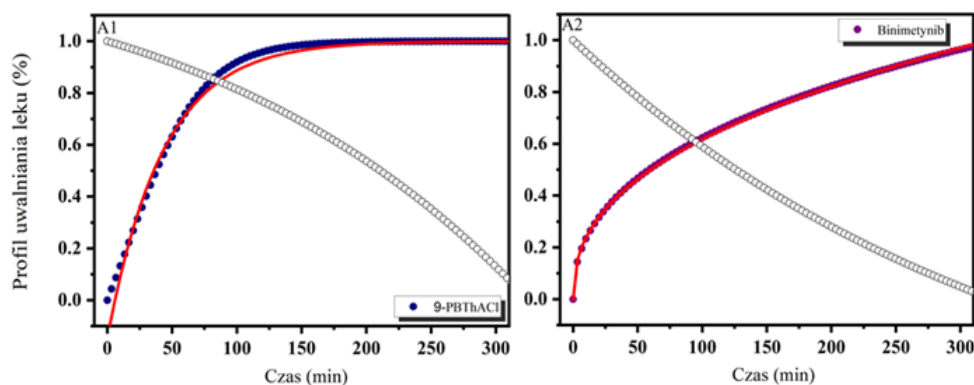
Rysunek 46. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37°C.

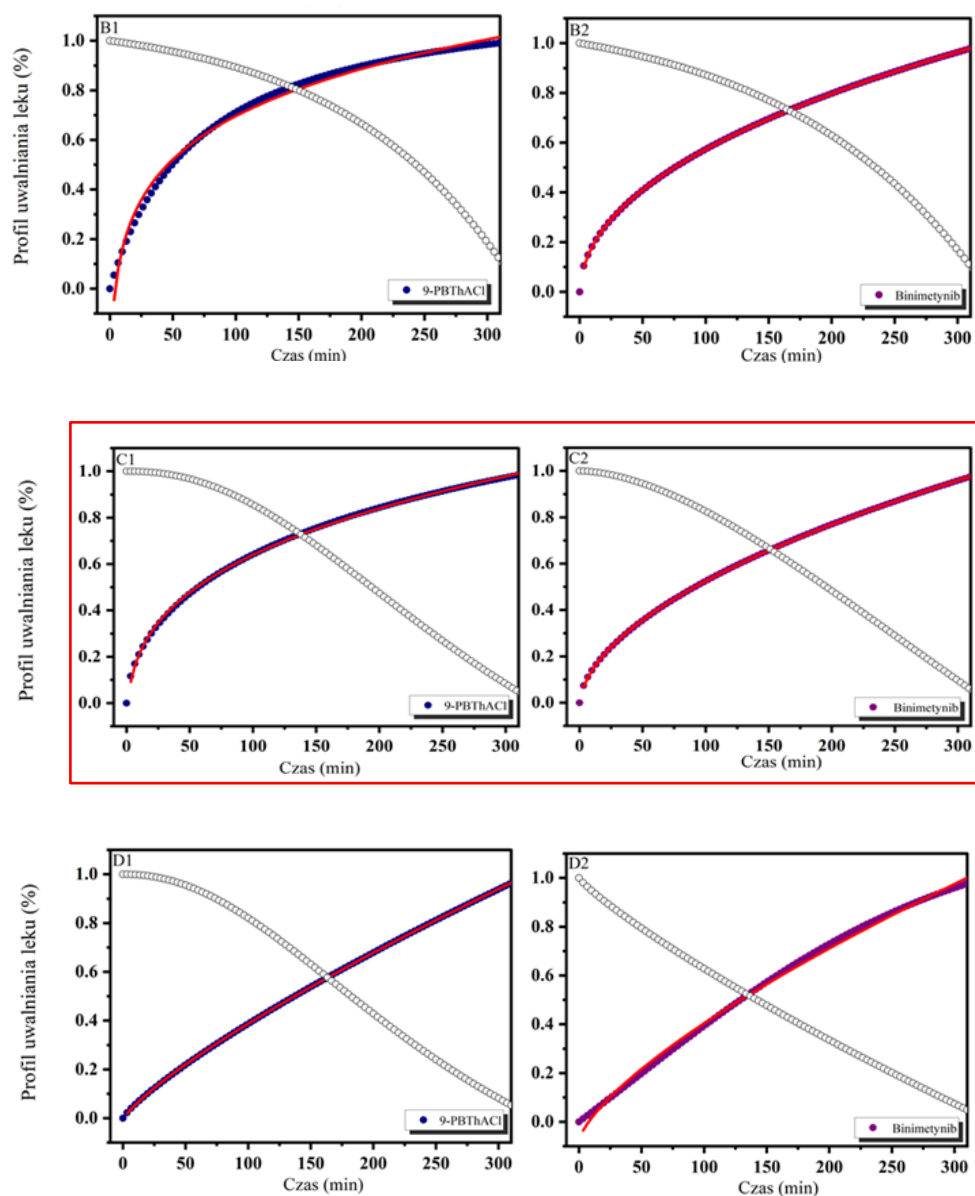


Rysunek 47. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41°C.

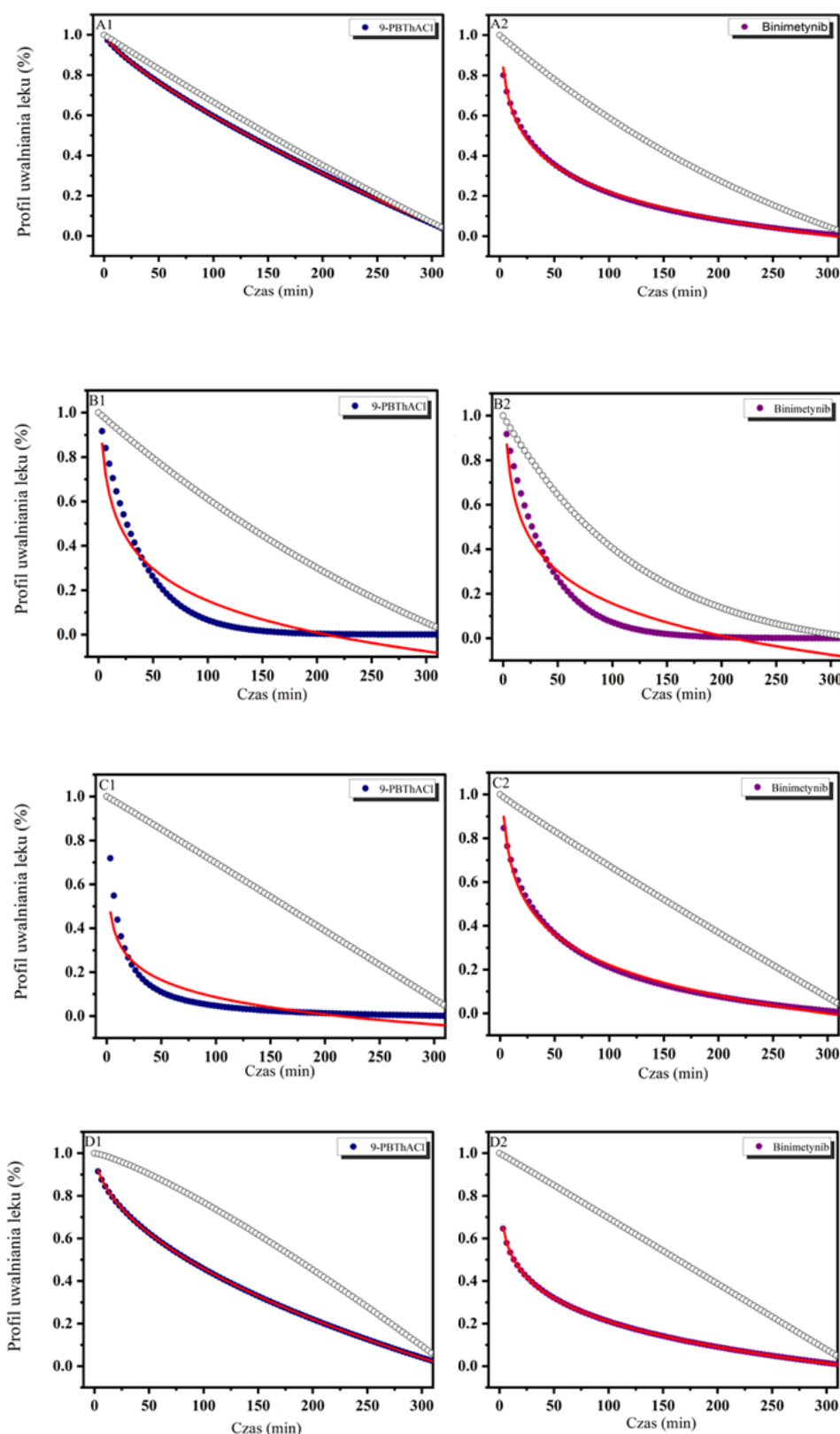
Wyniki badań przedstawiają wpływ pH i temperatury na otrzymane profile uwalniania leku i związku chemicznego z liposomów. Przebieg profili uzyskanych w temperaturze 37⁰C i otaczającym pH równym 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 był przybliżony funkcją wykładniczą (tabela A7). W przypadku pH 5,50 proces uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu najlepiej opisuje zależność liniowa, ponieważ dla rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha współczynnik (dla 9-PBThACl $R^2_{adj}=0,99912$, a dla Binimetynibu $R^2_{adj}=1$). W przypadku funkcji malejących w temperaturze 41⁰C zastosowano rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Najlepsze dopasowanie modelu do wyników eksperymentalnych otrzymano dla 9-PBThACl i Binimetynibu w pH 6,50 i 7,40 ($R^2_{adj}=1$). Profile uwalniania leków są funkcjonalnie zależne od procesów dyfuzji, degradacji nośnika, pęcznienia materiału i parametrów środowiskowych.

4.12.8. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACl i Binimetynibu z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (HSA) [$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





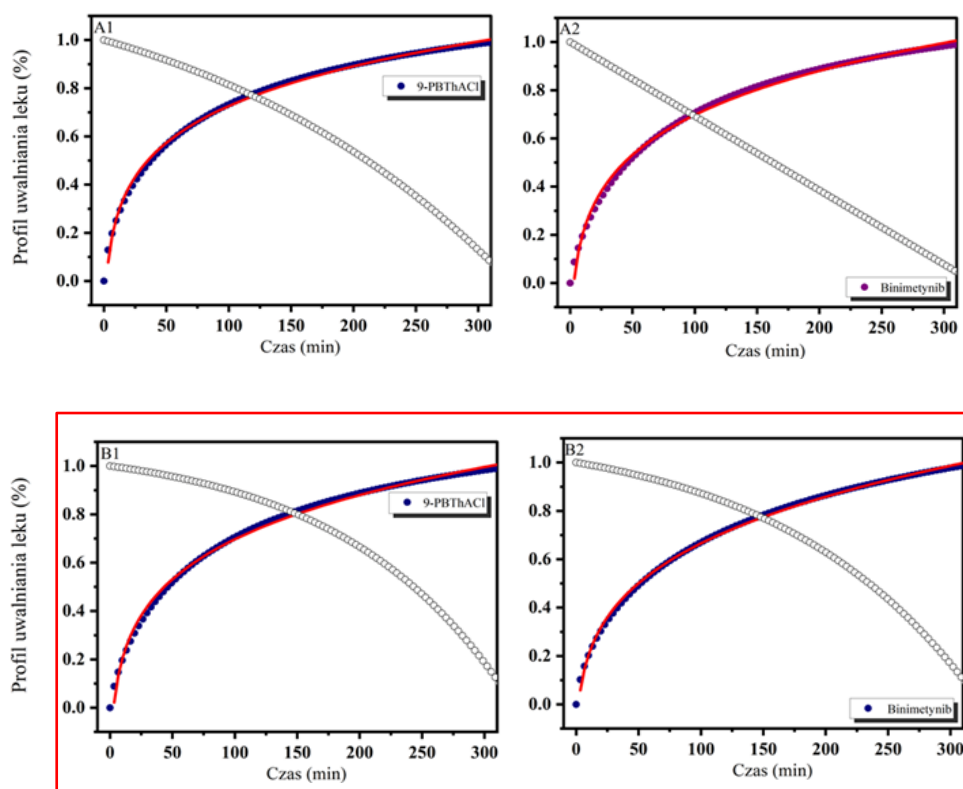
Rysunek 48. Kinytyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$]: HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37°C.

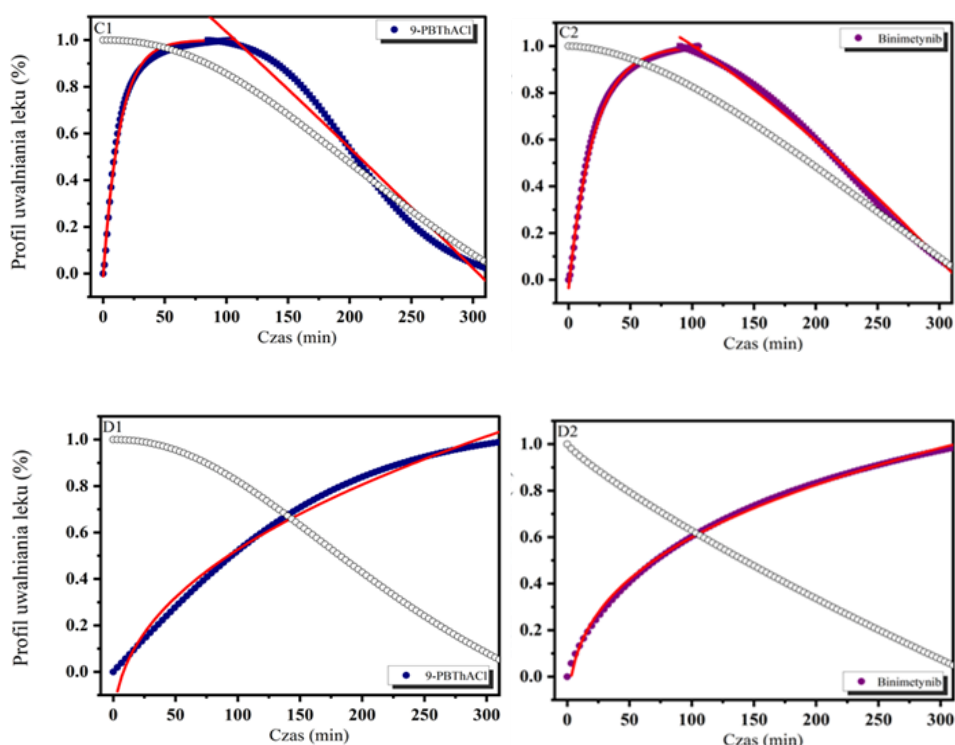


Rysunek 49. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$]: HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41°C.

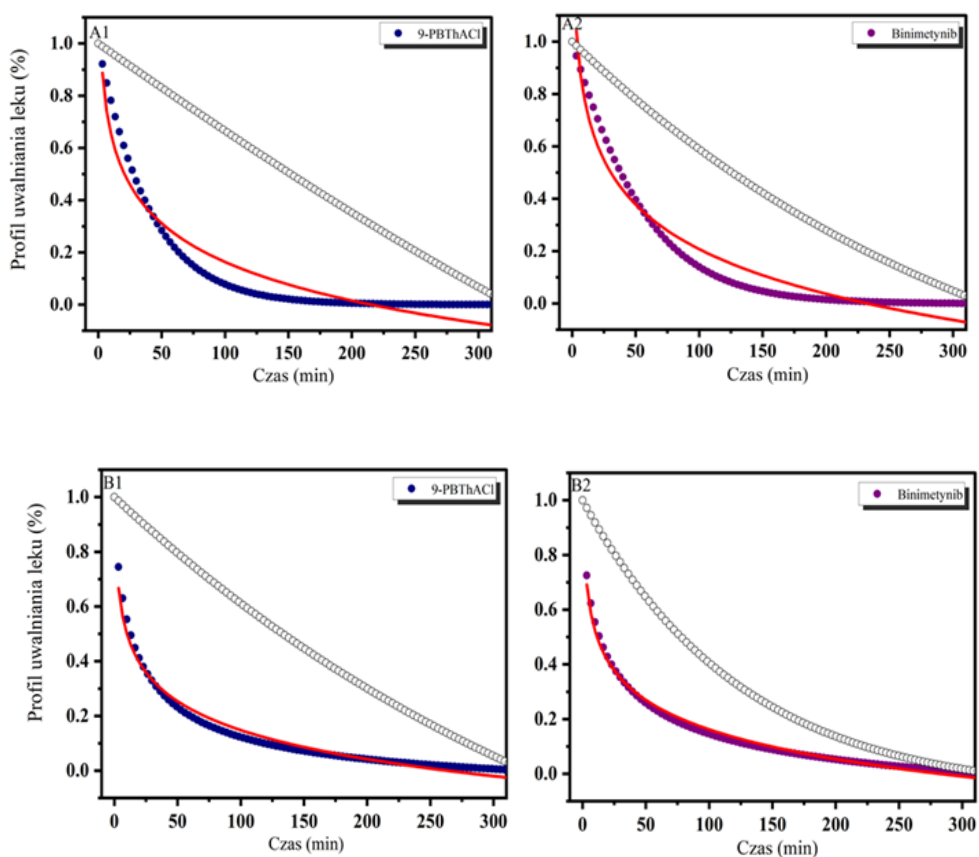
Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37⁰C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 były aproksymowane funkcją wykładniczą (tabela A8). Najlepsze dopasowanie zaobserwowano przy pH 6,50, stosując rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Ten sam model zastosowano do funkcji malejących w temperaturze 41⁰C. Wydaje się, że pH otoczenia może bezpośrednio wpływać na profile leków zamkniętych w liposomach z białkiem HSA. Charakterystyka termiczna uwalniania leku dla kompleksu liposomalnego [L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:HSA, przygotowanego w temperaturze 41⁰C i w buforach o pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 były opisane przez $R^2_{adj} \sim 1$. Uzyskane wyniki potwierdzają, że pH środowiska i temperatura istotnie wpływają na profil uwalniania leku.

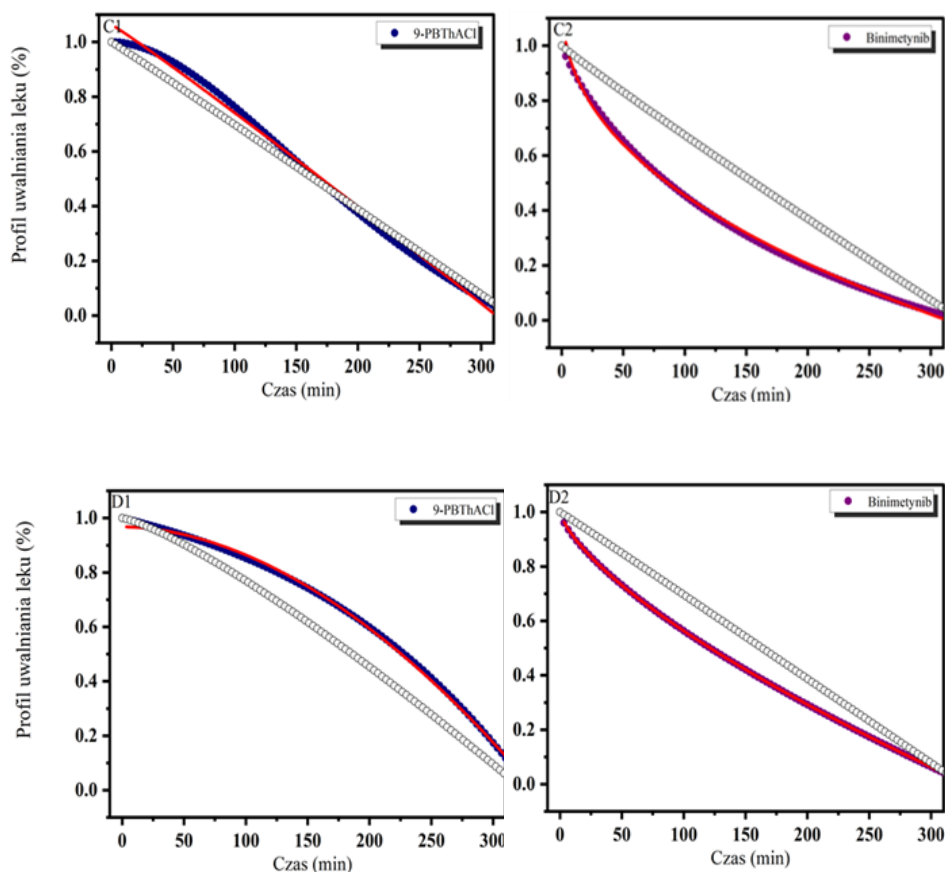
4.12.9. Przedstawienie profili uwalniania leku i substancji lekowej 9-PBThACI i Binimetynibu z układów liposom-lek/substancja lekowa- albumina (dHSA)[L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





Rysunek 50. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 – pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 – pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 – pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 – pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37°C.

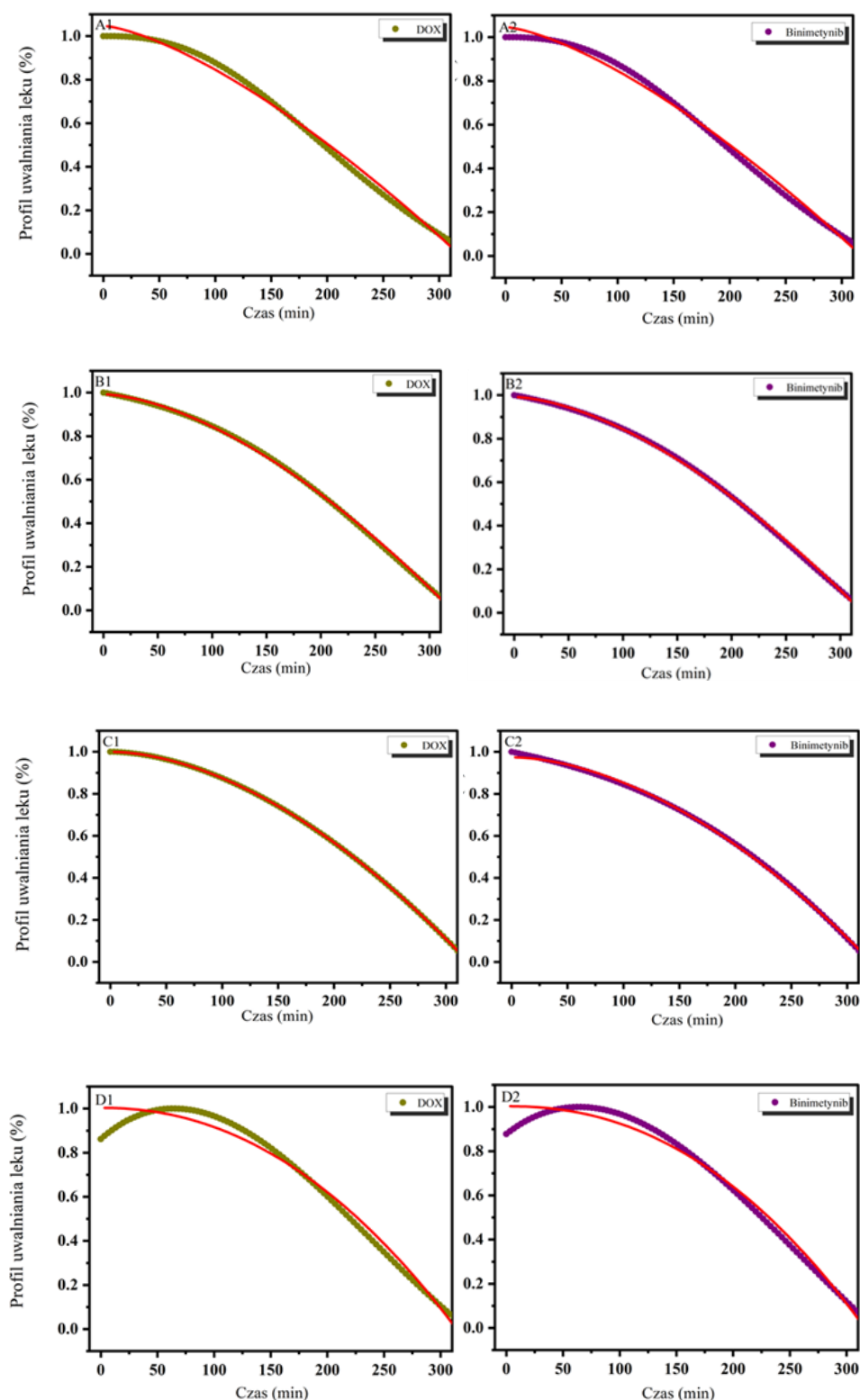




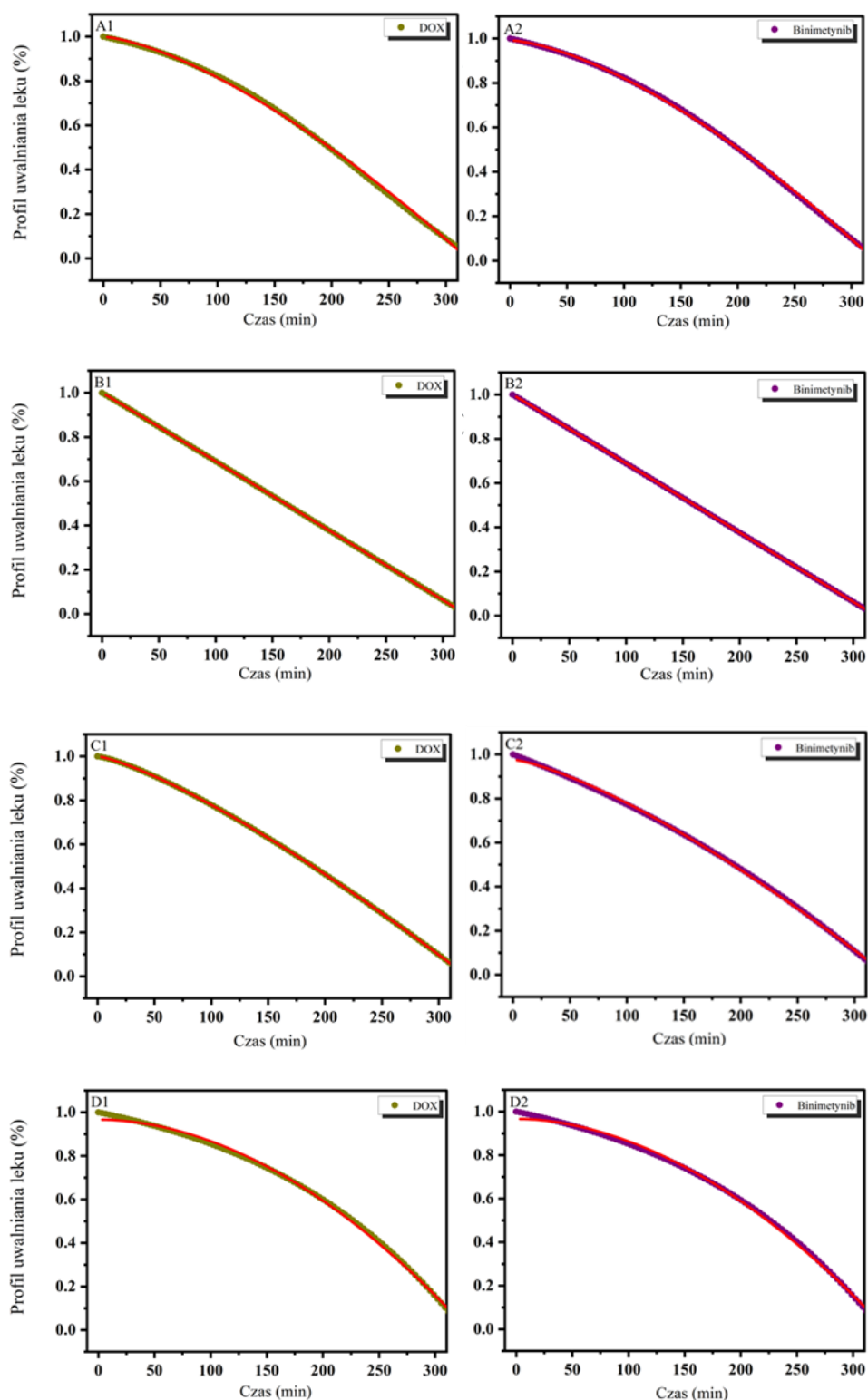
Rysunek 51. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41°C.

Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37°C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 zostały opisane modelem wykładniczym (tabela A9). Najlepsze dopasowanie z danymi eksperymentalnymi dla dHSA uzyskano przy użyciu rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha. Podobnie ten sam model został wykorzystany do funkcji malejących w temperaturze 41°C. Dodatkowo, wpływ temperatury na uwalnianie leku dla kompleksu liposomalnego [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:dHSA przygotowanego w temperaturze 41°C oraz w buforach 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 był opisany przez $R^2_{adj} \approx 1$. Uzyskane dane wskazują na istnienie optymalnego zakresu pH odgrywającego kluczową rolę w procesie uwalniania leku, a najkorzystniejsze warunki stwierdzono przy pH=6,00.

4.12.10. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}] wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.



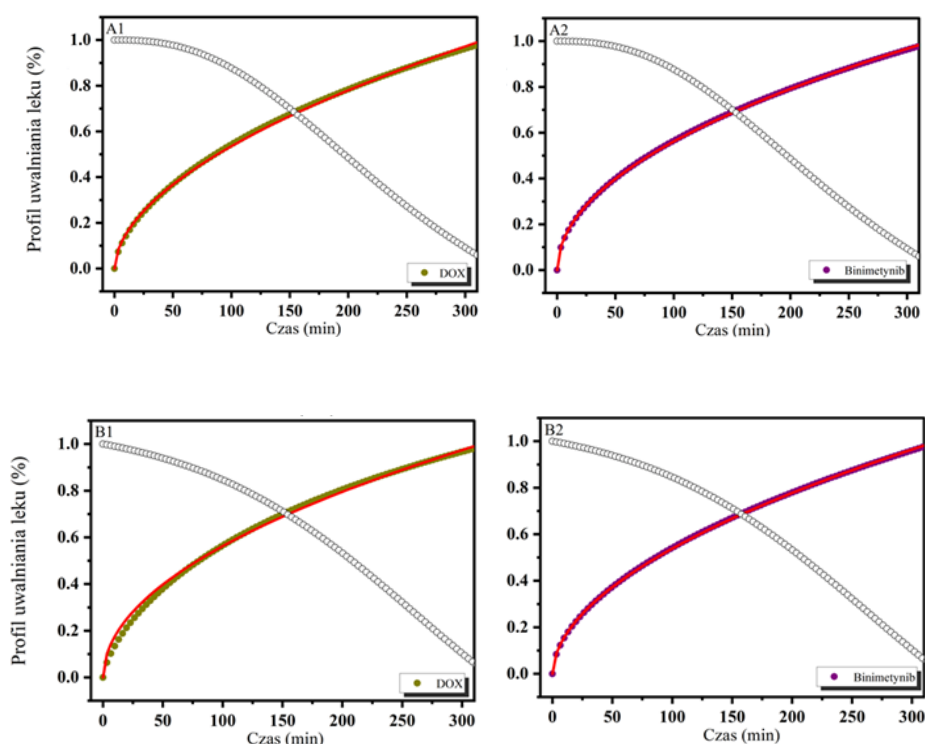
Rysunek 52. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów L_{DPPC/DOX/Binimetynib}. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37°C.

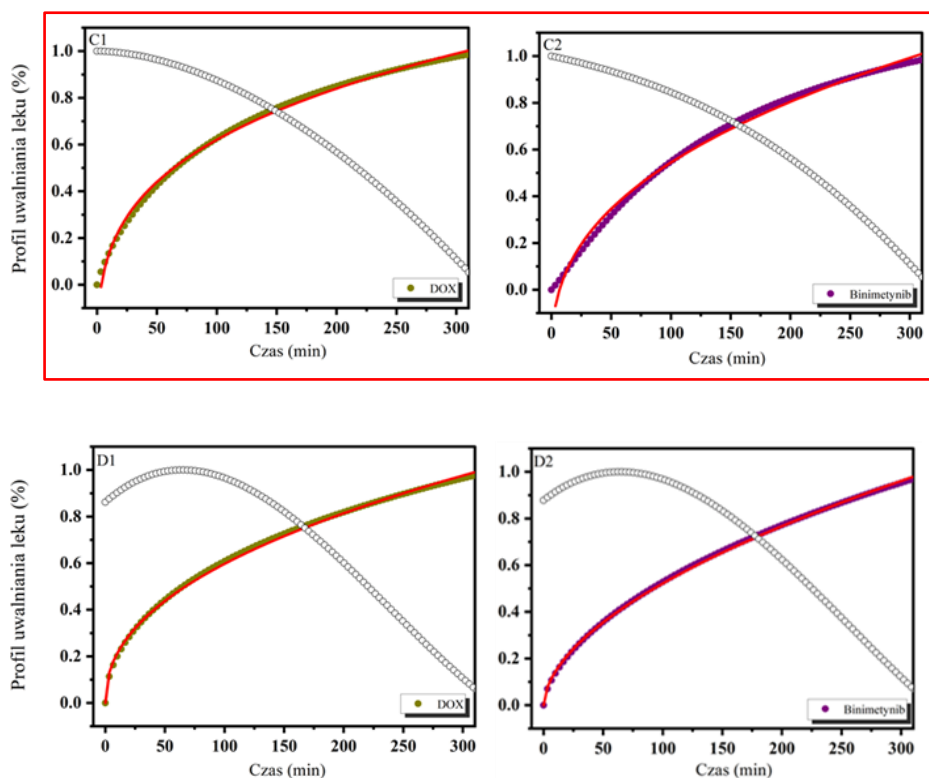


Rysunek 53. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41°C.

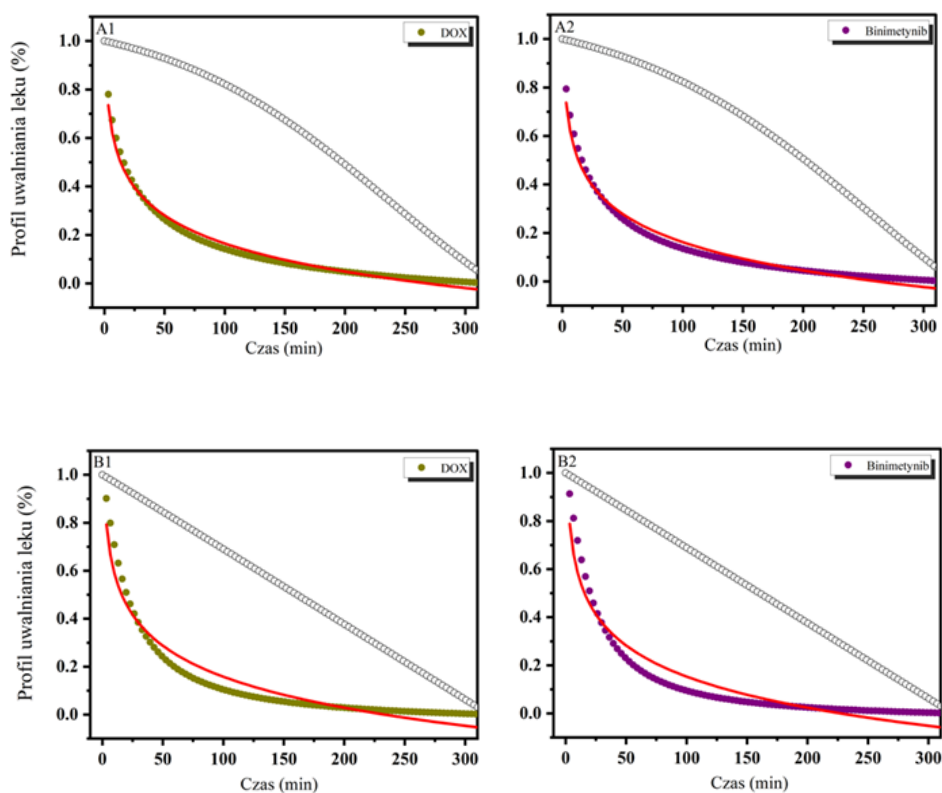
Wyniki badań przedstawiają wpływ pH i temperatury na otrzymane profile uwalniania leku i związku chemicznego z liposomów. Przebieg profili uzyskanych w temperaturze 37⁰C i otaczającym pH równym 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 był przybliżony funkcją wykładniczą (tabela A10). Proces uwalniania DOX (dla pH=6,50) oraz Binimetynibu (dla pH=6,00) najlepiej opisuje zależność liniowa, ponieważ dla rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha współczynnik (dla DOX $R^2_{adj}=1$, a dla Binimetynibu $R^2_{adj}=0,9996$). W temperaturze 41⁰C zastosowano rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Najlepsze dopasowanie modelu do wyników eksperymentalnych otrzymano dla DOX i Binimetynibu w pH 6,00 i 6,50 ($R^2_{adj}=1$). Uzyskane wyniki wskazują, że pH wpływa na profil uwalniania leku, a najlepsze wyniki obserwuje się w zakresie pH 6,00-6,50.

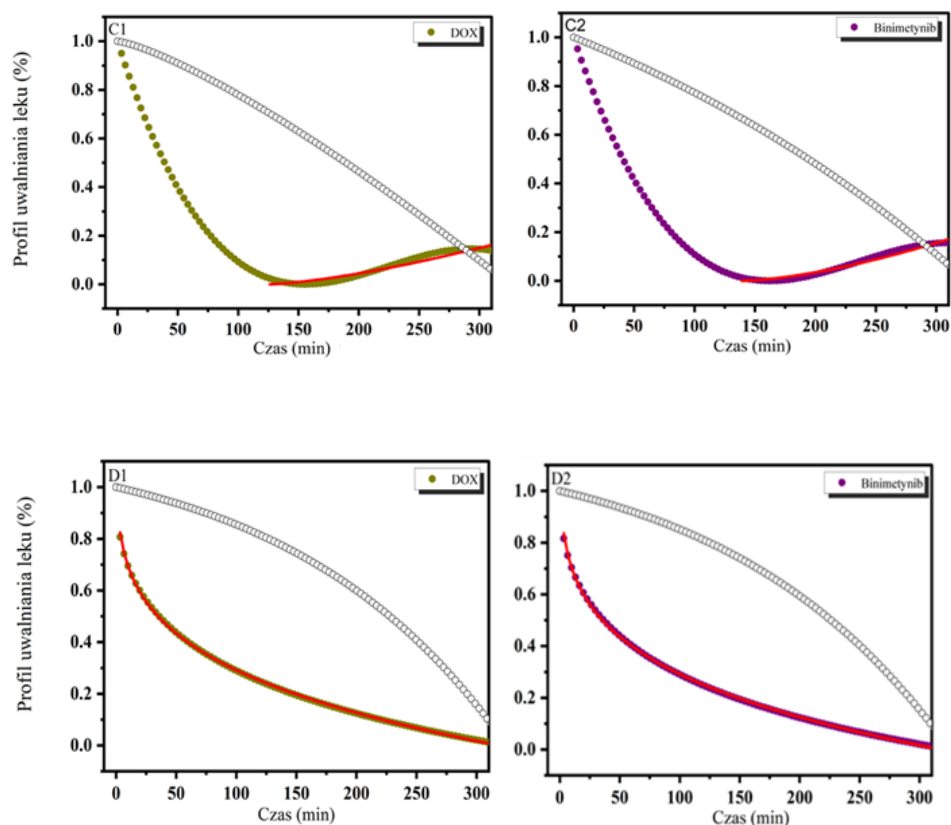
4.12.11. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z układów liposom-lek-albumina (HSA) [L_{DPPC}/DOX/Binimetynib]:HSA wraz z dopasowaniem parametrów do różnych modeli kinetycznych.





Rysunek 54. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]: HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 – pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 – pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 – pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 – pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37°C.

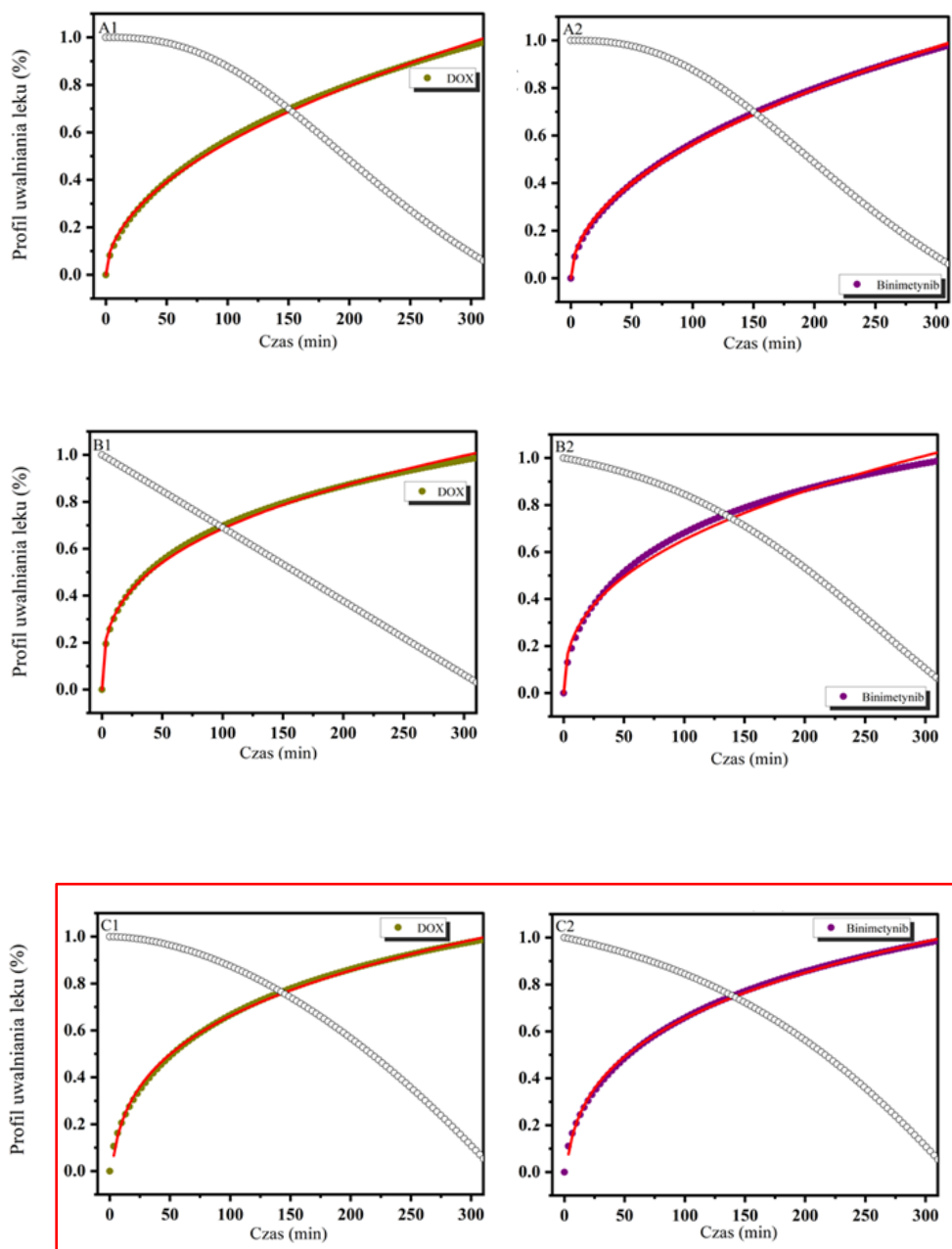


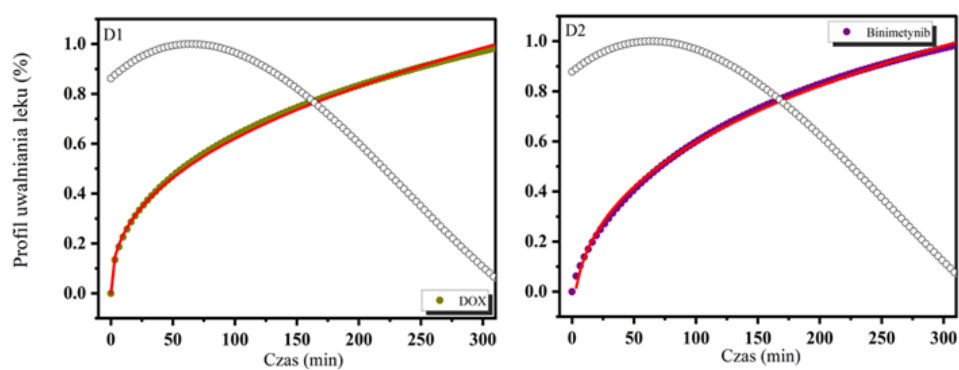


Rysunek 55. Kinetyka uwalniania DOXi Binimetynibu z liposomów [$L_{\text{DPPC/DOX/Binimetynib}}$]: HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

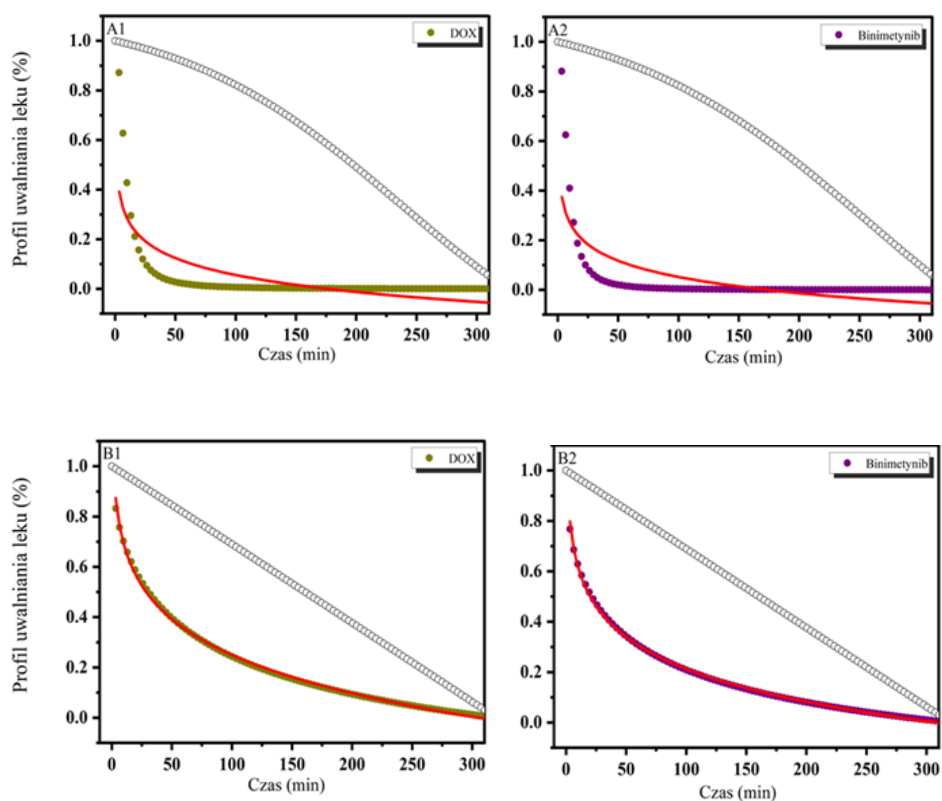
Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37⁰C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 były aproksymowane funkcją wykładniczą (tabela A11). Najlepsze dopasowanie zaobserwowano przy pH 6,50, stosując rozszerzony klasyczny model Freundlicha. Ten sam model zastosowano do funkcji malejących w temperaturze 41⁰C. Wydaje się, że pH otoczenia może bezpośrednio wpływać na profile leków zamkniętych w liposomach z białkiem HSA. Uzyskane wyniki potwierdzają, że pH środowiska i temperatura istotnie wpływają na profil uwalniania leku. Malejący charakter profili uwalniania leku w temperaturze 41⁰C może być przyczyną spowolnionego uwalniania substancji lub oddziaływań międzycząsteczkowych. Najkorzystniejszy profil uwalniania zaobserwowano przy pH=6,50.

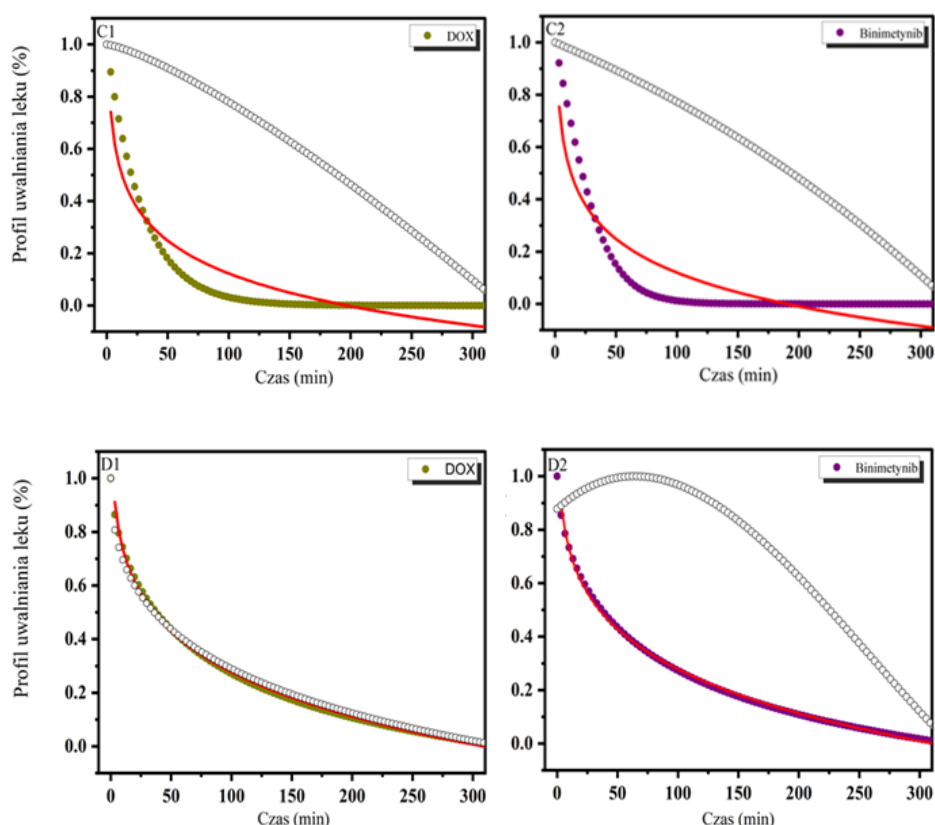
**4.12.12. Przedstawienie profili uwalniania leku DOX i Binimetynibu z układów liposom-
lek-albumina (dHSA) [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA wraz z dopasowaniem parametrów do
różnych modeli kinetycznych.**





Rysunek 56. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 – pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 – pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 – pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 – pH 7,40, Binimetynib) Temperatura pomiaru: 37°C.

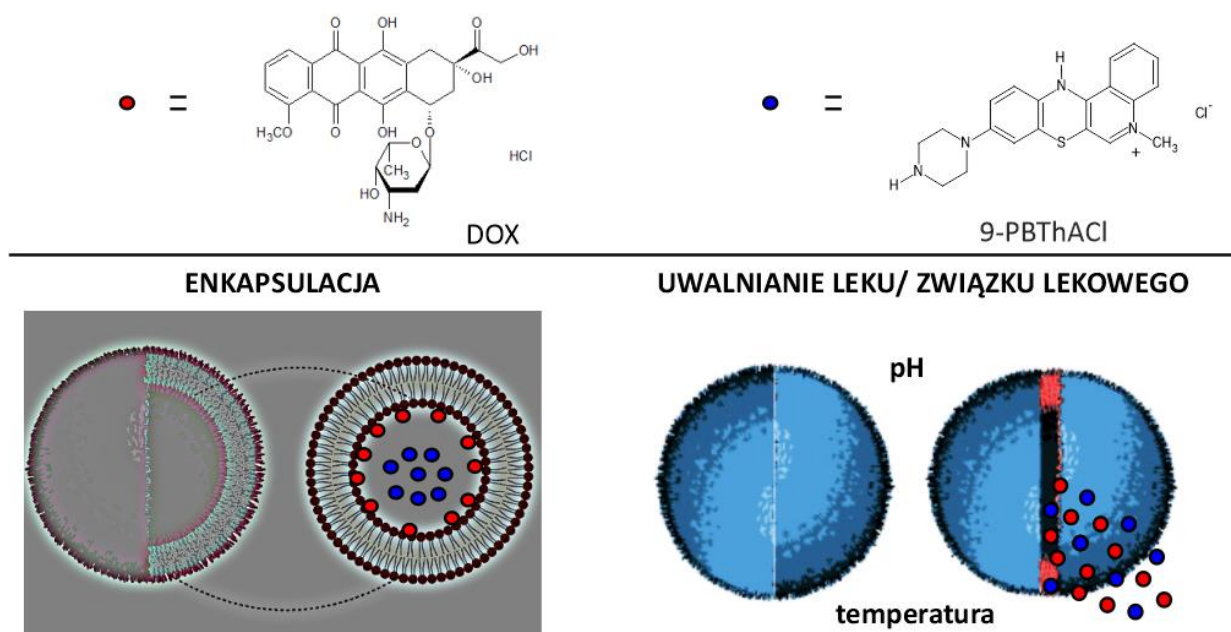




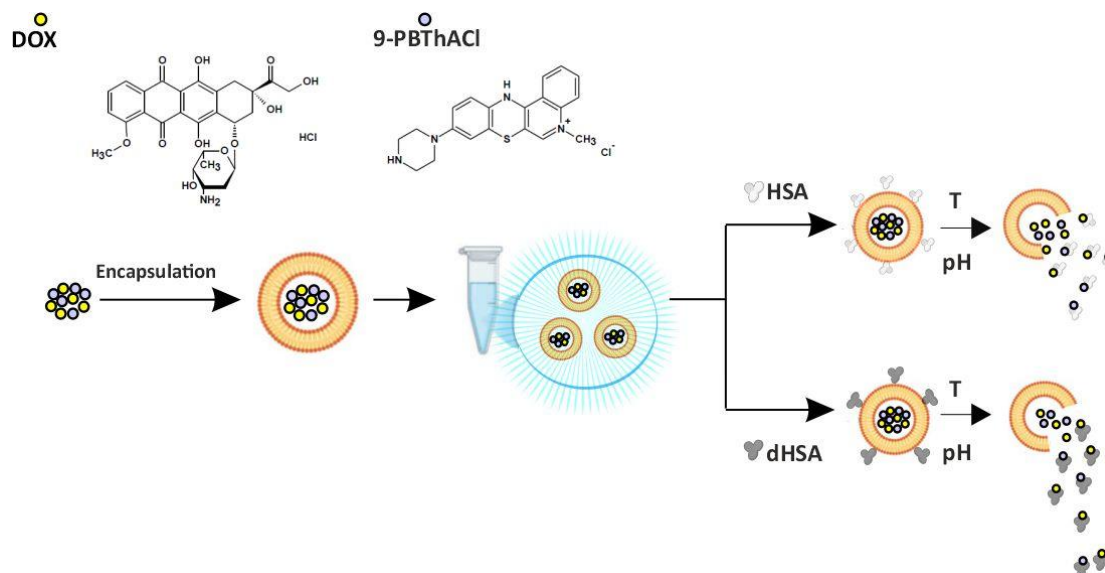
Rysunek 57. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41°C.

Profile uwalniania leku otrzymane w temperaturze 37°C i pH 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 zostały opisane modelem wykładniczym (tabela A12). Najlepsze dopasowanie z danymi eksperymentalnymi dla dHSA uzyskano przy użyciu rozszerzonego klasycznego modelu Freundlicha. Podobnie ten sam model został wykorzystany do funkcji malejących w temperaturze 41°C. Dodatkowo, wpływ temperatury na uwalnianie leku dla kompleksu liposomalnego [$L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$]:dHSA przygotowanego w temperaturze 41°C oraz w buforach 5,50; 6,00; 6,50; 7,40 był opisany przez $R^2_{adj} \approx 1$. Uzyskane dane wskazują na istnienie optymalnego zakresu pH odgrywającego kluczową rolę w procesie uwalniania leku, a najkorzystniejsze warunki stwierdzono przy pH=6,50.

4.12.13. Graficzne podsumowanie procesu uwalniania leków



Rysunek 58. Proces uwalniania leku/ substancji lekowej z liposomu pod wpływem temperatury i pH środowiska.



Rysunek 59. Proces uwalniania leku/ substancji lekowej z liposomu pod wpływem temperatury i pH środowiska z albuminą surowicy ludzkiej (HSA i dHSA).

4.13. Mikroskopia

Mikroskopia umożliwia analizę obiektów na poziomie mikroskalowym. Metoda ta jest cennym narzędziem stosowanym przede wszystkim w biologii i w medycynie. Mikroskopia fluorescencyjna była wykorzystywana do obserwacji liposomów przez m.in. Belfiore, L. i in. [109], czy Tentori, P. i in. [110]. W celu wizualizacji struktur liposomów został wykorzystany mikroskop fluorescencyjny. Mikrofotografie (Rysunek 60) przedstawiają zmiany w strukturze liposomów w zależności od ich zawartości tzn. związków, które zostały zamknięte w liposomach oraz warunków środowiskowych, które mogą prowadzić do ich fuzji lub degradacji. Przedstawione liposomy mają okrągłe kształty, jednak ze względu na różny czas przygotowania formulacji, można zaobserwować zmianę w ich wielkości (np. rysunek C i D). W eksperymencie zastosowano liposomy z różnymi lekami (Doksorubicyna/ Biniemetynib oraz z substancją lekową (9-PBThACI).

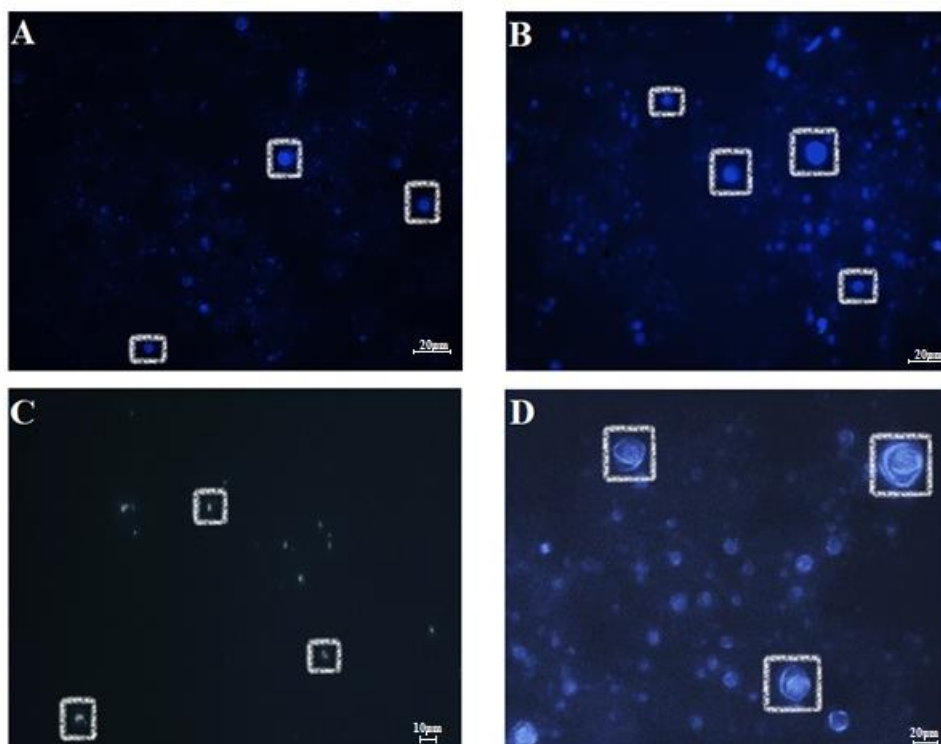
Po zastosowaniu odpowiedniego barwnika liposomy nie są bezpośrednio widoczne, a obserwację umożliwia emitowane przez nie światło fluorescencyjne. Zatem mikroskop fluorescencyjny sam w sobie nie pozwala na bezpośrednią obserwację liposomów, ale po oznaczeniu odpowiednimi barwnikami uzyskujemy obrazy fluorescencyjne, które umożliwiają ich wizualizację. Zastosowany barwnik (Błękit Nilu) wykazuje właściwości fluorescencyjne, które mogą być wykorzystane do barwienia struktur lipidowych. Wiąże się z dwuwarstwą lipidową liposomów i emituje ich światło, umożliwiając obserwację właściwości strukturalnych znaczących w badaniach nad nośnikami leków. Dzięki zdolności do selektywnego wnikania w obszary lipidowe, Błękit Nilu jest użytecznym narzędziem w badaniach nad strukturą i funkcją liposomów [111].

Barwienie liposomów przeprowadzono z wykorzystaniem roztworu (Tabela 16), który przygotowano poprzez rozpuszczenie Błękitu Nilu w 70% etanolu, o stężeniu 1mg/ml.

Tabela 16. Barwienie liposomów.

Próbka liposomów	Roztwór błękitu nilu
20 μ l	2 μ l

Mikrofotografie liposomów wykonano przy użyciu mikroskopu Leica DMI8, posiadającym oświetlenie fluorescencyjne EL6000. Rejestrację obrazu przeprowadzono z wykorzystaniem kamery Leica DFC7000 GT i obiektywu o powiększeniu $\times 40$.



Rysunek 60. Mikrofotografie przedstawiające liposomy z lekiem i związkiem lekowym (A- Binimetynib-9-BThACl, B- Doksorubicyna, C – Binimetynib, D- Doksorubicyna-9-PBThACl), pH 7,4.

Mikrofotografie ukazują struktury o kulistym kształcie występujące pojedynczo oraz w grupach. Na mikrofotografiach A i B zaznaczono pojedyncze sferyczne pęcherzyki o wielkości kilku mikrometrów. Poprzez zastosowanie barwnika oraz przy użyciu odpowiednich filtrów można zaobserwować ich rozmieszczenie w próbce. Na mikrofotografii C widoczne są małe pęcherzyki, natomiast mikrofotografia D uwidacznia dwuwarstwę lipidową liposomów. Wszystkie rysunki umożliwiają ocenę rozkładu rozmiarów liposomów w danej próbce, co jest ważne dla funkcji terapeutycznych. Rozmiar liposomów związany jest z zastosowanym związkiem, który zostaje uwalniany w odpowiedzi na różne bodźce zewnętrzne (np. zmiany pH, temperatury, czy obecność enzymów). Mogą one dotyczyć interakcji między liposomami oraz związkami, co jest istotne podczas projektowania systemów dostarczania leków. Bardzo ważnym aspektem jest czas przechowywania liposomów. Zmiany w strukturze są zauważalne w zależności od czasu (C i D), co może wpływać na stabilność i funkcje liposomów.

4.14. Lipofilowość

Do wyznaczenia teoretycznej wartości współczynnika podziału $clogP$ dla trzech związków: dwóch leków zatwierdzonych przez FDA (Binimetynib i Doksorubicyna) oraz dla substancji chemicznej (9-PBThACl) o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym zastosowano następujące programy komputerowe: AlogPS, OSIRIS, HyperChem, Sybyl X, MarvinSketch i Kowwin. W tabeli 17 przedstawiono oszacowane wartości lipofilowości $clogP$ dla trzech związków, a w tabeli 18 wartości wyznaczone eksperymentalnie [112, 113, 114].

Tabela 17. Obliczone wartości $clogP$ dla dwóch leków oraz związku lekowego.

Nazwa związku	Lipofilowość – $clogP$					
	AlogPS	OSIRIS property explorer	HyperChem 7.0	Sybyl X	Marvin Sketch	Kowwin
Binimetynib	3.0	2.5028	2.37	3.3104	3.81	3.66
Doksorubicyna	2.17	1.6865	1.36	1.9962	2.68	3.81
9-PBThACl	-1.4	-0.3015	3.72	-0.477	-0.94	-0.59

Do wyznaczenia lipofilowości za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz wykorzystano: Binimetynib, Doksorubicynę i 9-PBThACl. Analizy przeprowadzono na płytkach chromatograficznych RP-TLC (Merck: TLC Silica gel 60 RP-18) o wymiarach 10 x 10 cm. Fazy ruchome (50 ml) przygotowano przez zmieszanie odpowiednich ilości modyfikatora organicznego w układzie metanol/woda destylowana. W przypadku modyfikatora zmieniano stężenia w zakresie od 0,60 do 1,00 co 0,10. Przygotowane roztwory o stężeniu 10 mg/ml nanoszono punktowo po 4 krople związków za pomocą szklanych kapilar w odstępach co 1 cm w odległości 2 cm od dolnej krawędzi płytki. Chromatografię prowadzono przez 30 minut w szklanej komorze, nasyconej parami fazy ruchomej. Odległość migracji związku na płytce wynosiła 7,0 cm do pełnego rozwinięcia płytki. Płytki suszono w temperaturze pokojowej ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) i wywoływano w świetle UV ($\lambda = 254\text{ nm}$). Wszystkie analizy zostały powtórzone trzykrotnie.

Tabela 18. Wartości lipofilowości dla dwóch leków oraz związku chemicznego wyznaczonych eksperymentalnie.

Nazwa związku	Lipofilowość – $AlogP$
Binimetynib	3.01
Doksorubicyna	1.4
9-PBThACl	1.65

Zestawienie teoretycznych wartości clogP z danymi eksperymentalnymi pozwoliło na obliczenia współczynnika korelacji. Najwyższe wartości współczynnika $r > 0,6$ obliczono dla clogP oszacowanego przy pomocy programu SybylX oraz Osiris. Różnice w wartościach clogP mogą wynikać z różnych algorytmów obliczeniowych zastosowanych w programach komputerowych przewidujących clogP.

Tabela 19. Korelacja dla danych teoretycznych i empirycznych.

	AlogPS	HyperChem 7.0	Sybyl X	Marvin Sketch	Osiris	Kowwin	Exp.
AlogPS	1						
HyperChem 7.0	-0,8144	1					
Sybyl X	0,9855	-0,7043	1				
MarvinSketch	0,9783	-0,9169	0,9291	1			
Osiris	0,9941	-0,7468	0,9981	0,9502	1		
Kowwin	0,9783	-0,9169	0,9291	1	0,9502	1	
Exp.	0,5289	0,0617	0,665	0,3418	0,6176	0,3418	1

Ustalanie teoretycznej wartości lipofilowości, może być obciążone błędem. Na podstawie obliczeń nie można wskazać uniwersalnego programu do wyznaczania clogP. Wartości podawane są w skali logarytmicznej, a każda najmniejsza różnica może wpływać na określenie wartości rzeczywistych.

4.15. Analiza głównych składowych (PCA)

W wielu dyscyplinach naukowych m.in. w chemii, biologii, czy farmacji coraz powszechniejsze gromadzone są obecnie duże zbiory danych (tzw. big data). Aby przeanalizować takie zbiory danych są efektywne metody ich przesyłania, przechowywania i przetwarzania (3xp). W celu graficznej prezentacji danych wielowymiarowych (mD) konieczne jest zastosowanie techniki redukcji ich wymiarowości – jedną z takich technik jest metoda analizy czynników głównych (PCA). Odkrywcą metody PCA jest Karl Pearson, który w 1901 roku przedstawił procedurę dopasowania prostych i płaszczyzn do zbioru próbek w przestrzeni pomiarowej [115]. Na podstawie danych wejściowych dobierane są nowe wektory bazowe (tzw. czynniki globalne) tak aby maksymalizować opis wariancji. Analizę czynników głównych stosuje się głównie do kompresji, modelowania oraz wizualizacji

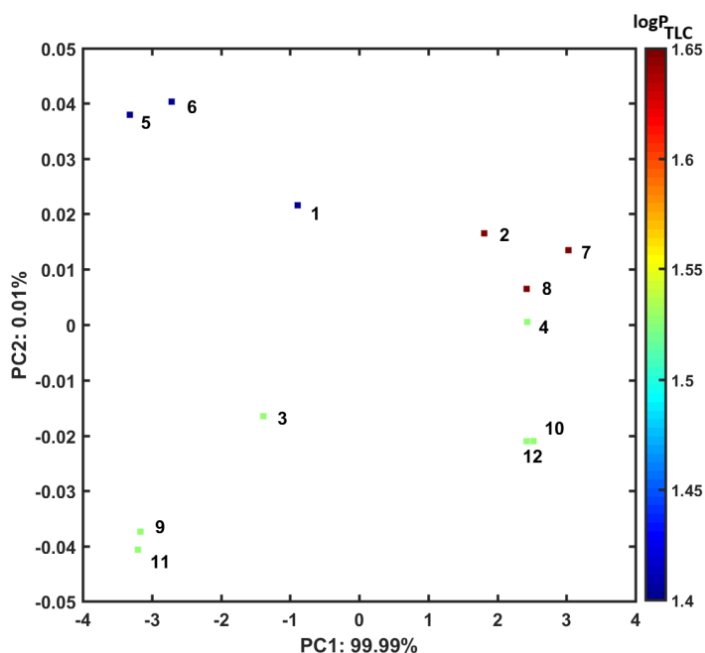
wielowymiarowych danych. Macierz wejściowych $X_m X_n$ o m obiektach i n zmiennych podlega dekompozycji do dwóch ortogonalnych macierzy wyników i wag. O liczbie istotnych czynników głównych (kompleksowości modelu) decyduje zwykle skumulowany procent wariancji opisanej przez kolejne czynniki główne. Obiekty (cząsteczki) rzutowane są na płaszczyzny określone przez pary istotnych czynników głównych (PCs), a podobieństwo pomiędzy molekułami opisuje się najczęściej na podstawie wybranej metryki podobieństwa (np. odległości Euklidesowej) [116].

Tabela 20. Układy liposomalne wybrane do analizy prawdopodobieństwa.

Układ	Formulacja liposomalna
1	L_{DPPC}/DOX
2	$L_{DPPC}/9-PBThACl$
3	$L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl_{\lambda 1}$
4	$L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl_{\lambda 2}$
5	$[L_{DPPC}/Doksorubicyna]:HSA$
6	$[L_{DPPC}/Doksorubicyna]:dHSA$
7	$[L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA$
8	$[L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA$
9	$[L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl]_{\lambda 1}:HSA$
10	$[L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl]_{\lambda 2}:HSA$
11	$[L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl]_{\lambda 1}:dHSA$
12	$[L_{DPPC}/DOX/9-PBThACl]_{\lambda 2}:dHSA$

Analiza podobieństwa wybranych układów liposomalnych umożliwia wskazanie grup podobnych formulacji w wielowymiarowej przestrzeni parametrów eksperymentalnych (UV/Vis). Jako parametry wejściowe do analizy PCA i hierarchicznej analizy skupień (HCA) użyte zostały profile uwalniania leku (dane o absorbancji) w temperaturach 37 i 41°C dla pH 7,4 formulacji liposomalnych zawierających 9-PBThACl oraz DOX z HSA oraz dHSA. Ocena podobieństwa profilu uwalniania danego leku została przeprowadzona na podstawie 37 pomiarów absorbancji zebranych w macierz $X_{12 \times 37}$, gdzie wiersze reprezentują 12 układów liposomalnych (1: $[L_{DPPC}/DOX]$, 2: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]$, 3: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}$, 4: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}$, 5: $[L_{DPPC}/DOX]:HSA$, 6: $[L_{DPPC}/DOX]:dHSA$, 7: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA$, 8: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA$, 9: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:HSA$, 10: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:HSA$, 11: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:dHSA$, 12: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:dHSA$, gdzie $\lambda 1=233$ nm i $\lambda 2=488$ nm) oraz kolumnami reprezentującymi parametry numeryczne wyznaczonej empirycznie absorbancji. Rzutowanie formulacji wykonano na płaszczyzny zdefiniowane przez pierwsze dwa czynniki główne (PC1 vs. PC2), gdyż odpowiadają one za 99,9% całkowitej wariancji

danych. Kolorami oznaczono lipofilowość eksperymentalną wyznaczoną techniką TLC dla cząsteczek 9-PBThACl i DOX (Rysunek 61).

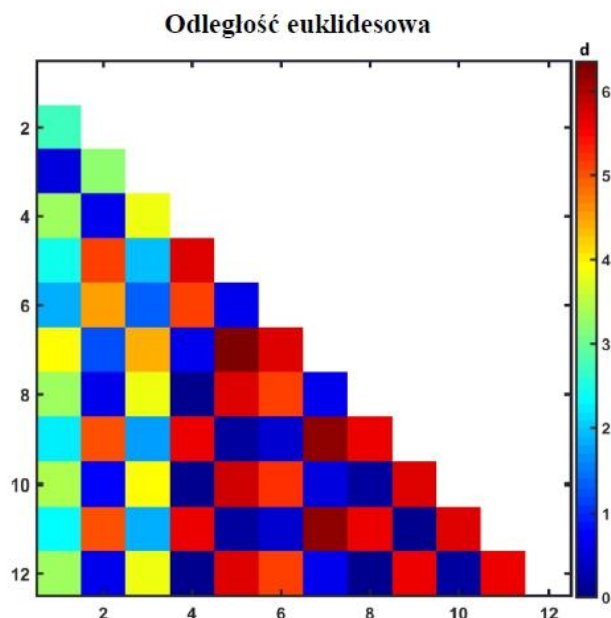


Rysunek 61. Rzut układów liposomalnych 1–12 na płaszczyznę zdefiniowaną PC1 i PC2. Kolory kodują empiryczną lipofilowość TLC 9-PBThACl i DOX wyrażone w skali logarytmicznej ($\log P_{TLC}$), gdzie 1: $[L_{DPPC}/DOX]$, 2: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]$, 3: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}$, 4: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}$, 5: $[L_{DPPC}/DOX]:HSA$, 6: $[L_{DPPC}/DOX]:dHSA$, 7: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA$, 8: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA$, 9: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:HSA$, 10: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:HSA$, 11: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:dHSA$, 12: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:dHSA$ [105].

Graficzna analiza rzutowanych formuacji 1-12 wskazuje na wyraźne tendencje do grupowania się danych względem pierwszego czynnika głównego PC1. Liposomy zawierające DOX tworzą pierwszą grupę charakteryzowaną ujemnymi wartościami PC1 ($PC1 < 0$), podczas gdy liposomy z 9-PBThACl są skupione przy dodatnich wartościach PC1 ($PC1 > 0$). Podobne są układy podwójnych leków 9-PBThACl i DOX (tzw. Combo) umieszczone są po ujemnej stronie osi PC2 ($PC2 < 0$), gdzie kompleksy liposom-lek-albumina ulegają klasteryzacji wzdłuż drugiego czynnika głównego (PC2). Liposomy zawierające pojedynczą cząsteczkę leku (9-PBThACl lub DOX) grupuje się po dodatniej stronie PC2.

W celu dokładniejszej analizy podobieństwa obliczone zostały odległości euklidesowe (d) dla współrzędnych PC1 i PC2 wszystkich 12 preparatów liposomalnych. Macierz odległości przedstawiona została w postaci kolorowej trójkątnej mapy, gdzie układ koduje

wartości odległości d (Rysunek 62). Kompleksy liposomalne 5, 6, 11 i 12 (systemy oparte na DOX) charakteryzowane są skrajnymi wartościami współrzędnych PC1 i PC2 (znajdując się na krawędziach płaszczyzny PC1 vs. PC2).

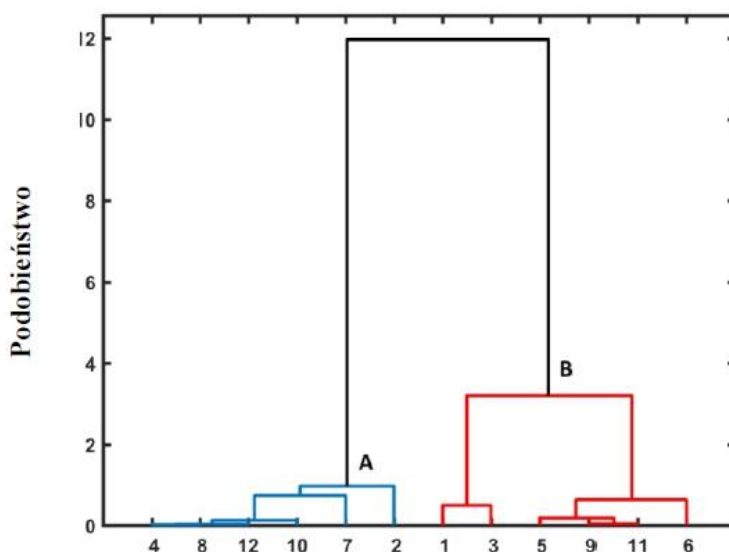


Rysunek 62. Macierz odległości euklidesowych obliczonych dla układów liposomalnych 1–12, gdzie 1: $[L_{DPPC}/DOX]$, 2: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]$, 3: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}$, 4: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}$, 5: $[L_{DPPC}/DOX]:HSA$, 6: $[L_{DPPC}/DOX]:dHSA$, 7: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA$, 8: $[L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA$, 9: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:HSA$, 10: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:HSA$, 11: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 1}:dHSA$, 12: $[L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{\lambda 2}:dHSA$ [105].

4.16. Metoda klasteryzacji hierarchicznej (HCA)

Klastrowanie hierarchiczne jest procedurą, której głównym celem jest grupowanie danych. Efekt analizy przedstawiany jest w postaci dendrogramu. Po zebraniu danych wybiera się odpowiedni sposób obliczenia odległości między obiektami (cząsteczkami) w przestrzeni wielowymiarowej, np. odległość euklidesową oraz metody analizy skupień np. metodę Warda. Użycie metody klasteryzacji hierarchicznej umożliwia prześledzenie podobieństw/różnic między obiektami w przestrzeni mierzonych parametrów. Metoda HCA tworzy wzór grupowania hierarchicznego obiektów przedstawiający graficznie jako dendrogram 2D, gdzie oś OX przedstawia szereg obiektów lub parametrów, a oś OY pokazuje podobieństwo/różnice między nimi [117]. Wygenerowany dendrogram potwierdza obserwowaną wcześniej w PCA tendencję do grupowania badanych kompleksów liposomalnych. Zasadniczo liposomy zawierające DOX tworzą oddzielny klaster oznaczony

jako B, który różni się od zbioru A z potencjalnym lekiem 9-PBThACl.



Rysunek 63. Dendrogram koniugatów liposomalnych 1–12. A,B – nazwy klastrow i 1:

[L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACl], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:dHSA, 12: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:dHSA [105].

4.17. Jednoczynnikowa analiza wariancji - ANOVA

Analiza wariancji ANOVA jest jedną z najczęściej stosowanych w badaniach medycznych metod statystycznych. Koncentruje się ona na analizie różnic wariancji między dwiema lub więcej grupami danych. W jednoczynnikowej wersji ANOVA (one-way) zakłada się hipotezę zerową (H_0), iż wszystkie k średnich populacji (μ) są sobie równe. W przeciwieństwie, hipoteza alternatywna H_1 przyjmuje iż co najmniej jedna z k średnich populacji nie jest równa. Jeśli wariancje pomiędzy grupami są wyraźnie większe od wariancji wewnątrz poszczególnych grup danych, to hipoteza H_0 nie jest prawdziwa i może być odrzucona na założonym poziomie istotności p (zwykle $p=0,05$) [118]. W praktyce statystyczną równość średnich dla danych grup weryfikuje się poprzez porównanie obliczonej wartości statystyki F z tabelarycznymi wartościami krytycznymi rozkładu $F_{p(df_1, df_2)}$ dla odpowiednich stopni swobody (df) i wartości p .

W celu zbadania, czy istnieje statystycznie istotny wpływ temperatury T i pH środowiska na stopień uwalniania enkapsulowanego leku (Doksorubicyna) i potencjalnego

leku (9-PBThACl), zastosowano klasyczną jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) na widmach absorpcji układów liposomalnych 1-12. W hipotezie zerowej H_0 przyjęto, że nie ma statystycznej różnicy między średnimi absorbancji dla 1-12 kompleksów liposomalnych przy różnych wartościach pH środowiska (5,50; 6,00; 6,50; 7,40) w stałej temperaturze 37 °C. Obliczone wartości F dla wszystkich analizowanych układów liposomalnych były większe w odniesieniu do krytycznej wartości statystyki F ($F_{0,05(3,144)}=3,144$) na założonym poziomie istotności $p=0,05$ wskazując, iż można odrzucić hipotezę zerową i jednocześnie przyjąć hipotezę alternatywną H_1 – istnieje więc istotny wpływ pH środowiska na analizowane układy liposomalne. Następnie przeanalizowano zależności absorbancji zmierzonej dla wszystkich 1-12 kompleksów liposomalnych przy stałym pH=7,4 środowiska, ale zmiennych wartościach temperatur 37°C i 41°C. Również w tym przypadku prawie wszystkie obliczone wartości statystyki F były większe od wartości krytycznej statystyki F ($F_{0,05(1,72)}=3,97$), wskazując na istotne statystyczne znaczenie temperatury w procesie uwalniania leku z liposomów. Jedynie w jednym przypadku $F_{obliczone} < F_{krytyczne}$, prawdopodobnie z powodu błędu systematycznego związanego z procesem kalibracji spektrometru.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono szereg badań, które pozwoliły na wyselekcjonowanie najlepszego nośnika do sporządzania formulacji terapeutycznej chemioterapeutyku przydatnego w onkologii. W pierwszym etapie badań wykonano syntezy i analizy potencjalnych nośników. Następnie dokonano selekcji i do dalszych eksperymentów zostały wybrane liposomy. Do stworzenia formulacji [nośnik:lek] wykorzystano dwa leki zatwierdzone przez FDA (Doksorubicyna i Binimetynib) oraz zsyntezowany nowy związek chemiczny o potwierdzonym silnym działaniu przeciwnowotworowym i potencjalnej możliwości zastosowania jako lek przeciwnowotworowy (Chlorek 9-(N-piperazylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny). Aby dokładnie przeanalizować skuteczność terapeutyczną przyszłej formulacji przyłączono białka HSA i dHSA w celu sprawdzenia ich wpływu na profil uwalniania leku.

- Przygotowano 18 nowych układów formulacji liposomalnych, które stanowią innowacyjne rozwiązanie w terapii celowanej. Każdy z układów został zbadany kolejno w temperaturach 37⁰C (przybliżona temperatura ciała) i 41⁰C (temperatura przejścia fazowego DPPC) oraz w czterech środowiskach o wartościach pH (5,50, 6,00, 6,50, 7,40).
- Otrzymane układy:
 1. L_{DPPC}/Binimetynib
 2. L_{DPPC}/Doksorubicyna
 3. L_{DPPC}/9-PBThACl
 4. L_{DPPC}/Binimetynib/Doksorubicyna
 5. L_{DPPC}/Binimetynib/9-PBThACl
 6. L_{DPPC}/Doksorubicyna/9-PBThACl
 7. [L_{DPPC}/Binimetynib]:HSA
 8. [L_{DPPC}/Binimetynib]:dHSA
 9. [L_{DPPC}/Doksorubicyna]:HSA
 10. [L_{DPPC}/Doksorubicyna]:dHSA
 11. [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA
 12. [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA
 13. [L_{DPPC}/Binimetynib/Doksorubicyna]:HSA

14. [L_{DPPC}/Binimetynib/Doksorubicyna]:dHSA
15. [L_{DPPC}/Binimetynib/9-PBThACl]:HSA
16. [L_{DPPC}/Binimetynib/9-PBThACl]:dHSA
17. [L_{DPPC}/Doksorubicyna/9-PBThACl]:HSA
18. [L_{DPPC}/Doksorubicyna/9-PBThACl]:dHSA

- W celu porównania wyników eksperymentalnych z wartościami teoretycznymi zastosowano sześć modeli matematycznych do określenia uwalniania związków chemicznych o właściwościach leczniczych z liposomów w określonych warunkach temperatury i odczynu.

Zastosowane modele matematyczne:

1. First-order
2. Bhaskas
3. Higuchi
4. Ritger-Peppas
5. Korsmeyer-Peppas
6. Rozwinięcie modelu Freundlich'a

- Zmodyfikowana metodologia odparowywania w odwróconej fazie (mREV) została zastosowana do zaprojektowania i eksperymentalnego przygotowania zestawu systemów dostarczania leków opartych na liposomach. Co więcej, do przybliżenia danych empirycznych zastosowano następujące modele: pierwszego rzędu, Bhaskasa, Higuchiego, Ritgera-Peppasa, Korsmeyera-Peppasa oraz rozszerzenie klasycznego modelu Freundlicha. W rzeczywistości modele pierwszego rzędu i Bhaskasa, które są oparte na rozkładzie prawdopodobieństwa Weibulla, zapewniły zadowalającą zgodność z danymi eksperymentalnymi dla kompleksów liposomalnych buforowanych przy wartościach pH odpowiednio 5,50, 6,00 i 7,40. Wykazano również, że modele Ritgera-Peppasa, Korsmeyera-Peppasa i rozszerzenie klasycznego modelu Freundlicha charakteryzowały się najwyższym współczynnikiem R^2_{adj} dla układu liposom/lek przy pH = 6,50. Z drugiej strony, model Higuchi wykazał najniższą zgodność z danymi empirycznymi, z wartościami R^2_{adj} w zakresie od 0,17448 do 0,97732 - odnotowano również całkowity brak zgodności.

- Wykonano obliczenia wartości lipofilowości wykorzystując odpowiednie programy komputerowe, a następnie porównano wartości lipofilowości z danymi empirycznymi w celu określenia korelacji uzyskanych wyników. Najlepsze wyniki uzyskano przy pomocy programów SybylX oraz Osiris. Wynika z tego, że ich algorytmy obliczeniowe są najbliższe danym eksperymentalnym w stosunku do badanych molekuł.
- Wybór wartości logarytmu dziesiętnego w zakresie pH (5,50 – 7,40) dla badanych formułacji nośnik-lek był podyktowany kilkoma czynnikami, a mianowicie:
 1. pH w guzach nowotworowych może być obniżone do poziomu w zakresie 5,50-7,00. Najczęściej w obrębie nowotworów obserwowana jest podwyższona temperatura spowodowana lokalnym stanem zapalnym co może powodować obniżenie pH środowiska guza.
 2. pH krwi w organizmie wynosi ok. 7,40. Jest to wartość, która zapewnia stabilność leków, co ułatwia systemowe leczenie, szczególnie w terapii przeciwnowotworowej.
 3. Interakcja leku z nośnikiem może zmieniać się w zależności od pH otoczenia.
 4. Biodostępność, rozpuszczalność i stabilność leku może być uwarunkowana pH środowiska.
- Przedstawione wyniki empiryczne i wyniki analiz statystycznych potwierdziły, że zastosowanie zmodyfikowanej metody mREV do przygotowania stabilnych liposomowych systemów uwalniania leków z perspektywą zastosowania ich w terapii jest odpowiednio wybraną strategią. Dzięki niej możliwe było zbadanie wpływu temperatury i pH na proces uwalniania badanych cząsteczek z liposomów.
- W ramach badań przeprowadzono analizę interakcji wytworzonych liposomów z albuminą surowicy ludzkiej. W celu oceny właściwości fizykochemicznych struktur liposomalnych oceniono stabilność preparatu oraz stopień uwalniania enkapsulowanych leków. Szczegółowo zbadano wpływ dwóch temperatur 37°C i 41°C oraz czterech wartości pH: 5,50; 6,00; 6,50 i 7,40. Okazało się, że pH otoczenia może wyraźnie modyfikować profil termiczny kompleksów leków zamkniętych w liposomach z białkami HSA i dHSA, co przekłada się na kinetykę procesu uwalniania związku zamkniętego w liposomach.

- Wykazano, że istniejące w błonie wiązania wodorowe mogą ulegać rozerwaniu wraz ze wzrostem temperatury, co skutkuje zwiększeniem płynności dwuwarstwy fosfolipidowej. Wydaje się, że obserwowany wpływ pH otoczenia na błonę liposomalną może wynikać z protonowania grup fosforanowych w środowisku kwaśnym i tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami DPPC. Uśredniona wartość absorbancji, obliczona jako różnica absorbancji pomiędzy układami $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ i $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ i $L_{DPPC/DOX}$, pozwoliła nam wskazać wartość pH środowiska ($pH \approx 6,8$), przy której profile właściwości fizykochemicznych kompleksów liposomalnych ulegały zauważalnym zmianom. Podczas zamknięcia w liposomach zaobserwowano pewną konkurencję między badanymi cząsteczkami, ponieważ stosunkowo wysokie wartości wydajności enkapsulacji (EE%) zaobserwowano tylko dla kompleksów liposomalnych zawierających jedną uwieczoną cząsteczkę leku. Na przykład, kompleks $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ przy pH 7,40 charakteryzuje się o połowę mniejszą enkapsulacją w porównaniu do systemów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ i $L_{DPPC/DOX}$.
- W celu oceny właściwości fizykochemicznych struktury liposomalnej $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ określono stabilność preparatu oraz stopień uwalniania enkapsulowanych leków. Albumina użyta w badaniach zapewniła wgląd w warunki fizjologiczne i procesy, którym mogą ulegać liposomy. Zgodnie z danymi literaturowymi, cząsteczki albuminy częściowo penetrują dwuwarstwę fosfolipidową, stymulując proces uwalniania badanych związków. Nie bez znaczenia jest również fakt, że zarówno cząsteczki 9-PBThACl, jak i DOX wiążą się z albuminą po uwolnieniu z liposomów.
- W poniższej tabeli przedstawiono wyniki profili uwalniania leków w temperaturze 37°C i 41°C. Uzyskane dane wskazują na istnienie optymalnego zakresu pH odgrywającego kluczową rolę w procesie uwalniania leku, a najkorzystniejsze warunki dla uwalniania leków zaobserwowano przy pH=6,50 w obu temperaturach.

Układ liposomalny	37°C	41°C
$L_{DPPC/9-PBThACl}$	pH = 6,5	pH = 5,5
$L_{DPPC/DOX}$	pH = 6,5	pH = 5,5

[L _{DPPC/9-PBThACl}]:HSA	pH = 6,0	pH = 5,5
[L _{DPPC/DOX}]:HSA	pH = 6,0	pH = 5,5
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA	pH = 6,5	pH = 6,0
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA	pH = 6,5	pH = 6,0
L _{DPPC/9-PBThACl/DOX} dla 9-PBThACl	pH = 6,5	pH = 5,5
L _{DPPC/9-PBThACl/DOX} dla DOX	pH = 6,5	pH = 5,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA dla 9-PBThACl	pH = 6,5	pH = 5,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA dla DOX	pH = 6,5	pH = 5,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA dla 9-PBThACl	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA dla DOX	pH = 6,5	pH = 6,5
L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib} dla 9-PBThACl	pH = 5,5	pH = 6,5
L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib} dla Binimetyribu	pH = 5,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib}]:HSA dla 9-PBThACl	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib}]:HSA dla Binimetyribu	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib}]:dHSA dla 9-PBThACl	pH = 6,0	pH = 6,0
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetyrib}]:dHSA dla Binimetyribu	pH = 6,0	pH = 6,0
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}] dla DOX	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}] dla Binimetyribu	pH = 6,0	pH = 6,0
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}]:HSA dla DOX	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}]:HSA dla Binimetyribu	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}]:dHSA dla DOX	pH = 6,5	pH = 6,5
[L _{DPPC/DOX/Binimetyrib}]:dHSA dla Binimetyribu	pH = 6,5	pH = 6,5

- Z przeprowadzonych badań wynika, że w zakresie fizjologicznego temperatury organizmu pacjenta najlepsze uwalnianie leku przebiega w lekko kwaśnym środowisku.
- W celu zbadania, czy istnieje statystycznie istotny wpływ temperatury T i pH środowiska na stopień uwalniania enkapsulowanego leku (Doksorubicyna) i potencjalnego leku (9-PBThACl), zastosowano klasyczną jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) na widmach absorpcji układów liposomalnych 1-12. W hipotezie zerowej H_0 przyjęto, że nie ma statystycznej różnicy między średnimi absorbancji dla 1-12 kompleksów liposomalnych przy różnych wartościach pH środowiska (5,50; 6,00; 6,50; 7,40) w stałej temperaturze 37 °C. Obliczone wartości F dla wszystkich analizowanych układów liposomalnych były większe w odniesieniu do krytycznej wartości statystyki F ($F_{0,05(3,144)} = 3,144$) na założonym poziomie istotności $p=0,05$ wskazując, iż można odrzucić hipotezę zerową i jednocześnie przyjąć hipotezę alternatywną H_1 – istnieje więc istotny wpływ pH środowiska na analizowane układy liposomalne. Następnie przeanalizowano zależności absorbancji zmierzonej dla wszystkich 1-12 kompleksów liposomalnych przy stałym pH=7,4 środowiska, ale zmiennych wartościach temperatur 37°C i 41°C. Również w tym przypadku prawie wszystkie obliczone wartości statystyki F były większe od wartości krytycznej statystyki F ($F_{0,05(1,72)} = 3,97$), wskazując na istotne statystyczne znaczenie temperatury w procesie uwalniania leku z liposomów. Jedynie w jednym przypadku $F_{obliczone} < F_{krytyczne}$, prawdopodobnie z powodu błędu systematycznego związanego z procesem kalibracji spektrometru.
- Profile uwalniania leku są funkcjonalnie zależne od procesów dyfuzji, degradacji nośnika, pęcznienia materiału i parametrów środowiskowych, np. zmian temperatury i pH.
- Z uwagi na to, że pH mikrośrodowiska nowotworowego, w tym czerniaka może wynosić od 6,00 do 6,9, otrzymane wyniki dając potwierdzające najlepsze uwalnianie leku przy pH 6,50 budzą nadzieje i szansę na zastosowanie wybranego nośnika w terapii celowanej, która ułatwi leczenie szczególnie w przypadku stosowania leków hydrofobowych, których transport ze względu na właściwości fizykochemiczne jest utrudniony. Przewidywanie *in silico* charakterystyki dostarczania leku wspomaganego liposomami może znacznie obniżyć koszty badań podstawowych związanych z poszukiwaniem nowych leków i skrócić czas tworzenia innowacyjnych nośników

leku. Wprowadzenie liposomalnych formuacji leków trudno rozpuszczalnych o dobrych właściwościach terapeutycznych może przynieść korzyści dla pacjentów leczonych onkologicznie w aspekcie zdrowotnym, społecznym i ekonomicznym w skali globalnej. W nowoczesnej onkologii wprowadzenie leku do miejsca zmienionego chorobowo przy wykorzystaniu inteligentnych nośników daje szerokie możliwości na stosowanie terapii skojarzonych i stosowanie mniejszych ilości leków w porównaniu z klasyczną chemioterapią.

Omówione wyniki badań zostały opublikowane w następujących pracach:

1. Kozik, V.; Pentak, D.; **Paździor, M.**; Zięba, A.; Bąk, A. From design to study of liposome-driven drug release part 1: Impact of temperature and pH on environment. *Int J Mol Sci.* **2023**, 24, 11686.
2. Pentak, D.; Kozik, V.; Zięba, A.; **Paździor-Heiske, M.**; Szymczyk, A.; Jampilek, J.; Bąk, A. Preparing a liposome-aided drug delivery system: The entrapment and release profiles of Doxorubicin and 9-(N-Piperazinyl)-5-methyl-12(H)-quino[3,4-b][1,4]benzothiazinium Chloride with Human serum albumin. *Pharmaceutics.* **2025**, 17, 202.

I załączone do niniejszego manuskryptu.

Wykaz stosowanych odczynników

- 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC, $\geq 99\%$) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Dichlorometan [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Chloroform [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Wodorofosforan dipotasu ($\geq 98\%$) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Diwodorofosforan sodu, monohydrat ($\geq 98\%$) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Chlorowodorek doksorubicyny (98.0-102.0% (HPLC)) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Binimetynib ($\geq 98\%$ (HPLC)) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Albumina surowicy ludzkiej, liofilizowana, nasycona kwasami tłuszczowymi (HSA) frakcja V, [EMD Millipore, Niemcy]
- Albumina surowicy ludzkiej, liofilizowana, pozbawiona kwasów (dHSA) ($\geq 99\%$) [Sigma-Aldrich, Niemcy]
- Chlorek 9-(N-piperazylo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny) zsyntezowany w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, w Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach
- Chitozan [Chemat]
- Kwas octowy [Chempur]
- Wodorotlenek sodu [Chempur]
- Kwas metakrylowy [Merck]
- Perhydrol 30% [Sigma Aldrich]
- Glikol polietylenowy [Sigma Aldrich]
- Żelatyna [Kol-Pol]
- Żel krzemionkowy [Merck]
- Chlorek tionylu [Thermo Fisher Scientific]
- Glicyna, DL-metionina, L-izoleucyna, L-leucyna, DL-cysteina [Sigma Aldrich]
- DL-seryna [Fluka]
- Kwas iminodiotowy [Thermo Fisher Scientific]
- Eter dietylowy [Chempur]
- Tetrahydrofuran [Chempur]
- Etanol [Chempur]
- Metanol [Chempur]
- Chlorek wapnia bezw. [Chempur]
- Dimetyloforamid [Chempur]
- Kwas solny [Chempur]

- Dimetylosulfotlenek (DMSO) [Sigma Aldrich]
- Tlenek grafenu [Sigma Aldrich]
- Haloizyt [próbka otrzymana z Politechniki Śląskiej w Gliwicach]
- Alamar Blue [Thermo Fisher Scientific]
- RPMI [Sigma Aldrich]
- Komórki mysiego czerniaka B16-F10 [ATCC]
- Komórki ludzkiego czerniaka: WM793B, WM35, 1205 Lu [ATCC]
- WP 760 zsyntezowany przez prof. Waldemara Priebego w Centrum MD Andersona w Huston w Teksasie
- ED FBS [Gibco]
- PBS [Thermo Fisher Scientific]
- Błękit Nilu [Warchem]

Wykaz aparatury pomiarowej oraz użytego oprogramowania

- Myjka ultradźwiękowa Sonic 3; Polsonic
- Aparat do pomiaru temperatury topnienia Stuart SMP10
- Mieszadło magnetyczne IKA RV 10- Reaktor mikrofalowy Botti Electronic
- Wyparka Heidolph Laborota 4000 efficient
- Waga RADWAG WXD 200/2000
- Czasza grzejna z mieszadłem CHEMLAND SXKW-982B
- NanoSight NS300 (NanoSight, Malvern, Wielka Brytania) z kamerą CMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) i laserem o długości fali 488 nm
- Spektrometr UV-Vis Lambda Bio 40 (Per-kin Elmer, Walthman, MA, USA), wyposażony w automatyczny regulator temperatury PTP-1 (Perkin Elmer, Walthman, MA, USA)
- Zetasizer Nano-ZS90 instrument (Malvern Instruments)
- Zetasizer Advance Malvern Panalytical
- Spektrometr FT-IR, SpectrumOne, Perkin Elmer
- Analizator DSC TA Instrument (zakres -90 do 600°C)
- Termograwimetr TG, TA Instrument
- Program Mestrenova
- Program ChemsSketch
- Program Biorender (<https://biorender.com>)
- Program CorelDRAW2020 (64-bit)
- oprogramowanie NTA 3.2 Dev Build 3.2.16

- oprogramowania UV WinLab Perkin Elmer.
- Program OriginPro 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).
- Programy do obliczania lipofilowości clogP: AlogPS, OSIRIS, HyperChem, Sybyl X, MarvinSketch i Kowwin
- MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA)

REFERENCJE

- [1] Bray, F.; Jemal, A.; Grey, N.; Ferlay, J.; Forman, D. Global cancer transitions according to the human development index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* **2012**, 13: 790–801.
- [2] Dolatabadi, J.E.N.; Valizadeh, H.; Hamishehkar, H. Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull.* **2015**, 5, 151-9.
- [3] Deng, Y.; Zhang, X.; Shen, H.; He, Q.; Wu, Z.; Liao, W.; Yuan, M. Application of the nano-drug delivery system in treatment of cardiovascular diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, 7, 489
- [4] Brown, D.G.; Wobst, H.J. A decade of FDA-approved drugs (2010-2019): trends and future directions. *J.Med.Chem.* **2021**, 64, 2312-2338.
- [5] Jain, K.K. An overview of drug delivery systems. *Methods Mol Biol.* **2020**, 2059, 1-54.
- [6] Ku, M.S. Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. *AAPS J.* **2008**, 10, 208–212.
- [7] Verma, P.; Thakur, A.S.; Deshmukh, K.; Jha, A.K.; Verma S. Routes of drug administration. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* **2010**, 1, 54-59.
- [8] Cai, X.; Jin, M.; Yao, L.; He, B.; Ahmed, S.; Safdar, W.; Ahmad, I.; Cheng, D.B.; Lei, Z.; Sun, T. Physicochemical properties, pharmacokinetics, toxicology and application of nanocarriers. *J. Mater. Chem. B.* **2023**, 11, 716–733.
- [9] Adepu, S.; Ramakrishna, S. Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules* **2021**, 26, 5905.
- [10] Habet, S. Narrow therapeutic index drugs: clinical pharmacology perspective. *JPP.* **2021**, 73, 1285-1291.
- [11] Park, K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *J Control Release.* **2014**, 190, 3-8.
- [12] Goldstein, M.J.; Peters, M.; Weber, B.L.; Davis, C.B. Optimizing the therapeutic window of targeted drugs in oncology: potency-guided first-in-human studies. *Clin Transl Sci.* **2021**, 14, 536-543.
- [13] Sabbagh, F.; Kim, B.S. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *J Control Release.* **2022**, 341, 132-146.
- [14] Varanko, A.; Saha, S.; Chilkoti, A. Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, 156, 133-187.
- [15] Zhuo, S.; Zhang, F.; Yu, J.; Zhang, X.; Yang, G.; Liu, X. pH-sensitive biomaterials for drug delivery. *Molecules* **2020**, 25, 5649.

- [16] Deirram, N.; Zhang, C.; Kermaniyan, S.S.; Johnston, A.P.R.; Such, G.K. pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40*, 1800917.
- [17] Arnott, J.A.; Planey, S.L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov.* **2012**, *7*, 863-75.
- [18] Silakari, O.; Singh, P.K. ADMET tools: Prediction and assessment of chemical ADMET properties of NCEs, *Concepts and Experimental Protocols of Modelling and Informatics in Drug Design.* **2021**, 299-320.
- [19] Atangcho, L.; Navaratna, T.; Thurber, G.M. Hitting undruggable targets: Viewing stabilized peptide development through the lens of quantitative systems pharmacology. *Trends Biochem Sci.* **2019**, *44*, 241-257.
- [20] Chandrasekaran, B.; Abed, S.A.; Al-Attaqchi, O.; Kuche, K.; Tekade, R.K. Chapter 21 - Computer-aided prediction of pharmacokinetic (ADMET) properties. *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research.* **2018**, 731-755.
- [21] Kapustikova, I.; Bāk, A.; Gonec, T.; Kos, I.; Kozik, V.; Jampilek, J. Investigation of hydro-lipophilic properties of N-alkoxyphenylhydroxynaphthalenecarboxamides. *Molecules.* **2018**, *23*, 1635.
- [22] Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical application to nanomedicine. *Molecules* **2020**, *25*, 112.
- [23] Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
- [24] Chakraborty, S.; Dhakshinamurthy, G.; Misra, S. Tailoring of physicochemical properties of nanocarriers for effective anti-cancer applications. *J Biomed Mater Res A.* **2017**, *105*, 2906-2928.
- [25] Thakur, N.; Thakur, S.; Chatterjee, S.; Das, J.; Sil, P.C. Nanoparticles as smart carriers for enhanced cancer immunotherapy. *Front Chem.* **2020**, *8*, 597806.
- [26] Surendiran, A.; Sandhiya, S.; Pradhan, S.C.; Adithan, C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J. Med. Res.* **2009**, *130*, 689–701.
- [27] Smith, I.T.; Zhang, E.; Yildirim, Y.A.; Campos, M.A.; Abdel-Mottaleb, M.; Yildirim, B.; Ramezani, Z.; Andre, V.L.; Scott-Vandeusen A.; Liang, P.; Khizroev, S. Nanomedicine and nanobiotechnology applications of magnetoelectric nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* **2023**, *15*, 1849.
- [28] Yetisgin, A.A.; Cetinel, S.; Zuvun, M.; Kosar, A.; Kutlu, O. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules* **2020**, *25*, 2193.

- [29] Alshawwa, S.Z.; Kassem, A.A.; Farid, R.M.; Mostafa, S.K.; Labib, G.S. Nanocarrier drug delivery systems: characterization, limitations, future perspectives and implementation of artificial intelligence. *Pharmaceutics*. **2022**, *14*, 833.
- [30] Wu, W.; Luo, L.; Wang, Y.; Wu, Q.; Dai, H.B.; Li, J.S.; Durkan, C.; Wang, N.; Wang, G.X. Endogenous pH-responsive nanoparticles with programmable size changes for targeted tumor therapy and imaging applications. *Theranostics*. **2018**, *8*, 3038–3058.
- [31] Alqosaibi, A.I. Nanocarriers for anticancer drugs: challenges and perspectives. *Saudi J Biol Sci*. **2022**, *29*, 103298.
- [32] Pytlakowska, K.; Kozik, V.; Matussek, M.; Pilch, M.; Hachuła, B.; Kocot, K. Glycine modified graphene oxide as a novel sorbent for preconcentration of chromium, copper, and zinc ions from water samples prior to energy dispersive X-ray fluorescence spectrometric determination. *RSC Adv*. **2016**, *6*, 42836.
- [33] Kozik, V.; Bąk, A.; Pentak, D.; Hachuła, B.; Pytlakowska, K.; Rojkiewicz, M.; Jampilek, J. Sieroń, K.; Jazowiecka-Rakus, J.; Sochanik, A. Derivatives of graphene oxide as potential drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol*. **2019**, *19*, 2489-2492.
- [34] Sima, L.E.; Chiritoiu, G.; Negut, I.; Grumezescu, V.; Orobeti, S.; Munteanu, C.V.A.; Sima, F.; Axente, E. Functionalized graphene oxide thin films for anti-tumor drug delivery to melanoma cells. *Front Chem*. **2020**, *8*, 184.
- [35] Magrzyk, M. Biofarmaceutyczna rewolucja oparta na mleku. **2025** <https://biotechnologia.pl/farmacja/biofarmaceutyczna-rewolucja-oparta-na-mleku,23564?month=3&year=2025>.
- [36] Sharma, H.; Mondal, S. Functionalized graphene oxide for chemotherapeutic drug delivery and cancer treatment: A promising material in nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci*. **2020**, *21*, 6280.
- [37] Mondal, J.; Pillariseti, S.; Junnuthula, V.; Saha, M.; Hwang, S.R.; Park, I.K.; Lee, Y.K. Hybrid exosomes, exosome-like nanovesicles and engineered exosomes for therapeutic application. *J Control Release* **2023**, *353*, 1127-1149.
- [38] Meng, W.; He, C.; Hao, Y.; Wang, L.; Li, L.; Zhu, G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug Deliv*. **2020**, *27*, 585-598.
- [39] Jaferník, K.; Ładniak, A.; Blicharska E.; Czarnek, K.; Ekiert, H.; Wiącek, A.E.; Szopa, A. Chitosan- based nanoparticles as effective drug delivery system- a review. *Molecules*. **2023**, *28*, 1963.
- [40] Rizeq, B.R.; Younes, N.N.; Rasool, K.; Nasrallah, G.K. Synthesis, bioapplications, and

- toxicity evaluation of chitosan- based nanoparticles. *Int J Mol Sci.* **2019**, 20, 5776.
- [41] Santos, A.C.; Ferreira, C.; Veiga, F.; Ribeiro, A.J.; Panchal, A.; Lvov, Y. Agarwal, A. Halloysite clay nanotubes for life sciences applications: from drug encapsulation to bioscaffold. *Adv Colloid Interface Sci.* **2018**, 257, 58-70.
- [42] Li, C.; Zhang, D.; Pan, Y.; Chen, B. Human serum albumin based nanodrug delivery systems: recent advances and future perspective. *Polymers* **2023**, 15, 3354.
- [43] di Masi, A. Human serum albumin: from molecular aspects to biotechnological applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 4081.
- [44] Ballinger, J.R. Challenges in preparation of albumin nanoparticle-based radiopharmaceuticals. *Molecules* **2022**, 27, 8596.
- [45] Spada, A.; Emami, J.; Tuszynski, J.A.; Lavasanifar, A. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2021**, 18, 1862-1894.
- [46] Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439–446.
- [47] Olivieri, J.R.; Craievich, A.F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering. *Eur Biophys J.* **1995**, 24(2), 77-84.
- [48] Gradishar, W.J.; Tjulandin, S.; Davidson, N.; Shaw, H.; Desai, N.; Bhar, P.; Hawkins, M.; O'Shaughnessy, J. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* **2005**, 23, 7794–7803.
- [49] Onafuye, H.; Pieper, S.; Mulac, D.; Jr, J.C.; Wass, M.N.; Langer, K.; Michaelis. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles overcome transporter-mediated drug resistance in drug-adapted cancer cells. *Beilstein J Nanotechnol.* **2019**, 10, 1707-1715.
- [50] Park, C.R.; Kim, H.Y.; Song, M.G.; Lee, Y.S.; Youn, H.; Chung, J.K.; Cheon, G.J.; Kang, K.W. Efficacy and safety of human serum albumin-cisplatin complex in U87MG xenograft mouse models. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21,7932.
- [51] Shen, Y.; Wang, M.; Wang, H.; Zhou, J.; Chen, J. Multifunctional human serum albumin fusion protein as a docetaxel nanocarrier for chemo-photothermal synergetic therapy of ovarian cancer. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2022**, 14, 19907–19917.
- [52] Jr, D.V.J.; Nichols, A.P.; Bender, R.A. Interaction of albumin and vincristine with a human lymphoblastic leukemia cell line in vitro. *Cancer Biochem Biophys.* **1980**, 4, 133-6.
- [53] Almond, B.A.; Hadba, A.R.; Freeman, S.T.; Cuevas, B.J.; York, A.M.; Detrisac, C.J.; Goldberg, E.P. Efficacy of mitoxantrone-loaded albumin microspheres for intratumoral

chemotherapy of breast cancer. *J Control Release*. **2003**, 91, 147-55.

[54] Wang, W.; Sun, Q.; Gan, N.; Zhai, Y.; Xiang, H.; Li, H. Characterizing the interaction between methyl ferulate and human serum albumin by saturation transfer difference NMR. *RSC Adv*. **2020**, 10, 32999-33009.

[55] Bychkova, A.V.; Yakunina, M.N.; Lopukhova, M.V.; Degtyarev, Y.N.; Motyakin, M.V.; Pokrovsky, V.S.; Kovarski, A.L.; Gorobets, M.G.; Retivov, V.M.; Khachatryan, D.S. Albumin-functionalized iron oxide nanoparticles for theranostics: engineering and long-term in situ imaging. *Pharmaceutics*. **2022**, 14, 2771.

[56] Irache, J.M.; Merodio, M.; Arnedo, A.; Camapanero, M.A.; Mirshahi, M.; Espuelas, S. Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini Rev Med Chem*. **2005**, 5, 293-305.

[57] Kouchakzadeh, H.; Shojaosadati, S.A.; Maghsoudi, A.; Farahani, E.V. Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology. *AAPS PharmSciTech*. **2010**, 11, 1206-11.

[58] Zhang, S.; Wang, G.; Lin, X.; Chatzinikolaidou, M.; Jennissen, H.P.; Laub, M.; Uludağ, H. Polyethylenimine-coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery. *Biotechnol Prog*. **2008**, 24, 945-56.

[59] Shamsi, M.; Mohammadi, A.; Manshadi, M.K.D.; Sanati-Nezhad, A. Mathematical and computational modeling of nano-engineered drug delivery systems. *J Control Release*. **2019**, 307, 150-165.

[60] Arifin, D.Y.; Lee, L.Y.; Wang, C.H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv Drug Deliv. Rev*. **2006**, 58, 1274-1325.

[61] Siepmann, J.; Peppas, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*. **2001**, 48, 139-157.

[62] Siepmann, J.; Siepmann, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release*. **2012**, 161, 351-62.

[63] Romm, E.L.; Tsigelny, I.F. Artificial intelligence in drug treatment. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2020**, 60, 353-369.

[64] Siepmann, J.; Peppas, N.A. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *Int J Pharm*. **2011**, 418, 6-12.

[65] Arifin, D.Y.; Lee, L.Y.; Wang, C.H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. **2006**, 58, 1274-1325.

- [66] Lin, C.C.; Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev.* **2006**, *58*, 1379-408.
- [67] Siepmann, J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm.* **2008**, *364*, 328-43.
- [68] Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release.* **1987**, *5*, 23–36.
- [69] Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* **2010**, *67*, 217-23.
- [70] Ilgin, P.; Ozay, H.; Ozay, O. A new dual stimuli responsive hydrogel: modeling approaches for the prediction of drug loading and release profile. *Eur Polym J.* **2019**, *113*, 244-253.
- [71] Li, M.; Du, C.; Guo, N.; Teng, Y.; Meng, X.; Sun, H.; Li, S.; Yu, P.; Galons, H. Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem.* **2019**, *164*, 640-653.
- [72] Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Davarani, F.H.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* **2018**, *10*, 57.
- [73] Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, *65*, 36-48.
- [74] Pentak, D. Evaluation of the physicochemical properties of liposomes as potential carriers of anticancer drugs: spectroscopic study. *J Nanopart Res.* **2016**, *18*, 126.
- [75] Pruchnik, H.; Gliszczyńska, A.; Włoch, A. Evaluation of the physico-chemical properties of liposomes assembled from bioconjugates of anisic acid with phosphatidylcholine. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*, 13146.
- [76] 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*, 1372.
- [77] Kozik, V.; Pentak, D.; Paździor, M.; Zięba, A.; Bąk, A. From design to study of liposome-driven drug release part 1: Impact of temperature and pH on environment. *Int J Mol Sci.* **2023**, *24*, 11686.
- [78] Pentak, D. In vitro spectroscopic study of piperine-encapsulated nanosize liposomes. *Eur Biophys J.* **2016**, *45*, 175-86.
- [79] Alavi, M.; Hamidi, M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and

lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther.* **2019**, 34.

[80] Huang, C.-h.; Li, S. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* **1999**, 1422, 273-307.

[81] Pentak, D.; Ploch-Jankowska, A.; Zięba, A.; Kozik, V. The advances and challenges of liposome-assisted drug release in the presence of serum albumin molecules: the influence of surrounding pH. *Materials.* **2022**, 15, 1586.

[82] Goik, U.; Załęska-Żyłka, I.; Pietrzycka, A. Liposomes as carriers for the delivery of active substances to the skin. *Inż Biomater.* **2015**, 130, 27-39.

[83] Wang, S.; Chen, Y.; Guo, J.; Huang, Q. Liposomes for tumor targeted therapy: a review. *Int J Mol Sci.* **2023**, 24, 2643.

[84] Zhai, Y.; Su, J.; Ran, W.; Zhang, P.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Yu, H.; Li, Y. Preparation and application of cell membrane-camouflaged nanoparticles for cancer therapy. *Theranostics.* **2017**, 7, 2575–2592.

[85] Luk, B.T.; Zhang, L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery. *J Control Release.* **2015**, 220, 600–607.

[86] Ribeiro, B.C.; Alvarez, C.A.R.; Alves, B.C.; Rodrigues, J.M.; Queiroz, M.J.R.P.; Almeida, B.G.; Pires, A.; Pereira, A.M.; Araújo, J.P.; Coutinho, P.J.G.; Rodrigues, A.R.O.; Castanheira, E.M.S. Development of thermo- and pH-sensitive liposomal magnetic carriers for new potential antitumor thienopyridine derivatives. *Materials (Basel).* **2022**, 15, 1737.

[87] Lombardo, D.; Kiselev, M.A. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics.* **2022**, 14, 543.

[88] Grit, M.; Crommelin, D.J.A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids.* **1993**, 64, 3-18.

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

[90] Shashi, K.; Satinder, K.; Bharat, P.; A complete review on: liposomes. *Inter Re. J of Pharm.* **2012**, 3, 10-16.

[91] Stebelska, K.; Wyrozumska, P.; Gubernator, J.; Sikorski, A.F. Highly fusogenic cationic liposomes transiently permeabilize the plasma membrane of HeLa cells. *Cell Mol Biol Lett.* **2007**, 12, 39–50.

[92] Awad, N.S.; Paul, V.; AlSawaftah, N.M.; Hussein, G.A. Effect of phospholipid head group on ultrasound-triggered drug release and cellular uptake of immunoliposomes. *Sci Rep.* **2023**, 13, 16644.

- [93] 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*, 1372.
- [94] Pande, S. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. **2023**, *51*, 428-440.
- [95] 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*, 1372.
- [96] Cagel, M.; Grotz, E.; Bernabeu, E.; Moretton, M.A.; Chiappetta, D.A. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today*. **2017**, *22*, 270-281.
- [97] Peter, S.; Alven, S.; Maseko, R.B.; Aderibigbe, B.A. Doxorubicin-based hybrid compounds as potential anticancer agents: a review. *Molecules*. **2022**, *27*, 4478.
- [98] Zhao, H.; Yu, J.; Zhang, R.; Chen, P.; Jiang, H.; Yu, W. Doxorubicin prodrug-based nanomedicines for the treatment of cancer. *Eur J Med Chem*. **2023**, *258*, 115612.
- [99] Meredith, A.M.; Dass, C.R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*. **2016**, *68*, 729-41.
- [100] Eide, S.; Feng, Z.P. Doxorubicin chemotherapy-induced “chemo-brain”: meta-analysis. *Eur J Pharmacol*. **2020**, *881*, 173078.
- [101] Tran, B.; Cohen, M.S. The discovery and development of binimetinib for the treatment of melanoma. *Expert Opin Drug Discov*. **2020**, *15*, 745-754.
- [102] Lyseng-Williamson, K.A. Encorafenib + binimetinib: a profile of their combined use in treating BRAF-mutated unresectable or metastatic melanoma. *Drugs Ther Perspect*. **2019**, *35*, 151–159.
- [103] Zięba, A.; Latocha, M.; Sochanik, A.; Nycz, A.; Kuśmierz, D. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel phenyl ring-substituted 5-alkyl-12(H)-quino[3,4-b][1,4]benzothiazine derivatives. *Molecules*. **2016**, *21*, 1455.
- [104] Zheng, M.; Priebe, W.; Walch, E.T.; Roth, K.G.; Han, M.; Tang, C.-H.; Lee, S.; Poindexter, N.J.; Fokt, I.; Grimm, E.A. WP760, a melanoma selective drug. *Cancer Chemother Pharmacol*. **2007**, *60*(5), 625-33.
- [105] Gill, P.; Moghadam, T.T.; Ranjbar, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech*. **2010**, *21*, 167-193.
- [106] Plante, A.F.; Fernandez, J.M.; Leifeld, J. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma*. **2009**, *153*, 1-10.

- [107] Szoka F., Jr., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1980, 9, 467–508.
- [108] Pentak, D.; Kozik, V.; Zięba, A.; Paździor-Heiske, M.; Szymczyk, A.; Jampilek, J.; Bąk, A. Preparing a liposome-aided drug delivery system: The entrapment and release profiles of Doxorubicin and 9-(N-Piperazinyl)-5-methyl-12(H)-quino[3,4-b][1,4]benzothiazinium Chloride with Human serum albumin. *Pharmaceutics*. **2025**, 17, 202.
- [109] Belfiore, L.; Spenkelink, L.M.; Ranson, M.; M van Oijen, A.; Vine, K.L. Quantification of ligand density and stoichiometry on the surface of liposomes using single-molecule fluorescence imaging. *J Control Release*. **2018**, 278:80-86.
- [110] Tentori, P.; Signore, G.; Camposeo, A.; Carretta, A.; Ferri, G.; Pingue, P.; Luin, S.; Pozzi, D.; Gratton, E.; Beltram, F.; Caracciolo, G.; Cardarelli, F. Fluorescence lifetime microscopy unveils the supramolecular organization of liposomal Doxorubicin. *Nanoscale*. **2022**, 14,8901-8905.
- [111] Costa, C.; Fernandes, B.; Guimaraes, D.; Nogueira, E.; Martins, M.; Matama, T.; Cavaco-Paulo, A. Comparing the delivery to the hair bulb of two fluorescent molecules of distinct hydrophilicities by different nanoparticles and a serum formulation. *Int J Pharm.* **2021**, 602, 120653.
- [112] Link: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/explore/compound/CHEMBL3187723>
- [113] Oriyama, T.; Yamamoto, T.; Nara, K.; Kawano, Y.; Nakajima, K.; Suzuki, H.; Aoyama, T. Prediction of the permeability of antineoplastic agents through nitrile medical gloves by zone classification based on their physicochemical properties. *J Pharm Health Care Sci.* **2020**, 6, 23.
- [114] Kisiel-Nawrot, E.; Pindjakova, D.; Latocha, M.; Bąk, A.; Kozik, V.; Suwinska, K.; Sochanik, A.; Cizek, A.; Jampilek, J.; Zięba, A. Design, synthesis and antimicrobial properties of new tetracyclic quinobenzothiazine derivatives. *Int J Mol Sci.* **2022**, 23,15078.
- [115] Jolliffe, I.T.; Cadima, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* **2016**, 374, 20150202.
- [116] Daszykowski, M.; Walczak, B. Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych. *Instytut Ekspertyz Sądowych.* **2008**, 91-132.
- [117] Kisiel-Nawrot, E.; Latocha, M.; Bak, A.; Kozik, V.; Jampilek, J.; Zieba, A. Anticancer efficacy of antibacterial quinobenzothiazines. *Appl. Sci.* **2023**, 13, 2886.
- [118] Bertinetto, C.; Engel, J.; Jansen, J. ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. *Anal. Chim. Acta X* **2020**, 6, 100061.

WYKAZ RYSUNKÓW

WSTĘP TEORETYCZNY

Rysunek 1. Profil uwalniania leku [9].

Rysunek 2. Kinetyka uwalniania leku [9].

Rysunek 3. Ograniczenia konwencjonalnych systemów dostarczania leków (kapsułki, tabletki, czopki, syropy, maści, itd.) [9].

Rysunek 4. Porównanie konwencjonalnego dostarczania leków (I.) oraz kontrolowanego uwalniania leków (II.) [9].

Rysunek 5. Działanie systemów dostarczania leków o kontrolowanym uwolnieniu [14].

Rysunek 6. Nanomateriały wykorzystywane w terapii [28].

Rysunek 7. Struktura krystaliczna HSA z pozycją Cys34 zaznaczoną na czerwono (a). Podział białka na domeny (I-III) i subdomeny (A, B). Kod identyfikacyjny PDB: 1bm0. Lokalizacje siedmiu (1-7) miejsc wiązania wspólnych dla anionów kwasów tłuszczowych wykorzystujących palmitynian przedstawiono na czerwono (b). Kod PDB id: 1e7h [108].

Rysunek 8. Wzory modeli matematycznych [68, 69, 70].

Rysunek 9. Budowa liposomu [79].

Rysunek 10. Struktura liposomu zawierającego leki hydrofilowe i hydrofobowe [79].

Rysunek 11. Rodzaje liposomów [82].

Rysunek 12. Syntetyczne fosfolipidy na bazie kwasu palmitynowego [92].

Rysunek 13. Struktura Doksorubicyny [97].

Rysunek 14. Struktura Binimetynibu [101].

Rysunek 15. Struktura (9-PBThACl) [103].

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Rysunek 16. Synteza chlorowodorków estrów metylowych aminokwasów.

Rysunek 17. Synteza na przykładzie GO-Gly [32].

Rysunek 18. Przykładowe widma IR dla tlenku grafenu i jego pochodnych (GO - Gly: tlenek grafenu- chlorowodorek glicyny; GO-Ser: tlenek grafenu – chlorowodorek seryny; GO -ASA: tlenek grafenu – chlorek aspiryny; GO - Leu: tlenek grafenu - chlorowodorek leucyny; GO-Ile: tlenek grafenu – chlorowodorek izoleucyny.

Rysunek 19. Proces izolacji egzosomów. Grafika wykonana w programie BioRender.

Rysunek 20. Charakterystyka mikropęcherzyków w rozdzielonych frakcjach medium

hodowlanego.

Rysunek 21. Rozkład wielkości cząstek.

Rysunek 22. Cytotoksyczność egzosomów zawierających leki na komórki czerniaka B16-F10.

Rysunek 23. Wykresy przedstawiające wyniki testu cytotoksyczności haloizytu po 24 i 48h.

Rysunek 24. Termogramy przedstawiające hydrożele na bazie chitozanu.

Rysunek 25. Termogram TGA przedstawiający hydrożel na bazie chitozanu.

Rysunek 26. Przykładowe widma IR dla hydrożeli po liofilizacji (Chitozan, Chitozan – żel krzemionkowy, Chitozan – żelatyna).

Rysunek 27. Synteza chlorku 9-(N-piperazyńlo)-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny [103].

Rysunek 28. Rozkład wielkości cząstek formulacji liposomalnej.

Rysunek 29. Rozkład wielkości w liposomach $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$ i $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ (1.). Rozkład wielkości w liposomach $L_{DPPC/Binimetynib}$, $L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}$ i $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ (2.).

Rysunek 30. Profil uwalniania leku i substancji lekowej (R%) 9-PBThACl, DOX z DPPC/lek/lek i DPPC/kompleksy lekowe dla różnych wartości pH: (A1-2: pH=5,50), (B1-2: pH=6,00), (C1-2: pH= 6,50), (D1-2 pH=7,40).

Rysunek 31. Wpływ 5-tygodniowej inkubacji kompleksów liposomalnych: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$; $L_{DPPC/9-PBThACl}$ na absorbancję A ($A_{\lambda_{max}9-PBThACl} = 488nm$); (A: pH=5,50) (B: pH=6,00), (C: pH=6,50), (D: pH=7,40).

Rysunek 32. Wpływ 5-tygodniowej inkubacji kompleksów liposomalnych: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$; $L_{DPPC/DOX}$ na absorbancję A ($A_{\lambda_{max}DOX} = 233nm$); (A: pH=5,50), (B: pH=6,00), (C: pH=6,50), (D: pH=7,40).

Rysunek 33. Wpływ otaczającego pH na średnią wartość absorbancji; (A: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX} - L_{DPPC/9-PBThACl}$, $A_{\lambda_{max}}=488nm$), (B: $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX} - L_{DPPC/DOX}$, $A_{\lambda_{max}}=233nm$).

Rysunek 34. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThACl, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThACl, B2 - pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThACl, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThACl, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 37°C.

Rysunek 35. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThACl, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThACl, B2 - pH 6.00,

DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThACl, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThACl, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 36. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThACl, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThACl, B2 - pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThACl, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThACl, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 37. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5.50, 9-PBThACl, A2 - pH 5.50, DOX), (B1 – pH 6.00, 9-PBThACl, B2 - pH 6.00, DOX), (C1 – pH 6.50, 9-PBThACl, C2 - pH 6.50, DOX), (D1 – pH 7.40, 9-PBThACl, D2 - pH 7.40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 38. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 39. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA oraz [L_{DPPC}/DOX]:dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 40. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 41. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 42. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH

5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 43. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 44. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 45. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:dHSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, DOX), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, DOX), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, DOX), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, DOX). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 46. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 47. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 48. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]: HSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50,

Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 49. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]: HSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 50. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 51. Kinetyka uwalniania 9-PBThACl i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]: dHSA Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, 9-PBThACl, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, 9-PBThACl, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, 9-PBThACl, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, 9-PBThACl, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 52. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów L_{DPPC}/DOX/Binimetynib. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 53. Kinetyka uwalniania DOXi Binimetynibu z liposomów L_{DPPC}/DOX/Binimetynib. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 54. Kinetyka uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC}/DOX/binimetynib]: HSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 -

pH 7,40, binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 55. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]: HSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 56. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]: dHSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 37⁰C.

Rysunek 57. Kinetyka uwalniania DOX i Binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]: dHSA. Czerwone linie odpowiadają dopasowaniom najlepszych modeli matematycznych (A1 – pH 5,50, DOX, A2 - pH 5,50, Binimetynib), (B1 – pH 6,00, DOX, B2 - pH 6,00, Binimetynib), (C1 – pH 6,50, DOX, C2 - pH 6,50, Binimetynib), (D1 – pH 7,40, DOX, D2 - pH 7,40, Binimetynib). Temperatura pomiaru: 41⁰C.

Rysunek 58. Proces uwalniania leku/substancji lekowej z liposomu pod wpływem temperatury i pH środowiska.

Rysunek 59. Proces uwalniania leku/substancji lekowej z liposomu pod wpływem temperatury i pH środowiska z albuminą surowicy ludzkiej (HSA i dHSA).

Rysunek 60. Mikrofotografie przedstawiające liposomy z lekiem i związkiem lekowym (A- Binimetynib-9-PBThACl, B- Doksorubicyna, C- Binimetynib, D- Doksorubicyna - 9-PBThACl), pH 7,40.

Rysunek 61. Rzut układów liposomalnych 1–12 na płaszczyznę zdefiniowaną PC1 i PC2. Kolory kodują empiryczną lipofilowość TLC 9-PBThACl i DOX wyrażone w skali logarytmicznej ($\log P_{TLC}$), gdzie 1: [L_{DPPC/DOX}], 2: [L_{DPPC/9-PBThACl}], 3: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}, 4: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}, 5: [L_{DPPC/DOX}]:HSA, 6: [L_{DPPC/DOX}]:dHSA, 7: [L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA, 8: [L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA, 9: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:dHSA, 12: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:dHSA [105].

Rysunek 62. Macierz odległości euklidesowych obliczonych dla układów liposomalnych 1–12, gdzie 1: [L_{DPPC/DOX}], 2: [L_{DPPC/9-PBThACl}], 3: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}, 4: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}, 5: [L_{DPPC/DOX}]:HSA, 6: [L_{DPPC/DOX}]:dHSA, 7: [L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA, 8: [L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA, 9: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:dHSA, 12: [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:dHSA [105].

Rysunek 63. Dendrogram koniugatów liposomalnych 1–12. A,B – nazwy klastrów i 1: [L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACl], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:dHSA, 12: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:dHSA 105.

WYKAZ TABEL

WSTĘP TEORETYCZNY

Tabela 1. Procesy farmakokinetyczne ADME [8]

Tabela 2. Przykłady tradycyjnych metod otrzymywania liposomów [83].

Tabela 3. Rodzaje liposomów i ich reakcje na bodźce [85, 86].

Tabela 4. Czynniki wpływające na stabilność fizyczną i chemiczną liposomów [85, 88].

Tabela 5. Preparaty liposomalne stosowane klinicznie i ich zastosowanie [94, 95].

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

Tabela. 6. Porównanie wydajności chlorowodorków estrów metylowych wybranych aminokwasów.

Tabela 7. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACl, DOX, Binimetynibu w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl, L_{DPPC}/DOX, L_{DPPC}/Binimetynib dla różnych wartości pH.

Tabela 8. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACl i DOX w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX dla różnych wartości pH.

Tabela 9. Wydajność procentowa kapsułkowania 9-PBThACl i Binimetynibu w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib dla różnych wartości pH.

Tabela 10. Wydajność procentowa DOX i Binimetynibu w liposomach L_{DPPC}/DOX/Binimetynib dla różnych wartości pH.

Tabela 11. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i DOX w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl i L_{DPPC}/DOX dla różnych wartości pH.

Tabela 12. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i DOX w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX dla różnych wartości pH.

Tabela 13. Obciążenie lekiem (DL%) Binimetynibu w liposomach L_{DPPC}/Binimetynib dla różnych wartości pH.

Tabela 14. Obciążenie lekiem (DL%) 9-PBThACl i Binimetynib w liposomach L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib dla różnych wartości pH.

Tabela 15. Obciążenie lekiem (DL%) DOX i Binimetynib w liposomach $L_{DPPC/DOX/Binimetynib}$ dla różnych wartości pH.

Tabela 16. Barwienie liposomów.

Tabela 17. Obliczone wartości clogP dla dwóch leków oraz związku lekowego.

Tabela 18. Wartości lipofilowości dla dwóch leków oraz związku chemicznego wyznaczonych eksperymentalnie.

Tabela 19. Korelacja dla danych teoretycznych i empirycznych.

Tabela 20. Układy liposomalne wybrane do analizy prawdopodobieństwa.

ANEKS

Tabela A1. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A2. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:HSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A3. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA$ oraz $[L_{DPPC/DOX}]:dHSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A4. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A5. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A6. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A7. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i binimetynibu z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}]$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A8. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i binimetynibu z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}]:HSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A9. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i binimetynibu z liposomów $[L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}]:dHSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A10. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów $[L_{DPPC/DOX/binimetynib}]$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A11. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów $[L_{DPPC/DOX/binimetynib}]:HSA$ w różnych modelach matematycznych.

Tabela A12. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/binimetynib}]:dHSA w różnych modelach matematycznych.

Tabela A13. Parametry statystyczne ANOVA dla kompleksów liposomalnych 1-12 w różnych wartościach pH środowiska, gdzie pH₁=5,50, pH₂=6,00, pH₃=6,50 i pH₄=7,40 w stałej temperaturze T=37°C. Krytyczna wartość F na poziomie istotności 0,05 wynosi F_{0,05(3,144)}=3,144.

Tabela A13. Parametry statystyczne ANOVA dla kompleksów liposomalnych 1-12 w różnych temperaturach T₁=37°C i T₂=41°C w stałym pH=7,40. Krytyczna wartość F na poziomie istotności 0,05 wynosi F_{0,05(1,72)}=3,97.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje w recenzowanych czasopismach:

1. Józef Ciuła, Violetta Kozik, Agnieszka Generowicz, Krzysztof Gaska, Andrzej Bąk, **Marlena Paździor**, Krzysztof Barbusiński. Emission and neutralization of methane from a municipal landfill-parametric analysis. *Energies* **2020**, 13(23), 6254.

IF= 3,0; MEiN=140.

2. Joanna Jazowiecka-Rakus, Agata Hadryś, Masmudur M Rahman, Grant McFadden, Wojciech Fidyk, Ewa Chmielik, **Marlena Paździor**, Maciej Grajek, Violetta Kozik, Aleksander Sochanik. Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-Loaded into Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Effective Treatment for Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* **2021**, 13(6), 1394.

IF= 4,5; MEiN=140.

3. Violetta Kozik, Danuta Pentak, **Marlena Paździor**, Andrzej Zięba, Andrzej Bąk. From Design to Study of Liposome-Driven Drug Release Part 1: Impact of Temperature and pH on Environment. *Int J Mol Sci.* **2023**, 24(14), 11686.

IF= 4,9; MEiN=140.

4. Ilona Nowak, **Marlena Paździor**, Robert Sarna, Marcel Madej. Molecular mechanisms in the design of novel targeted therapies for neurodegenerative diseases. *Curr Issues Mol Biol.* **2024**, 46(6), 5436-5453.

IF= 2,8; MEiN=70.

5. Danuta Pentak, Violetta Kozik, Andrzej Zięba, **Marlena Paździor-Heiske**, Aleksandra Szymczyk, Josef Jampilek, Andrzej Bąk. Towards liposome-aided drug delivery system part 2: Entrapment and release profile with human serum albumin. *Pharmaceutics.* **2025**, IF=4,9; MEiN=100.

Punktowane materiały pokonferencyjne oraz współautorstwo rozdziałów w monografii:

2019 Preparation of selected quinoline derivatives using N-oxides : [abstract : II, 19]
Paździor Marlena Beata, W: XXIII Gliwice Scientific Meetings lecture abstracts, 2019, Gliwice, Association for the Support of Cancer Research, s.[93]
MEiN=5,0

2020 Badanie profilu lipofilowości związków biologicznie aktywnych : [abstract : IV, 8]
Aleksandra Świetlicka, Andrzej Waldemar Bąk, Violetta Elżbieta Kozik, **Marlena Beata Paździor**, W: VII Śląskie Spotkania Naukowe [materiały konferencyjne], 2020, Gliwice, Politechnika Śląska, s.56-57
MEiN=20,0

2020 Cytotoxicity of drug-loaded exosome carriers for melanoma cell cultures : [abstract: IV, 57] **Paździor Marlena Beata**, Kozik Violetta Elżbieta, Świetlicka Aleksandra [i in.], W: XXIV Gliwice Scientific Meetings lecture abstracts, 2020, Gliwice, Association for the Support of Cancer Research, s.[123]
MEiN=5,0

2020 Effectiveness of Light-encoding oncolytic myxoma virus-loaded ADSCs to destroy murine pancreatic cancer cells : [abstract: IV, 54] Agata Ewa Hadryś, Aleksander Sochanik, Wojciech Fidyk, Maciej Grajek, **Marlena Beata Paździor**, Masmudur M Rahman, Grant McFadden, Violetta Elżbieta Kozik, Joanna Jazowiecka-Rakus, W: XXIV Gliwice Scientific Meetings lecture abstracts, 2020, Gliwice, Association for the Support of Cancer Research, s.[120]
MEiN=5,0

Patent na wynalazek pt.: Symetryczne tioamidy kwasu tereftalowego oraz sposoby ich otrzymywania, UŚ661, udzielony 9.04.2025, autorzy: Kozik, V.; Bąk, A.; Zięba, A.; Świetlicka, A.; Paździor, M.; Hadryś, A.; Jędrzejowska, A., Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice, Polska

Wystąpienia ustne:

1. **Paździor M.**, Sochanik A., Jazowiecka-Rakus J., Świetlicka A., Hadryś A., Kozik V. „Egzosomy z WP760 w badaniach nad terapią czerniaka złośliwego” VIII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 2021.
2. **Paździor M.**, Sochanik A., Kozik V., Hadryś A., Jazowiecka-Rakus J. „Cytotoksyczność bisantracykliny WP760 przenoszonej w nośnikach egzosomalowych dla hodowli komórek czerniaka złośliwego” Onkologia obliczeniowa i spersonalizowana medycyna TU i TERAZ! Computational Oncology and Personalized Medicine COPM2021 Conference, Politechnika Śląska, Gliwice, 2021.

Współautor wystąpień ustnych:

3. Świetlicka A., Bąk A., Kozik V., **Paździor M.** „Badanie profilu lipofilowości związków biologicznie aktywnych” VII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 2020.
4. Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., **Paździor M.**, M Rahman M., McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. “Effectiveness of Light-encoding oncolytic myxoma virus loaded ADSCS to destroy murine pancreatic cancer cells” XXIV Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 2020.
5. Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., **Paździor M.**, Rahman M.M, McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. „Wirus myksomatozy i mezenchymalne komórki macierzyste – nowa eksperymentalna strategia leczenia nowotworu trzustki” Onkologia obliczeniowa i spersonalizowana medycyna TU i TERAZ! Computational Oncology and Personalized Medicine COPM2021 Conference, Politechnika Śląska, Gliwice, 2021.
6. Jazowiecka-Rakus J., Hadryś A., Rahman M.M, McFadden G., Fidyk W., Chmielik E., **Paździor M.**, Grajek M., Kozik V., Sochanik A. „Myxoma virus expressing LIGHT (TNFSF14) pre-loaded into adipose-derived mesenchymal stem cells is effective treatment for murine pancreatic adenocarcinoma XXIII International Poxvirus, Asfarvirus, and Iridovirus Conference Philadelphia, Pennsylvania (Meeting being held virtually due to the SARS-CoV-2 pandemic) 2021.

7. Jazowiecka-Rakus J., Hadryś A., Rahman M.M., McFadden G., Fidyk W., Chmielik E., **Paździor M.**, Grajek M., Kozik V., Sochanik A. „Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-Loaded into Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells is Effective Treatment for Murine Pancreatic Adenocarcinoma”. The 6th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology. Poland, 2021.

Postery na konferencjach międzynarodowych:

1. **Paździor M.** „Preparation of selected quinoline derivatives using N-oxides”. XXIII rd Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 22-23.11.2019.
2. **Paździor M.**, Kozik V., Świetlicka A., Bąk A., Środa A., Hadryś A., Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A. „Cytotoxicity of various drug-modified exosome carriers on melanoma cell cultures”. 24th Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 20-21.11.2020.
3. **Paździor M.**, Sochanik A., Świetlicka A., Bąk A., Hadryś A., Jazowiecka-Rakus J., Kozik V. “Novel therapy against lung cancer a disease with many links to environmental pollution”. 3rd International Conference „Bioreactors in struggle for pure air”, Uniwersytet Śląski, Katowice, 27.07.2021.
4. **Paździor M.**, Świetlicka A., Hadryś A., Bąk A., Kozik V. „, Graphene Oxide derivatives as potential drug nanocarriers”. Chemistry towards Biology 10 – Instruct, Bratysława, Słowacja, 11-14.09.2022.
5. **Paździor M.**, Świetlicka A., Hadryś A., Bąk A., Kozik V. “Derivatives of Graphene Oxide as potential drug nanocarriers”. IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze” Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.
6. **Paździor M.**, Świetlicka A., Bąk A., Hadryś A., Sochanik A., Kozik V. “Novel therapeutic strategy against malignant melanoma”. IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze” Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.
7. **Paździor M.**, Świetlicka A., Hadryś A., Strhársky T., Bąk A., Kozik V. „Nanogels as potential drug carriers”. 5th International Conference - Bioreactors in the

fight for clean air". Urząd Marszałkowski w Katowicach, Sala Sejmu Śląskiego, Katowice, 12.05.2023.

8. Świetlicka A., Bąk A., **Paździor M.**, Hadryś A., Barbusiński K., Kasperczyk D., Kozik V. "Electrochemical corrosion monitoring in low conductive fluid: Pilot-scale study on sulfolane corrosion potential". 3rd International Conference „Bioreactors in struggle for pure air”, Uniwersytet Śląski, Katowice, 27.07.2021.

9. Świetlicka A., Bąk A., **Paździor M.**, Barbusiński K., "Biodegradation of Volatile Organic Compounds (VOC) using the Compact Trickle Bed Bioreactor (CTBB)". 3rd International Conference „Bioreactors in struggle for pure air”, Uniwersytet Śląski, Katowice, 27.07.2021.

10. Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., **Paździor M.**, Rahman M.M., McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. "A novel strategy for treating pancreatic cancer: a disease with many environmental risk factors". 3rd International Conference „Bioreactors in struggle for pure air”, Uniwersytet Śląski, Katowice, 27.07.2021.

11. Świetlicka A., **Paździor M.**, Bąk A., Sochanik A., Hadryś A., Jazowiecka-Rakus J., Kozik V. „Amides and thioamides as prospect drug molecules". XXV Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 19-20.11.2021.

12. Świetlicka A., **Paździor M.**, Hadryś A., Kozik V., Bąk A. „Diamides and dithioamides as compounds with potential bioactivity". Chemistry towards Biology 10 – Instruct, Bratysława, Słowacja, 11-14.09.2022.

13. Świetlicka A., **Paździor M.**, Hadryś A., Bąk A., Kozik V. "Real-Time Corrosion Monitoring of AISI 1010 Carbon Steel with Metal Surface Mapping in Sulfolane". IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze" Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.

14. Świetlicka A., **Paździor M.**, Bąk A., Kozik V. "Biodegradation of Volatile Organic Compounds (VOC) using the Compact Trickle Bed Bioreactor (CTBB)". IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze" Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.

15. Świetlicka A., **Paździor M.**, Hadryś A., Bąk A., Kozik V. "Amides and thioamides as prospect drug molecules". IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze” Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.
16. Hadryś A., **Paździor M.**, Świetlicka A., Bąk A., Kozik V. "New derivatives of cytidine with non-steroidal anti-inflammatory drugs for pancreatic cancer treatment". IV Międzynarodowa Konferencja – Bioreaktory w walce o czyste powietrze” Innowacje w służbie ochrony powietrza, Grzybów, 20.10.2022.
17. Hadryś A., **Paździor M.**, Świetlicka A., Kozik V., Bąk A. „Novel cytidine derivatives with non-steroidal anti-inflammatory drugs for pancreatic cancer treatment”. XXVI Gliwice Scientific Meetings Gliwice, 18-19.11.2022.

Bierne uczestnictwo w konferencjach naukowych:

1. The 5th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology: Molecular Immunology of Cancer, Poland, 23-24.09.2020.
2. Cellular Therapies – Interdisciplinary Approach, Warszawa, 2022.

Członek komitetu organizacyjnego konferencji naukowych:

1. 3rd International Conference „Bioreactors in struggle for pure air”, Uniwersytet Śląski, Katowice, 2021.
2. „Szybkie testy jakości paliw” w ramach projektu pn. „Opracowanie serii nowatorskich testów kontroli jakości paliw płynnych (benzyna, olej napędowy)” oraz Mini recital skrzypcowy, Firma i-Petrol Katowice, 2021.
3. 5th International Conference - Bioreactors in the fight for clean air", Katowice, 2023.

Odbyte staże:

1. 22.07-14.11.2019 Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach
2. 10.02-17.02.2020 Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

3. 30.05-12.06.2022 Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Słowacja

Popularyzacja nauki:

- Aktywne uczestnictwo w Kole Naukowym „Aqua Regia” – udział w pokazach chemicznych, warsztatach dla młodzieży szkolnej, 2014-2019.
- Śląski Festiwal Nauki, Katowice, 2016.
- Śląski Festiwal Nauki, Katowice, 2017.
- Gala Sukcesów – wydarzenie podsumowujące działania ogólnopolskiego programu Akademia Przyszłości w województwie śląskim, 2017.
- Przeprowadzenie warsztatów dla młodzieży szkolnej, 2018.
- Udział w XII Święcie Liczby Pi, 2018.
- Udział w Wirtualnym Święcie liczby Pi, 2020.
- Wirtualne Dni Otwarte na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych, 2020.
- Pomoc w organizowaniu warsztatów chemicznych dla młodzieży szkolnej w projekcie: „Kreatywny odkrywca”, Uniwersytet Śląski w Katowicach, 2019-2020.
- Wygłoszenie wykładu na spotkaniu Koła Naukowego Chemików „Aqua Regia”, 2022.
- Organizacja oraz informacja podczas koncertu charytatywnego „Miasto Nauki Ukrainie”, 2022.
- Wygłoszenie prezentacji oraz prowadzenie warsztatów dla młodzieży z Akademickiego Liceum Ogólnokształcącego Politechniki Śląskiej w Gliwicach, w Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach, 2022.
- Pokazy chemiczne dla młodzieży szkolnej, Uniwersytet Śląski w Katowicach, 2022.
- Rodzinny Piknik Naukowy, Uniwersytet Śląski w Katowicach, 2022.

Działalność dydaktyczna:

Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Chemia organiczna dla studentów III roku na kierunku: Chemia oraz dla studentów I roku na kierunku: Biologia, prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Zielona Chemia dla studentów III roku na kierunku: Technologia Chemiczna na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Nagrody:

- Zwycięstwo dla Koła Naukowego Chemików „Aqua Regia” w konkurencji na najlepszy film z eksperymentem podczas Festiwalu Pokazów Chemicznych w Toruniu, 2018.
- **Laureatka XIV edycji Konkursu Wyróżnień JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego za osiągnięcia naukowe oraz działalność popularyzacyjną, 2022.**

Certyfikaty:

- Certyfikowane szkolenie na Pełnomocnika i Audytora Wewnętrznego Systemu Zarządzania Środowiskowego wg normy ISO 14001, 2019.
- Certyfikowane szkolenie na Pełnomocnika i Audytora Wewnętrznego systemu zarządzania jakością wytwórców wyrobów medycznych wg normy ISO13485, 2019.
- Certyfikowane szkolenie „System zarządzania Jakością wg normy ISO 9001”, 2019.
- Zaświadczenie o ukończeniu kursu na Audytora wewnętrznego zintegrowanego systemu zarządzania jakością, środowiskiem oraz bezpieczeństwem i higieną pracy, 2024.
- Zaświadczenie o ukończeniu kursu „Zarządzanie danymi badawczymi dla naukowców - kurs podstawowy”, 2024
- Certyfikowane szkolenie: Chromatografia cieczowa oraz technika FPLC, 2024

- Zaświadczenie o ukończeniu szkolenia: „Pomieszczenia czyste cleanroom w świetle wymagań PN-EN-ISO 14644-1:2016-03 oraz GMP”, 2024
- Zaświadczenie o ukończeniu szkolenia: „Kwalifikacja i walidacja pomieszczeń, urządzeń, procesów zgodnie z wymaganiami GMP”, 2024
- Zaświadczenie o ukończeniu szkolenia praktycznego: „Praktyczne aspekty pracy w pomieszczeniach cleanroom zgodnie z wymaganiami ISO 14644”, 2024
- Zaświadczenie o ukończeniu szkolenia: Pierwsza Pomoc w Centrum Dydaktyki i Symulacji Medycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, 2024

6. ANEKS

Tabela A1. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACl}$ oraz $L_{DPPC/DOX}$ w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
$L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=5,50/37^{\circ}C$	SUM	0,09088	0,0219	0,9587	0,33891	0,23549	0,05297
	α	-11,13849	$-1,22734 \times 10^{-24}$	-65,41258	$-2,44834 \times 10^{-57}$	-	-77,97979
	k	0,01555	0,02169	0,05504	0,17053	0,23011	77,84652
	n	-	-	-	0,31736	0,26063	0,00255
	R^2_{adj}	0,97786	0,99467	0,7664	0,91657	0,93089	0,98429
$L_{DPPC/DOX}/pH=5,50/37^{\circ}C$	SUM	0,12422	0,05059	0,46801	0,04407	0,02695	0,00206
	α	-27,6722	-1,51398	-57,42713	0	-	-0,94148
	k	0,01143	0,01898	0,05565	0,19187	0,21627	0,99781
	n	-	-	-	0,2933	0,26932	0,11598
	R^2_{adj}	0,96538	0,9859	0,86957	0,98759	0,99085	0,99929
$L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=5,50/41^{\circ}C$	SUM	0,10973	0,01155	1,33529	0,47562	0,32461	0,19156
	α	-5,34527	$-3,69721 \times 10^{-26}$	-205,5847	0	-	-163,57409
	k	0,03076	0,04207	0,04644	0,30694	0,40895	163,77764
	n	-	-	-	0,21765	0,16138	$8,78728 \times 10^{-4}$
	R^2_{adj}	0,96009	0,9958	0,51426	0,82516	0,83197	0,89981

L_{DPPC/DOX}/pH=5,50/41° C	SUM	0,09639	0,05437	0,37577	0,04635	0,02555	0,00243
	α	-24,32798	-0,38238	-38,51108	0	-	-0,58131
	k	0,0107	0,0168	0,05696	0,1523	0,17529	0,61146
	n	-	-	-	0,33384	0,30577	0,16552
	R ² _{adj}	0,97624	0,98658	0,90727	0,98844	0,99258	0,99929
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,00/37° C	SUM	0,09473	0,01966	1,12442	0,41014	0,29125	0,09162
	α	-10,09473	-6,94229×10 ⁻²⁴	-94,26912	-1,99998×10 ⁻⁶²	-	-96,39432
	k	0,01602	0,02207	0,05082	0,18594	0,25426	96,2965
	n	-	-	-	0,29731	0,23924	0,00198
	R ² _{adj}	0,97565	0,99494	0,71091	0,89347	0,90794	0,97074
L_{DPPC/DOX}/pH=6,00/37° C	SUM	0,095	0,02112	0,68728	0,19002	0,13137	0,01478
	α	-15,21971	-1,6465×10 ⁻²²	-46,70427	-3,63051×10 ⁻⁵⁶	-	-22,95959
	k	0,01377	0,02043	0,05785	0,16122	0,204	22,80856
	n	-	-	-	0,32871	0,28347	0,00866
	R ² _{adj}	0,97722	0,99484	0,83523	0,95397	0,96262	0,99575
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,00/41° C	SUM	0,00144	0,00247	0,00183	3,51479×10 ⁻⁴	6,90683×10 ⁻⁴	4,21127×10 ⁻⁴
	α	-19,19074	-7,87421	-71,43464	-5,06585	-	0,60709
	k	0,0652	0,1546	0,09432	0,57966	0,66652	0,11439
	n	-	-	-	0,141	0,10691	0,32853
	R ² _{adj}	0,96739	0,94416	0,95856	0,99117	0,98438	0,98942
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,00/41° C	SUM	8,487	8,48704	bd	8,487	0,86251	0,2508
	α	-1,99753×10 ⁸	-1,84977×10 ⁷	bd	380	-	46,68024
	k	1,77902×10 ⁻⁹	1,10053×10 ⁻⁸	bd	0,29853	198,77624	-43,48907

	n	-	-	bd	0	-1,27662	0,01227
	R ² _{adj}	-0,01163	-0,01163	bd	-0,02353	0,89719	0,96675
L_{DPPC/DOX}/pH=6,00/41 °C	SUM	0,07047	12,28795	0,03103	0,02537	0,0488	5,66182×10 ⁻⁴
	α	0,2892	85,89986	5	5	-	-0,27324
	k	0,00829	0,00317	0,05645	0,04143	0,0394	0,14178
	n	-	-	-	0,55872	0,5651	0,38109
	R ² _{adj}	0,98907	-1,36224	0,99519	0,996030	0,99242	0,99991
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,50/37 °C	SUM	0,10934	0,09537	0,25318	0,00152	8,93076×10 ⁻⁴	6,669×10 ⁻⁵
	α	-47,04944	-3,39715	-57,34546	0	-	-0,06805
	k	0,00624	0,00989	0,04559	0,1429	0,14684	0,18673
	n	-	-	-	0,31649	0,31146	0,28267
	R ² _{adj}	0,97174	0,97536	0,93458	0,9996	0,99973	0,99998
L_{DPPC/DOX}/pH=6,50/37 °C	SUM	0,09417	0,02	0,6914	0,18619	0,13069	0,01564
	α	-15,30475	-4,98416×10 ⁻²²	-47,78155	-2,38821×10 ⁻⁵⁷	-	-23,1315
	k	0,01385	0,02064	0,05778	0,16421	0,20624	22,98879
	n	-	-	-	0,32544	0,28161	0,00856
	R ² _{adj}	0,97728	0,99517	0,83318	0,95461	0,9625	0,99547
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,50/41 °C	SUM	0,0063	0,02171	0,02809	0,00639	0,00427	0,00414
	α	-15,7691	-6,18206	-29,58028	-4,11779	-	-0,18453
	k	0,03782	0,06645	0,09964	0,31685	0,36938	0,52757
	n	-	-	-	0,26283	0,22992	0,18641
	R ² _{adj}	0,98653	0,9536	0,93995	0,98548	0,98732	0,98689
L_{DPPC/9-PBThACl}/pH=6,50/41 °C	SUM	7,91194	3,32458	bd	7,91194	1,3276	0,01126

	α	$-4,32909 \times 10^9$	276,54115	bd	480	-	1,39251
	k	$1,55913 \times 10^{-10}$	0,00258	bd	0,49087	129,54744	-0,00714
	n	-	-	bd	0	-1,0181	0,85725
	R^2_{adj}	-0,01266	-2,57791	bd	-0,02564	0,83008	0,99854
	SUM	6,88698	6,88698	bd	6,88697	8,58931	1,0549
$L_{DPPC/DOX}$ /pH=6,50/41 °C	α	$-5,21699 \times 10^8$	$-1,46296 \times 10^8$	bd	320	-	206,77537
	k	$2,67933 \times 10^{-10}$	$3,31261 \times 10^{-10}$	bd	0,13047	$6,12701 \times 10^{13}$	-205,32402
	n	-	-	bd	0	$-1,76118 \times 10^7$	0,00133
	R^2_{adj}	-0,0102	-0,0102	bd	-0,02062	-0,25991	0,84367
	SUM	0,05477	0,04632	1,64519	0,83495	0,51518	0,34239
$L_{DPPC/9-PBThACl}$ /pH=7,40/37 °C	α	-1,6892	$-3,07939 \times 10^{-24}$	-234,89147	0	-	-200,26312
	k	0,0348	0,04126	0,04443	0,27059	0,41242	200,45015
	n	-	-	-	0,24052	0,15936	$7,33102 \times 10^{-4}$
	R^2_{adj}	0,98167	0,9845	0,44949	0,71767	0,76076	0,83934
	SUM	0,06986	0,04834	0,66528	0,23796	0,15931	0,02365
$L_{DPPC/DOX}$ /pH=7,40/37 °C	α	-12,04184	$-9,94101 \times 10^{-24}$	-33,92891	$-1,08148 \times 10^{-53}$	-	-14,96602
	k	0,01358	0,01868	0,05921	0,13478	0,17905	14,7544
	n	-	-	-	0,36148	0,30708	0,0139
	R^2_{adj}	0,98481	0,98949	0,85539	0,94774	0,95977	0,99397
	SUM	0,00513	0,61017	0,60318	0,51188	1,05622	0,40641
$L_{DPPC/9-PBThACl}$ /pH=7,40/41 °C	α	10,73473	10	10	10	-	-142,31911
	k	0,06995	0,06209	0,1427	0,16213	0,08239	141,34332

	n	-	-	-	0,46451	0,60548	0,00339
	R ² _{adj}	0,9996	0,89518	0,89638	0,91092	0,81855	0,92927
L_{DPPC/9-PBThAcI}/pH=7,40/41 °C	SUM	2,05312	2,05312	bd	2,05291	0,14493	2,2154×10 ⁻⁴
	α	-3,92847×10 ⁶	-3,92847×10 ⁶	bd	390	-	1,15971
	k	3,59831×10 ⁻⁷	3,59831×10 ⁻⁷	bd	0,75676	8,27023	-0,00144
	n	-	-	bd	0	-0,44377	1,02525
	R ² _{adj}	-0,01063	-0,01063	bd	-0,02128	0,92866	0,99989
L_{DPPC/DOX}/pH=7,40/41 °C	SUM	0,00277	0,00666	0,00922	0,00118	0,00475	0,00267
	α	2,50332	14,15349	-33,66362	18,32001	-	-7,66269
	k	0,05036	0,10734	0,09607	0,49576	0,28134	7,59202
	n	-	-	-	0,17162	0,29315	0,03045
	R ² _{adj}	0,98402	0,96157	0,94678	0,9928	0,97261	0,98374
L_{DPPC/DOX}/pH=7,40/41 °C	SUM	72,52071	2,17486	bd	7,56869	1,4753	0,01143
	α	220,83477	220,83477	bd	315	-	1,19996
	k	0,00438	0,00438	bd	0,57768	178,95462	1,38241×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-1,10747	1,5772
	R ² _{adj}	-3,44462	-3,5266	bd	-0,02632	0,80255	0,99845

bd- brak dopasowania

Tabela A2. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA oraz [L_{DPPC/DOX}]:HSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:HSA/pH=5,50 /37°C	SUM	0,02247	0,09353	1,84315	1,03824	0,6556	0,51331
	α	0,25145	$-3,33645 \times 10^{-24}$	-320,41675	0	-	-218,64776
	k	0,05358	0,05953	0,04201	0,3224	0,49547	218,96986
	n	-	-	-	0,21386	0,12999	$5,7719 \times 10^{-4}$
	R ² _{adj}	0,99182	0,96568	0,32364	0,615	0,64532	0,7194
[L _{DPPC/DOX}]:HSA/pH=5,50/37°C	SUM	0,06497	0,05853	0,52128	0,17675	$8,46705 \times 10^{-4}$	$9,77113 \times 10^{-5}$
	α	-13,6579	$-9,40501 \times 10^{-24}$	-27,15893	$-1,45403 \times 10^{-48}$	-	-0,04244
	k	0,01231	0,01711	0,05928	0,10028	0,10321	0,12411
	n	-	-	-	0,39999	0,3945	0,36921
	R ² _{adj}	0,98619	0,98756	0,88922	0,99971	0,9998	0,99998
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:HSA/pH=5,50 /41°C	SUM	0,09076	0,11489	0,17648	0,00168	$8,86474 \times 10^{-4}$	$8,31464 \times 10^{-5}$
	α	-30,53198	-0,67244	-27,46098	0	-	-0,05374
	k	0,00774	0,01159	0,05268	0,12161	0,12545	0,15471
	n	-	-	-	0,35783	0,35181	0,32468
	R ² _{adj}	0,97907	0,9735	0,9593	0,99961	0,99977	0,99998
[L _{DPPC/DOX}]:HSA/pH=5,50 /41°C	SUM	0,08008	13,09105	0,10373	0,00137	$8,46705 \times 10^{-4}$	$9,77113 \times 10^{-5}$
	α	-21,57105	54,588	-12,52957	$-1,78269 \times 10^{-48}$	-	-0,04244
	k	0,00858	0,00313	0,0571	0,10028	0,10321	0,12411
	n	-	-	-	0,39999	0,3945	0,36921

	R ² _{adj}	0,98333	-2,19459	0,9784	0,99971	0,9998	0,99998
[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA/pH=6,00 /37°C	SUM	0,10844	0,00879	1,00892	0,31178	0,22821	0,06049
	α	-13,40116	-6,02983×10 ⁻²⁵	-94,48511	-1,63947×10 ⁻⁶⁴	-	-84,70113
	k	0,01489	0,02174	0,05063	0,19496	0,25364	84,61545
	n	-	-	-	0,28782	0,2389	0,00221
	R ² _{adj}	0,97111	0,99766	0,73121	0,91608	0,92482	0,97986
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=6,00/37°C	SUM	0,09126	0,05326	0,37365	0,06117	0,03167	0,00266
	α	-22,60783	-0,0706	-34,57363	0	-	-0,65516
	k	0,01073	0,01653	0,05736	0,14132	0,16741	0,66
	n	-	-	-	0,34789	0,31407	0,16019
	R ² _{adj}	0,97823	0,9873	0,91087	0,98525	0,99118	0,99925
[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA/pH=6,00 /41°C	SUM	8,9326	4,91356	bd	8,9326	1,5062	0,00658
	α	-3,62601×10 ⁹	19144908	bd	380	-	1,40152
	k	1,64239×10 ⁻¹⁰	0,00303	bd	0,44561	38,66879	-0,02876
	n	-	-	bd	0	-0,86523	0,65601
	R ² _{adj}	-0,0098	-2,43259	bd	-0,0198	0,82973	0,99925
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=6,00/41°C	SUM	0,09729	11,69657	0,00692	2,4884×10 ⁻⁴	1,79504×10 ⁻⁴	3,2566×10 ⁻⁵
	α	-9,61979	84,64472	-4,48722×10 ⁻²²	-7,98171×10 ⁻⁹⁶	-	-0,01169
	k	0,00764	0,00313	0,05538	0,04824	0,04887	0,05252
	n	-	-	-	0,52613	0,5237	0,513
	R ² _{adj}	0,98377	-1,50412	0,99885	0,99996	0,999970	0,99999
	SUM	0,01858	0,25707	1,8331	1,09124	0,99789	0,48893
	α	6,26743	5	-70,28971	5	-	-172,92853

[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA/pH=6,50 /37°C	k	0,02248	0,02375	0,05466	0,14813	0,21349	172,62465
	n	-	-	-	0,34647	0,27667	0,00136
	R ² _{adj}	0,99639	0,94766	0,62681	0,77555	0,79684	0,89944
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=6,50/37°C	SUM	0,05579	13,09788	0,04724	0,0292	0,01988	0,00242
	α	-10,92184	67,17289	-1,87706×10 ⁻⁷	-3,58518×10 ⁻⁶¹	-	-
	k	0,00867	0,00308	0,05788	0,0637	0,0727	0,16038
	n	-	-	-	0,48178	0,45687	0,34755
	R ² _{adj}	0,99032	-1,7111	0,9918	0,99488	0,99623	0,99954
	SUM	0,16269	11,76933	0,43029	0,17029	0,15	0,09108
[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA/pH=6,50 /41°C	α	1,49951	10,99227	-1,37522×10 ⁻³³	-1,61681×10 ⁻¹⁵	-	-0,20324
	k	0,07889	0,02359	0,16748	0,08414	0,09874	0,21712
	n	-	-	-	0,72865	0,67707	0,49756
	R ₁ ² _{adj}	0,98134	-1,17567	0,93504	0,97395	0,97604	0,98525
	SUM	45,99803	4,80905	bd	8,35329	1,21321	0,03544
	α	182,49926	182,49926	bd	395	-	1,65213
[L_{DPPC/9-PBThAcI}]:HSA/pH=6,50 /41°C	k	0,00288	0,00288	bd	0,45839	30,59644	-0,09097
	n	-	-	bd	0	-0,8138	0,48224
	R ₂ ² _{adj}	-2,44055	-2,50588	bd	-0,02083	0,85327	0,99567
	SUM	4,95823	4,95827	bd	4,95823	1,00223	0,00455
	α	-6,02746×10 ⁸	-1,39208×10 ⁷	bd	305	-	-
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=6,50/41°C	k	4,87486×10 ⁻¹⁰	1,09155×10 ⁻⁸	bd	0,25461	2,08951	-0,38412
	n	-	-	bd	0	-0,46112	0,22804
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,76972	0,99894

[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,0464	0,49313	2,44243	1,42084	1,15309	0,70065
	α	4,7615	$-2,50229 \times 10^{-22}$	-90,45318	$-3,21363 \times 10^{-56}$	-	-231,24
	k	0,02722	0,02747	0,05446	0,17811	0,27444	231,09151
	n	-	-	-	0,31682	0,23604	$9,13587 \times 10^{-4}$
	R ² _{adj}	0,99554	0,9059	0,53393	0,72608	0,74055	0,84071
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=7,40/37 °C	SUM	0,05537	13,69977	0,13281	0,03335	0,02393	0,00317
	α	-14,18349	54,8457	-6,40289	$-2,72839 \times 10^{-42}$	-	-0,26139
	k	0,00948	0,00317	0,05916	0,08561	0,09669	0,24068
	n	-	-	-	0,43331	0,41012	0,28919
	R ² _{adj}	0,98955	-2,01182	0,97494	0,99364	0,99499	0,99933
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	0,43727	13,75825	0,81771	0,19385	0,29252	0,09076
	α	22,92276	68,00847	10	10	-	-0,48289
	k	0,01736	0,00589	0,07506	0,01783	0,01199	0,13699
	n	-	-	-	0,8089	0,87558	0,46898
	R ² _{adj}	0,97913	-0,76724	0,91258	0,97905	0,96873	0,99019
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	2,49511	6,25342	bd	2,4949	0,10624	0,01712
	α	$-2,85739 \times 10^6$	284,96279	bd	384,29439	-	1,61697
	k	$4,8363 \times 10^{-7}$	0,00502	bd	0,74894	203,94994	-0,00424
	n	-	-	bd	0	-0,9977	0,9402
	R ² _{adj}	0,01084	-16,83573	bd	-0,02174	0,95696	0,99299
[L_{DPPC/DOX}]:HSA/pH=7,40/41 °C	SUM	2,18277	2,18277	bd	2,18277	0,00777	0,65859
	α	$-1,31081 \times 10^7$	$-1,90531 \times 10^7$	bd	320	-	181,29536

	k	$5,55986 \times 10^{-9}$	$9,33692 \times 10^{-10}$	bd	0,07029	20,93856	-180,47027
	n	-	-	bd	0	-1,3095	$8,56693 \times 10^{-4}$
	R ² adj	-0,01021	-0,01021	0	-0,02062	0,9964	0,69206

Tabela A3. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA oraz [L_{DPPC/DOX}]:dHSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=5,50/37°C	SUM	0,10685	0,01222	1,34318	0,46085	0,32457	0,20292
	α	-4,82269	$-3,83467 \times 10^{-23}$	-235,2213	0	-	-166,77739
	k	0,03289	0,04473	0,04474	0,32848	0,42984	167,01634
	n	-	-	-	0,20449	0,15201	$8,21869 \times 10^{-4}$
	R ² _{adj}	0,95912	0,99532	0,48607	0,82181	0,81818	0,88514
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=5,50/37°C	SUM	0,14765	0,03901	0,64022	0,09029	0,05824	0,00417
	α	-24,99117	-1,24243	-79,58117	0	-	-15,16324
	k	0,01348	0,02313	0,05458	0,22568	0,263	15,16891
	n	-	-	-	0,26758	0,23686	0,0111
	R ² _{adj}	0,95505	0,98812	0,80511	0,97223	0,97758	0,99838
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=5,50/41°C	SUM	0,13537	0,02367	0,69316	0,1372	0,08446	0,00789
	α	-24,0005	-0,4715	-83,54092	0	-	-24,73861
	k	0,01255	0,02089	0,0521	0,20238	0,24775	24,69184
	n	-	-	-	0,28286	0,24325	0,00715
	R ² _{adj}	0,96086	0,99315	0,79957	0,95991	0,96951	0,99712
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=5,50/41°C	SUM	0,08008	13,09105	0,10373	0,00137	$8,46705 \times 10^{-4}$	$9,77113 \times 10^{-5}$
	α	-21,57105	54,588	-12,52957	$-1,78269 \times 10^{-48}$	-	-0,04244
	k	0,00858	0,00313	0,0571	0,10028	0,10321	0,12411
	n	-	-	-	0,39999	0,3945	0,36921

	R_1^2 adj	0,98333	-2,19459	0,9784	0,99971	0,9998	0,99998
	SUM	0,01538	2,99482	0,05083	0,05714	0,04982	0,01395
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=5,50/41 °C	α	0,71989	13,56839	$-1,76359 \times 10^{-14}$	$-1,3534 \times 10^{-54}$	-	-2,14798
	k	0,05764	0,01719	0,14146	0,10956	0,13229	1,95087
	n	-	-	-	0,57024	0,51865	0,12151
	R_2^2 adj	0,99179	-1,1444	0,96927	0,9633	0,95701	0,98716
	SUM	0,02678	0,31293	2,01678	1,14969	0,87201	0,45378
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,00/37 °C	α	3,06189	$-1,99887 \times 10^{-22}$	-86,29043	$-8,08969 \times 10^{-56}$	-	-199,12391
	k	0,02326	0,02317	0,05278	0,15958	0,25375	198,94594
	n	-	-	-	0,3302	0,24456	0,00106
	R^2 adj	0,9957	0,9369	0,59331	0,76577	0,79213	0,8907
	SUM	0,08454	0,02926	0,98524	0,3724	0,25639	0,06023
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=6,00/37 °C	α	-9,03946	$-1,10867 \times 10^{-23}$	-56,16941	$-4,57836 \times 10^{-56}$	-	-82,54168
	k	0,01749	0,02397	0,05838	0,16984	0,2322	82,4149
	n	-	-	-	0,32458	0,26423	0,00244
	R^2 adj	0,97991	0,99304	0,76583	0,91058	0,92698	0,98267
	SUM	0,00139	14,39972	0,00383	$4,32566 \times 10^{-4}$	0,00319	$6,75428 \times 10^{-4}$
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,00/41 °C	α	-8,80548	3,75877	-46,01384	-2,14751	-	0,84777
	k	0,23403	0,07765	0,13273	0,83128	0,90078	0,05454
	n	-	-	-	0,07099	0,04053	0,4231
	R_1^2 adj	0,97865	-416,5929	0,94101	0,9932	0,94583	0,98828
	SUM	17,28515	17,28525	bd	17,28515	1,34998	0,04388
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,00	α	$-4,62139 \times 10^9$	$-2,0458 \times 10^7$	bd	360	-	4,23146

	/41° C	k	1,12395×10 ⁻¹⁰	1,78478×10 ⁻⁸	bd	0,40519	5,84775	-2,52764
		n	-	-	bd	0	-0,62599	0,08877
		R ₂ ² _{adj}	-0,00763	-0,00764	bd	-0,01538	0,9213	0,99742
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=6,00 /41° C	SUM	0,0722	12,9044	0,07971	0,00551	0,00313	3,65648×10 ⁻⁴	
	α	-17,73915	58,27879	-7,33926	-5,32333×10 ⁻⁴⁴	-	-0,07769	
	k	0,00872	0,00317	0,05797	0,08625	0,09187	0,12897	
	n	-	-	-	0,42855	0,41652	0,36956	
		R ₂ ² _{adj}	0,98585	-2,01831	0,98438	0,99831	0,99932	0,99992
	SUM	0,11467	0,00964	1,28763	0,49114	0,31282	0,15788	
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,50 /37° C	α	-7,72537	-2,16603×10 ⁻²³	-176,84719	0	-	-138,94406	
	k	0,02291	0,03219	0,04647	0,25459	0,35469	139,04774	
	n	-	-	-	0,24674	0,18296	0,00114	
		R ₂ ² _{adj}	0,96243	0,99684	0,57814	0,8374	0,8617	0,92947
	SUM	0,03543	14,50309	0,15985	0,09526	0,06756	0,0133	
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=6,50/37° C	α	-8,96842	57,24055	-1,75674	-2,34628×10 ⁻⁴⁹	-	-0,46706	
	k	0,00998	0,00313	0,06001	0,07258	0,08961	0,36351	
	n	-	-	-	0,46482	0,42488	0,24396	
		R ₂ ² _{adj}	0,99387	-1,86219	0,97234	0,98334	0,98714	0,99744
	SUM	0,05445	7,20213	0,11324	0,05336	0,05231	0,02853	
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,50 /41° C	α	0,69808	13,9428	-0,0037	-0,01503	-	-0,21796	
	k	0,05779	0,02115	0,14609	0,10549	0,10565	0,23593	
	n	-	-	-	0,59634	0,596	0,43257	
		R ₁ ² _{adj}	0,98782	-1,17682	0,97229	0,98668	0,98587	0,99214

[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA/pH=6,50 /41 °C	SUM	13,42346	5,21991	bd	13,42346	2,60716	0,20272
	α	-3,98414×10 ⁹	199,71772	bd	382	-	1,38196
	k	1,69768×10 ⁻¹⁰	0,00308	bd	0,4916	38,51613	-0,0128
	n	-	-	bd	0	-0,85363	0,79407
	R ² _{adj}	-0,00901	-2,17709	bd	-0,01818	0,80403	0,98462
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=6,50 /41 °C	SUM	4,62251	4,62253	bd	4,62251	8,14915	0,06518
	α	-5,90086×10 ⁸	-1,65917×10 ⁷	bd	325	-	91,40754
	k	3,52466×10 ⁻¹⁰	5,38226×10 ⁻⁹	bd	0,18779	-1,33758×10 ⁸	-90,05336
	n	-	-	bd	0	-1,20135×10 ⁶	0,00266
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,78092	0,98561
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,09926	0,01678	1,26892	0,44833	0,33482	0,13943
	α	-7,85818	-4,34654×10 ⁻²⁵	-123,97908	-3,6803×10 ⁻⁷⁰	-	-108,71769
	k	0,01962	0,02678	0,04962	0,22405	0,29857	108,70829
	n	-	-	-	0,26695	0,21327	0,00163
	R ² _{adj}	0,97212	0,99529	0,64358	0,87277	0,8805	0,94972
[L_{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=7,40/37 °C	SUM	0,06823	12,83501	0,06778	0,00663	0,0049	7,063×10 ⁻⁴
	α	-16,27998	61,44329	-5,22335	-5,53432×10 ⁻⁴²	-	-0,0933
	k	0,0086	0,00313	0,0577	0,08126	0,08582	0,12937
	n	-	-	-	0,43799	0,42761	0,3707
	R ² _{adj}	0,98703	-1,93933	0,98711	0,99873	0,99897	0,99985
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA	SUM	0,08433	14,54138	0,05255	0,03866	0,2764	0,07899
	α	31,17138	50,35151	31,79914	33,56244	-	-15,05898

/pH=7,40/41 °C	k	0,05731	0,01936	0,14495	0,18593	0,00763	12,70355
	n	-	-	-	0,43721	1,1163	0,05362
	R ₁ ² adj	0,97891	-4,04548	0,98686	0,99021	0,93087	0,97999
[L _{DPPC/9-PBThAcI}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	13,27124	8,24337	bd	13,27124	0,61079	0,10206
	α	-3,7338×10 ⁹	170,28707	bd	385,20571	-	22,43745
	k	1,45337×10 ⁻¹⁰	0,00336	bd	0,41885	801,30786	-18,52622
	n	-	-	bd	0	-1,46778	0,03259
	R ₂ ² adj	-0,00877	-1,86294	bd	-0,0177	0,95357	0,99217
	SUM	0,04485	5,14476	0,09506	0,08549	0,07278	0,02878
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=7,40/41 °C	α	2,85525	25,3843	-2,10042×10 ⁻²⁶	-1,81×10 ⁻²⁷	-	-0,62564
	k	0,0326	0,01014	0,10655	0,06336	0,07996	0,45846
	n	-	-	-	0,62533	0,56976	0,28376
	R ₁ ² adj	0,98737	-1,08655	0,96602	0,96839	0,96867	0,98717
	SUM	58,5121	1,98969	bd	3,80962	0,42648	0,01091
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA/pH=7,40/41 °C	α	217,18743	217,18743	bd	315	-	1,29259
	k	0,00469	0,00469	bd	0,65934	95,21673	-7,02252×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-0,94802	1,27141
	R ₂ ² adj	-7,06577	-6,93107	bd	-0,03077	0,88363	0,99705
	SUM	58,5121	1,98969	bd	3,80962	0,42648	0,01091

Tabela A4. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACI i DOX z liposomów $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$ w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
$L_{DPPC/9-PBThACI/DOX/pH=5,50/37^{\circ}C}$	SUM	0,09768	0,01645	0,7792	0,22736	0,1598	0,02245
	α	-14,30834	$-2,28817 \times 10^{-21}$	-54,74838	$-3,03185 \times 10^{-58}$	-	-46,93909
	k	0,01437	0,02123	0,05671	0,16944	0,21694	46,80077
	n	-	-	-	0,31929	0,27201	0,00423
	R^2_{adj}	0,9761	0,99598	0,80932	0,94379	0,95318	0,99335
$L_{DPPC/9-PBThACI/DOX/pH=5,50/37^{\circ}C}$	SUM	0,10566	0,01004	1,00753	0,31503	0,23156	0,06046
	α	-11,05408	$-1,04804 \times 10^{-25}$	-76,85931	$-1,46195 \times 10^{-63}$	-	-86,40557
	k	0,01762	0,0256	0,05546	0,2016	0,26034	86,34303
	n	-	-	-	0,2908	0,24169	0,00219
	R^2_{adj}	0,97222	0,99736	0,73512	0,91632	0,92501	0,98022
$L_{DPPC/9-PBThACI/DOX/pH=5,50/41^{\circ}C}$	SUM	0,10557	$1,04336 \times 10^{-5}$	0,28586	0,00804	0,0046	$3,32134 \times 10^{-4}$
	α	-30,26692	$-2,76888 \times 10^{-45}$	-39,67538	0	-	-0,17533
	k	0,00943	0,00113	0,0553	0,15838	0,16794	0,2838
	n	-	-	-	0,32099	0,30935	0,24546
	R^2_{adj}	0,97304	1	0,92699	0,99793	0,99862	0,9999
$L_{DPPC/9-PBThACI/DOX/pH=5,50/41^{\circ}C}$	SUM	0,09994	12,63109	0,24028	0,06956	0,05424	0,01785
	α	6,45432	99,70089	$-2,72015 \times 10^{-30}$	$-4,30809 \times 10^{-20}$	-	-0,16234
	k	0,00787	0,00303	0,05381	0,02193	0,02717	0,07086
	n	-	-	-	0,66833	0,62859	0,48583

	R ² _{adj}	0,98759	-1,01957	0,96875	0,99086	0,99255	0,99752
	SUM	0,07351	0,04538	0,50871	0,13905	0,09315	0,01249
	α	-14,76861	-9,77786×10 ⁻²³	-29,382	-1,5672×10 ⁻⁵¹	-	-2,03081
	k	0,01295	0,01863	0,06062	0,13742	0,17135	1,92341
	n	-	-	-	0,35925	0,31646	0,08062
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,00/37° C	R ² _{adj}	0,9837	0,98994	0,88722	0,96885	0,97606	0,99676
	SUM	0,02046	15,00534	0,19185	0,25043	0,19051	0,06212
	α	2,65348	66,33091	-1,9847×10 ⁻⁷⁴	-9,43837×10 ⁻⁴⁷	-	-0,55753
	k	0,01098	0,00333	0,06135	0,04166	0,05845	0,34815
	n	-	-	-	0,57367	0,50928	0,26691
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,00/37° C	R ² _{adj}	0,99734	-1,31761	0,97394	0,96563	0,97226	0,99086
	SUM	0,10728	0,24733	2,08466	1,08316	0,90119	0,80717
	α	1,90302	-3,24117×10 ⁻²⁵	-355,64372	-4,64015×10 ⁻¹⁴³	-	-319,12996
	k	0,13825	0,1281	0,0441	0,488	0,628	319,65566
	n	-	-	-	0,14817	0,09537	3,0701×10 ⁻⁴
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,00/41° C	R ² _{adj}	0,99338	0,90206	0,17448	0,56665	0,43852	0,49186
	SUM	5,07434	5,07439	bd	5,07434	1,19337	1,27488×10 ⁻⁴
	α	-4,86652×10 ⁸	-1,0214×10 ⁷	bd	240	-	1,04237
	k	7,10265×10 ⁻¹⁰	1,90998×10 ⁻⁸	bd	0,29225	1,80173	-0,12465
	n	-	-	bd	0	-0,41917	0,38784
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,00/41° C	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,73608	0,99997
	SUM	0,1921	10,75796	0,312	2,37342×10 ⁻⁵	1,82411×10 ⁻⁵	4,86778×10 ⁻⁶
	α	4,41383	133,02569	-4,8194×10 ⁻³¹	-1,0694×10 ⁻²¹	-	-0,00239

L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,50/37°C	k	0,00604	0,00274	0,0479	0,01719	0,01727	0,01764
	n	-	-	-	0,68889	0,68804	0,68482
	R ² _{adj}	0,97323	-1,06641	0,95627	1	1	1
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,50/37°C	SUM	0,14777	11,1602	0,15261	2,81027×10 ⁻⁵	2,09504×10 ⁻⁵	4,88823×10 ⁻⁶
	α	-2,19742	119,99359	-4,16627×10 ⁻³³	-5,2606×10 ⁻³⁴	-	-0,00298
	k	0,00622	0,00274	0,04934	0,02504	0,02517	0,02576
	n	-	-	-	0,62515	0,62425	0,62073
	R ² _{adj}	0,97804	-1,20486	0,97732	1	1	1
	SUM	88,89513	2,78547	bd	9,81841	3,59485	0,01069
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,50/41°C	α	215,14679	215,14679	bd	360	-	1,03922
	k	0,0029	0,0029	bd	0,56596	4,64382	-3,82332×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-0,42724	1,34741
	R ² _{adj}	-3,23449	-3,3079	bd	-0,02062	0,63013	0,99889
	SUM	73,9963	3,1289	bd	8,85841	3,63358	7,95487×10 ⁻⁵
	α	192,9854	192,9854	bd	360	-	1,00365
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=6,50/41°C	k	0,00278	0,00278	bd	0,52694	2,34809	-0,00145
	n	-	-	bd	0	-0,31106	1,11092
	R ² _{adj}	-3,08807	-3,15495	bd	-0,02062	0,57474	0,99999
	SUM	0,0804	0,03148	0,8249	0,30075	0,20141	0,03443
	α	-12,44505	-1,50318×10 ⁻²⁴	-51,82758	-7,55056×10 ⁻⁵⁵	-	-52,33001
	k	0,01354	0,01893	0,05517	0,14695	0,20033	52,13487
L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}/pH=7,40/37°C	n	-	-	-	0,34074	0,28255	0,00395
	R ² _{adj}	0,98154	0,99277	0,81061	0,93024	0,94535	0,99056

L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}/pH=7,40/37 °C	SUM	0,06641	0,07169	1,05337	0,41812	0,32759	0,08237
	α	-7,00963	$-1,23382 \times 10^{-22}$	-51,66095	$-1,25531 \times 10^{-54}$	-	-87,36594
	k	0,01557	0,01986	0,05589	0,15435	0,20567	87,15269
	n	-	-	-	0,33397	0,28004	0,00244
	R ² _{adj}	0,9856	0,98445	0,77157	0,9084	0,91651	0,97879
L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}/pH=7,40/41 °C	SUM	7,99984	7,99987	bd	7,99983	14,61952	0,152
	α	-2,11684×10 ⁸	-1,89848×10 ⁷	bd	352,61138	-	2,03435
	k	1,52592×10 ⁻⁹	9,25849×10 ⁻⁹	bd	0,27604	-46673,80267	-0,69103
	n	-	-	bd	0	-2095,26681	0,18869
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,97716	0,97923
L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}/pH=7,40/41 °C	SUM	7,38557	7,38562	bd	7,38557	14,93784	0,06705
	α	-7,15868×10 ⁸	-1,80919×10 ⁷	bd	360	-	1,62692
	k	4,83212×10 ⁻¹⁰	1,07961×10 ⁻⁸	bd	0,29244	-9,27636×10 ⁶	-0,38692
	n	-	-	bd	0	-343663,40104	0,24804
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-1,19362	0,99005

Tabela A5. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACI i DOX z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:HSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:HSA /pH=5,50 /37°C	SUM	0,06594	0,06861	1,27683	0,58973	0,40403	0,14146
	α	-4,74859	$-5,12524 \times 10^{-24}$	-66,49279	$-1,18795 \times 10^{-55}$	-	-110,84737
	k	0,02023	0,02521	0,05708	0,16855	0,24786	110,72547
	n	-	-	-	0,32647	0,25272	0,00183
	R ² _{adj}	0,98476	0,98414	0,70483	0,86226	0,88783	0,96032
[L _{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:HSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,03579	0,12254	1,9106	0,984	0,69943	0,45395
	α	0,1576	$-5,18709 \times 10^{-24}$	-162,83202	$-4,67862 \times 10^{-71}$	-	-222,96716
	k	0,03928	0,04275	0,05065	0,25608	0,38387	223,09021
	n	-	-	-	0,25615	0,17801	$7,3537 \times 10^{-4}$
	R ² _{adj}	0,98989	0,96534	0,4595	0,71876	0,74193	0,83076
[L _{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:HSA /pH=5,50/41°C	SUM	0,07663	12,96616	0,09688	0,00275	0,00166	$2,02551 \times 10^{-4}$
	α	-19,92808	55,19242	-10,55504	$-8,73684 \times 10^{-47}$	-	-0,05855
	k	0,00874	0,00317	0,05773	0,09575	0,09982	0,12855
	n	-	-	-	0,40966	0,4017	0,36689
	R ² _{adj}	0,98439	-2,1342	0,98026	0,99943	0,99962	0,99995
[L _{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:HSA /pH=5,50/41°C	SUM	0,70582	9,39986	1,73058	0,00198	0,00247	$3,71956 \times 10^{-8}$
	α	39,05572	174,81655	10	10	-	-0,0197
	k	0,00635	0,00328	0,04365	0,00187	0,00102	0,00141
	n	-	-	-	1,09631	1,19761	1,14477

	R ² _{adj}	0,93999	-0,58574	0,79978	0,99977	0,99971	1
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,09086	0,02379	0,64167	0,16865	0,11691	0,01376
	α	-16,58021	-1,42518×10 ⁻²¹	-46,03559	-6,48174×10 ⁻⁵⁶	-	-11,07238
	k	0,01277	0,01903	0,05671	0,15578	0,19519	10,9166
	n	-	-	-	0,33169	0,28869	0,01754
	R ² _{adj}	0,97838	0,99434	0,84734	0,95946	0,9671	0,99609
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,09524	0,01739	0,7762	0,22939	0,16079	0,02294
	α	-14,3182	-1,33136×10 ⁻²²	-54,34042	-1,28078×10 ⁻⁵⁷	-	-45,65522
	k	0,01417	0,02088	0,05647	0,16683	0,21429	45,50996
	n	-	-	-	0,3214	0,27362	0,00437
	R ² _{adj}	0,97685	0,99577	0,81132	0,94366	0,95328	0,99327
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,00/41 °C	SUM	100,6343	2,45452	bd	8,95075	2,96959	1,2022×10 ⁻⁶
	α	220,3816	220,3816	bd	337	-	1,01628
	k	0,00321	0,00321	bd	0,5928	6,56584	-9,41712×10 ⁻⁵
	n	-	-	bd	0	-0,48682	1,59565
	R ² _{adj}	-3,87852	-3,95378	bd	-0,02062	0,66484	1
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,00/41 °C	SUM	8,04349	4,42356	bd	8,04349	2,84015	1,14552×10 ⁻⁴
	α	-3,66099×10 ⁹	146,52659	bd	337	-	1,00751
	k	1,65888×10 ⁻¹⁰	0,00297	bd	0,45523	2,32341	-0,00821
	n	-	-	bd	0	-0,34503	0,82662
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,65212	bd	-0,02062	0,62945	0,99998
	SUM	0,02187	0,26	0,43319	0,28135	0,21196	0,04777
	α	-5,02695	-5,93272×10 ⁻²²	-4,32155	-1,79014×10 ⁻⁴³	-	-1,82164

[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,50/37 °C	k	0,01084	0,01239	0,05855	0,0776	0,10603	1,53763
	n	-	-	-	0,44974	0,39181	0,10496
	R ² _{adj}	0,99634	0,95644	0,92742	0,95238	0,96069	0,99105
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,50/37 °C	SUM	0,03258	14,36994	0,12344	0,09746	0,07273	0,01488
	α	-7,99417	68,5576	$-9,79387 \times 10^{-9}$	$-1,35027 \times 10^{-60}$	-	0,43966
	k	0,00874	0,00278	0,05643	0,06189	0,0763	0,31555
	n	-	-	-	0,48271	0,44398	0,26008
	R ² _{adj}	0,9946	-1,72888	0,97953	98367	0,98681	0,99727
	SUM	77,60973	3,45562	bd	10,37142	4,56237	0,02943
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,50/41 °C	α	186,748	186,748	bd	350	-	1,04988
	k	0,00286	0,00286	bd	0,53565	2,44266	-0,00155
	n	-	-	bd	0	-0,31727	1,11907
	R ² _{adj}	-2,76201	-2,83732	bd	-0,02062	0,54603	0,99704
	SUM	7,63859	5,04028	bd	7,63859	2,54227	$1,12119 \times 10^{-4}$
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=6,50/41 °C	α	$-3,77597 \times 10^9$	138,29735	bd	350	-	1,00932
	k	$1,48245 \times 10^{-10}$	0,00286	bd	0,42853	2,34463	-0,01331
	n	-	-	bd	0	-0,35733	0,73932
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,52682	bd	-0,02062	0,64857	0,99998
	SUM	0,03289	0,40786	2,06391	1,20868	0,95801	0,48364
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=7,40/37 °C	α	3,97697	$-1,11088 \times 10^{-22}$	-60,64196	$-3,13275 \times 10^{-51}$	-	-193,74098
	k	0,02344	0,02371	0,05702	0,15104	0,23527	193,51569
	n	-	-	-	0,34541	0,2623	0,00115
	R ² _{adj}	0,99576	0,92471	0,619	0,77458	0,79471	0,89528
	SUM	0,03289	0,40786	2,06391	1,20868	0,95801	0,48364

[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,05114	0,16822	0,17909	0,05829	0,04042	0,00524
	α	-15,03988	-1,741×10 ⁻²³	-8,20825	-7,23391×10 ⁻⁴⁴	-	-0,39426
	k	0,00866	0,01092	0,05572	0,08194	0,09696	0,32746
	n	-	-	-	0,43244	0,40117	0,24738
	R ² _{adj}	0,99039	0,96839	0,96635	0,98893	0,91651	0,99889
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	70,58657	3,64262	bd	9,7402	4,0393	0,01333
	α	184,29338	184,29338	bd	360	-	1,04171
	k	0,00278	0,00278	bd	0,51606	2,45437	-0,00246
	n	-	-	bd	0	-0,32449	1,2314
	R ² _{adj}	-2,72359	-2,79725	bd	-0,02062	0,57059	0,99857
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	7,6396	5,05253	bd	7,6396	2,55113	6,92232×10 ⁻⁵
	α	-3,87488×10 ⁹	143,1693	bd	360	-	1,00726
	k	1,45119×10 ⁻¹⁰	0,00278	bd	0,43016	2,36494	-0,01249
	n	-	-	bd	0	-0,35621	0,7461
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,53868	bd	-0,02062	0,64749	0,99999

Tabela A6. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i DOX z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,09415	0,02501	0,593	0,13754	0,09594	0,01031
	α	-18,03109	$-3,17194 \times 10^{-19}$	-45,17254	$-1,72296 \times 10^{-55}$	-	-4,61748
	k	0,01244	0,01887	0,05684	0,15794	0,19352	4,49781
	n	-	-	-	0,32895	0,29013	0,03876
	R ² _{adj}	0,97733	0,99398	0,85721	0,96654	0,97266	0,99703
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,08979	0,06462	0,32431	0,03689	0,01977	0,00196
	α	-24,72875	-0,24593	-33,96062	0	-	-0,41928
	k	0,00998	0,01539	0,05631	0,14009	0,15981	0,45445
	n	-	-	-	0,3458	0,31969	0,19719
	R ² _{adj}	0,97856	0,98457	0,92258	0,9911	0,9945	0,99945
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA /pH=5,50/41°C	SUM	0,11353	0,0308	0,54355	0,07651	0,05734	0,00485
	α	-23,25363	-0,30451	-54,9635	$-2,61167 \times 10^{-63}$	-	-2,33865
	k	0,0119	0,01921	0,05562	0,18323	0,20967	2,30496
	n	-	-	-	0,30065	0,2748	0,06439
	R ² _{adj}	0,97011	0,99189	0,8569	0,97965	0,9818	0,99845
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:dHSA	SUM	0,04163	13,97388	0,1093	0,06236	0,04413	0,00843
	α	-10,23483	62,18766	-1,16753	$-9,74418 \times 10^{-51}$	-	-0,32687

/pH=5,50/41 °C	k	0,00921	0,00303	0,0585	0,0692	0,08255	0,25667
	n	-	-	-	0,46887	0,43564	0,28516
	R ² _{adj}	0,99276	-1,81285	0,981	0,98905	0,99158	0,99837
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,05009	13,01538	0,03932	0,05389	0,03855	0,00734
	α	-4,66555	76,43465	-4,14029×10 ⁻³²	-1,01513×10 ⁻⁶⁷	-	-0,21958
	k	0,00862	0,00308	0,05697	0,04567	0,05476	0,14573
	n	-	-	-	0,54154	0,50748	0,36931
	R ² _{adj}	0,99225	-1,43318	0,99391	0,99157	0,99357	0,99876
	SUM	0,04235	13,54491	0,07738	0,09227	0,06872	0,0187
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,00/37 °C	α	-1,31264	79,51086	-7,32878×10 ⁻⁵⁸	-2,95002×10 ⁻⁵²	-	-0,27375
	k	0,00876	0,00303	0,05669	0,0395	0,04963	0,16216
	n	-	-	-	0,56771	0,52506	0,35842
	R ² _{adj}	0,99384	-1,33033	0,98875	0,98644	0,98929	0,99705
	SUM	91,72243	2,49798	bd	9,08401	4,06881	5,78924×10 ⁻⁸
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,00/41 °C	α	197,00157	197,00157	bd	330	-	1,00007
	k	0,00303	0,00303	bd	0,57259	2,23512	-4,13046×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-0,20828	1,34367
	R ² _{adj}	-3,56034	-3,63146	bd	-0,02062	0,53809	1
	SUM	89,55618	2,65545	bd	8,95757	3,38557	1,29555×10 ⁻⁷
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,00/41 °C	α	199,29268	199,29268	bd	330	-	1,00886
	k	0,00313	0,00313	bd	0,56693	3,49705	-3,84807×10 ⁻⁴

	n	-	-	bd	0	-0,37835	1,3574
	R ² _{adj}	-3,53685	-3,6046	bd	-0,02062	0,61819	1
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,50/37° C	SUM	0,01966	0,27913	0,82252	0,50428	0,38677	0,10067
	α	-2,00929	-2,43294×10 ⁻²⁵	-12,79123	-2,29079×10 ⁻⁴³	-	-30,35313
	k	0,01335	0,01475	0,05937	0,09344	0,13543	29,94551
	n	-	-	-	0,42196	0,35288	0,00804
	R ² _{adj}	0,99667	0,9527	086061	0,91366	0,92664	0,98071
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,50/37° C	SUM	0,00444	0,55118	0,67093	0,66108	0,58909	0,18114
	α	6,36895	4,58324	4,58324	4,58324	-	-7,19019
	k	0,01318	0,01306	0,06194	0,06265	0,08946	6,64825
	n	-	-	-	0,49737	0,42888	0,03677
	R ² _{adj}	0,99942	0,92286	0,9061	0,90652	0,91755	0,97439
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,50/41° C	SUM	130,72812	1,74056	bd	10,50365	5,82055	0,03644
	α	249,08865	249,08865	bd	360	-	1,02511
	k	0,00282	0,00282	bd	0,66537	2,39371	-6,1177×10 ⁻⁶
	n	-	-	bd	0	-0,26332	2,05224
	R ² _{adj}	-4,2109	-4,33045	bd	-0,02062	0,4402	0,99646
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=6,50/41° C	SUM	79,43133	2,90601	bd	8,89309	3,74735	5,41203×10 ⁻⁸
	α	200,38635	200,38653	bd	360	-	1,00009
	k	0,00278	0,00278	bd	0,54154	2,32644	-9,45381×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-0,3033	1,18314

	R^2_{adj}	-3,24701	-3,31335	bd	-0,02062	0,56387	1
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,07935	13,10399	0,11417	0,0024	0,00145	1,31321×10 ⁻⁴
	α	-22,3069	55,03449	-13,70671	-1,26869×10 ⁻⁴⁸	-	-0,05829
	k	0,00841	0,00303	0,0563	0,10068	0,10464	0,13388
	n	-	-	-	0,39754	0,39023	0,35682
	R^2_{adj}	0,98339	-2,22264	0,9761	0,99949	0,99966	0,99997
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,07586	13,219	0,11974	0,00593	0,00341	2,45332×10 ⁻⁴
	α	-21,13112	55,07061	-12,75609	-3,56514×10 ⁻⁴⁷	-	-0,09334
	k	0,00852	0,00303	0,05654	0,09742	0,10372	0,15155
	n	-	-	-	0,4041	0,39223	0,34116
	R^2_{adj}	0,98435	-2,1936	0,97529	0,99876	0,99921	0,99994
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	84,21343	3,23002	bd	11,09457	5,1831	0,06142
	α	180,75833	180,75833	bd	328	-	1,05812
	k	0,00305	0,00305	bd	0,55329	2,40278	-9,95802×10 ⁻⁴
	n	-	-	bd	0	-0,31096	1,2118
	R^2_{adj}	-2,7648	-2,84427	bd	-0,02062	0,51928	0,99424
[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	7,79076	4,72638	bd	7,79076	2,67383	1,82065×10 ⁻⁵
	α	-3,55538×10 ⁹	136,7035	bd	328	-	1,00338
	k	1,64444×10 ⁻¹⁰	0,00305	bd	0,44275	2,28748	-0,01037
	n	-	-	bd	0	-0,34984	0,7894
	R^2_{adj}	-0,0102	-2,60627	bd	-0,02062	0,63871	1

Tabela A7. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i binimetynibu z liposomów [$L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}$] w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatur	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=5,50/37^{\circ}C$	SUM	105,89564	2,05532	bd	8,3394	3,89169	0,00707
	α	210,78083	210,78083	bd	325	-	$-9,52401 \times 10^5$
	k	0,00308	0,00308	bd	0,60202	2,11074	0,96963
	n	-	-	bd	0	-0,26625	1,59215
	R^2_{adj}	-4,28977	-4,37331	bd	-0,02062	0,5193	0,99912
$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=5,50/37^{\circ}C$	SUM	64,52921	3,64383	bd	8,50168	3,29303	$1,64715 \times 10^{-29}$
	α	162,5	162,5	bd	325	-	-0,00308
	k	0,00308	0,00308	bd	0,5	2,27814	1
	n	-	-	bd	0	-0,32292	1
	R^2_{adj}	-2,89812	-2,96496	bd	-0,02062	0,59669	1
$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=5,50/41^{\circ}C$	SUM	57,8679	4,05433	bd	8,57017	3,20685	0,00108
	α	151,83456	151,83456	bd	325	-	-0,00549
	k	0,00308	0,00308	bd	0,47815	2,31976	1,01548
	n	-	-	bd	0	-0,33649	0,90387
	R^2_{adj}	-2,65276	-2,72898	bd	-0,02062	0,60942	0,99987
$L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=5,50/41^{\circ}C$	SUM	8,41333	5,40667	bd	8,41333	2,8452	0,00899
	α	$-3,59909 \times 10^9$	125,95948	bd	325	-	-0,02004
	k	$1,533 \times 10^{-10}$	0,00308	bd	0,4241	2,40072	1,06589

	n	-	-	bd	0	-0,37	0,69022
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,32273	bd	-0,02062	0,64417	0,99886
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,00 /37 °C	SUM	146,57534	1,3367	bd	7,85214	4,236	0,01422
	α	243,26599	243,26599	bd	325	-	-1,44089×10 ⁻⁶
	k	0,00308	0,00308	bd	0,68266	1,96127	0,9675
	n	-	-	bd	0	-0,22338	2,31461
	R ² _{adj}	-5,92022	-6,10887	bd	-0,02062	0,44781	0,99813
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,00 /37 °C	SUM	134,68261	1,59377	bd	8,02675	4,15821	0,01257
	α	234,76293	234,76293	bd	325	-	-5,6341×10 ⁻⁶
	k	0,00308	0,00308	bd	0,66003	2,00533	0,96685
	n	-	-	bd	0	-0,2354	2,07916
	R ² _{adj}	-5,39878	-5,54106	bd	-0,02062	0,46889	0,99838
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,00 /41 °C	SUM	8,45615	5,04407	bd	8,45615	2,94231	0,00552
	α	-3,58851×10 ⁹	133,30891	bd	325	-	-0,01403
	k	1,61459×10 ⁻¹⁰	0,00308	bd	0,43981	2,37608	1,04761
	n	-	-	bd	0	-0,35986	0,7483
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,42639	bd	-0,02062	0,63477	0,99931
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,00 /41 °C	SUM	7,7835	9,44178	bd	7,78349	16,15471	0,07207
	α	-6,57794×10 ⁸	77,88155	bd	325	-	-0,23298
	k	5,55556×10 ⁻¹⁰	0,00308	bd	0,30612	-3563302,9378	1,41871
	n	-	-	bd	0	-126303,13189	0,31817

L_{DPPC/9-PBThACl/ Binimetynib}/pH=6,50 /37 °C	R ² _{adj}	-0,0102	-1,97543	bd	-0,02062	-1,23666	0,98992
	SUM	97,02706	2,57284	bd	10,726	5,24068	0,03519
	α	193,97089	193,97089	bd	325	-	-3,14237×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,58749	2,30931	1,03885
	n	-	-	bd	0	-0,29026	1,4084
	R ² _{adj}	-3,20618	-3,28781	bd	-0,02062	0,49833	0,9966
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,50 /37 °C	SUM	95,6599	2,58669	bd	9,80816	4,59103	0,00595
	α	195,50808	195,50808	bd	325	-	-3,41436×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,58332	2,2624	1,01927
	n	-	-	bd	0	-0,28762	1,38655
	R ² _{adj}	-3,43751	-3,51193	bd	-0,02062	0,51848	0,99937
	SUM	65,75481	3,71429	bd	8,56028	3,34188	3,58504×10 ⁻⁶
L_{DPPC/9-PBThACl/ Binimetynib}/pH=6,50 /41 °C	α	164,06606	164,06606	bd	325	-	-0,00285
	k	0,00308	0,00308	bd	0,50359	2,27922	1,00093
	n	-	-	bd	0	-0,32144	1,01358
	R ² _{adj}	-2,91967	-2,98605	bd	-0,02062	0,59377	1
	SUM	60,38651	3,9265	bd	8,37096	3,15969	2,18163×10 ⁻⁶
	α	156,67238	156,67238	bd	325	-	-0,00413
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}/pH=6,50 /41 °C	k	0,00308	0,00308	bd	0,4874	2,28279	1,00082
	n	-	-	bd	0	-0,32895	0,94945
	R ² _{adj}	-2,80199	-2,87093	bd	-0,02062	0,60616	1
	SUM	60,38651	3,9265	bd	8,37096	3,15969	2,18163×10 ⁻⁶
	α	156,67238	156,67238	bd	325	-	-0,00413
	k	0,00308	0,00308	bd	0,4874	2,28279	1,00082

L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib} /pH=7,40/37 °C	SUM	84,0002	3,22513	bd	10,92304	5,06375	0,05134
	α	182,12761	182,12761	bd	330	-	-9,97867×10 ⁻⁴
	k	0,00303	0,00303	bd	0,55296	2,39841	1,05475
	n	-	-	bd	0	-0,31035	1,20893
	R ² _{adj}	-2,80071	-2,87885	bd	-0,02062	0,52282	0,99511
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib} /pH=7,40/37 °C	SUM	8,03018	4,62183	bd	8,03018	2,81915	1,78011×10 ⁻⁴
	α	-3,59251×10 ⁹	142,03273	bd	330	-	-0,00895
	k	1,67587×10 ⁻¹⁰	0,00303	bd	0,45236	2,31003	1,00952
	n	-	-	bd	0	-0,34673	0,81531
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,62793	bd	-0,02062	0,63141	0,99998
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib} /pH=7,40/41 °C	SUM	84,0842	2,87324	bd	8,9865	3,87918	1,31625×10 ⁻⁶
	α	186,0213	186,0213	bd	325	-	-7,57899×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,55359	2,24574	1,0004
	n	-	-	bd	-	-0,29758	1,24237
	R ² _{adj}	-3,35979	-3,42502	bd	-0,02062	0,55389	1
L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib} /pH=7,40/41 °C	SUM	65,31384	3,68378	bd	8,54978	3,32911	5,06752×10 ⁻⁶
	α	163,46258	163,46258	bd	325	-	-0,00294
	k	0,00308	0,00308	bd	0,50229	2,2801	1,00112
	n	-	-	bd	0	-0,32209	1,00804
	R ² _{adj}	-2,9085	-2,97471	bd	-0,02062	0,59475	1

Tabela A8. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACl i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACl/binimetynib}]:HSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,06612	0,67601	2,04218	1,35078	1,09873	0,56793
	α	5,89421	$-4,15694 \times 10^{-22}$	-29,05974	$-1,51418 \times 10^{-46}$	-	137,71464
	k	0,02317	0,0232	0,06341	0,1255	0,1985	-138,03858
	n	-	-	0,5	0,38614	0,2991	0,00178
	R ² _{adj}	0,99442	0,89434	0,680081	0,7867	0,80593	0,89864
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,07683	12,97121	0,09032	0,00237	0,00142	$1,74806 \times 10^{-4}$
	α	-20,63133	58,76863	-10,3637	$-2,12602 \times 10^{-46}$	-	0,12123
	k	0,0083	0,00303	0,05638	0,09219	0,09592	-0,053
	n	-	-	0,5	0,41277	0,40527	0,37312
	R ² _{adj}	0,98444	-2,10851	0,98171	0,99951	0,99968	0,99996
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/41°C	SUM	7,68301	4,87519	bd	7,68301	2,5951	$2,13162 \times 10^{-5}$
	α	$-3,52745 \times 10^9$	131,92087	bd	325	-	-0,01198
	k	$1,62081 \times 10^{-10}$	0,00308	bd	0,4355	2,27702	1,00388
	n	-	-	bd	0	-0,35319	0,76576
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,57246	bd	-0,02062	0,64382	1
[L _{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:HSA	SUM	3,71107	3,71109	bd	3,71107	6,22731	0,00551
	α	$-5,97277 \times 10^8$	$-1,52641 \times 10^7$	bd	320	-	-3,73614

/pH=5,50/41 °C	k	$3,47656 \times 10^{-10}$	$5,83562 \times 10^{-9}$	bd	0,18752	-14,55251	4,7672
	n	-	-	bd	0	-111,79489	0,04262
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-1,06667	0,99815
[L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]:HSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,02265	0,24207	0,40746	0,25653	0,18861	0,04338
	α	-5,44578	$-7,49274 \times 10^{-22}$	-4,75413	$-1,01784 \times 10^{-47}$	-	1,30594
	k	0,0118	0,01367	0,06134	0,0816	0,11059	-1,54747
	n	-	-	0,5	0,44853	0,391	0,1175
	R ² _{adj}	0,99615	0,95883	0,93071	0,95592	0,96445	0,99174
	SUM	0,08247	12,2974	0,00679	$9,13342 \times 10^{-4}$	$6,25265 \times 10^{-4}$	$9,99917 \times 10^{-5}$
[L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]:HSA /pH=6,00/37 °C	α	-13,46067	75,44185	$-2,56253 \times 10^{-8}$	$-3,16672 \times 10^{-43}$	-	0,07263
	k	0,00784	0,00308	0,0563	0,06195	0,06312	-0,02573
	n	-	-	0,5	0,48302	0,4784	0,45807
	R ² _{adj}	0,98535	-1,68633	0,99879	0,99984	0,99988	0,99998
	SUM	4,80881	4,80881	bd	4,80881	0,81348	0,39825
[L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]:HSA /pH=6,00/41 °C	α	$-1,53938 \times 10^8$	$-5,13309 \times 10^9$	bd	325	-	-186,54948
	k	$8,13029 \times 10^{-10}$	$7,95993 \times 10^{-12}$	bd	0,11764	2,89122	187,65476
	n	-	-	bd	0	-0,69563	0,00111
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,0102	bd	-0,02062	0,79568	0,89893
	SUM	4,85682	4,85683	bd	4,85682	5,31301	0,37748
[L_{DPPC}/9-PBThACl/Binimetynib]:HSA /pH=6,00/41 °C	α	$-1,55579 \times 10^8$	$-2,20584 \times 10^7$	bd	325	-	-176,22981
	k	$8,26562 \times 10^{-10}$	$1,93199 \times 10^{-9}$	bd	0,12067	-1738125,49	177,34817

	n	-	-	bd	0	-6793,64017	0,00118
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,31699	0,90545
[L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:HSA /pH=6,50/37° C	SUM	0,0592	13,54914	0,12235	0,02152	0,01605	0,00238
	α	-15,99412	56,71178	-7,67665	-6,00614×10 ⁻⁴³	-	0,20364
	k	0,00902	0,00308	0,05792	0,08767	0,09624	-0,20231
	n	-	-	0,5	0,42579	0,4081	0,30812
	R ² _{adj}	0,98862	-2,04529	0,97649	0,99582	0,99657	0,99949
[L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:HSA /pH=6,50/37° C	SUM	0,10512	11,76158	0,03209	7,53532×10 ⁻⁴	5,46263×10 ⁻⁴	1,0979×10 ⁻⁴
	α	-6,9405	91,68722	-1,33403×10 ⁻³⁹	-8,25824×10 ⁻⁷³	-	0,04642
	k	0,00742	0,00308	0,05428	0,04015	0,0411	-0,01878
	n	-	-	0,5	0,55691	0,55254	0,53435
	R ² _{adj}	0,98322	-1,39305	0,99488	0,99988	0,99991	0,99998
[L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:HSA /pH=6,50/41° C	SUM	2,14954	2,14954	bd	2,14953	1,66187	0,19898
	α	-1,34353×10 ⁷	-1,96185×10 ⁷	bd	325	-	-162,61476
	k	5,52765×10 ⁻⁹	9,33461×10 ⁻¹⁰	bd	0,07158	-4,06319×10 ⁷	163,22129
	n	-	-	bd	0	-1574805	6,93793×10 ⁻⁴
	R ² _{adj}	-0,01021	-0,01021	bd	-0,02062	-0,31289	0,84117
[L_{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:HSA /pH=6,50/41° C	SUM	4,06567	4,0657	bd	4,06567	6,5437	0,01359
	α	-6,04011×10 ⁸	-1,6114×10 ⁷	bd	325	-	-20,94884
	k	3,41697×10 ⁻¹⁰	5,47643×10 ⁻⁹	bd	0,18649	-6,33202	22,07769
	n	-	-	bd	0	-90,95428	0,00921

	R^2_{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,94606	0,99592
[L-DPPC/9-PBThACI/Binimetynib]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,32614	10,50541	0,69293	$3,2153 \times 10^{-4}$	$2,6114 \times 10^{-4}$	$8,66228 \times 10^{-5}$
	α	16,80188	136,99595	$-4,44442 \times 10^{-44}$	$-4,185 \times 10^{-12}$	-	0,01004
	k	0,00647	0,00308	0,04823	0,00917	0,00933	-0,00706
	n	-	-	0,5	0,81203	0,80876	0,79709
	R^2_{adj}	0,96438	-0,85659	0,91135	0,99996	0,99997	0,99999
[L-DPPC/9-PBThACI/Binimetynib]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,95711	11,81106	0,88641	0,05193	0,04548	0,02558
	α	36,42383	128,99722	$-3,78403 \times 10^{-51}$	$-7,38228 \times 10^{-9}$	-	0,0181
	k	0,00744	0,00308	0,05017	0,00765	0,00912	-0,07753
	n	-	-	0,5	0,8528	0,82057	0,71238
	R^2_{adj}	0,95301	-0,71321	0,90089	0,99413	0,99472	0,997
[L-DPPC/9-PBThACI/Binimetynib]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	6,08197	6,08203	bd	6,08197	1,65077	$7,48137 \times 10^{-5}$
	α	$-3,50372 \times 10^9$	$-1,36487 \times 10^7$	bd	325	-	-0,05388
	k	$1,20146 \times 10^{-10}$	$1,93596 \times 10^{-8}$	bd	0,34362	2,16719	1,01766
	n	-	-	bd	0	-0,39522	0,50831
	R^2_{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,70465	0,99999
[L-DPPC/9-PBThACI/Binimetynib]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	2,72809	2,72806	bd	2,72804	0,39717	$1,04988 \times 10^{-4}$
	α	-9398010	$-1,42546 \times 10^7$	bd	325	-	-0,544
	k	$2,03389 \times 10^{-8}$	$5,50126 \times 10^{-9}$	bd	0,17399	1,53786	1,30259
	n	-	-	bd	0	-0,47619	0,15117
	R^2_{adj}	-0,01022	-0,01021	bd	-0,02062	0,80319	0,99995

Tabela A9. Parametry dopasowania profili uwalniania 9-PBThACI i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/9-PBThACI/binimetynib}]:dHSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/37 °C	SUM	0,06945	0,05579	0,44244	0,11727	0,07695	0,01039
	α	-16,46613	$-1,58796 \times 10^{-21}$	-27,69951	$-9,00171 \times 10^{-50}$	-	1,20887
	k	0,01141	0,01631	0,05832	0,12586	0,15611	-1,30534
	n	-	-	0,5	0,36875	0,32767	0,1127
	R ² _{adj}	0,98489	0,98786	0,90376	0,97423	0,98073	0,99737
[L _{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/37 °C	SUM	0,04179	0,13768	0,36232	0,14532	0,10621	0,01911
	α	-10,86207	$-8,54023 \times 10^{-23}$	-12,1484	$-2,42627 \times 10^{-45}$	-	0,91648
	k	0,001112	0,01408	0,05983	0,09752	0,12232	-1,06758
	n	-	-	0,5	0,41416	0,37114	0,14233
	R ² _{adj}	0,99212	0,97402	0,93163	0,9723	0,97752	0,99591
[L _{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50 /41 °C	SUM	4,98883	4,98884	bd	4,98883	5,51767	0,37859
	α	$-1,59055 \times 10^8$	$-2,23555 \times 10^7$	bd	330	-	-164,69516
	k	$8,29797 \times 10^{-10}$	$1,98411 \times 10^{-9}$	bd	0,12365	-2159531,6	165,83794
	n	-	-	bd	0	-7876,3956	0,00129
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,32316	0,90827
[L _{DPPC/9-PBThACI/Binimetynib}]:dHSA	SUM	6,10706	6,10707	bd	6,10705	7,66999	0,30118
	α	$-1,73039 \times 10^8$	$-2,13423 \times 10^7$	bd	330	-	-103,44413

/pH=5,50/41 °C	k	1,00821×10 ⁻⁹	3,19252×10 ⁻⁹	bd	0,16009	6,303717	104,77852
	n	-	-	bd	0	-55900,45677	0,00235
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,43648	0,94301
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,0428	0,13411	0,35555	0,13819	0,10128	0,01797
	α	-11,19324	-1,28089×10 ⁻²²	-12,38968	-4,15933×10 ⁻⁴⁴	-	0,87711
	k	0,01106	0,01408	0,05974	0,09821	0,1224	-1,02155
	n	-	-	0,5	0,41268	0,37086	0,14602
	R ² _{adj}	0,99189	0,97458	0,9326	0,97353	0,97845	0,99614
	SUM	0,04861	14,59832	0,21093	0,06335	0,04672	0,0016
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/37 °C	α	-13,67728	51,69753	-9,26385	-2,01999×10 ⁻⁴³	-	0,38578
	k	0,00987	0,00308	0,05887	0,09166	0,10711	-0,44917
	n	-	-	0,5	0,42128	0,39174	0,23041
	R ² _{adj}	0,99075	-2,13883	0,95988	0,98783	0,99009	0,99837
	SUM	2,77962	2,7796	bd	2,77959	3,3292	0,04904
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/41 °C	α	-1,12804×10 ⁷	-1,71082×10 ⁷	bd	325	-	-81,26671
	k	1,17846×10 ⁻⁸	2,62159×10 ⁻⁹	bd	0,12448	1,60216×10 ⁸	82,11363
	n	-	-	bd	0	-4,41944×10 ⁸	0,00186
	R ² _{adj}	-0,01021	-0,01021	bd	-0,02062	-0,6773	0,97504
	SUM	2,808	2,80798	bd	2,80797	3,70378	0,01865
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/41 °C	α	-1,076×10 ⁷	-1,62414×10 ⁷	bd	325	-	-62,10533
	k	1,3767×10 ⁻⁸	3,26186×10 ⁻⁹	bd	0,13769	-6,137	2,98004

	n	-	-	bd	0	-198,1667	0,00248
	R^2_{adj}	-0,01022	-0,01021	bd	-0,02062	-0,81924	0,99074
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37°C	SUM	0,02894	0,2388	1,68198	0,80574	0,69344	0,30268
	α	0,16366	$-9,98161 \times 10^{-23}$	-17,68963	$-1,34326 \times 10^{-56}$	-	249,59151
	k	0,07312	0,07863	0,1046	0,2541	0,31957	-249,5318
	n	-	-	0,5	0,31993	0,26396	$8,74141 \times 10^{-4}$
	$R^2_{1\ adj}$	0,99427	0,95251	0,66552	0,83812	0,83852	0,92878
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37°C	SUM	12,87817	4,2899	bd	12,87816	2,77234	0,28527
	α	$-2,80454 \times 10^9$	204,57409	bd	325	-	-0,00334
	k	$2,52939 \times 10^{-10}$	0,00417	bd	0,50811	476,34123	1,48912
	n	-	-	bd	0	-1,31941	1,06668
	$R^2_{2\ adj}$	-0,0102	-2,19429	bd	-0,02062	0,78253	0,97739
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37°C	SUM	0,01156	0,47229	0,97396	0,6688	0,56996	0,18286
	α	0,71081	$-2,33538 \times 10^{-26}$	-1,44948	$-2,30841 \times 10^{-43}$	-	71,04886
	k	0,04875	0,04989	0,11297	0,15349	0,19931	-71,20757
	n	-	-	0,5	0,42914	0,36628	0,00365
	$R^2_{1\ adj}$	0,99842	0,92776	0,85104	0,89665	0,90349	0,96871
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37°C	SUM	10,30524	3,25081	bd	10,30524	2,0206	0,04048
	α	$-2,59075 \times 10^9$	218,77962	bd	325	-	$-3,62556 \times 10^{-4}$
	k	$2,9689 \times 10^{-10}$	0,00426	bd	0,53665	317,50522	1,24902
	n	-	-	bd	0	-1,22518	1,41536

	R^2_{adj}	-0,0102	-2,88932	bd	-0,02062	0,80192	0,99599
	SUM	10,58399	3,7448	bd	10,58399	4,58821	0,04401
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/41 °C	α	$-3,62554 \times 10^9$	166,85101	bd	325	-	-0,00256
	k	$2,03351 \times 10^{-10}$	0,00308	bd	0,52163	2,42705	1,06316
	n	-	-	bd	0	-0,32659	1,04994
	R^2_{adj}	-0,0102	-2,66044	bd	-0,02062	0,55225	0,99566
	SUM	7,1002	7,8622	bd	7,1002	1,92988	0,01215
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/41 °C	α	$-3,63247 \times 10^9$	86,84459	bd	325	-	-0,10229
	k	$1,14786 \times 10^{-10}$	0,00308	bd	0,34099	2,39605	1,18226
	n	-	-	bd	0	-0,418	0,42586
	R^2_{adj}	-0,0102	-2,15597	bd	-0,02062	0,70731	0,99814
	SUM	0,16012	14,60327	0,40591	0,21194	0,17725	0,09055
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	α	13,55996	95,13549	$-1,80909 \times 10^{-34}$	$-6,29381 \times 10^{-16}$	-	0,10405
	k	0,00916	0,00308	0,05627	0,02018	0,02747	-0,25937
	n	-	-	0,5	0,69258	0,63532	0,43913
	R^2_{adj}	0,98689	-0,96932	0,95337	0,9754	0,97857	0,98894
	SUM	0,03981	13,59625	0,05504	0,06955	0,05147	0,01187
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	α	-5,47665	71,07206	$-2,26351 \times 10^{-18}$	$-8,12788 \times 10^{-71}$	-	0,19114
	k	0,00902	0,00308	0,05792	0,0521	0,06291	-0,27838
	n	-	-	0,5	0,51984	0,48437	0,33092
	R^2_{adj}	0,99372	-1,5293	0,99131	0,98891	0,99121	0,99795

[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	121,94928	1,78888	bd	8,21438	4,0751	0,00972
	α	228,17829	228,17829	bd	330	-	-2,04093×10 ⁻⁵
	k	0,00303	0,00303	bd	0,63518	2,06153	0,96781
	n	-	-	bd	0	-0,24878	1,85265
	R ² _{adj}	-4,87012	-4,98032	bd	-0,02062	0,49045	0,99877
[L_{DPPC/9-PBThACl/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	7,28045	5,54223	bd	7,28045	2,32432	2,71842×10 ⁻⁵
	α	-3,55447×10 ⁹	121,41083	bd	330	-	-0,01853
	k	1,48641×10 ⁻¹⁰	0,00303	bd	0,41046	2,27177	1,00548
	n	-	-	bd	0	-0,3646	0,68888
	R ² _{adj}	-0,0102	-2,47547	bd	-0,02062	0,66111	1

Tabela A10. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/binimetynib}] w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=5,50 /37°C	SUM	97,80031	2,81886	bd	11,21861	5,60929	0,06244
	α	196,29745	196,29745	bd	330	-	-2,83857×10 ⁻⁴
	k	0,00303	0,00303	bd	0,58947	2,34017	1,04722
	n	-	-	bd	0	-0,29131	1,42584
	R ² _{adj}	-3,09572	-3,17742	bd	-0,02062	0,48706	0,99423
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=5,50/37°C	SUM	98,123	2,59347	bd	11,15993	5,57526	0,05867
	α	196,78972	196,78972	bd	330	-	-2,75734×10 ⁻⁴
	k	0,00303	0,00303	bd	0,5903	2,33569	1,04599
	n	-	-	bd	0	-0,29061	1,43039
	R ² _{adj}	-3,20535	-3,43759	bd	-0,02062	0,48748	0,99455
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=5,50/41°C	SUM	96,20241	2,48483	bd	9,66088	4,59193	0,00712
	α	197,5645	197,5645	bd	325	-	-2,18713×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,58051	2,2294	0,99855
	n	-	-	bd	0	-0,28555	1,46168
	R ² _{adj}	-3,46597	-3,54915	bd	-0,02062	0,51079	0,99923
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=5,50/41°C	SUM	99,28473	2,38924	bd	9,36609	4,45582	0,00281
	α	201,43587	201,43587	bd	325	-	-1,65482×10 ⁻⁴

L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=6,00 /37° C	k	0,00308	0,00308	bd	0,58801	2,19904	0,9918
	n	-	-	bd	0	-0,27991	1,50705
	R ² _{adj}	-3,66126	-3,74346	bd	-0,02062	0,51039	0,99989
	SUM	106,78635	2,21612	bd	9,46543	4,66966	0,00401
	α	208,4684	208,14684	bd	325	0,49315	-8,18867×10 ⁻⁵
	k	0,00308	0,00308	bd	0,60537	217649	0,99223
	n	-	-	bd	0	-0,2139	1,62942
	R ² _{adj}	3,84645	-3,93615	bd	-0,02062	0,49315	0,99956
	SUM	106,78199	2,21836	bd	9,43458	4,64825	0,00364
	α	208,23163	208,23163	bd	325	-	-8,20396×10 ⁻⁵
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=6,00/37° C	k	0,00308	0,00308	bd	0,60533	217475	0,99164
	n	-	-	bd	0	-0,27123	1,62881
	R ² _{adj}	-3,85795	-3,94734	bd	-0,2062	0,4938	0,9996
	SUM	65,151	3,67594	bd	8,52597	3,31527	1,57986×10 ⁻⁷
	α	160,80829	160,80829	bd	-0,02062	-	-0,003
L_{DPPC/DOX/ Binimetynib}/pH=6,00/41° C	k	0,00313	0,00313	bd	0,50184	2,26671	1,0002
	n	-	-	bd	0	-0,3221	1,00722
	R ² _{adj}	-2,91081	-2,97693	bd	-0,02062	0,59525	1
	SUM	64,86086	3,66	bd	8,51901	3,30687	4,1227×10 ⁻⁷
	α	160,41434	160,41434	bd	320	-	-0,00306
L_{DPPC/DOX/Binimetynib}/pH=6,00/41° C	k	0,00313	0,00313	bd	0,50097	2,26725	1,0032

	n	-	-	bd	0	-0,32253	1,00358
	R ² _{adj}	-2,90348	-2,96992	bd	-0,02062	0,59589	1
L_{DPPC/DOX}/ Binimetynib/pH=6,50/37° C	SUM	121,12833	1,80846	bd	9,17846	4,66756	7,39779×10 ⁻⁷
	α	216,90777	216,90777	bd	320	-	-3,4123×10 ⁻⁵
	k	0,00313	0,00313	bd	0,6393	2,12016	1,00017
	n	-	-	bd	0	-0,25487	1,78318
	R ² _{adj}	-4,42193	-4,52696	bd	-0,02062	0,47876	1
L_{DPPC/DOX}/ Binimetynib/pH=6,50/37° C	SUM	117,24724	2,0381	bd	8,56052	4,23612	0,00421
	α	216,45702	216,45702	bd	320	-	-3,28865×10 ⁻⁵
	k	0,00313	0,00313	bd	0,62661	2,08013	0,97439
	n	-	-	bd	0	-0,25525	1,7833
	R ² _{adj}	-4,54784	-4,64649	bd	-0,02062	0,49169	0,99949
L_{DPPC/DOX}/ Binimetynib/pH=6,50/41° C	SUM	87,09767	2,76918	bd	9,02533	3,95368	1,17238×10 ⁻⁷
	α	189,26092	189,26092	bd	325	-	-6,02329×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,56119	2,2376	1,00011
	n	-	-	bd	0	-0,29384	1,28201
	R ² _{adj}	-3,43922	-3,5055	bd	-0,02062	0,54767	1
L_{DPPC/DOX}/ Binimetynib/pH=6,50/41° C	SUM	89,38638	2,48352	bd	8,43955	3,68238	0,00359
	α	194,10537	194,10537	bd	325	-	-3,95633×10 ⁻⁴
	k	0,00308	0,00308	bd	0,56529	2,17238	0,97565
	n	-	-	bd	0	-0,28606	1,34802

L_{DPPC/DOX}/Binimetynib /pH=7,40/37° C	R ² _{adj}	-3,72179	-3,7892	bd	-0,02062	0,54898	0,99956
	SUM	125,79547	1,84159	bd	10,5658	6,64424	0,16168
	α	220,36855	220,36855	bd	325	-	-4, 69125×10 ⁻⁶
	k	0,00308	0,00308	bd	0,65574	1,98097	1,00346
	n	-	-	bd	0	-0,23317	2,1346
	R ² _{adj}	-4,06736	-4,18205	bd	-0,02062	0,36208	0,98432
L_{DPPC/DOX}/Binimetynib /pH=7,40/37° C	SUM	131,65183	1,82923	bd	10,23055	6,41943	0,1222
	α	225,39257	225,39257	bd	325	-	-2,93214×10 ⁻⁶
	k	0,00308	0,00308	bd	0,66829	1,96735	1,00351
	n	-	-	bd	0	-0,22775	2,21383
	R ² _{adj}	-4,36056	-4,48046	bd	-0,02062	0,3633	0,98775
	SUM	125,41171	1,70163	bd	8,12872	4,07326	0,01135
L_{DPPC/DOX}/ Binimetynib /pH=7,40/41° C	α	227,67301	227,67301	bd	325	-	-1,49592×10 ⁻⁵
	k	0,00308	0,00308	bd	0,64187	2,03841	0,96663
	n	-	-	bd	0	-0,24493	1,91055
	R ² _{adj}	-5,02952	-5,14864	bd	-0,02062	0,48554	0,99855
	SUM	123,55637	1,87096	bd	8,15358	4,05944	0,01093
	α	226,17331	226,17331	bd	325	-	-1,80241×10 ⁻⁵
L_{DPPC/DOX}/Binimetynib /pH=7,40/41° C	k	0,00308	0,00308	bd	0,6382	2,04538	0,9668
	n	-	-	bd	0	-0,24689	1,87846
	R ² _{adj}	-4,95475	-5,06564	bd	-0,02062	0,4887	0,99861
	SUM	123,55637	1,87096	bd	8,15358	4,05944	0,01093
	α	226,17331	226,17331	bd	325	-	-1,80241×10 ⁻⁵
	k	0,00308	0,00308	bd	0,6382	2,04538	0,9668

Tabela A11. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/binimetynib}]:HSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/37 °C	SUM	0,08706	11,94254	0,01629	0,005	0,00363	7,3418×10 ⁻⁴
	α	-7,3183	85,97703	-3,58909×10 ⁻³²	-5,14503×10 ⁻⁷⁶	-	0,06343
	k	0,00772	0,00308	0,05516	0,04388	0,04649	-0,05297
	n	-	-	-	0,54315	0,53229	0,48652
	R ² _{adj}	0,98601	-1,43413	0,99738	0,99919	0,99937	0,99987
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/37 °C	SUM	0,08484	12,15467	0,00185	8,72537×10 ⁻⁴	6,18543×10 ⁻⁴	1,02974×10 ⁻⁴
	α	-12,35598	78,12793	-1,64072×10 ⁻¹⁰	-7,17911×10 ⁻⁸²	-	0,06765
	k	0,00777	0,00308	0,05597	0,05758	0,05895	-0,02453
	n	-	-	-	0,49463	0,49021	0,47016
	R ² _{adj}	0,98521	-1,63103	0,99968	0,99985	0,99988	0,99998
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=5,50/41 °C	SUM	3,12621	3,12623	bd	3,12621	4,10622	0,03589
	α	-5,59994×10 ⁸	-1,66291×10 ⁷	bd	320	-	-75,97482
	k	2,70788×10 ⁻¹⁰	3,30282×10 ⁻⁹	bd	0,14071	8,62356×10 ¹⁰	76,90446
	n	-	-	bd	0	-1,06239×10 ¹⁰	0,00217
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,74281	0,98461
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA	SUM	3,18021	3,18022	bd	3,18021	4,07614	0,04938
	α	-1,66339×10 ⁸	-1,67598×10 ⁷	bd	320	-	-83,15145

/pH=5,50/41 °C	k	8,9060×10 ⁻¹⁰	3,16113×10 ⁻⁹	bd	0,13769	-3,89488×10 ⁸	84,08422
	n	-	-	bd	0	-4,43011×10 ⁷	0,002
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,69533	0,97925
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=6,00/37 °C	SUM	0,06422	12,60614	0,0217	0,0247	0,01802	0,00395
	α	-6,04356	80,21007	-2,04155×10 ⁻³⁰	-2,18386×10 ⁻⁷¹	-	0,10035
	k	0,00822	0,00308	0,05624	0,04552	0,05146	-0,13207
	n	-	-	-	0,53983	0,51679	0,42057
	R ² _{adj}	0,98987	-1,4399	0,99658	0,99606	0,99694	0,99932
	SUM	0,09517	11,75753	0,00894	7,86756×10 ⁻⁴	5,67637×10 ⁻⁴	1,05837×10 ⁻⁴
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=6,00/37 °C	α	-9,14379	86,13553	-2,13027×10 ⁻²⁴	-7,25186×10 ⁻⁸³	-	0,05428
	k	0,00756	0,00308	0,05498	0,04672	0,04781	-0,02078
	n	-	-	-	0,53073	0,5264	0,5076
	R ² _{adj}	0,98427	-1,48505	0,99852	0,99987	0,9999	0,99998
	SUM	3,89409	3,8941	bd	3,89409	4,51504	0,20108
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=6,00/41 °C	α	-0,0102	-1,90182×10 ⁷	bd	325	-	-156,9511
	k	-1,58719×10 ⁸	2,44733×10 ⁻⁹	bd	0,12732	-637633,06462	157,96457
	n	-	-	bd	0	-18385,03468	0,00118
	R ² _{adj}	8,57996×10 ⁻¹⁰	-0,01021	bd	-0,02062	-0,45979	0,93431
	SUM	3,95323	3,95324	bd	3,95323	4,45709	0,2469
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=6,00/41 °C	α	-1,56144×10 ⁸	-1,94535×10 ⁷	bd	325	-	-176,90446
	k	8,37863×10 ⁻¹⁰	2,24942×10 ⁻⁹	bd	0,12263	-407904,86103	177,91417

	n	-	-	bd	0	-9502,27378	0,00105
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,41798	0,92063
[L_{DP}PC/DOX/Binimetynib]:HSA /pH=6,50/37°C	SUM	0,0302	14,05255	0,09797	0,09975	0,07765	0,01819
	α	-5,34422	65,85317	$-1,68763 \times 10^{-11}$	$-2,351186 \times 10^{-68}$	-	0,28124
	k	0,00955	0,00308	0,05892	0,05839	0,0713	-0,4023
	n	-	-	-	0,50153	0,46393	0,28037
	R ² _{adj}	0,9952	-1,61208	0,98442	0,98397	0,98658	0,99682
[L_{DP}PC/DOX/Binimetynib]:HSA /pH=6,50/37°C	SUM	0,06072	13,62203	0,21871	0,15254	0,1197	0,04163
	α	6,42828	87,75909	$-2,51668 \times 10^{-34}$	$-1,89076 \times 10^{-20}$	-	0,13698
	k	0,00697	0,00308	0,05617	0,02643	0,03529	-0,28855
	n	-	-	-	0,64168	0,5878	0,392
	R ² _{adj}	0,99292	-1,06977	0,97199	0,98027	0,98376	0,99429
[L_{DP}PC/DOX/Binimetynib]:HSA /pH=6,50/41°C	SUM	5,67783	5,67784	0,50141	0,01672	1,33202	1,20551
	α	$-1,30852 \times 10^8$	$-1,33896 \times 10^7$	122,82828	126,0606	-	-177,44666
	k	$1,62696 \times 10^{-9}$	$6,91229 \times 10^{-9}$	$9,32972 \times 10^{-5}$	$1,03122 \times 10^{-4}$	2,66961	178,64888
	n	-	-	-	1,41125	-0,58009	0,00119
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	-1,68138	0,90904	0,73181	0,75476
[L_{DP}PC/DOX/Binimetynib]:HSA /pH=6,50/41°C	SUM	5,87336	5,87338	0,49827	0,00782	1,41413	1,00368
	α	$-1,33921 \times 10^8$	$-1,37183 \times 10^7$	132,52525	138,9899	-	2,3695
	k	$1,62976 \times 10^{-9}$	$7,01012 \times 10^{-9}$	$6,05641 \times 10^{-5}$	$6,29468 \times 10^{-5}$	2,68055	-0,5469
	n	-	-	-	1,53768	-0,57469	-0,25013

	R^2_{adj}	-0,0102	-0,01021	-1,53446	0,95883	0,72633	0,80374
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,06627	12,93133	0,0593	0,00845	0,00611	9,21362×10 ⁻⁴
	α	-15,66276	64,97357	-3,94983	-3,92366×10 ⁻⁴²	-	0,12753
	k	0,00833	0,00303	0,05691	0,07604	0,08113	-0,10174
	n	-	-	-	0,44748	0,43527	0,37261
	R^2_{adj}	0,98764	-1,88433	0,98894	0,99841	0,99875	0,99981
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,09433	11,79699	0,02807	0,00378	0,00274	5,7064×10 ⁻⁴
	α	-6,5236	90,59373	-1,98757×10 ⁻⁴¹	-1,43175×10 ⁻⁶⁷	-	0,05553
	k	0,00748	0,00303	0,0543	0,04032	0,04244	-0,04377
	n	-	-	-	0,556	0,54639	0,50659
	R^2_{adj}	0,98507	-1,39027	0,99556	0,9994	0,99953	0,9999
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	4,13499	4,13502	-	4,13498	0,77328	0,00114
	α	-6,35511×10 ⁸	-1,45665×10 ⁷	325	325	-	-0,37409
	k	4,15602×10 ⁻¹⁰	8,85373×10 ⁻⁹	1	0,23213	1,94891	1,30893
	n	-	-	-	0	-0,461	0,21723
	R^2_{adj}	-0,0102	-0,01021	0	-0,02062	0,77927	0,99967
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:HSA /pH=7,40/41 °C	SUM	4,21487	4,2149	bd	4,21486	0,78662	0,00156
	α	-1,96219×10 ⁸	-1,45946×10 ⁷	bd	325	-	-0,40773
	k	1,34983×10 ⁻⁹	8,87438×10 ⁻⁹	bd	0,23269	1,97843	1,35952
	n	-	-	bd	0	-0,46369	0,20898
	R^2_{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,78047	0,99956

Tabela A12. Parametry dopasowania profili uwalniania DOX i binimetynibu z liposomów [L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA w różnych modelach matematycznych.

Liposom/pH/Temperatura	Parametr	Model matematyczny					Rozwinięcie modelu Freundlich'a
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger-Peppas	Korsmeyer-Peppas	
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,07227	12,46698	0,00658	0,00884	0,00655	0,00124
	α	-9,44386	78,07455	$-7,06118 \times 10^{-15}$	$-1,78148 \times 10^{-86}$	-	0,08685
	k	0,00804	0,00308	0,05626	0,0528	0,05666	-0,08158
	n	-	-	-	0,51193	0,49865	0,437
	R ² _{adj}	0,98794	-1,55239	0,9989	0,99851	0,99882	0,99977
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/37°C	SUM	0,0775	12,29511	0,00376	0,00392	0,00296	$5,24322 \times 10^{-4}$
	α	-11,02075	77,54808	$-2,01778 \times 10^{-12}$	$-5,15059 \times 10^{-99}$	-	-0,05482
	k	0,00793	0,00308	0,05619	0,05595	0,05856	0,07863
	n	-	-	-	0,50076	0,4922	0,44955
	R ² _{adj}	0,98675	-1,59994	0,99936	0,99932	0,99945	0,9999
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/41°C	SUM	2,33928	2,33928	bd	2,33928	1,53599	0,59898
	α	$-9,6603 \times 10^7$	$-4,55154 \times 10^9$	bd	325	-	-222,19614
	k	$4,69581 \times 10^{-10}$	$1,88354 \times 10^{-12}$	bd	0,04435	-8416307,29	222,70471
	n	-	-	bd	0	-38193,6758	$4,42119 \times 10^{-4}$
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,0102	bd	-0,02062	-0,09531	0,56842
[L _{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=5,50/41°C	SUM	2,31756	2,31756	bd	2,31756	1,48971	0,63609
	α	$-9,21338 \times 10^7$	$-4,31597 \times 10^8$	bd	325	-	-237,38751
	k	$4,59909 \times 10^{-10}$	$1,78978 \times 10^{-11}$	bd	0,04149	$-1,35818 \times 10^7$	237,8742
	n	-	-	bd	0	-42561,97837	$-3,97357 \times 10^{-4}$

	R ² _{adj}	-0,0102	-0,0102	bd	-0,02062	-0,08314	0,53269
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/37° C	SUM	0,09414	0,08271	0,26442	0,01266	0,00693	6,29345×10 ⁻⁴
	α	-26,99564	-0,76532	-32,33849	0	-	0,28386
	k	0,00953	0,01473	0,05628	0,1429	0,15438	-0,20041
	n	-	-	-	0,34051	0,32515	0,24987
	R ² _{adj}	0,97724	0,98001	0,93608	0,99691	0,99805	0,99982
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/37° C	SUM	0,06278	0,10412	0,23962	0,04955	0,03013	0,00406
	α	-17,88561	-6,34517×10 ⁻²⁴	-16,59765	-6,95404×10 ⁻⁴⁶	-	0,37331
	k	0,00982	0,1358	0,05807	0,10438	0,12288	-0,39242
	n	-	-	-	0,3979	0,36689	0,22881
	R ² _{adj}	0,98705	0,97851	0,95055	0,98967	0,99297	0,99904
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/41° C	SUM	4,13496	4,13498	bd	4,13495	0,67143	0,00625
	α	-1,87619×10 ⁸	-1,52926×10 ⁷	bd	320	-	-1,49727
	k	1,23802×10 ⁻⁹	6,92038×10 ⁻⁹	bd	0,20727	2,05719	2,54202
	n	-	-	bd	0	-0,50044	0,09252
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,80619	0,99818
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,00/41° C	SUM	3,43257	3,43259	bd	3,43257	0,48342	0,00331
	α	-5,97436×10 ⁸	-1,50692×10 ⁷	bd	320	-	-3,04244
	k	3,35091×10 ⁻¹⁰	5,58791×10 ⁻⁹	bd	0,18144	1,87968	4,01871
	n	-	-	bd	0	-0,51208	0,04859
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,82277	0,99877
	SUM	0,05082	14,47289	0,19469	0,05279	0,03921	0,00622
	α	-14,30917	52,26289	-9,30089	-4,09335×10 ⁻⁴⁴	-	0,34336

[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37 °C	k	0,00971	0,00308	0,05867	0,09192	0,10589	-0,39257
	n	-	-	-	0,42014	0,39329	0,24358
	R ² _{adj}	0,99028	-2,13296	0,96275	0,9898	0,99163	0,99866
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/37 °C	SUM	0,05366	0,15367	0,17109	0,04041	0,03011	0,00464
	α	-15,04188	-9,62096×10 ⁻²⁴	-9,05195	-3,66568×10 ⁻⁴³	-	0,29019
	k	0,00948	0,01236	0,05841	0,09133	0,10344	-0,32103
	n	-	-	-	0,42037	0,39676	0,26343
	R ² _{adj}	0,98968	0,97045	0,96711	0,99215	0,99355	0,999
	SUM	4,09007	4,09007	bd	4,09007	3,96953	0,49063
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/41 °C	α	-1,41401×10 ⁸	-2,32165×10 ⁷	bd	325	-	-229,59435
	k	6,96389×10 ⁻¹⁰	1,21743×10 ⁻⁹	bd	0,09378	-243479,24359	230,55064
	n	-	-	bd	0	-125,0895	7,86697×10 ⁻⁴
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-0,23	0,84639
	SUM	4,47663	4,47663	bd	4,47663	4,27777	0,71946
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=6,50/41 °C	α	-1,34091×10 ⁸	-5,10552×10 ⁹	bd	325	-	-259,62308
	k	6,99264×10 ⁻¹⁰	5,13196×10 ⁻¹²	bd	0,08951	-2,444231×10 ⁸	260,59842
	n	-	-	bd	0	-2110,48636	7,14491×10 ⁻⁴
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,0102	bd	-0,02062	-0,18757	0,79819
	SUM	0,07031	13,16862	0,10103	0,00815	0,00478	6,28661×10 ⁻⁴
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	α	-18,79404	-18,79404	-9,38993	-6,41911×10 ⁻⁴⁵	-	0,1474
	k	0,00864	0,00864	0,05721	0,08976	0,09665	-0,10188
	n	-	-	-	0,41989	0,40587	0,34845
	R ² _{adj}	0,98601	-2,08871	0,9799	0,99836	0,99894	0,99986
	SUM	0,07031	13,16862	0,10103	0,00815	0,00478	6,28661×10 ⁻⁴

[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/37 °C	SUM	0,04399	13,45896	0,0448	0,05535	0,0411	0,00912
	α	-6,32458	71,5539	$-7,27871 \times 10^{-18}$	$-3,50036 \times 10^{-83}$	-	0,17222
	k	0,00887	0,00308	0,05773	0,05311	0,06283	-0,24344
	n	-	-	-	0,51561	0,484	0,34393
	R ² _{adj}	0,99296	-1,5442	0,99283	0,99105	0,99288	0,9984
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	4,59427	4,5943	bd	4,59427	8,62884	0,00846
	α	$-1,92931 \times 10^8$	$-1,55065 \times 10^7$	bd	325	-	-1,00733
	k	$1,31699 \times 10^{-9}$	$7,83557 \times 10^{-9}$	bd	0,22438	-12,62947	2,08277
	n	-	-	bd	0	-520,61549	0,12669
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	-1,18677	0,99783
[L_{DPPC/DOX/Binimetynib}]:dHSA /pH=7,40/41 °C	SUM	4,49123	4,49126	bd	4,49123	0,79529	0,00655
	α	$-1,93419 \times 10^8$	$-1,52887 \times 10^7$	bd	325	-	-0,87857
	k	$1,31451 \times 10^{-9}$	$7,95504 \times 10^{-9}$	bd	0,2245	2,12518	1,93008
	n	-	-	bd	0	-0,48728	0,13712
	R ² _{adj}	-0,0102	-0,01021	bd	-0,02062	0,79312	0,99828

Tabela A13. Parametry statystyczne ANOVA dla kompleksów liposomalnych 1-12 w różnych wartościach pH środowiska, gdzie pH₁=5,50, pH₂=6,00, pH₃=6,50 i pH₄=7,40 w stałej temperaturze T=37 °C. Krytyczna wartość F na poziomie istotności 0,05 wynosi F_{0,05(3,144)}=3,144.

Liposomy	Źródła zmienności	Parametry statystyczne ANOVA			
		Suma kwadratów (SS)	Stopnie swobody (df)	Średnia kwadratowa (MS)	F
[L _{DPPC/DOX}]	Grupy	0,6588	3	0,2196	1067,43
	Błąd	0,0296	144	2,1×10 ⁻⁴	-
	Całkowita	0,6884	147	-	-
[L _{DPPC/9-PBThACl}]	Grupy	0,3249	3	0,1083	5928,4
	Błąd	0,0018	144	1,8×10 ⁻⁵	-
	Całkowita	0,3267	147	-	-
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}] _{1,1}	Grupy	0,0271	3	0,0090	99,06
	Błąd	0,0131	144	9,1×10 ⁻⁵	-
	Całkowita	0,0402	147	-	-
[L _{DPPC/9-PBThACl/DOX}] _{1,2}	Grupy	0,0171	3	0,0057	329,9560
	Błąd	0,0025	144	1,7×10 ⁻⁵	-
	Całkowita	0,0196	147	-	-
[L _{DPPC/DOX}]:HSA	Grupy	4,4873	3	1,4958	8724,41
	Błąd	0,0247	144	1,7×10 ⁻⁴	-
	Całkowita	4,5120	147	-	-
[L _{DPPC/DOX}]:dHSA	Grupy	0,5210	3	0,1737	1007,53
	Błąd	0,0248	144	1,7×10 ⁻⁴	-
	Całkowita	0,5458	147	-	-
[L _{DPPC/9-PBThACl}]:HSA	Grupy	1,4836	3	0,4945	8627,36

	Błąd	0,0083	144	$5,7 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	1,4918	147	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA	Grupy	0,6167	3	0,2056	10496,06
	Błąd	0,0028	144	$1,9 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,6195	147	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:HSA	Grupy	0,2715	3	0,0905	1932,53
	Błąd	0,0067	144	$4,7 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,2782	147	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:HSA	Grupy	0,0811	3	0,0270	2342,21
	Błąd	0,0017	144	$1,2 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0827	147	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:dHSA	Grupy	0,7019	3	0,2340	2665,26
	Błąd	0,0126	144	$8,7 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,7146	147	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:dHSA	Grupy	0,1592	3	0,0531	3359,56
	Błąd	0,0023	144	$1,6 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,1615	147	-	-

$\lambda_1=233$ nm and $\lambda_2=488$ nm

Tabla A14. Parametry statystyczne ANOVA dla kompleksów liposomalnych 1-12 w różnych temperaturach $T_1=37^\circ\text{C}$ i $T_2=41^\circ\text{C}$ w stałym $\text{pH}=7,4$. Krytyczna wartość F na poziomie istotności 0,05 wynosi $F_{0,05(1,72)}=3,97$.

Liposomy	Źródła zmienności	Parametry statystyczne ANOVA			
		Suma kwadratów (SS)	Stopnie swobody (df)	Średnia kwadratowa (MS)	F
[L _{DPPC} /DOX]	Grupy	0,2828	1	0,2828	2840,91
	Błąd	0,0072	72	$9,9 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,2899	73	-	-
[L _{DPPC} /9-PBThACl]	Grupy	0,1510	1	0,1510	10655,49
	Błąd	0,0010	72	$1,4 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,1520	73	-	-
[L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX] _{1,1}	Grupy	0,0332	1	0,0332	438,73
	Błąd	0,0054	72	$7,5 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0386	73	-	-
[L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX] _{1,2}	Grupy	0,0003	1	0,0003	35,85
	Błąd	0,0006	72	$8,3 \times 10^{-6}$	-
	Całkowita	0,0009	73	-	-
[L _{DPPC} /DOX]:HSA	Grupy	0,0463	1	0,0463	698,45
	Błąd	0,0048	72	$6,6 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0511	73	-	-
[L _{DPPC} /DOX]:dHSA	Grupy	1,9080	1	1,9080	16982,41
	Błąd	0,0081	72	$1,1 \times 10^{-4}$	-
	Całkowita	1,9161	73	-	-
[L _{DPPC} /9-PBThACl]:HSA	Grupy	0,0130	1	0,0130	2239,84

	Błąd	0,0004	72	$5,8 \times 10^{-6}$	-
	Całkowita	0,0135	73	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl}]:dHSA	Grupy	0,0634	1	0,0634	3770,78
	Błąd	0,0012	72	$1,7 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0646	73	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:HSA	Grupy	0,0043	1	0,0043	38,22
	Błąd	0,0081	72	$1,3 \times 10^{-4}$	-
	Całkowita	0,0125	73	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:HSA	Grupy	0,0002	1	0,0002	16,39
	Błąd	0,0009	72	$1,3 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0012	73	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ1}:dHSA	Grupy	0,0003	1	0,0003	1,92
	Błąd	0,0102	72	$1,4 \times 10^{-4}$	-
	Całkowita	0,0105	73	-	-
[L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]_{λ2}:dHSA	Grupy	0,0001	1	0,00013	6,27
	Błąd	0,0015	72	$2,1 \times 10^{-5}$	-
	Całkowita	0,0016	73	-	-

$\lambda_1=233$ nm and $\lambda_2=488$ nm



Article

From Design to Study of Liposome-Driven Drug Release Part 1: Impact of Temperature and pH on Environment

Violetta Kozik ^{1,*}, Danuta Pentak ^{1,2,*}, Marlena Paździor ¹ , Andrzej Zięba ³ and Andrzej Bąk ¹

¹ Institute of Chemistry, University of Silesia, Szkolna 9, 40-006 Katowice, Poland; marlena.pazdzior@us.edu.pl (M.P.); andrzej.bak@us.edu.pl (A.B.)

² Faculty of Chemistry, University of Opole, Oleska 48, 45-052 Opole, Poland

³ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia in Katowice, Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, Poland; zieba@sum.edu.pl

* Correspondence: violetta.kozik@us.edu.pl (V.K.); danuta.pentak@uni.opole.pl (D.P.); Tel.: +48-323591336 (V.K.); +48-774527149 (D.P.)

Abstract: The marketed drug Doxorubicin (DOX) and the promising anti-cancer agent 9-(N-piperazinyl)-5-methyl-12(H)-quino[3,4-b][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl) were used to prepare and compare a range of liposomal delivery systems based on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Liposome-assisted drug release was examined using the spectrophotometric method. In order to provide in vitro release characteristics of liposomal conjugates ($L_{DPPC}/drug$ vs. $L_{DPPC}/drug/drug$) as well as to evaluate the impact of temperature and pH buffering on the conformation/polarity of the phospholipid bilayer, the encapsulation efficiency of the liposomes entrapping 9-PBThACl and DOX was calculated. In fact, some competition between the investigated molecules was noticed during the entrapment process because relatively high values of the encapsulation efficiency were observed only for the liposomal complexes containing one trapped drug molecule. An averaged absorbance value enabled us to indicate the pH value of the environment ($pH \approx 6.8$), at which the physicochemical property profiles of the liposomal complexes were noticeably changed. Moreover, the operational factors limiting the drug release kinetics from the produced liposomes were mathematically modeled. First-order and Bhaskas models ensured satisfactory compliance with the experimental data for the liposomal complexes buffered at pH values of 5.50, 6.00, and 7.40, respectively.

Keywords: nanocarriers; liposomal delivery systems; encapsulation efficiency; drug release profile



Citation: Kozik, V.; Pentak, D.; Paździor, M.; Zięba, A.; Bąk, A. From Design to Study of Liposome-Driven Drug Release Part 1: Impact of Temperature and pH on Environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11686. <https://doi.org/10.3390/ijms241411686>

Academic Editor: Carla Matos

Received: 16 June 2023

Revised: 14 July 2023

Accepted: 18 July 2023

Published: 20 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The development of innovative delivery systems based on biomaterials and nanotechnology might enhance not only a drug's stability and bioavailability but also diminish the toxicity of the potential pharmaceutical agent. Hence, an intensively growing interest has been observed recently in targeted therapy using nanoparticles as carriers of active substances that facilitate drug transport from the place of administration to the site of action [1]. One of the most commonly used nanoscale carriers for the targeted delivery of drugs are liposomes—artificially structured spherical vesicles composed of a phospholipid bilayer enclosing an aqueous solution [2–5]. It seems that the potential penetration of liposome-encapsulated anti-cancer substances into the surrounding tissues results from the fact that the endothelium of tumor blood vessels and healthy cells varies notably [6]. The injection of the drug-containing liposome allows for a decrease in the dose of the active substance and a reduction in the frequency of administration, limiting the overall drug toxicity while preserving the desired ADMET-like properties. In other words, the drug's biodistribution (pharmacokinetics and pharmacodynamics) can be improved noticeably since the liposomal form of the drug stays longer in the bloodstream [7]. Overall, recent years have witnessed the application of liposomes as nanocarriers for anti-viral, anti-fungal, anti-diabetic, and anti-cancer agents, enhancing their pharmaceutical effectiveness [8–11].

It should be highlighted that the entrapment of medicines can also be conducted using other nanocarriers. For instance, exosomes and niosomes are the nanostructured media that are used in the transportation of chemotherapeutics [12] and sometimes compose hybrid structures with liposomes to facilitate the distribution of hydrophobic substances [13]. Moreover, derivatives of graphene oxide were also proposed to embed nanoparticles in potential drug delivery systems [14].

Regardless of the administration route, pharmaceutical availability is a significant factor defining the phase of the active component release from the drug molecule. In technological practice, the release study has become indispensable to assess a drug's quality at the early stages of formulation preparation [15]. In order to prove the reproducibility of the manufacturing operations and the steady composition of each bunch of the final product, the drug release evaluation has to be investigated meticulously, especially after a drug's registration. Moreover, the operational parameters of a drug's production can be controlled systematically. A comprehensive analysis of the release profile might provide valuable hints in cases where a drug's properties are unexpectedly changed, whereas other methods might prove inefficient.

In practice, a release study can be conducted using the one-point and multi-spot tests, respectively. In the one-point approach, the quantity of the released substance (Q) is compared to the volume of the acceptor liquid as a function of time; the resulting ratio is referred to as the previously specified acceptance criteria. In the multi-point test, the variations of the released substance are recorded at a few or even numerous time spots. Armed with such data, the drug release profiles might be established in the form of curves presenting the changes of the released substance as a function of time. Not surprisingly, in-depth drug release profiling should be routinely performed at the early stages of drug R&D activities since the multi-point examination is more precise compared to the single-spot test.

In the presented study, the marketed drug Doxorubicin (DOX) and the promising anti-cancer agent 9-(*N*-piperaziny)-5-methyl-12(*H*)-quino[3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl) were utilized to prepare a range of liposomal complexes ($L_{DPPC}/drug$ vs. $L_{DPPC}/drug/drug$). In fact, the anti-cancer potential of neuroleptic phenothiazines containing alkylaminoalkyl substituents at the thiazine nitrogen atom has been reported previously [16]. It seems that the anti-proliferative activity of 9-PBThACl reagents stems from an interaction between such structural motifs and enzymes involved in inducing apoptosis, as well as from DNA intercalating properties that induce its fragmentation in cancer cells. Similarly, to the action exerted by the anthracycline antibiotics, the planar structural fragments of the analyzed quinobenzothiazine salts can ease intercalation into the DNA helix. The stability of the DNA-drug complex can be enhanced by the existence of an intercalating factor (a substitute capable of forming hydrogen bonds with purine and pyrimidine bases) that raises the stability of the DNA-drug conjugate, resulting in inhibited cell proliferation. In this context, the experimental and theoretical findings of the drug release modeling using six selected mathematical models implemented to describe the release profiles of a new, biologically tested 9-PBThACl molecule and doxorubicin appear valid. Overall, the obtained data proved the immense contribution of the pH buffer in the environment to the physicochemical profiles of the prepared liposomal conjugates. In fact, the pH value of the environment was specified, at which the physicochemical property profiles of the liposomal complexes were noticeably changed. It was also demonstrated that the rise in temperature resulting in the increment of the phospholipid bilayer fluidity can damage the membrane hydrogen bonds accordingly. Moreover, some competition between the investigated molecules was noticed during the entrapment process because relatively high values of the encapsulation efficiency were recorded only for the liposomal complexes containing one trapped drug molecule. Additionally, the operational factors that limit the rate of drug release from the produced liposomes were modeled mathematically.

2. Results and Discussion

Nanoparticle tracking analysis (NTA) is the method commonly used for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples in suspension in the range from 10 to 1000 nm based on the analysis of Brownian motion [17–19]. Hence, the critical evaluation of $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$, and $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ liposomes was performed using the NTA methodology in order to specify the size distribution of the investigated liposomal complexes as potential drug carriers. A limited number of huge liposomal aggregates (size > 300 nm) does not affect the average size distribution of the analyzed complexes, as shown in Figure 1.

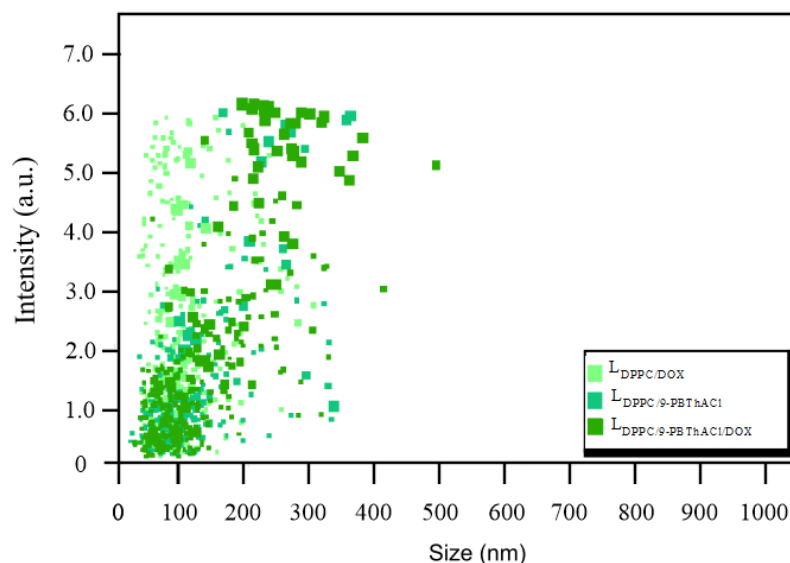


Figure 1. Size distribution in $L_{DPPC/DOX}$, $L_{DPPC/9-PBThACl}$, and $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ liposomes.

2.1. Encapsulation Degree Analysis

The examination of the liposomal encapsulation degree of 9-PBThACl and Doxorubicin hydrochloride was conducted using the spectrophotometric methodology for systems with a surrounding pH changing from 5.50 to 7.40. The absorbance measurements were performed at 488 nm for 9-PBThACl and at 233 nm for DOX, respectively. The standard curves of the absorbance against the concentration were plotted for the examined drugs. Consequently, the concentration of the nano-encapsulated drug was specified in the supernatant. The encapsulation efficiency (EE%) of the liposomes entrapping 9-PBThACl and DOX was calculated as the mass ratio between the amount of the drug incorporated in the liposomes and the ratio used in the liposome preparation according to Equation (1). Tables 1 and 2 report the encapsulation efficiencies of 9-PBThACl and DOX in the liposomes, respectively.

Table 1. Percentage of 9-PBThACl and DOX encapsulation in liposomes $L_{DPPC/9-PBThACl}$ and $L_{DPPC/DOX}$ for different pH values.

pH	Encapsulation Efficiency ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl in $L_{DPPC/9-PBThACl}$	DOX in $L_{DPPC/DOX}$
5.50	100.00 $\pm$ 0.00	76.06 $\pm$ 1.92
6.00	81.28 $\pm$ 2.43	92.74 $\pm$ 2.20
6.50	74.69 $\pm$ 1.96	95.50 $\pm$ 2.35
7.40	91.96 $\pm$ 2.15	100.00 $\pm$ 0.00

^a Standard deviation.

Table 2. Percentage of 9-PBThACl and DOX encapsulation in liposomes L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX for different pH values.

pH	Encapsulation Efficiency ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl in L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX	DOX in L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX
5.50	75.96 $\pm$ 3.11	69.55 $\pm$ 3.40
6.00	53.00 $\pm$ 2.80	77.37 $\pm$ 3.79
6.50	22.16 $\pm$ 1.17	40.37 $\pm$ 1.97
7.40	44.88 $\pm$ 2.37	52.48 $\pm$ 2.57

^a Standard deviation.

The drug loading (DL%) was calculated for different liposomal systems according to Equation (2) for the pH values of 5.50, 6.00, 6.50, and 7.40, as shown in Tables 3 and 4.

Table 3. Drug loading (DL%) of 9-PBThACl and DOX encapsulation in liposomes L_{DPPC}/9-PBThACl and L_{DPPC}/DOX for different pH values.

pH	Drug Loading ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl in L _{DPPC} /9-PBThACl	DOX in L _{DPPC} /DOX
5.50	6.53 $\pm$ 0.35	6.56 $\pm$ 0.39
6.00	6.50 $\pm$ 0.33	6.58 $\pm$ 0.34
6.50	6.49 $\pm$ 0.33	6.59 $\pm$ 0.32
7.40	6.51 $\pm$ 0.28	6.60 $\pm$ 0.44

^a Standard deviation.**Table 4.** Drug loading (DL%) of 9-PBThACl and DOX encapsulation in liposomes L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX for different pH values.

pH	Drug Loading ($\pm$ std) ^a [%]	
	9-PBThACl in L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX	DOX in L _{DPPC} /9-PBThACl/DOX
5.50	6.58 $\pm$ 0.36	6.57 $\pm$ 0.39
6.00	6.55 $\pm$ 0.38	6.59 $\pm$ 0.46
6.50	6.49 $\pm$ 0.31	6.52 $\pm$ 0.32
7.40	6.53 $\pm$ 0.37	6.54 $\pm$ 0.39

^a Standard deviation.

The presented findings confirmed the impact of buffer pH on the encapsulation degree of the investigated molecules.

2.2. Stability of Liposomal Preparations

The evaluation of physical and chemical stability is the principal research objective in the investigation of novel potential carriers for therapeutic compounds. The provided data form the basis for defining the conditions of technological conduct, the specification of auxiliary agents in the development of drug formulations, and the selection of their storage conditions. The durability of medicinal substances themselves and their transport structures are directly dependent on physicochemical factors [20]. The 5 week time period was chosen to analyze the stability of the prepared liposomal aggregates, during which the samples were stored at a temperature of 4 °C. The weekly recorded drug release rates (*R*%) calculated according to Equations (3) and (4) for varied liposomal systems are illustrated in Figure 2(A1–D2).

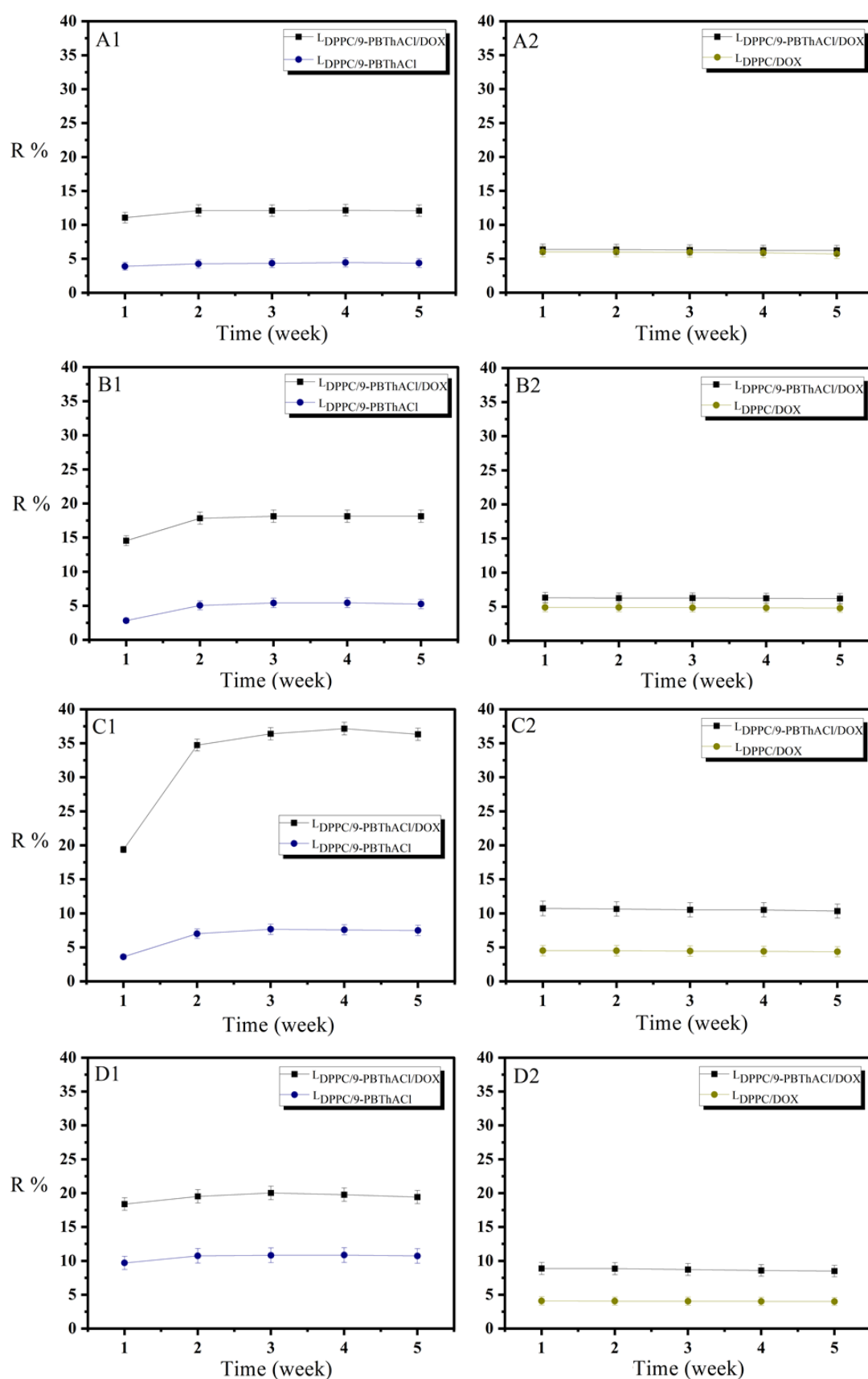


Figure 2. Drug release (R%) profiles of 9-PBThACl and DOX from DPPC/drug/drug and DPPC/drug complexes for different pH values: ((A1,A2): pH = 5.50); ((B1,B2): pH = 6.00); ((C1,C2): pH = 6.50); and ((D1,D2): pH = 7.40).

The greatest variations in the degree of the analyzed drug release were observed at a pH level of 6.5 for the liposomal complexes $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ vs. $L_{DPPC/9-PBThACl}$ and $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ vs. $L_{DPPC/DOX}$, reaching an average of ~28–30% for 9-PBThACl and ~5% for DOX, respectively. For the same pH value in the environment, the percentage of DOX and 9-PBThACl encapsulation in the liposomal $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$ conjugate is also smaller (see Table 2), gaining 22.16% for 9-PBThACl and 40.37% for DOX. According to our previous findings, the release percentage of the liposome-encapsulated drugs depends on both the surrounding pH and the entrapment site in the nanocarriers [5]. In general, the hydrophilic compounds are located in the central, buffered zone of the liposomes, while the hydrophobic ones are incorporated in the phospholipid bilayer [21]. Consequently, the drug arrangement itself within the liposome structure determines the degree of its release. As a matter of fact, the molecules entrapped in the hydrophilic zone of the liposomes need to penetrate the phospholipid bilayer; therefore, the liposomal membrane has to be in the liquid (crystalline) phase, which is disordered and leaky [22]. The fluidity of the bilayer is related to many factors [23], primarily: (i) the character and value of the electrostatic charges of phospholipid ‘heads’ composing the liposomal structure; (ii) the length of fatty acid chains that are present in phospholipids; (iii) the number of unsaturated bonds in phospholipids; and (iv) the concentration of cholesterol and protein molecules. Due to the lack of covalent bonds, the liposomal bilayer is not a stiff structure. In fact, twofold interactions between the membrane building blocks are observed that outline the surface (polar) area as well as the inner (hydrophobic) zone, which is characterized mainly by dispersion interactions.

The accidental fluctuation of the electron density can occur in molecules without a permanent dipole moment, resulting in the appearance of the instantaneous dipole moment despite the lack of noticeable bond polarizations. The emerging force field surrounding a molecule can induce the polarization of the neighboring molecule with the generation of another dipole moment. The above phenomenon may happen within the entire bilayer simultaneously between the interacting molecules. It is believed that dispersion forces decrease the energy of the system thanks to the correlated fluctuations of charge distributions in the proximal molecules. The power of dispersion interactions reaches the maximal values for molecules that are set parallel to each other; therefore, Van der Waals forces strive towards the parallel arrangement of hydrocarbon chains—the closer the better, since the dispersion energy is inversely proportional to the distance r between the interacting molecules (r^{-6}). In addition, the density of phospholipid packing depends on the proportion between the ‘head’ size and the remaining hydrophobic part of the molecule [24]. The hydrophilic areas of the phospholipid bilayer constitute the polar lipids, interacting as ion-ion, ion-dipole, dipole-dipole, or hydrogen bonds (HB). Moreover, the interface boundary with the absorbed water molecules (called the structural water) is also a significant component of the phospholipid bilayer [25], particularly for glycolipids that form the energetic barrier for transporting the hydrophobic molecules. Due to the strong ionization of the bilayer, other ions and ionized molecules present in solution are adsorbed on the membrane surface, particularly those not transported through the lipid boundary. The strong adsorption properties of the multivalent ions play a valid role in organizing polar (particularly ionized) parts of phospholipids situated on the membrane interface (called phospholipid ‘head’ cross-linking). Doxorubicin, as well as 9-PBThACl, are hydrophilic molecules. It seems that DOX is probably bonded with the polar bilayer via relatively weak interactions. The resulting disorganization of the membrane polar area facilitates the release of 9-PBThACl molecules that are localized in the central hydrophilic part of the liposome (see Figure 3). Each modification of the bilayer structure involving the introduction of another membrane component (even localized on the surface) directly effects the process of drug release [26]. Undoubtedly, the surface area of the bilayer is increased, resulting in changes in the membrane’s physicochemical properties.

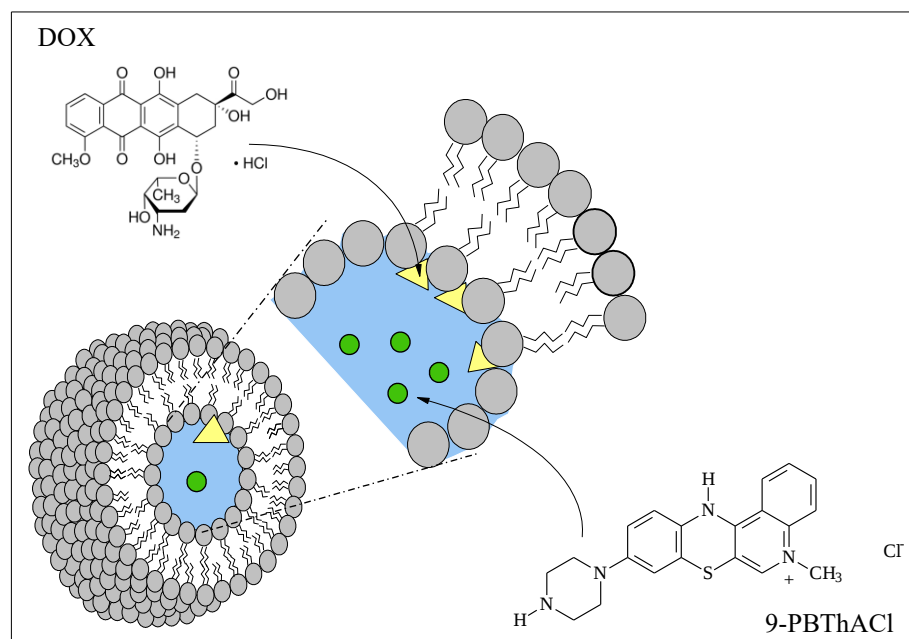


Figure 3. Liposomal location of 9-PBThACl and DOX.

2.3. Influence of Surrounding pH on Drug Release–Spectrophotometric Analysis

The preparatory procedures of liposomal systems were conducted so as to maintain the constant ratio of the analyzed compounds to phospholipid, amounting to 30:1:1 for $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$; and 30:1 for $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}$; 30:1 for L_{DPPC}/DOX , respectively. The detailed analyses of the absorption spectra obtained for $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$, $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}$, and L_{DPPC}/DOX allowed us to evaluate the changes appearing in the liposomal complex with two molecules in tandem ($L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$), as shown in Figures 4 and 5. The following assumptions were made:

- $A = 0$, if subtracting the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ spectrum from the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}$ or subtracting the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ spectrum from the L_{DPPC}/DOX yields zero absorbance, that means there are no interactions between the analyzed compounds;
- $\Delta A \neq 0$, if subtracting the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ spectrum from $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}$ or subtracting the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ spectrum from L_{DPPC}/DOX produces non-zero absorbance that suggests interactions within the investigated complex;
- $\Delta A > 0$ and $\Delta A < 0$ are particularly relevant because:
 - $\Delta A > 0$, when the absorbance of molecule X in tandem is higher than the absorbance of X alone, is regarded as a reference value. Then, the growth of absorbance is the result of the increased release degree of molecule X influenced by the presence of compound Y in the binary system;
 - $\Delta A < 0$, when the absorbance of molecule X in the binary complex is lower compared to the corresponding A value observed for the singular complex treated as a reference. In this case, the absorbance decrease results from the reduced release degree of X affected by the appearance of molecule Y in tandem.

Agreed assumptions explain the competitive effect, while 9-PBThACl is incorporated and then released from the phospholipid nanocarriers.

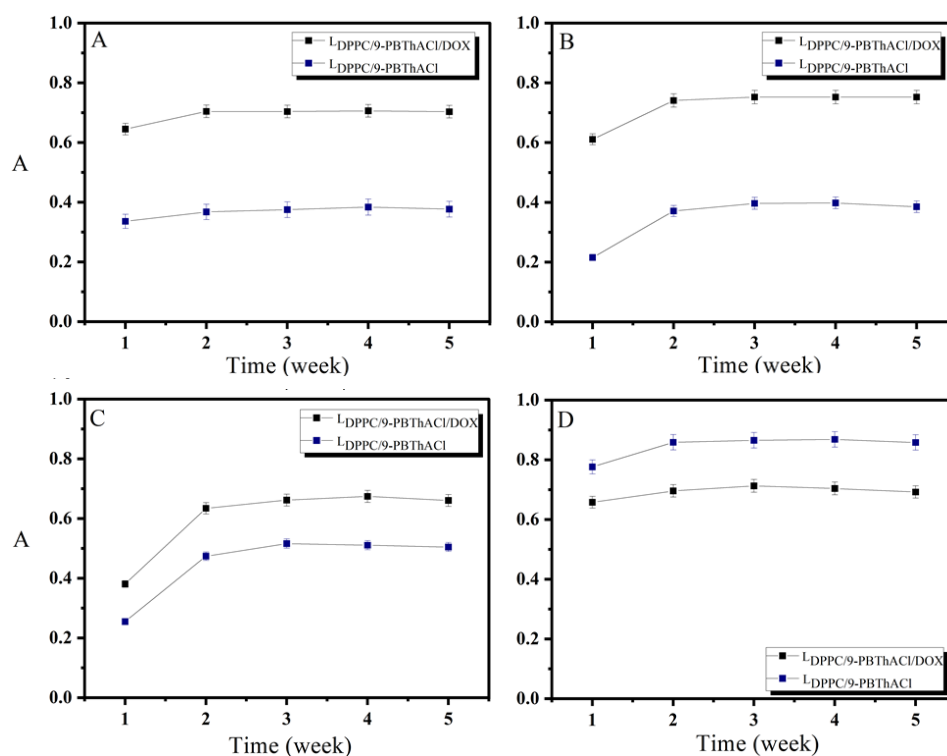


Figure 4. Impact of 5 week incubation of liposomal complexes: L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX and L_{DPPC}/9-PBThACI on absorbance A ($A_{\lambda_{\max} \text{ 9-PBThACI}} = 488 \text{ nm}$); ((A): pH = 5.50), ((B): pH = 6.00), ((C): pH = 6.50), and ((D): pH = 7.40).

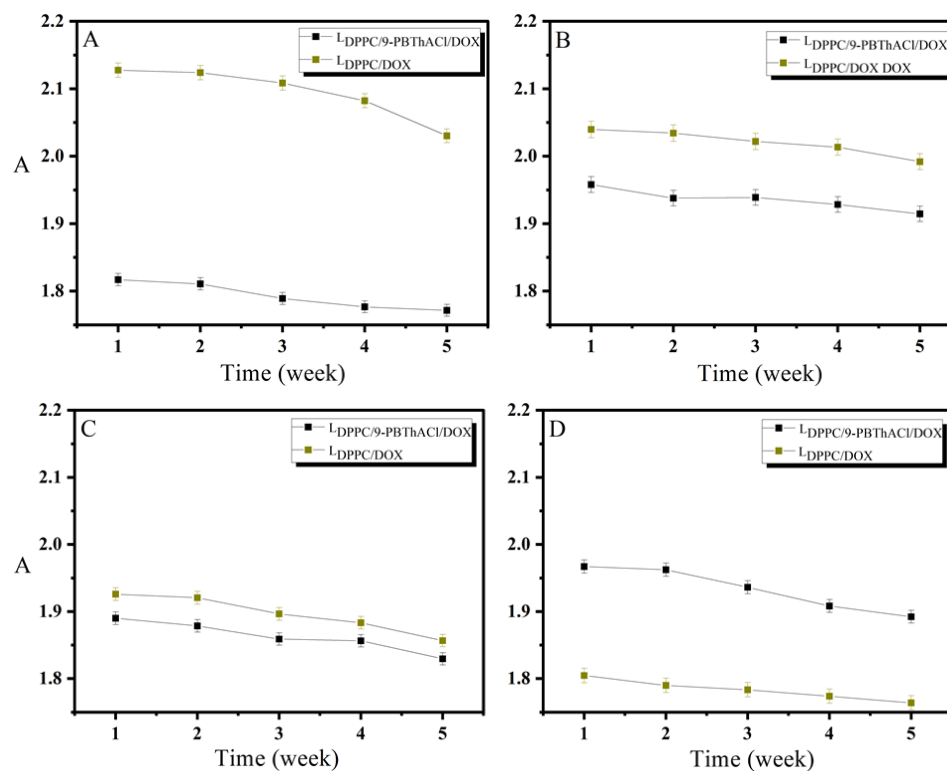


Figure 5. Impact of 5 week incubation of liposomal complexes: L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX and L_{DPPC}/DOX on absorbance A ($A_{\lambda_{\max} \text{ DOX}} = 233 \text{ nm}$); ((A): pH = 5.50), ((B): pH = 6.00), ((C): pH = 6.50), and ((D): pH = 7.40).

According to our previous findings, the fluidity of the phospholipid bilayer increases with the rise of the surrounding pH [27]. The hydrogen bonds are probably formed between the oxygen atom of the phosphate group in phospholipids and the hydrogen atom of the hydroxyl group present in the proximal DPPC molecule. If the pH of the environment goes beyond the value of 7.40, then the hydrogen bonds existing in the acidic environment are broken down. As a consequence, an increment in the bilayer fluidity is observed. Stiffened so far with the hydrogen bonds, the polar phospholipid ‘heads’ begin to move, imparting the characteristic fluidity of the membrane. In the investigated range of pH values (from 5.50 to 7.40), the noticeable adjustment of the membrane fluidity directly affects the process of drug release for the analyzed set of compounds. Mathematical fitting of a function to an average score of the absorbance recorded in the subsequent weeks of the liposome incubation, which differs from the pH value (see Figure 6), is comparable with the curve illustrating the impact of pH on the value of the N parameter obtained via the analysis of the phospholipid membrane using EPR spectroscopy [5,28]. Compared to pH = 7.40, the fluidity of the phospholipid bilayer is lower in the range of pH 5.50–6.50. It appears that the perpendicular movement of 9-PBThACl towards the membrane surface along the aliphatic phospholipid chains is feasible thanks to the evolving packing of phospholipids as well as the growing relaxation of the bilayer associated with the increasing pH of the surroundings. A similar mobility of 5-DOXYL spin labels was reported in our previous findings [27]. Moreover, the presence of DOX in the bilayer can directly affect the penetration of 9-PBThACl into the surrounding tissues—depending on the pH of the environment; it may strengthen or weaken the process of 9-PBThACl release accordingly. Possibly, DOX is partly immobilized in the hydrophilic zone of the bilayer using the hydrogen bonds formed with DPPC molecules. As a consequence of such a location, the compact structure of the bilayer is noticeably disturbed, which facilitates the permeation of the membrane via the unbonded 9-PBThACl molecules. The recorded inversions of 9-PBThACl and DOX release characteristics manifest at the potential pH cut-off value (pH $\approx$ 6.8), as illustrated in Figures 6A and 6B, respectively.

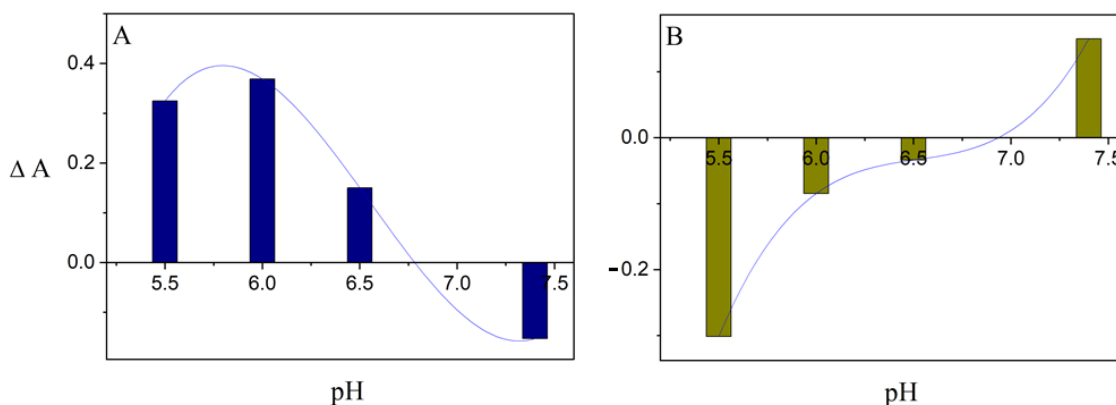


Figure 6. Effect of surrounding pH on averaged value of absorbance ΔA ((A): $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX} - L_{DPPC/9-PBThACl}$, $A_{\lambda_{max}} = 488$ nm) and ((B): $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX} - L_{DPPC/DOX}$, $A_{\lambda_{max}} = 233$ nm).

2.4. In Vitro Drug Release Examination

Pharmaceutical availability is the quantity of an active component released from a pharmaceutical formulation and dissolved in the surrounding body fluid that is measured under laboratory conditions [29]. Briefly speaking, pharmaceutical availability might be equated with the rate of the drug release process that specifies the parameter characterizing the first stage in the system of drug transformation in the body (LADME). Numerically, the value is calculated as the percentage or ratio of the drug dose that is dissolved in the received fluid as a function of time; however, only the free fraction of the therapeutic compound is absorbed, exerting the corresponding pharmacological effect. Hence, the drug's active substance must be released from the structure of the drug (its form) in a timely

manner. Accordingly, the appropriate drug formulation needs to be constructed a priori. Obviously, the form of the drug and the method of administration primarily govern the rate and degree of active ingredient release. Moreover, the procedure of medicine preparation and the excipients applied are crucial for the release process; therefore, the search for new alternative forms of drug transport seems valid.

According to the FDA guidelines, two basic approaches were proposed for dissolution testing of immediate drug release: the independent and the model-related ones which were successfully implemented in the statistical analysis of the medicine leakage [30]. It should be emphasized that a range of statistical methodologies can be proposed for the quantitative modeling of drug release from controlled delivery systems [31–34]; however, the first and most widespread one is the concept of similarity and difference factors. Moreover, the mathematical testing and comparison of dissolution profiles can be based on multidimensional (mD) data space analyses [31]. Actually, the FDA guidelines do not recommend the specific modeling procedure, but rather the general objectives are provided to be met as follows: (i) the acceptance criterion should be designated so that it is comparable with the data variance calculated for the reference sample and suitable for distance multidimensional specification; (ii) the multidimensional distance between the averaged values of the subsequent time points for the reference as well as the test data should be calculated; (iii) the 90% confidence level should be determined for the multidimensional distance; and (iv) the calculated limit should be compared with the acceptance criterion. If the upper limit of the confidence interval is smaller or equal to the acceptance criterion, the similarity between the two profiles is statistically confirmed. The third group of methods suggested by the FDA for the comparison of in vitro dissolution profiles are model-dependent procedures, where the shape of the profile is specified using a theoretical curve [35]. At least a few such functions are recommended for fitting the experimental data; however, a continuous Weibull probability distribution is commonly applied.

In practice, six mathematical models were used, including First-order, Bhaskas, Higuchi, Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model (see Equations (5)–(10)) in order to explain the process of releasing encapsulated compounds from liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine as the main component of the membrane [32,36]. The release rate studies were carried out at 37 °C and 41 °C, as shown in Figures 7 and 8, respectively.

As a matter of fact, the presented data confirm the tendency reported previously in the literature, where the direct impact of surrounding pH and temperature on the drug release profiles from liposomes was observed [37]. Overall, a wide range of aspects related to the drug's in vivo spreading are implemented in the mathematical models, calculated according to Equations (5)–(10). A comprehensive review, including the systematic analysis of different drug release systems in terms of mechanisms that limit the transport of the active component, can be found elsewhere [33,38]. Accordingly, the drug release systems are controlled by diffusion (within the material or through the membrane), degradation of a carrier, material bulking, as well as environmental factors, e.g., pH and temperature variations. Nevertheless, the extensive list of operational parameters that should be taken into account during the search for clarification of the drug release mechanisms is definitely longer [33].

It was revealed that the course of profiles obtained at a temperature of 37 °C and the surrounding pH equal to 5.50, 6.00, and 7.40 were approximated exponentially, as reported in Table 5. Conversely, at pH = 6.5, the drug release process was estimated via linear dependency since 3 out of 5 models (Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model) were characterized by $R^2_{\text{adj}} = 1$. An extension of the classical Freundlich model was applied for decreasing functions at a temperature of 41 °C (see Table 5). Undoubtedly, the rise of the temperature to the point of the main DPCC phase transition [39] destabilizes the investigated liposomal systems [40]. It seems that the surrounding pH can directly alter the thermal characteristics of liposome-encapsulated drug complexes.

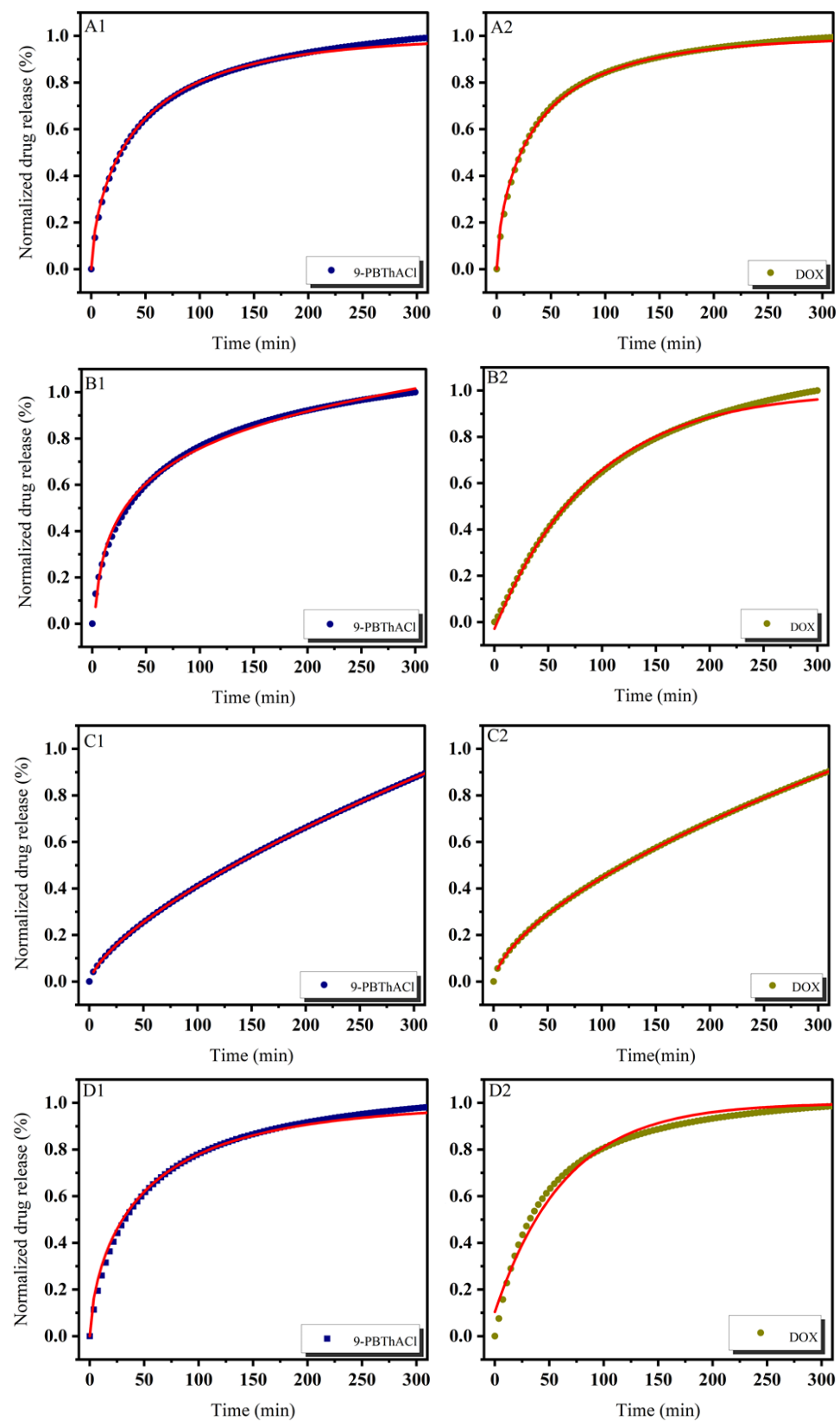


Figure 7. Release kinetics of 9-PBThACl and DOX from $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ liposomes. Red lines correspond to the fits of the best mathematical models; ((A1): pH = 5.50, 9-PBThACl, (A2): pH = 5.50, DOX); ((B1): pH = 6.00, 9-PBThACl, (B2): pH = 6.00, DOX); ((C1): pH = 6.50, 9-PBThACl, (C2): pH = 6.50, DOX); and ((D1): pH = 7.40, 9-PBThACl, (D2): pH = 7.40, DOX). Measurement temperature: 37 °C.

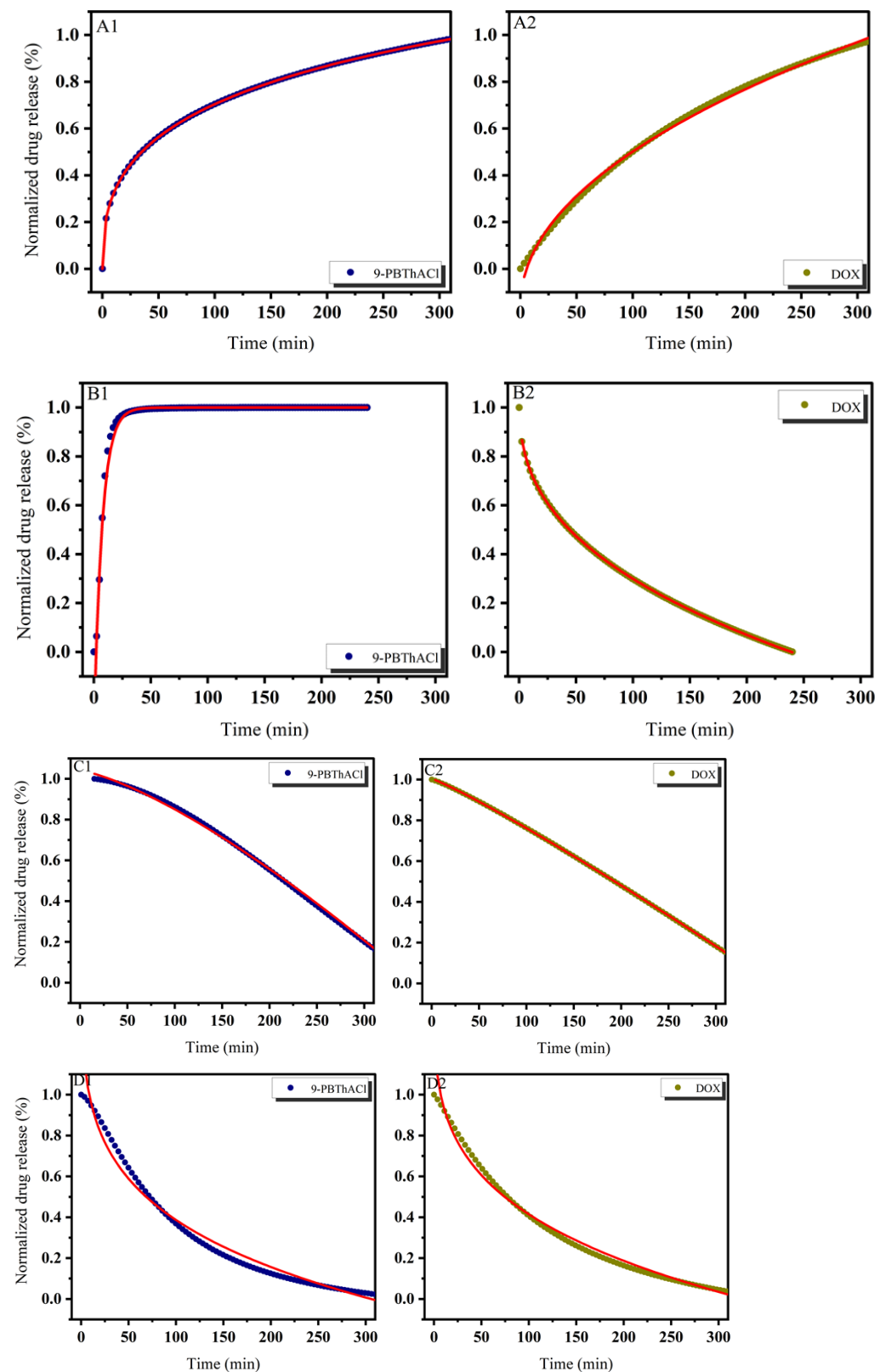


Figure 8. Release kinetics of 9-PBThACl and DOX from the $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}$ liposomes. Red lines correspond to the fits of the best mathematical models; ((A1): pH = 5.50, 9-PBThACl, (A2): pH = 5.50, DOX); ((B1): pH = 6.00, 9-PBThACl, (B2): pH = 6.00, DOX); ((C1): pH = 6.50, 9-PBThACl, (C2): pH 6.50, DOX); and ((D1): pH = 7.40, 9-PBThACl, (D2): pH = 7.40, DOX). Measurement temperature: 41 °C.

Table 5. Fitting parameters of 9-PBThACI/DOX release profiles from L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX liposomes in different kinetic models.

Liposome/pH/Temperature	Parameter	Mathematical Model					
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger–Peppas	Korsmeyer–Peppas	An Extension of Classical Freundlich
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 5.50/37 °C	<i>SUM</i>	0.09768	0.01645	0.7792	0.22736	0.1598	0.02245
	α	−14.30834	-2.28817×10^{-21}	−54.74838	-3.03185×10^{-58}	-	−46.93909
	<i>k</i>	0.01437	0.02123	0.05671	0.16944	0.21694	46.80077
	<i>n</i>	-	-	-	0.31929	0.27201	0.00423
	<i>R</i> ² _{adj}	0.9761	0.99598	0.80932	0.94379	0.95318	0.99335
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 5.50/37 °C	<i>SUM</i>	0.10566	0.01004	1.00753	0.31503	0.23156	0.06046
	α	−11.05408	-1.04804×10^{-25}	−76.85931	-1.46195×10^{-63}	-	−86.40557
	<i>k</i>	0.01762	0.0256	0.05546	0.2016	0.26034	86.34303
	<i>n</i>	-	-	-	0.2908	0.24169	0.00219
	<i>R</i> ² _{adj}	0.97222	0.99736	0.73512	0.91632	0.92501	0.98022
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 5.50/41 °C	<i>SUM</i>	0.10557	1.04336×10^{-5}	0.28586	0.00804	0.0046	3.32134×10^{-4}
	α	−30.26692	-2.76888×10^{-45}	−39.67538	0	-	−0.17533
	<i>k</i>	0.00943	0.00113	0.0553	0.15838	0.16794	0.2838
	<i>n</i>	-	-	-	0.32099	0.30935	0.24546
	<i>R</i> ² _{adj}	0.97304	1	0.92699	0.99793	0.99862	0.9999
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 5.50/41 °C	<i>SUM</i>	0.09994	12.63109	0.24028	0.06956	0.05424	0.01785
	α	6.45432	99.70089	-2.72015×10^{-30}	-4.30809×10^{-20}	-	−0.16234
	<i>k</i>	0.00787	0.00303	0.05381	0.02193	0.02717	0.07086
	<i>n</i>	-	-	-	0.66833	0.62859	0.48583
	<i>R</i> ² _{adj}	0.98759	−1.01957	0.96875	0.99086	0.99255	0.99752
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 6.00/37 °C	<i>SUM</i>	0.07351	0.04538	0.50871	0.13905	0.09315	0.01249
	α	−14.76861	-9.77786×10^{-23}	−29.382	-1.5672×10^{-51}	-	−2.03081
	<i>k</i>	0.01295	0.01863	0.06062	0.13742	0.17135	1.92341
	<i>n</i>	-	-	-	0.35925	0.31646	0.08062
	<i>R</i> ² _{adj}	0.9837	0.98994	0.88722	0.96885	0.97606	0.99676
L _{DPPC} /9-PBThACI/DOX/pH = 6.00/37 °C	<i>SUM</i>	0.02046	15.00534	0.19185	0.25043	0.19051	0.06212
	α	2.65348	66.33091	-1.9847×10^{-74}	-9.43837×10^{-47}	-	−0.55753
	<i>k</i>	0.01098	0.00333	0.06135	0.04166	0.05845	0.34815
	<i>n</i>	-	-	-	0.57367	0.50928	0.26691
	<i>R</i> ² _{adj}	0.99734	−1.31761	0.97394	0.96563	0.97226	0.99086

Table 5. Cont.

Liposome/pH/Temperature	Parameter	Mathematical Model					
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger–Peppas	Korsmeyer–Peppas	An Extension of Classical Freundlich
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.00/41 °C	SUM	0.10728	0.24733	2.08466	1.08316	0.90119	0.80717
	α	1.90302	-3.24117×10^{-25}	-355.64372	$-4.64015 \times 10^{-143}$	-	-319.12996
	k	0.13825	0.1281	0.0441	0.488	0.628	319.65566
	n	-	-	-	0.14817	0.09537	3.0701×10^{-4}
	R^2_{adj}	0.99338	0.90206	0.17448	0.56665	0.43852	0.49186
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.00/41 °C	SUM	5.07434	5.07439	nd	5.07434	1.19337	1.27488×10^{-4}
	α	-4.86652×10^8	-1.0214×10^7	nd	240	-	1.04237
	k	7.10265×10^{-10}	1.90998×10^{-8}	nd	0.29225	1.80173	-0.12465
	n	-	-	nd	0	-0.41917	0.38784
	R^2_{adj}	-0.0102	-0.01021	nd	-0.02062	0.73608	0.99997
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.50/37 °C	SUM	0.1921	10.75796	0.312	2.37342×10^{-5}	1.82411×10^{-5}	4.86778×10^{-6}
	α	4.41383	133.02569	-4.8194×10^{-31}	-1.0694×10^{-21}	-	-0.00239
	k	0.00604	0.00274	0.0479	0.01719	0.01727	0.01764
	n	-	-	-	0.68889	0.68804	0.68482
	R^2_{adj}	0.97323	-1.06641	0.95627	1	1	1
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.50/37 °C	SUM	0.14777	11.1602	0.15261	2.81027×10^{-5}	2.09504×10^{-5}	4.88823×10^{-6}
	α	-2.19742	119.99359	-4.16627×10^{-33}	-5.2606×10^{-34}	-	-0.00298
	k	0.00622	0.00274	0.04934	0.02504	0.02517	0.02576
	n	-	-	-	0.62515	0.62425	0.62073
	R^2_{adj}	0.97804	-1.20486	0.97732	1	1	1
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.50/41 °C	SUM	88.89513	2.78547	nd ^a	9.81841	3.59485	0.01069
	α	215.14679	215.14679	nd ^a	360	-	1.03922
	k	0.0029	0.0029	nd ^a	0.56596	4.64382	-3.82332×10^{-4}
	n	-	-	nd ^a	0	-0.42724	1.34741
	R^2_{adj}	-3.23449	-3.3079	nd ^a	-0.02062	0.63013	0.99889
L _{DP} PC/9-PBThACI/DOX/pH = 6.50/41 °C	SUM	73.9963	3.1289	nd ^a	8.85841	3.63358	7.95487×10^{-5}
	α	192.9854	192.9854	nd ^a	360	-	1.00365
	k	0.00278	0.00278	nd ^a	0.52694	2.34809	-0.00145
	n	-	-	nd ^a	0	-0.31106	1.11092
	R^2_{adj}	-3.08807	-3.15495	nd ^a	-0.02062	0.57474	0.99999

Table 5. Cont.

Liposome/pH/Temperature	Parameter	Mathematical Model					
		First-Order	Bhaskas	Higuchi	Ritger–Peppas	Korsmeyer–Peppas	An Extension of Classical Freundlich
L _{DPPC/9-PBThACI/DOX} /pH = 7.40/37 °C	SUM	0.0804	0.03148	0.8249	0.30075	0.20141	0.03443
	α	−12.44505	$−1.50318 \times 10^{-24}$	−51.82758	$−7.55056 \times 10^{-55}$	-	−52.33001
	k	0.01354	0.01893	0.05517	0.14695	0.20033	52.13487
	n	-	-	-	0.34074	0.28255	0.00395
	R^2_{adj}	0.98154	0.99277	0.81061	0.93024	0.94535	0.99056
L _{DPPC/9-PBThACI/DOX} /pH = 7.40/37 °C	SUM	0.06641	0.07169	1.05337	0.41812	0.32759	0.08237
	α	−7.00963	$−1.23382 \times 10^{-22}$	−51.66095	$−1.25531 \times 10^{-54}$	-	−87.36594
	k	0.01557	0.01986	0.05589	0.15435	0.20567	87.15269
	n	-	-	-	0.33397	0.28004	0.00244
	R^2_{adj}	0.9856	0.98445	0.77157	0.9084	0.91651	0.97879
L _{DPPC/9-PBThACI/DOX} /pH = 7.40/41 °C	SUM	7.99984	7.99987	nd ^a	7.99983	14.61952	0.152
	α	$−2.11684 \times 10^8$	$−1.89848 \times 10^7$	nd ^a	352.61138	-	2.03435
	k	1.52592×10^{-9}	9.25849×10^{-9}	nd ^a	0.27604	−46673.80267	−0.69103
	n	-	-	nd ^a	0	−2095.26681	0.18869
	R^2_{adj}	−0.0102	−0.01021	nd ^a	−0.02062	−0.97716	0.97923
L _{DPPC/9-PBThACI/DOX} /pH = 7.40/41 °C	SUM	7.38557	7.38562	nd ^a	7.38557	14.93784	0.06705
	α	$−7.15868 \times 10^8$	$−1.80919 \times 10^7$	nd ^a	360	-	1.62692
	k	4.83212×10^{-10}	1.07961×10^{-8}	nd ^a	0.29244	−9.27636 $\times 10^6$	−0.38692
	n	-	-	nd ^a	0	−343663.40104	0.24804
	R^2_{adj}	−0.0102	−0.01021	nd ^a	−0.02062	−1.19362	0.99005

^a nd—non defined.

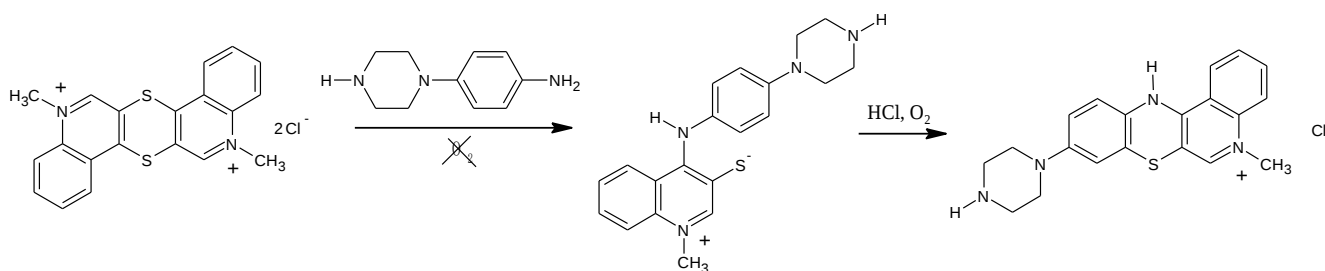
3. Materials and Methods

3.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, $\geq 99\%$), dichloromethane, chloroform, potassium phosphate dibasic ($\geq 98\%$), sodium phosphate monobasic monohydrate ($\geq 98\%$), and Doxorubicin hydrochloride (98.0–102.0% (HPLC)) were purchased from Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany. 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino[3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl) was synthesized at the Department of Organic Chemistry, Medical University of Silesia in Katowice, Poland [16].

3.2. The Synthesis of 9-PBThACl

The proposed method of quinobenzothiazine tetracyclic derivative synthesis relies on the cyclization of betaine systems featuring 1-alkyl-4-(arylamino)quinolinium-3-thiolates structure via nucleophilic substitution of the hydrogen or halogen atom in the phenyl ring by a thiolate-derived sulfur atom. Reactions proceed with high yield even at room temperature. Introducing such substituents or functional groups into the benzene ring permits modification of the quinobenzothiazine system, which is difficult to achieve using other methods of synthesis. The presence of oxygen in the reaction mixture has an impact on the course of the reaction between *bis*-chloride and 4-piperazinylaniline (see Scheme 1). In the presence of a hydrogen chloride donor and atmospheric oxygen, betaines underwent cyclization to appropriate quinobenzothiazine chlorides. It should be highlighted that the compound can also be synthesized directly from *bis*-chloride using adequate amines in a one-pot reaction in the presence of atmospheric oxygen without separating the intermediate product [16]. The synthesized 9-PBThACl compound shows strong anti-proliferative properties that are comparable with DOX and cisplatin.



Scheme 1. Synthesis of 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino[3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride.

3.3. Liposome Preparation

The modified reverse-phase evaporation method (mREV) was employed to prepare the liposomes. The mREV procedure relies on the continuous mixing of specific volumes of suitable phospholipid solutions in excess of organic solvents with water according to the methodology described in detail by Papahadjopoulos [41]. The replacement of the ultrasonic dispersion of the aqueous phase in the organic phase with mechanical dispersion that allows complete conversion of the phospholipids to the liposomes is a modification to the above method. Liposomes (L_{DPPC} ; $L_{DPPC/9-PBThAC}$; and $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$) were prepared by the mREV method using the DPPC:drug molar ratio 30:1 and the DPPC:drug:drug molar ratio 30:1:1. The lipid dispersion at a final lipid concentration of ca. 2.64×10^{-2} M was used. Finally, a total of 0.34 mL of 9-PBThACl and Doxorubicin at a concentration of 5×10^{-3} M were added to the prepared mixture. In order to unify the dimensionality of the analyzed structures, the standard method of homogenization was applied using the Avanti mini extruder with a 100 nm filter.

3.4. Solutions and Sample Preparation

Phosphate-buffered saline (PBS) pH 5.50, 6.00, 6.50, and 7.40 were used for the UV/Vis measurements. All mixtures used in the reactions were prepared in triplicate to allow for statistical analysis.

3.5. The Liposome Size Measurement

Diameters of L_{DPPC}/DOX , $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}$, and $L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/DOX$ liposomes were measured at room temperature with a NanoSight NS300 instrument (NanoSight, Malvern, UK) and subjected to nanoparticle tracking analysis (NTA), yielding size distribution and concentration (particles/mL). The instrument was equipped with a CMOS camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and a 488 nm laser. All experiments were made in triplicate. The software used for capturing and analyzing the data was NTA 3.2 Dev Build 3.2.16.

3.6. Stability Study

The period of 5 weeks was chosen to analyze the stability of the prepared liposomal aggregates, during which the samples were stored at a temperature of 4 °C.

3.7. UV/Vis Measurements

The absorption spectra of free 9-PBThACl, Doxorubicin, and the liposomal form of 9-PBThACl and Doxorubicin were recorded with the Lambda Bio 40 spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), equipped with a PTP-1 Peltier System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) automatic temperature controller. The temperature was maintained at 37 ± 0.1 °C and 41 ± 0.1 °C. All the spectra were recorded after the equilibration of the samples with the automatic temperature controller. The spectral analysis was conducted using UV WinLab Perkin Elmer Software (The Lambda Series).

3.8. Encapsulation Efficiency and Drug Loading

In order to separate the encapsulated drug from its unencapsulated form, the samples were dialyzed immediately after preparing the liposomal forms of 9-PBThACl and DOX ($L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/DOX$). Aliquots (8 mL) of the liposomal form of the analyzed drug dispersion were placed into a Float-A-Lyzer G2 (Spectra/Por) cellulose ester dialysis tubing (Spectra/Por®, 8–10 kilodaltons MWCO, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA), immersed in 50 mL buffer at 4 °C with magnetic stirring at 360 rpm. Then the samples taken from the recipient solution at predetermined times were replaced with the same volumes of fresh buffer and designated spectrophotometrically at 233 nm for the DOX and at 488 nm for the 9-PBThACl ingredient. The standard curve of the drug was used to analyze the concentration of the encapsulated drug by measuring the maximum absorption of the DOX ($\lambda_{\max}$ 233 nm) and of the 9-PBThACl ($\lambda_{\max}$ 488 nm). The encapsulation efficiency (EE%) of 9-PBThACl and DOX entrapped within the liposomes was calculated according to Equation (1) [42,43]:

$$EE\% = \frac{C_{total} - C_{free}}{C_{total}} \times 100. \quad (1)$$

The drug loading (DL%) was calculated based on Equation (2) [44,45]:

$$DL\% = \frac{C_{total} - C_{free}}{C_{total\ lipid}} \times 100, \quad (2)$$

where:

C_{total} —total concentration of the drug;

C_{free} —concentration of free drug in the supernatant;

$C_{total\ lipid}$ —total concentration of lipid.

3.9. Drug Release and Mathematical Modeling Study

The examination of 9-PBThACl and DOX release from liposomes ($L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/DOX$) was performed at 37 °C and at 41 °C for 5 h. Spectrophotometry was used to determine the degree of drug release from liposomes. During the initial 60 min, the measurements were

conducted at 5 min intervals. Afterwards, the measurements were recorded every 15 min. Drug release ($R\%$) was calculated according to Equations (3) and (4) [46]:

$$R(\%) = \frac{([x]_f - [x]_{fo})}{([x]_t \times EE\%)} \times 100, \quad (3)$$

where:

$R(\%)$ —encapsulated drug percentage of leakage;

$[x]_f$ —concentration of leaked drug;

$[x]_{fo}$ —initial concentration of unencapsulated drug;

$EE\%$ —percentage of drug encapsulation.

$$[x]_t = \frac{[x]_{to}}{\beta}, \quad (4)$$

where:

$[x]_{to}$ —is the concentration of total drug in the original liposomes;

β —dilution.

The following mathematical models were implemented in order to theoretically approach the process and degree of drug release from the liposomes [47–49]:

$$\text{First-order : } X = 1 - e^{-k(t-\alpha)}, \quad (5)$$

$$\text{Bhaskas : } X = 1 - e^{-k(t-\alpha)^{0.65}}, \quad (6)$$

$$\text{Higuchi : } X = k(t - \alpha)^{0.5}, \quad (7)$$

$$\text{Ritger-Peppas : } X = k(t - \alpha)^n, \quad (8)$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas : } X = kt^n, \quad (9)$$

$$\text{and an extension of the classical Freundlich model : } X = a + kt^n, \quad (10)$$

where:

X —release percentage $R(\%)$ from the fitting of experimental data to mathematical formulas;

t —release time;

k —kinetic constant;

α —modified parameter;

a —the fit factor;

n —exponent describing the various mechanisms of release.

The value of $n < 0.45$ corresponds to Fick's diffusion, and the square root of the time value is then proportional to the amount of fraction released from the carrier. A process other than Fick's diffusion appears for $0.45 < n < 0.89$, and drug release occurs as a consequence of both the diffusion and controlled mechanisms [50]. Equations 5–10 were evaluated using the residual sum of squares (SUM) and R^2_{adj} values.

3.10. Statistical Analysis

All experiments and measurements were conducted in triplicate, and the data were reported as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The obtained findings were analyzed using OriginPro 8.5.0 SR1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3.11. Weibull Probability Distribution

The Weibull probability distribution used in modeling the release curves was specified according to the following formula:

$$m = m_{\infty} \left[1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^{\beta}} \right], \quad (11)$$

where:

m —release percentage of the active substance in time t ;

m_{∞} —release asymptote ($m_{\infty} = 100\%$);

t_d —parameter defining the time scale of the process;

β —parameter characterizing the shape of the release curve (if $\beta = 1$, the function shows exponential, $\beta < 1$ parabolic, and $\beta > 1$ sigmoidal growth).

It should be emphasized that β parameter stands for the model's adaptability to almost all characteristics of the drug release profiles. Hence, the β parameter is recommended by the FDA guidelines to describe and compare the release profiles. Despite the undeniable advantages, the Weibull probability distribution has its own limits—there are no kinetic foundations for the model due to the lack of a parameter directly linked to the release kinetics. In other words, the underlying kinetics of the drug release cannot be characterized thoroughly, but profiling of the drug release is still provided.

4. Conclusions

The correctly prepared methodology of the pharmaceutical availability evaluation, containing the comparison of the drug release profiles, should also provide knowledge describing at least three main domains. First of all, the surveys of the drug release should reflect the variations of the substance's physicochemical properties resulting in the observed changes in the volume and rate of the active component delivery. Secondly, other procedures for product differentiation should be proposed, considering other excipients as well. Finally, in the case of the demonstrated in vitro/in vivo correlation (IVIVC), the drug release profile should be linked with the substance's bioavailability. The validity of the drug release studies was emphasized by the FDA and EMA agencies, which published a group of guiding principles to follow.

In this context, we present the findings of the drug release modeling using six selected mathematical models implemented to describe the release profiles of a new, biologically tested 9-PBThACI molecule and the marketed drug (Doxorubicin). Firstly, the modified methodology of reverse-phase evaporation (mREV) was employed to design and experimentally prepare a set of liposome-based drug delivery systems. Moreover, the following models were employed to approximate the empirical data: first-order, Bhaskas, Higuchi, Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model. As a matter of fact, First-order as well as Bhaskas models, which are based on the Weibull probability distribution, ensured satisfactory compliance with the experimental data for the liposomal complexes buffered at pH values of 5.50, 6.00, and 7.40, respectively. It was also revealed that Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model were characterized by the highest R^2_{adj} factor for the liposome/drug system at pH = 6.50. On the other hand, the Higuchi model demonstrated the lowest compatibility with the empirical data, with values of R^2_{adj} ranging from 0.17448 to 0.97732—a complete lack of conformity was also recorded. In general, the received experimental and modeling data confirm the profound impact of the surrounding pH buffer on the physicochemical profile of the produced liposomal complexes, as was reported previously [51].

It was also shown that the existing hydrogen bonds in the membrane might be broken down according to the rise in temperature, resulting in an increment in the phospholipid bilayer fluidity. It seems that the observed influence of the surrounding pH on the liposomal membrane can stem from the protonation of phosphate groups in the acidic environment and the formation of hydrogen bonds with DPPC molecules. An averaged value

of absorbance, calculated as the absorbance difference between the $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$ – $L_{DPPC/9-PBThACI}$ and $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$ – $L_{DPPC/DOX}$ systems, enabled us to indicate the pH value of the environment ($pH \approx 6.8$) at which the physicochemical property profiles of the liposomal complexes were noticeably changed. During the entrapment in the liposomes, some competition between the investigated molecules was noticed because relatively high values of the encapsulation efficiency ($EE\%$) were observed only for the liposomal complexes containing one trapped drug molecule. For instance, the $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$ complex at pH 7.40 is characterized by roughly halved encapsulation compared to the $L_{DPPC/9-PBThACI}$ and $L_{DPPC/DOX}$ systems. In consequence, the surrounding pH has a significant effect on the resulting liposomal properties.

As follows, the implemented mathematical models offer:

- Ability to estimate the concentration changes of the released drug molecules as a function of time;
- Opportunity to track drug transportation;
- Determination of factors limiting the rate of drug release;
- Indication of postulated changes in order to optimize the liposomal drug release profile.

It might be concluded that *in silico* prediction of the liposome-assisted drug delivery characteristics may significantly reduce the cost and time of the drug carrier formulation.

Author Contributions: Conceptualization, V.K., D.P. and M.P.; synthetic work, A.Z. and V.K.; formal analysis, D.P., M.P., V.K. and A.B.; investigation, M.P. and D.P.; data curation, M.P., D.P. and V.K.; writing—original draft preparation, V.K., D.P., M.P. and A.B.; writing—review and editing, A.B. and V.K.; visualization, A.B., M.P. and V.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the Medical University of Silesia in Katowice, Poland (Grant No. PCN-1-008/N/1/F).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pentak, D.; Sułkowski, W.W.; Sułkowska, A. Influence of some physical properties of 5-fluorouracil on encapsulation efficiency in liposomes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *108*, 67–71. [[CrossRef](#)]
3. Langer, R. Drug delivery and targeting. *Nature* **1998**, *392*, 5–10.
4. Pentak, D. Evaluation of the physicochemical properties of liposomes as potential carriers of anticancer drugs: Spectroscopic study. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 126. [[CrossRef](#)]
5. Pentak, D.; Ploch-Jankowska, A.; Zięba, A.; Kozik, V. The advances and challenges of liposome-assisted drug release in the presence of serum albumin molecules: The influence of surrounding pH. *Materials* **2022**, *15*, 1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chaurasiya, A.; Gorajiya, A.; Panchal, K.; Katke, S.; Singh, A.K. A review on multivesicular liposomes for pharmaceutical applications: Preparation, characterization, and translational challenges. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12*, 1569–1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Li, S.-D.; Huang, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 496–504. [[CrossRef](#)]
8. des Rieux, A.; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y.-J.; Préat, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control Release* **2006**, *116*, 1–27. [[CrossRef](#)]
9. Veisheh, O.; Tang, B.C.; Whitehead, K.A.; Anderson, D.G.; Langer, R. Managing diabetes with nanomedicine: Challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 45–57. [[CrossRef](#)]
10. Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760. [[CrossRef](#)]
11. Surendiran, A.; Sandhiya, S.; Pradhan, S.C.; Adithan, C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J. Med. Res.* **2009**, *130*, 689–701.

12. Bunggulawa, E.J.; Wang, W.; Yin, T.; Wang, N.; Durkan, C.; Wang, Y.; Wang, G. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. García-Manrique, P.; Machado, N.D.; Fernández, M.A.; Blanco-López, M.C.; Matos, M.; Gutiérrez, G. Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *186*, 110711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kozik, V.; Bık, A.; Pentak, D.; Hachula, B.; Pytlakowska, K.; Rojkiewicz, M.; Jampilek, J.; Sieron, K.; Jazowiecka-Rakus, J.; Sochanik, A. Derivatives of graphene oxide as potential drug carriers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 2489–2492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hosseini, S.M.; Mazinani, S.; Abdouss, M.; Kalhor, H.; Kalantari, K.; Amiri, I.S.; Ramezani, Z. Designing chitosan nanoparticles embedded into graphene oxide as a drug delivery system. *Polym. Bull.* **2022**, *79*, 541–554. [[CrossRef](#)]
16. Zięba, A.; Latocha, M.; Sochanik, A.; Nycz, A.; Kuśmierz, D. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel phenyl ring-substituted 5-alkyl-12(H)-quino[3,4-b][1,4]benzothiazine derivatives. *Molecules* **2016**, *21*, 1455. [[CrossRef](#)]
17. Rupert, D.L.M.; Claudio, V.; Lässer, C.; Bally, M. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subi.* **2017**, *1861*, 3164–3179. [[CrossRef](#)]
18. Yahata, S.; Hirose, M.; Ueno, T.; Nagumo, H.; Sakai-Kato, K. Effect of sample concentration on nanoparticle tracking analysis of small extracellular vesicles and liposomes mimicking the physicochemical properties of exosomes. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *69*, 1045–1053. [[CrossRef](#)]
19. Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 796–810. [[CrossRef](#)]
20. Yetisgin, A.A.; Cetinel, S.; Zuvin, M.; Kosar, A.; Kutlu, O. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules* **2020**, *25*, 2193. [[CrossRef](#)]
21. Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. Liposomal drug delivery systems: An update review. *Curr. Drug Deliv.* **2007**, *4*, 297–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lipowsky, R. The conformation of membranes. *Nature* **1991**, *349*, 475–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Los, D.A.; Murata, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1666*, 142–157. [[CrossRef](#)]
24. de Lange, N.; Kleijn, J.M.; Leermakers, F.A.M. Structural and mechanical parameters of lipid bilayer membranes using a lattice refined self-consistent field theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 5152–5175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lis, L.J.; McAlister, M.; Fuller, N.; Rand, R.P.; Parsegian, V.A. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.* **1982**, *37*, 657–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Goldstein, D.B. The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1984**, *24*, 43–64. [[CrossRef](#)]
27. Sułkowski, W.W.; Pentak, D.; Nowak, K.; Sułkowska, A. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747*, 737–747. [[CrossRef](#)]
28. Sułkowski, W.W.; Pentak, D.; Korus, W.; Sułkowska, A. Effect of temperature on liposome structures studied using EPR spectroscopy. *Spectrosc.* **2005**, *19*, 37–42. [[CrossRef](#)]
29. Adepu, S.; Ramakrishna, S. Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. *Molecules* **2021**, *26*, 5905. [[CrossRef](#)]
30. U.S. Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Center for Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (Issued 8/1997, Posed 8/25/1997)*; Food and Drug Administration: Rockville, MD, USA, 1997.
31. Costa, P.; Lobo, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123–133. [[CrossRef](#)]
32. Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 217–223. [[PubMed](#)]
33. Siepmann, J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2008**, *364*, 328–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Siepmann, J.; Faisant, N.; Benoit, J.-P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1885–1893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yuksel, N.; Kanik, A.E.; Baykara, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *Int. J. Pharm.* **2000**, *209*, 57–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Paarakh, M.P.; Jose, P.A.; Setty, C.M.; Christoper, G.P. Release kinetics-concepts and applications. *IJPRT* **2018**, *8*, 12–20.
37. Brunner, A.; Mäder, K.; Göpferich, A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 847–853. [[CrossRef](#)]
38. Peppas, N.A. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 5–9. [[CrossRef](#)]
39. Huang, C.; Li, S. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1422*, 273–307. [[CrossRef](#)]
40. Taylor, K.; Morris, R.M. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochim. Acta* **1995**, *248*, 289–3012. [[CrossRef](#)]
41. Szoka, F., Jr.; Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, *9*, 467–508. [[CrossRef](#)]

42. Niu, G.; Cogburn, B.; Hughes, J. Preparation and characterization of doxorubicin liposomes. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *624*, 211–219. [[PubMed](#)]
43. Nii, T.; Ishii, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 198–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gubernator, J. Active methods of drug loading into liposomes: Recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 565–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Xu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Liu, Y.; Chao, Y.; Liu, X.; Jin, Z.; Chen, Y.; Tang, X.; He, H.; et al. Membrane-loaded doxorubicin liposomes based on ion-pairing technology with high drug loading and pH-responsive property. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18*, 2120–2130. [[CrossRef](#)]
46. Jin, Y.; Li, M.; Hou, X. Pyrocatechol violet as a marker to characterize liposomal membrane permeability using the chelation and the first-order derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 379–382. [[CrossRef](#)]
47. Pentak, D.; Maciążek-Jurczyk, M.; Zawada, Z.H. The role of nanoparticles in the albumin-cytarabine and albumin-methotrexate interactions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *73*, 388–397. [[CrossRef](#)]
48. Siepmann, J.; Siepmann, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 351–362. [[CrossRef](#)]
49. Pentak, D.; Maciążek-Jurczyk, M. Self-assembled nanostructures formed by phospholipids and anticancer drugs. Serum albumin-nanoparticle interactions. *J. Mol. Liq.* **2016**, *224*, 1–8. [[CrossRef](#)]
50. Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **1987**, *5*, 23–36. [[CrossRef](#)]
51. Jacobson, K.; Papahadjopoulos, D. Phase Transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. *Biochemistry* **1975**, *14*, 152–161. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Preparing a Liposome-Aided Drug Delivery System: The Entrapment and Release Profiles of Doxorubicin and 9-(*N*-Piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium Chloride with Human Serum Albumin

Danuta Pentak ¹, Violetta Kozik ², Andrzej Zieba ³, Marlena Paździor-Heiske ², Aleksandra Szymczyk ², Josef Jampilek ^{2,*} and Andrzej Bak ^{2,*}

¹ Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Opole, Oleska 48, 45-052 Opole, Poland; danuta.pentak@uni.opole.pl

² Institute of Chemistry, University of Silesia, Szkolna 9, 40-006 Katowice, Poland; violetta.kozik@us.edu.pl (V.K.); pazdzior.marlena@gmail.com (M.P.-H.)

³ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia in Katowice, Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, Poland; zieba@sum.edu.pl

* Correspondence: josef.jampilek@gmail.com (J.J.); andrzej.bak@us.edu.pl (A.B.)

Abstract: Background/Objectives: The principal aim of this work was to prepare a liposomal drug delivery system based on the commercial drug doxorubicin (DOX) and a budding agent with promising anticancer activity, 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl). **Methods:** A spectrophotometric methodology was used to meticulously investigate the drug entrapment and release characteristics of the new liposomal complexes (L) based on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) with human serum albumin (HSA) and its defeated analog (dHSA). **Results:** The impact of the operational parameters (temperature and pH) on the liposome/drug(s)/(d)HSA, namely [L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}]:(d)HSA systems, as well as the polarity of the phospholipid bilayer, was examined. In order to compare the experimental findings, mathematical models were employed to specify the analytical factors controlling the process of drug release/potential drug release from liposomes. The observed variations in the drug encapsulation and release profiles were due to the combination of liposomal conjugates with human plasma protein. **Conclusions:** It was proven that changes in the environmental pH directly affect the percentage of drug entrapment in liposomes and the medicine release efficiency. Moreover, the grouping tendency of the liposomal combinations was investigated using a principal component analysis (PCA) and a hierarchical clustering analysis (HCA). Finally, an analysis of variance (ANOVA) confirmed the statistical impact of pH buffering and changing temperature factors on the drug release characteristics of liposomal conjugates.

Keywords: liposomes; drug release profile; human serum albumin; controlled drug delivery systems; ANOVA



Academic Editors: David Větvicka and Martin Studenovský

Received: 22 December 2024

Revised: 20 January 2025

Accepted: 4 February 2025

Published: 6 February 2025

Citation: Pentak, D.; Kozik, V.; Zieba, A.; Paździor-Heiske, M.; Szymczyk, A.; Jampilek, J.; Bak, A. Preparing a Liposome-Aided Drug Delivery System: The Entrapment and Release Profiles of Doxorubicin and 9-(*N*-Piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium Chloride with Human Serum Albumin. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 202. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020202>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human serum albumin (HSA) is a widely distributed plasma protein in nature that has attracted much attention in the development of drug delivery systems [1–4]. Due to the versatile properties of HSA, HSA-based nanoparticles are regarded as attractive therapeutic agents, characterized by desirable pharmaceutical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic profiles with enhanced efficacy, reduced toxicity, or an extended circulation

half-life [5–7]. As a matter of fact, the protein's ability to bind ligands (e.g., drug molecules) and act as a carrier protein (or drug vehicle) for many exo- and endogenous compounds has been extensively scrutinized so far [8–10]. Hence, a significant amount of data, including the locations of binding pockets and potential guest–host (ligand–receptor) interactions, have been periodically obtained [11,12].

HSA is a multifunctional protein synthesized exclusively by liver hepatocytes and continuously secreted into the blood circulation system with a fairly long half-life of 19 days. It is the most abundant protein, accounting for 60–65% of the total plasma protein; the total amount of HSA in the body is about 360 g, which is approximately one-third of the bloodstream (the concentration of 35–50 g/L). HSA is observed to be synthesized as a simple, monomeric protein without prosthetic groups and covalently bound lipids or carbohydrates. In fact, the geometrical 3D structure of a single polypeptide chain and its recombinant version (rHSA) has been crystallographically specified with a satisfactory resolution of 2.5 Å [13,14]. The polypeptide chain forms a heart-shaped protein with approximate dimensions of $80 \times 80 \times 80$ Å and a thickness of 30 Å, where 67% composes a regular α helix structure. HSA comprises three homologous domains (I–III), each consisting of two subdomains, A and B, with six and four α helices connected by flexible loops, respectively. All but 1 (Cys34) of the 35 cysteine residues are involved in forming 17 stabilizing disulfide S–S bonds, as illustrated in Figure 1.

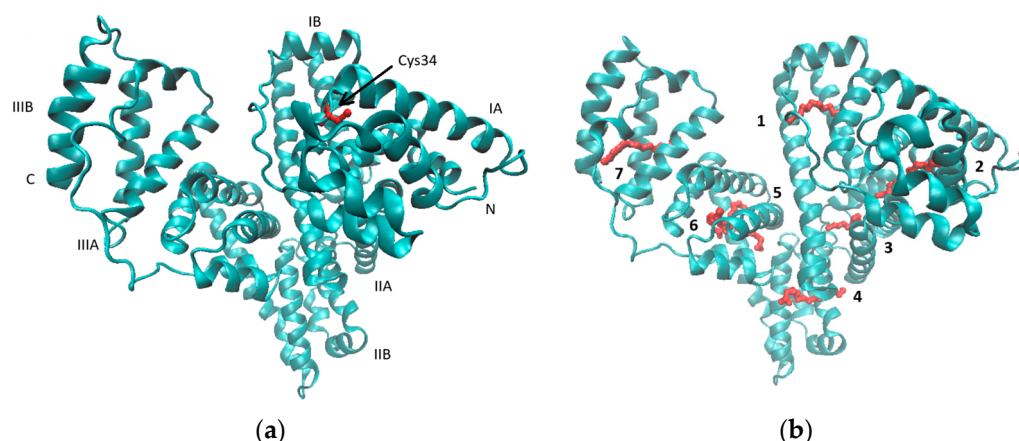


Figure 1. Crystal structures of HSA with the position of Cys34 indicated in red (a). The subdivision of the protein into domains (I–III) and subdomains (A, B). PDB id code: 1bm0. The locations of the seven (1–7) binding sites common to fatty acid anions using palmitate are presented in red (b). PDB id code: 1e7h.

Small-angle X-ray scattering studies of HSA in a solution revealed the general agreement with the crystal structure [15]. Furthermore, a combined phosphorescence depolarization hydrodynamic modeling study proved that the overall conformation of HSA in a neutral solution aligns with the one observed in crystal structures [16].

Not surprisingly, the application of many drugs, for instance, chemotherapeutic or gene therapy agents, is hampered by the drug's poor solubility in aqueous media, marked toxicity, and/or rapid degradation in vivo. In order to address the issues of drug distribution from the place of administration to the site of interaction, nanoparticles might be used as carriers (named 'Trojan horses') of active substances. It seems that artificially structured vesicles composed of a phospholipid bilayer (liposomes) are frequently used as nanoscale carriers to encapsulate medicines in controlled drug delivery systems. In this context, albumin appears to be a promising entrapment medium due to its stability, biodegradability, non-toxicity, non-immunogenicity, and ability to bind various drug molecules [17].

In general, HSA serves as a transport protein exerting a mutually noticeable impact on the drug's ADMET-related properties (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity). Interestingly, the binding of albumin may also affect ligands more individually, resulting in the increased solubility of the compound in plasma or the protection of the ligand against oxidizing agents. Despite the universal ligand-binding potential, HSA mainly binds organic anions and inorganic cations. In fact, the unique ability of the HSA protein to bind the drug molecule is mainly induced by the favorable combination of hydrophobic pockets, side chain charge distributions, and side chain flexibility, which is largely due to relatively long interdomains and intradomain polypeptide linkers and flexible loops [18]. The albumin-bound paclitaxel (Abraxane[®]) was the first commercially available protein-based nanoparticle (approved by the FDA in 2005) successfully applied in oncology. Thence, a range of albumin-based carriers containing other active compounds, such as doxorubicin [19,20], cisplatin [21,22], docetaxel [23,24], rapamycin [25], vincristine [26], mitoxantrone [27], ferulate [28], and iron oxide [29,30], were produced. It is known that the primary purpose of making such particles is their potential application to medicalize various forms of cancer and vascular diseases, as well as for uses in imaging and chelation therapy. In practice, trapped drugs are being extensively scrutinized at different phases of clinical trials. It was noticed that using nanoparticles improves the drug's biodistribution (pharmacokinetics and pharmacodynamics) pattern, including bioavailability, the release time of the active substance, and the extended duration of pharmacological action. Synthetically, nanoparticles are frequently prepared for therapeutic purposes in the form of liposomes, fullerenes, nanotubes, and dendrimers; however, in medicine, the most commonly analyzed are liposomes → spherically shaped media made of a single- or multi-layer lipid shell enclosed inside an aqueous space (liposomal core). Naturally, the liposomal shell is constructed analogously to biological membranes that facilitate the transport of both lipophilic drugs (located in the free spaces of the lipid layer) and hydrophilic substances (placed in the water solution). Unfortunately, the observed constraints in using liposomes are their rapid uptake and degradation by liver macrophages, which shorten the duration of action of the drug transported in the body. Luckily, the duration of liposomal interaction within the human body might be noticeably extended by generating a [liposome/drug]–albumin complex [31,32]. A unique feature that makes albumin so attractive as an effective drug carrier is its ability to bind with receptors overexpressed by tumors. The main metabolic path on which albumin depends during internalization inside the tumor is the transcytosis endothelial path, where the protein intercedes. Albumin is characterized by a fairly high affinity to the gp60 receptor (albondin) with a mass of 60 kDa. Additionally, the glycoprotein surface receptors gp18 and gp30 with masses of 18 and 30 kDa are targeted by albumin as well. It should be highlighted that gp60 allows albumin to participate in the specific targeting of cancerous cells because it mediates the transportation of medicines in albumin-based drug delivery systems via biological, epithelial, and endothelial barriers, undergoing overexpression in cancer cells [33]. A detailed study of albumin's interactions with liposomal structures showed that proteins partially penetrate and deform the lipid bilayer [34]. To some extent, HSA penetrates liposomal bubbles partially being adsorbed on its surface.

The marketed drug doxorubicin (DOX) forms complexes with DNA by intercalating between pairs of bases and inhibits topoisomerase II activity via stabilizing the DNA–topoisomerase II complex due to the partial prevention of the ligation reactions that are catalyzed by the topoisomerase II enzyme [35,36]. As a representative anthracycline antibiotic, doxorubicin exerts a cardiotoxic effect and exhibits antimitotic and cytotoxic activity. Conducted clinical studies revealed a reduced number of cardiac events in patients treated with liposomal DOX compared to those medicated using the conventional DOX; for in-

stance, a statistically significant lower incidence of heart failure was reported [37,38]. On the other hand, the liposome-based DOX exhibited a similar activity against doxorubicin-resistant cell lines. Moreover, the liposome-encapsulated DOX showed reduced drug distribution to the heart, gastric mucosa, and intestines while maintaining antitumor efficacy. Drug encapsulation seems to protect the patient from the adverse effects of the chemotherapeutics used.

Neuroleptic phenothiazines containing alkylaminoalkyl substituents at the thiazine nitrogen atom exhibit antitumor activity; therefore, we proposed a new method of tetracyclic phenothiazine derivative synthesis [39,40]. Briefly, the structure of the synthesized compounds was modified by introducing different pharmacophoric groups in the 9-, 10-, and 11-positions of the tetracyclic quinobenzothiazine system, revealing the dependence of antitumor activity not only on the nature of the pharmacophoric groups but also on their position in the tetracyclic quinobenzothiazine system [41]. In fact, the most active derivatives showed anticancer activity comparable to drugs currently used in chemotherapy (e.g., doxorubicin and cisplatin); therefore, the most probable mechanism of action is the intercalation of the DNA helix of cancer cells [42]. The most potent molecules contain the substituents (e.g., amino groups) in the 9- or 10-position of the tetracyclic system that form hydrogen bonds (HBs) with purine and pyrimidine bases of the DNA helix stabilizing the compound–DNA complex. Hence, 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl), containing a piperazyl substituent in the 9-position, was examined as an antiproliferative agent with a promising IC₅₀ value (compared to cisplatin as a reference drug molecule).

The choice of the liposome administration route depends on the type of cancer, the properties of the drug, and the intended therapeutic effect. In fact, some anticancer or anti-inflammatory drugs are designed to work more effectively in an acidic pH environment. The proposed carriers indicate the difference in drug release in response to pH changes. The effect of pH on the release and action of the drug is a key element of pharmacokinetics; therefore, the selected temperatures were intended to replicate physiological conditions, with 37 °C representing the normal state and 41 °C representing an inflammatory state.

The molecular entrapment and the release characteristics of liposomal delivery systems, including the promising anticancer agent 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl) and the marketed drug doxorubicin (DOX), were investigated in the presence of serum albumin molecules HSA and dHSA (deprived of endogenous fatty acids). In practice, new liposomal complexes 1–12 with human serum albumin ([L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:HSA vs. [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:dHSA) were experimentally and theoretically examined in the changing operational conditions of temperature and pH using the spectrophotometric methodology and modeling procedures as well.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC, ≥99%), dichloromethane, chloroform, potassium phosphate dibasic (≥98%), sodium phosphate monobasic monohydrate (≥98%), and doxorubicin hydrochloride (98.0–102.0% (HPLC)) were purchased from Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany; albumin from fatty acid-free and globulin-free human serum lyophilized powder (≥99%) was from Sigma Aldrich; and albumin from human serum fraction V, high purity, was from EMD Millipore, Germany. 9-(*N*-piperazinyl)-5-methyl-12(*H*)-quino [3,4-*b*][1,4]benzothiazinium chloride (9-PBThACl) was synthesized at the Department of Organic Chemistry, Medical University of Silesia in Katowice, Poland.

2.2. Liposome Preparation

The modified reverse-phase evaporation method (mREV) was used to produce the liposome conjugates. The mREV methodology consists of the continuous mixing of specific volumes of appropriate phospholipid solutions in excess of organic solvents with a water phase following the procedure described in detail by Papahadjopoulos [43]. The proposed adjustment of the above method involves substituting the ultrasonic dispersion of the aqueous phase in the organic phase with mechanical dispersion, which enables the comprehensive conversion of phospholipids to liposomes. The DPPC:drug molar ratio of 30:1 and the DPPC:drug:drug molar ratio of 30:1:1 were applied in order to prepare liposomes (L_{DPPC} ; $L_{DPPC/9-PBThACl}$; $L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$) using the mREV approach. Lipid dispersion at a final lipid concentration of ca. 2.64×10^{-2} M was used. In practice, a total of 0.34 mL of 9-PBThACl (the synthesis of 9-PBThACl was described previously in [44]) and doxorubicin at a concentration of 5×10^{-3} M were added to the mixture. Briefly, equal amounts (0.34 mL) of 9-PBThACl and DOX at a concentration of 5×10^{-3} were mixed with lipid dispersion. An amount of 2 mL of PBS buffer with the appropriate pH value and 4 mL of an organic solution prepared from dichloromethane and chloroform were applied. The average time required for liposome preparation did not exceed 12 min. The method used is fast, does not generate high costs, and allows for the complete transformation of phospholipids into liposomes.

2.3. Solutions and Sample Preparation

Phosphate-buffered saline (PBS) at pH = 5.50, 6.00, 6.50, and 7.40 was employed in the UV/Vis measurements. A stock solution of 9-PBThACl/DOX in H_2O (5.0×10^{-3} M) was prepared for the examination of the human serum albumin–drug interaction. Stock solutions of human serum albumin (HSA and dHSA) at the concentration of 1.0×10^{-3} M were used at the specific pH of the environment. All mixtures used in the reactions were prepared in triplicate, fulfilling the statistical analysis requirements.

2.4. UV/Vis Measurements

The absorption spectra of pure 9-PBThACl, doxorubicin, the liposomal form of 9-PBThACl, and doxorubicin with HSA and dHSA were recorded using a Lambda Bio 40 spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a PTP-1 Peltier System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) automatic temperature controller. The temperature was controlled in the range of 37 ± 0.1 °C and 41 ± 0.1 °C. All spectra were recorded after the equilibration of the samples with the automatic temperature controller. The spectral examination was performed using UV WinLab Perkin Elmer Software (V6.0.4).

2.5. Drug Release Versus Mathematical Modeling

The specification of 9-PBThACl, DOX release from liposomes [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]: HSA, and [$L_{DPPC/9-PBThACl/DOX}$]:dHSA was carried out at 37 °C and 41 °C in a period of 5 h. Spectrophotometry was employed to examine the degree of drug release from liposomes. During the first 60 min of experiments, the measurements were recorded in 5 min intervals. Subsequently, the surveys were recorded every 15 min. Drug release (R%) was calculated according to Equations (1) and (2) [45].

$$R(\%) = \frac{([x]_f - [x]_{fo})}{([x]_t \times EE\%)} \times 100 \quad (1)$$

where

$R(\%)$ —encapsulated drug percentage of release;

$[x]_f$ —concentration of released drug molecule;

$[x]_{f0}$ —initial concentration of unencapsulated drug;
 $EE\%$ —percentage of drug encapsulation.

$$[x]_t = \frac{[x]_{t0}}{\beta} \quad (2)$$

where

$[x]_{t0}$ —concentration of total drug in original liposomes;
 β —dilution.

In order to theoretically estimate the release process and the degree of drug leakage from the liposomes, a set of mathematical models [46–48] was implemented as follows:

$$\text{First-order : } X = 1 - e^{-k(t-\alpha)} \quad (3)$$

$$\text{Bhaskas : } X = 1 - e^{-k(t-\alpha)^{0.65}} \quad (4)$$

$$\text{Higuchi : } X = k(t - \alpha)^{0.5} \quad (5)$$

$$\text{Ritger-Peppas : } X = k(t - \alpha)^n \quad (6)$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas : } X = kt^n \quad (7)$$

$$\text{An extension of the classical Freundlich model : } X = a + kt^n \quad (8)$$

where

X —release percentage R [%] based on fitting of empirical data to mathematical equations;

t —release time;

k —kinetic constant;

α —modified parameter;

a —fit factor;

n —exponent factor depicting various mechanisms of drug leakage.

The numerical value of $n < 0.45$ corresponds to Fick's diffusion, and the square root of the time value is then proportional to the number of fractions released from the carrier. A process other than Fick's diffusion is used in the condition that $0.45 < n < 0.89$, and drug release appears as a consequence of both the diffusion and controlled mechanisms [49]. The residual sum of squares (SUM) and R^2_{adj} parameters were estimated according to Equations (3)–(8).

2.6. Encapsulation Efficiency

Following the preparation of the liposomal formulation containing 9-PBThACl and DOX, the samples were subjected to dialysis to separate the encapsulated molecules from their free forms. A total of 12 mL of the liposomal formulation was placed in cellulose ester dialysis tubing (Spectra/Por®, MWCO 8000–10,000 Da, Spectrum, Quebec, QC, Canada). The dialysis bag was immersed in 50 mL of buffer solution and maintained at 4 °C. Dialysis was continued until no characteristic peaks of the compounds were detected in the UV/Vis spectrum at wavelengths of 488 nm and 233 nm, indicating the removal of unencapsulated 9-PBThACl and DOX. The concentrations of encapsulated 9-PBThACl and DOX within the liposomes were determined spectrophotometrically by comparing absorbance values to a standard calibration curve. The encapsulation efficiency ($EE\%$) of 9-PBThACl and doxorubicin in the liposomal formulation was calculated using the following equation:

$$EE\% = \frac{c_{total} - c_{free}}{c_{total}} \times 100 \quad (9)$$

where

c_{total} —total amount of drug;

c_{free} —free amount of drug in supernatant.

2.7. Zeta Potential and Particle Size Measurements

Zeta potential and particle size measurements were performed using electrophoretic light scattering (ELS) on the Zetasizer Advance Malvern Panalytical. The suspended particles begin to move at a characteristic speed called electrophoretic mobility under the influence of an electric field. The zeta parameter can be measured using light scattering with phase analysis (PALS technique), which examines the tiny phase shifts in the scattered light caused by moving particles. The electrophoretic mobility can then be converted to the zeta potential. Dynamic light scattering (DLS) is a widespread method of measuring the size of nanoparticles dispersed in a liquid, where a laser beam illuminates the dispersion of nanoparticles. The laser light is scattered on particles vibrating with Brownian motion and hits the detector. The signal on the detector changes depending on the speed of the particles, which is correlated with their size—small particles move faster, and large ones move slower. The sizes of the particles are determined using the Stokes–Einstein equation. Zetasizer analyzers use the patented non-invasive back scatter (NIBS), where the detector is positioned at an angle of 173°.

2.8. Statistical Analysis

All experiments and measurements were conducted in triplicate, and the data were reported in the typical form of the mean with the standard deviation ($\pm$ SD). The generated findings were analyzed using OriginPro 8.5.0 SR1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). All PCA, HCA, and ANOVA calculations were performed using MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA) on a computer running the Windows 11 operating system.

3. Results and Discussion

3.1. In Vitro Drug Release Evaluation

In order to theoretically approach the operational parameters and the degree of drug (DOX) and/or potential drug (9-PBThACl) release from liposomes, six mathematical models were applied, including first-order, Bhaskas, Higuchi, Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model (see fitting variables reported in Tables S1 and S2). Practically, the release rates of the drug/prospective drug molecules were examined at temperatures of 37 °C as well as 41 °C. Additionally, the procedure of drug entrapment within liposomes was extended by the application of two forms of human serum albumin: HSA and dHSA. The released kinetics of the resulting complexes [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:HSA and [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]:dHSA are presented graphically in the functions of time (1–300 min), environment pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.4), measurement temperature (37 °C and 41 °C), and liposomal composition conjugated with human serum albumin (HSA and dHSA), as shown in Figures 2–5.

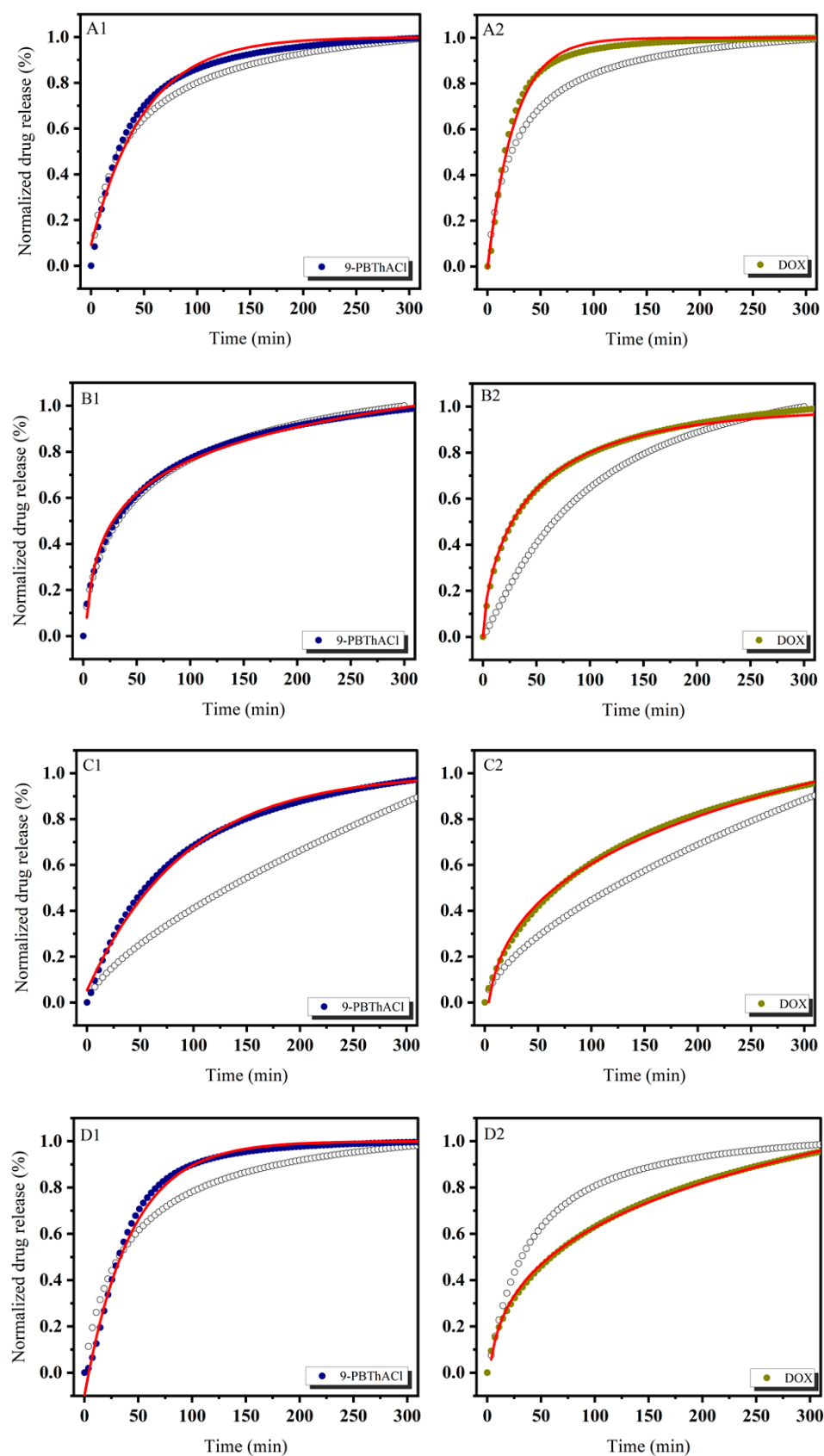


Figure 2. The release kinetics of 9-PBThACl and DOX from the $[L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}]:\text{HSA}$ liposomes. The red lines represent the fitting of the best mathematical models: (A1: pH = 5.5, 9-PBThACl, A2: pH = 5.5, DOX), (B1: pH = 6.0, 9-PBThACl, B2 pH = 6.0, DOX), (C1: pH = 6.5, 9-PBThACl, C2: pH = 6.5, DOX), and (D1: pH = 7.4, 9-PBThACl, D2: pH = 7.4, DOX). Measurement temperature: 37 °C.

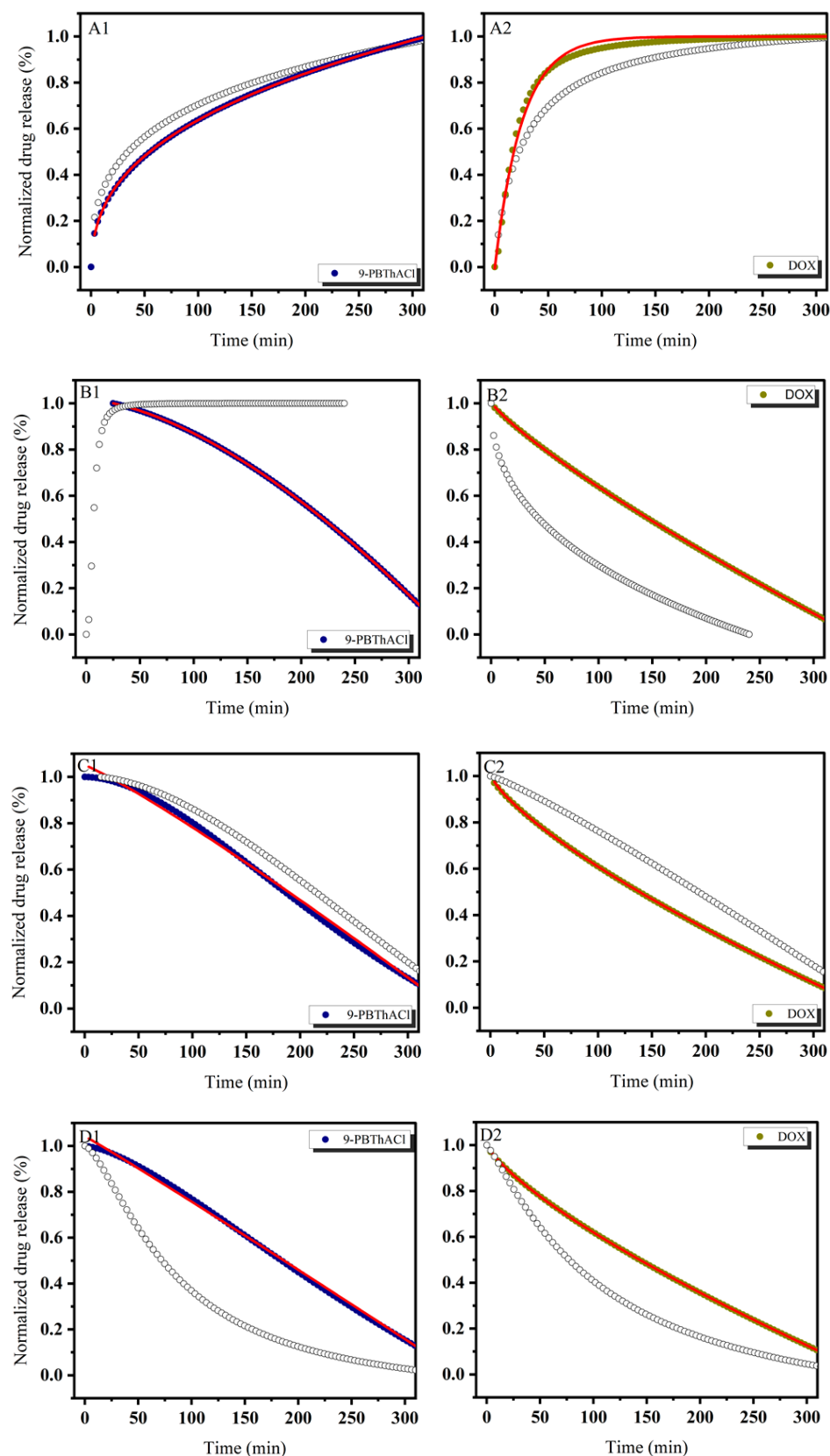


Figure 3. The release kinetics of 9-PBThACl and DOX from the $[L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}]:\text{HSA}$ liposomes. The red lines represent the fitting of the best mathematical models: (A1: pH = 5.5, 9-PBThACl, A2: pH = 5.5, DOX), (B1: pH = 6.0, 9-PBThACl, B2 pH = 6.0, DOX), (C1: pH = 6.5, 9-PBThACl, C2: pH = 6.5, DOX), and (D1: pH = 7.4, 9-PBThACl, D2: pH = 7.4, DOX). Measurement temperature: 41 °C.

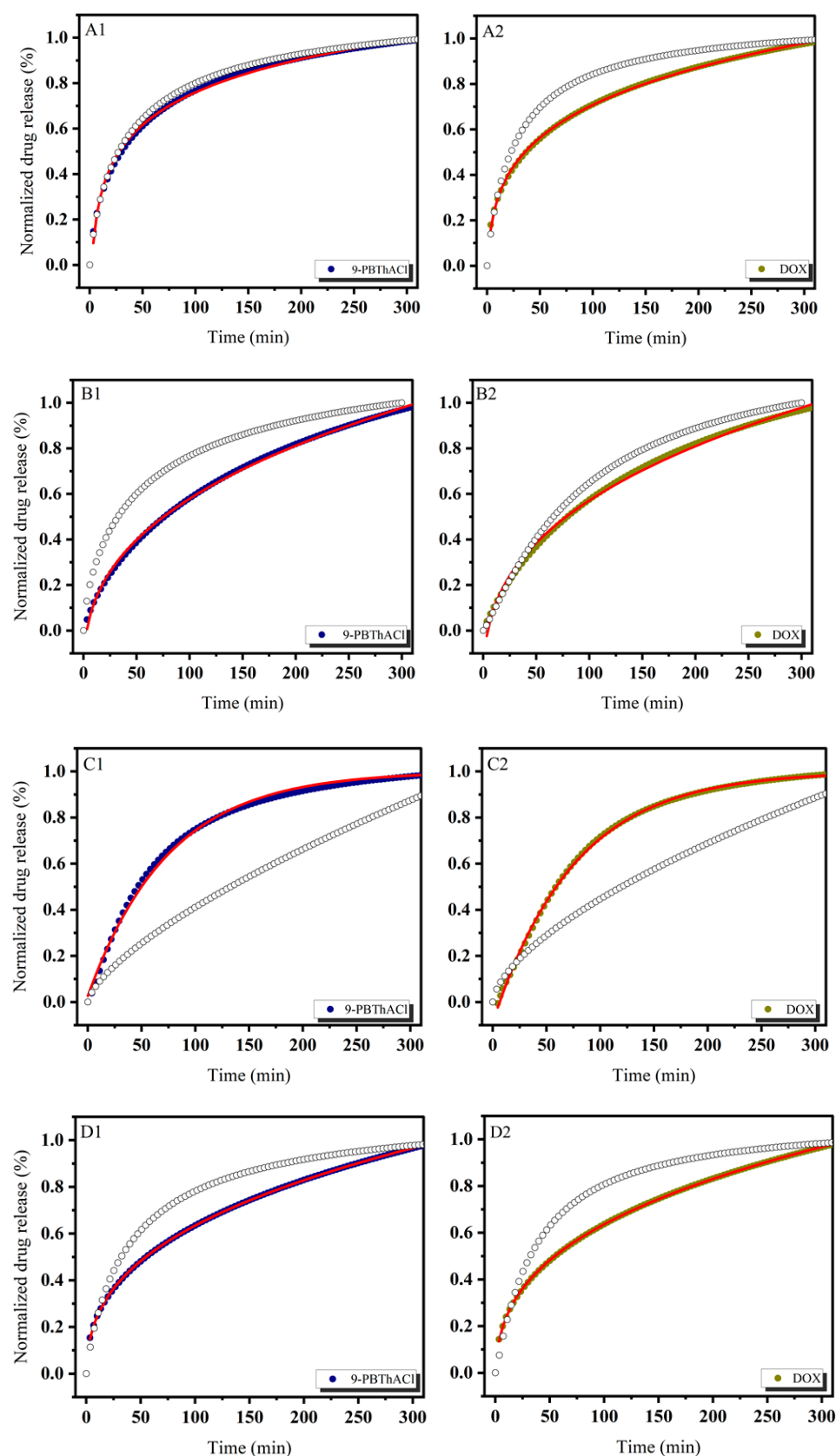


Figure 4. The release kinetics of 9-PBThACl and DOX from the [L-DPPC/9-PBThACl/DOX]:dHSA liposomes. The red lines represent the fitting of the best mathematical models: (A1: pH = 5.5, 9-PBThACl, A2: pH = 5.5, DOX), (B1: pH = 6.0, 9-PBThACl, B2 pH = 6.0, DOX), (C1: pH = 6.5, 9-PBThACl, C2: pH = 6.5, DOX), and (D1: pH = 7.4, 9-PBThACl, D2: pH = 7.4, DOX). Measurement temperature: 37 °C.

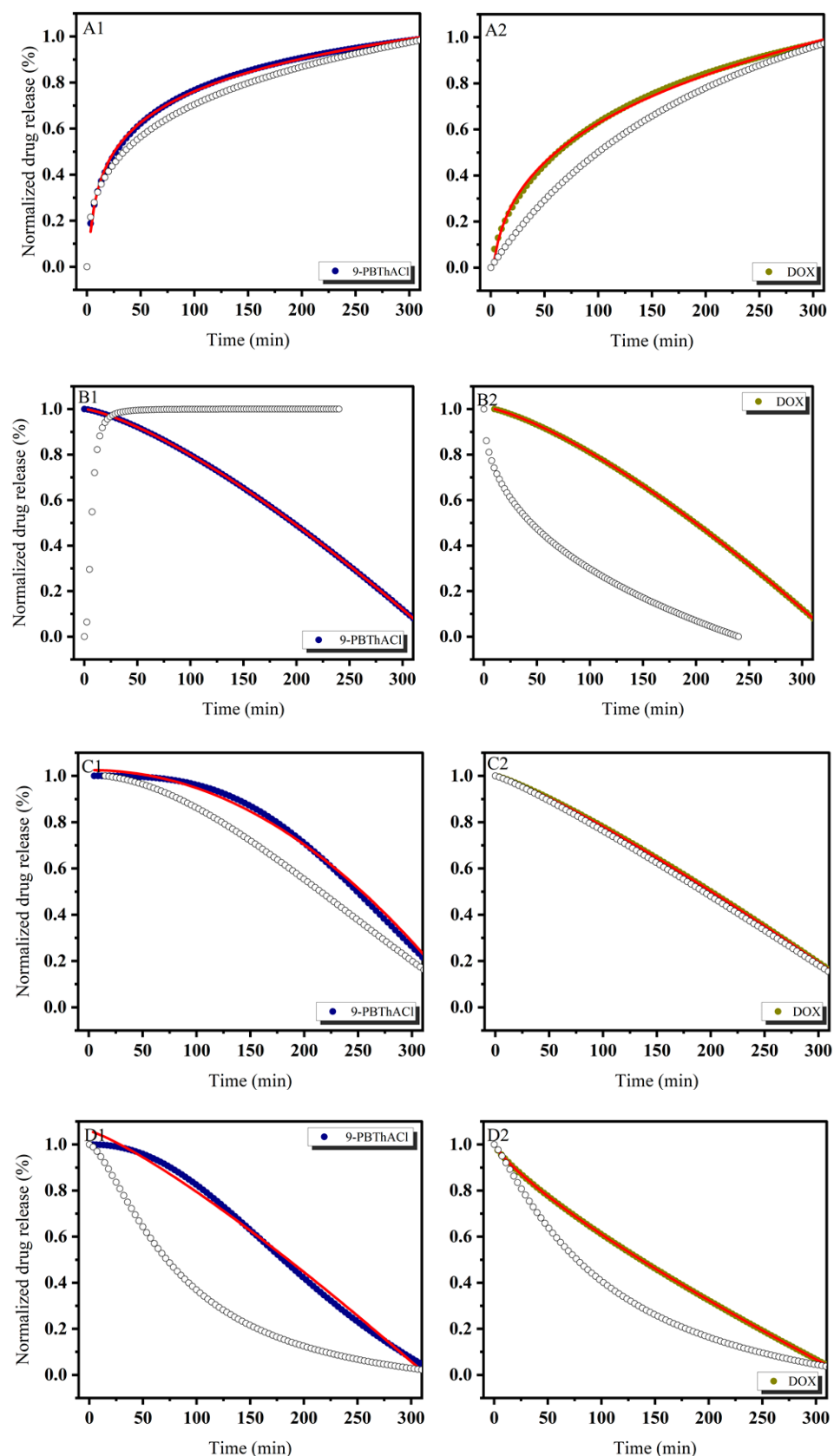


Figure 5. The release kinetics of 9-PBThACl and DOX from the $[L_{DPPC}/9\text{-PBThACl}/\text{DOX}]:\text{dHSA}$ liposomes. The red lines represent the fitting of the best mathematical models; (A1: pH = 5.5, 9-PBThACl, A2: pH = 5.5, DOX), (B1: pH = 6.0, 9-PBThACl, B2 pH = 6.0, DOX), (C1: pH = 6.5, 9-PBThACl, C2: pH = 6.5, DOX), and (D1: pH = 7.4, 9-PBThACl, D2: pH = 7.4, DOX). Measurement temperature: 41 °C.

The data, illustrated in Figures 2–5, confirm the previously presented tendency (see part 1 of our studies [44]), where the direct influence of temperature and environmental pH on the drug release characteristics from liposomes was reported. In general, the applied models, calculated according to Equations (3)–(8), enabled the examination of different aspects of the in vivo drug distribution. A comprehensive review (including the profound examination of various drug release systems with respect to the mechanism of action that restricts the drug from spreading within the body) is beyond the scope of this paper; however, it can be found elsewhere [50]. Overall, the drug release profiles are functionally dependent on diffusion processes (within the material and/or via the membrane), carrier degradation, material bulking, and environmental parameters, e.g., temperature and pH changes.

In practice, the drug release profiles produced at a temperature of 37 °C and the environmental pH values of 5.5, 6.0, 6.5, and 7.4 for the complexes with HSA and dHSA were approximated exponentially, as reported in the Supplementary Materials (see Tables S1 and S2). As a matter of fact, the best fit for HSA was recorded using the first-order model, while for dHSA, an extension of the classical Freundlich model exhibited satisfactory consistency with the experimental data. Conversely, the ultimate match for HSA data was demonstrated at pH = 6.5 by extension of the classical Freundlich model, whereas for dHSA, it was the first-order model at the same pH in the surrounding environment. Similarly, an extension of the classical Freundlich model was used to decrease functions at 41 °C for both HSA and dHSA data, as shown in Tables S1 and S2 in the Supplementary Materials. Not surprisingly, an increase in temperature to the main point of the DPCC phase transition destabilized the tested liposomal conjugates [51]. It appears that an ambient pH can explicitly modify the thermal profiles of drug complexes trapped in liposomes with HSA as well as dHSA proteins. Furthermore, the thermal characteristics of drug release for the [L_{DPCC/9-PBThACI/DOX}]:dHSA liposome complex prepared at a temperature of 41 °C and in surrounding buffer with pH = 6.0, 6.5, and 7.4 were described by $R^2_{\text{adj}} = 1$. In contrast, the recorded drug release pattern varied considerably from the system generated at pH = 5.5. Thus, the pH of the environment determines the specific conformation of phospholipids, which translates into the kinetics of releasing the compound enclosed in liposomes.

3.2. Characteristics of Liposomes

The zeta potential (ζ) depends on the surface charge and is essential for the stability of nanoparticles in suspension [52]. It is also a significant factor in the initial adsorption of nanoparticles on the cell membrane. The electrokinetic potential of liposomes is related to the presence of a double electrical layer on the surface of the particles with oppositely charged ions. The zeta potential is revealed by the mutual motion of particles relative to the medium—it is defined as the potential occurring at the surface interface separating the particle (liposome) with adsorbed ions from the rest of the double layer [53]. In the case of high and negative or positive potential, due to electrostatic repulsion, the system is characterized by good stability and is less susceptible to chemical degradation or aggregation. On the other hand, a potential close to 0 indicates low system stability, which adversely affects the properties of liposomes, which in turn fuse to form larger aggregates. Biodistribution and the rate of therapeutic removal by macrophages of the reticuloendothelial system (RES) depend on the sizes of the liposomes [54]. In fact, large liposomes with a diameter (d) of about 1000 nm are recognized to be removed faster by macrophages compared to smaller liposomes ($d \approx 100$ nm), which show increased accumulation in tumor tissue and a longer circulation time in the blood. Liposomes with a

size in the range of 100–1000 nm are responsible for efficient drug delivery to tumors using the effect of increased permeability and retention (EPR).

In order to provide the basic characteristic of the generated liposomal systems, the zeta potential ($\zeta = -1.8 \pm 07$ mV) and liposome particle size (67–68 nm) were measured three times at a temperature of 250 °C. A low negative zeta potential result was obtained, which affects liposome aggregation after several weeks.

3.3. Similarity-Guided Drug Release Evaluation

As a matter of fact, the grouping tendency of the analyzed liposomal complexes can be examined via retracing the (dis)similarities in the multidimensional (mD) parameter's space of drug release potency produced empirically using UV/Vis measurements. In practice, the drug release profiles generated at temperatures of 37 °C and 41 °C and an environmental pH of 7.4 for the liposomal systems composed of 9-PBThACl and DOX molecules with HSA and dHSA were applied as entry descriptors to the principal component analysis (PCA) as well as the hierarchical clustering analysis (HCA). At first, the metric-related (distance-based) drug release assessment was performed on a pool of 37 absorbance measurements organized into matrix $X_{12 \times 37}$ with rows representing various 1–12 liposomal systems (1: [L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACl], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:dHSA, and 12: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:dHSA, where $\lambda_1 = 233$ nm and $\lambda_2 = 488$ nm) and columns representing numerical parameters (descriptors) of the recorded experimental absorbance. In order to highlight the absorbance variations (differences), the resulting matrix was centered by subtracting the particular column mean values from each absorbance value at the preprocessing step. Roughly speaking, the PCA method is a projection procedure used to model multivariate data with a relatively small number of so-called principal components (PCs) that enables not only the reduction in data dimensionality (mD → 2/3D) but also graphical data presentation and distance-based similarity evaluation. In practice, the input matrix, X , is decomposed into two mutually orthogonal matrixes of scores (T) and loadings (P)—the principal components (PCs) are constructed as linear combinations of original variables to maximize the description of data variance [55]. Ordinarily, a restricted number of the relevant PCs is selected, taking into account the percentage of the modeled data variance. In our case, the first two PCs account for 99.9% of the total data variance; therefore, the investigated liposomal systems were projected on plane PC1 vs. PC2 which was color-coded according to the experimental TLC lipophilicity of 9-PBThACl and DOX molecules, as illustrated in Figure 6.

Noticeably, the examined liposomal conjugates (1–12) are generally clustered into two main groups according to the first principal component (PC1). Basically, DOX-containing liposomes compose the first group with PC1 < 0, while liposomes with the encapsulated 9-PBThACl molecule are clustered together along the positive values of the PC1 axis (PC1 > 0). Moreover, the thought-provoking distributions of liposome–drug–albumin complexes can be observed along the second principal component (PC2), where double-drug systems such as 9-PBThACl and DOX (named a 'combo') are placed on the negative side of the PC2 axis (PC2 < 0) and are discernibly separated from liposomes containing a single drug molecule (9-PBThACl or DOX).

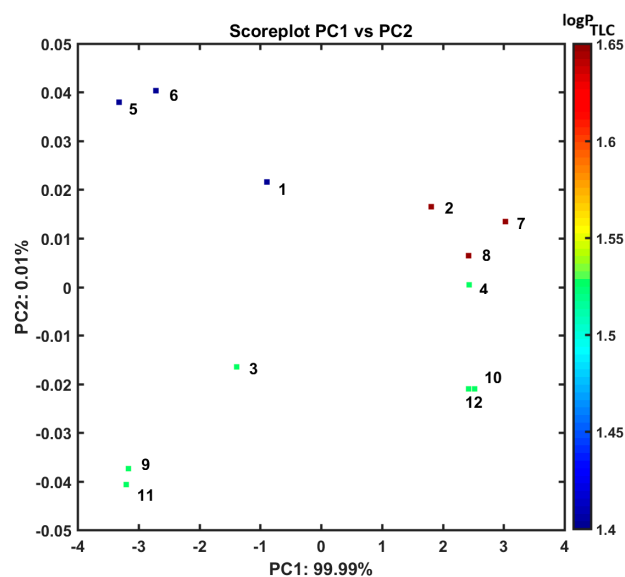


Figure 6. Projection of liposomal systems 1–12 on plane defined by PC1 and PC2. Colors code empirical TLC lipophilicity of 9-PBThACI and DOX molecules in logarithmic scale ($\log P_{TLC}$), where 1: [L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACI], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_λ, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACI]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACI]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ1}:dHSA, and 12: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}:dHSA.

The Euclidean distances (d) were calculated using PC1 and PC2 coordinates for all 1–12 liposomal formulations and introduced as a color-coded triangular matrix in Figure 7. It was confirmed that liposomal complexes 5, 6, 11, and 12 (DOX-based systems) are characterized by the extreme values of PC1 and PC2 coordinates being situated on the edges of the PC1 vs. PC2 plane.

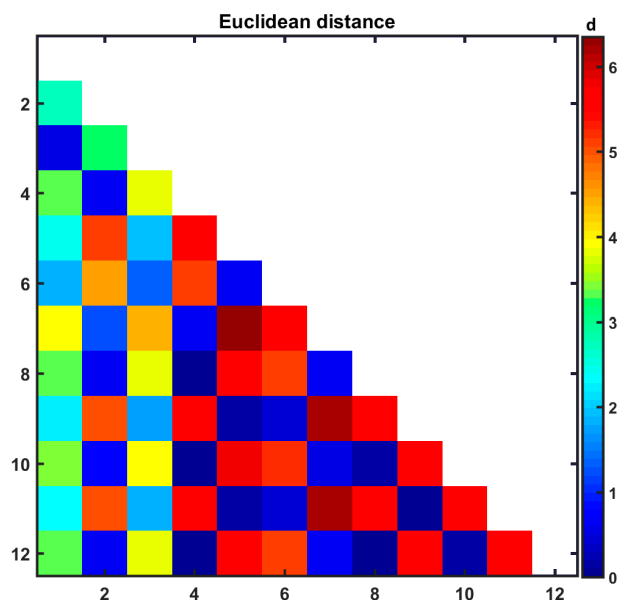


Figure 7. Color-coded matrix of Euclidean distances calculated for liposomal systems 1–12, where 1: [L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACI], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_λ, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACI]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACI]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ1}:dHSA, and 12: [L_{DPPC}/9-PBThACI/DOX]_{λ2}:dHSA.

Briefly, the exploratory HCA procedure generates the clustering pattern of objects/molecules illustrated as a 2D dendrogram produced in the Euclidean-based distance, where the OX axis presents the order of objects (or parameters) and the OY one shows the (dis)similarity between them that is basically related to the clusters' employed linkage method—Ward's linkage algorithm is usually employed [56]. In order to confirm the PCA grouping tendency of the investigated liposomal complexes, the HCA method was applied. Similarly to our previous PCA findings (Figure 6), the DOX-containing liposomes form cluster B which varies from collection A with the 9-PBThACl molecule mainly being encapsulated inside liposomes, as presented in the dendrogram in Figure 8.

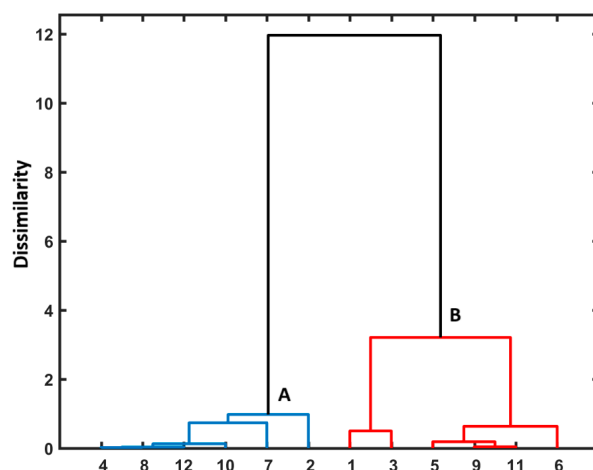


Figure 8. Dendrogram of liposomal conjugates 1–12. A,B are cluster names; 1: [L_{DPPC}/DOX], 2: [L_{DPPC}/9-PBThACl], 3: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_λ, 4: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}, 5: [L_{DPPC}/DOX]:HSA, 6: [L_{DPPC}/DOX]:dHSA, 7: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:HSA, 8: [L_{DPPC}/9-PBThACl]:dHSA, 9: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:HSA, 10: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:HSA, 11: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ1}:dHSA, and 12: [L_{DPPC}/9-PBThACl/DOX]_{λ2}:dHSA.

3.4. One-Factor Analysis of Variance (ANOVA)

An analysis of variance (ANOVA) is one of the most commonly used statistical methods in medical research, focusing on the difference in variances between two or more groups of data [57]. In other words, an ANOVA compares the means of at least two data groups to determine whether statistical evidence shows that the means of the associated population vary significantly according to the chosen factor of interest. In the one-factor version of the ANOVA procedure, the null hypothesis (H_0) assumes that all k population means (μ) are equal, whereas at least one of the k population means is not equal to the others according to the alternative hypothesis (H_1). To test the validity of the null hypothesis, one should check whether the contribution of the tested factor is larger with respect to the contribution of the errors (for instance, the random error). If the variances between groups are noticeably large compared to the variances within particular groups of data, then the H_0 hypothesis is not true (it can be rejected) based on the assumed level of significance p (typically $p = 0.05$). In practice, the statistical equality of the group's means is verified by comparing the calculated statistics F (so-called F -value) with the tabulated critical values of F -distribution $F_{p(df1, df2)}$ on the appropriate degrees of freedom (df) and p values.

In order to investigate whether there is a statistically significant impact of temperature and the environmental pH on the degree of encapsulated drug release, a classical one-way analysis of variance (ANOVA) was used on the absorption spectra of liposomal systems 1–12. At first, we assumed in the null hypothesis H_0 that there is no statistical difference between the means of absorbance for liposomal complexes 1–12 in different environmental pH values, where $pH_1 = 5.5$, $pH_2 = 6.0$, $pH_3 = 6.5$, and $pH_4 = 7.4$ were recorded in a constant

temperature of $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The calculated F statistics (see Table S3 in the Supplementary Materials) for all of the analyzed liposomal systems were considerably larger (by at least a few orders of magnitude) with regard to the critical F -value ($F_{0.05(3,144)} = 3.144$) at a significance level of 0.05, indicating that the null hypothesis can be withdrawn and the alternative H_1 stating that there is an important environmental pH effect can be accepted simultaneously. In the next step, the dependences of absorbance measured for all 1–12 liposomal conjugates at a constant pH = 7.4 (physiological liquid) were analyzed in relation to different temperatures, T , where $T_1 = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $T_2 = 41\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. Similarly to the previous findings (see Table S4 in the Supplementary Materials), almost all calculated F -values were noticeably larger in comparison to the critical F statistics ($F_{0.05(1,72)} = 3.97$), revealing the statistical importance of temperature on the drug release process. Only in one case, probably due to the systematic error related to the spectrometer calibration process, the absorbance data were accidentally disrupted.

Overall, the influence of the surrounding pH and temperature on the drug release characteristics of liposomal conjugates 1–12 was statistically confirmed, which is in line with our experimental findings as well.

4. Conclusions

The provided empirical and statistical findings prove that the practical application of the mREV approach is appropriate for preparing stable liposome-based drug release systems with prospects to be therapeutically implemented. The modified methodology enabled the examination of the impact of temperature and pH on the leakage process of 9-PBThACl and DOX from $L_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$ liposomes. Moreover, the analysis of the interaction of the generated liposomes with human serum albumin was described. In order to evaluate the physicochemical properties of the liposomal structure $L_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$, the stability of the preparation and the release degree of encapsulated drugs were assessed. The process of encapsulation of the tested compounds in liposomes did not include the impact of HSA/dHSA. Encapsulation was analyzed in terms of the influence of the environmental pH on the final liposomal form of both 9-PBThACl and doxorubicin. The albumin used in the studies provides insights into the physiological conditions and processes that liposomes may undergo. According to data in the literature, albumin molecules partially penetrate the bilayer phospholipid, stimulating the release process of the tested compounds. The fact that both 9-PBThACl and DOX molecules bind with albumin after being released from liposomes is also meaningful. The analysis of the encapsulation degree in liposomes of 9-PBThACl and doxorubicin showed some competition between the studied molecules since relatively high values of encapsulation efficiency (EE%) were only observed for liposomal complexes containing one compound; for example, the $L_{\text{DPPC/9-PBThACl/DOX}}$ complex at pH = 7.40 was characterized by encapsulation that was approximately two times lower compared to the $L_{\text{DPPC/9-PBThACl}}$ and $L_{\text{DPPC/DOX}}$ systems.

The theoretical parameters of liposome-based drug leakage modeling were established based on six selected mathematical models (first-order, Bhaskas, Higuchi, Ritger–Peppas, Korsmeyer–Peppas, and an extension of the classical Freundlich model) implemented to describe the release characteristics of the prospective drug molecule (9-PBThACl) and to compare it with the marketed drug (doxorubicin). In this context, the influence of two temperature points ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $41\text{ }^{\circ}\text{C}$) and four pH values, including 5.5, 6.0, 6.50, and 7.4, were investigated in detail. It was revealed that the extension of the classical Freundlich model was characterized by the highest R^2_{adj} coefficient value. In contrast, the Higuchi model showed the lowest agreement with the empirical data, with R^2_{adj} values ranging from 0.05669 to 0.99391; however, a complete lack of agreement was recorded as well ($R^2_{\text{adj}} \approx 0$).

Not surprisingly, the obtained experimental and modeling data confirm the impact of the surrounding pH on the physicochemical profile of the produced liposomal complexes.

Moreover, the PCA and HCA revealed that the examined liposomal conjugates are generally clustered into two main groups. In general, DOX-containing liposomes compose the first group, while liposomes with the encapsulated 9-PBThACI molecule are clustered together. Finally, the impact of operational conditions (surrounding pH and temperature) on the drug release characteristics of liposomal conjugates was statistically confirmed by the ANOVA method, which is in line with our experimental findings as well.

The presented results include an in-depth characterization of the new liposomal system $L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}$, particularly the interactions of HSA molecules with the phospholipid bilayer, thus giving insights into the critical process of drug release from non-specific carriers such as liposomes. It was proven that albumin can directly bind to the surfaces of liposomes, influencing the stability and mechanical properties of their phospholipid bilayers. These interactions can lead to changes in the liposome structure, such as the destabilization of the bilayer and the increased permeability of the liposome membrane to the drug, which facilitates drug release.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics17020202/s1>, Table S1: Fitting parameters of 9-PBThACI/DOX release profiles from $[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]$:HSA liposomes in different kinetic models; Table S2: Fitting parameters of 9-PBThACI/DOX release profiles from $[L_{DPPC/9-PBThACI/DOX}]$:dHSA liposomes in different kinetic models; Table S3: Statistical parameters of ANOVA for 1–12 liposomal complexes in different environment pH values, where $pH_1 = 5.5$, $pH_2 = 6.0$, $pH_3 = 6.5$ and $pH_4 = 7.4$ recorded in the constant temperature $T = 37^\circ\text{C}$. Critical F -value at significance level of 0.05 is $F_{0.05(3,144)} = 3.144$; Table S4. Statistical parameters of ANOVA for 1–12 liposomal complexes in different temperatures $T_1 = 37$ and $T_2 = 41^\circ\text{C}$ recorded at the constant pH = 7.4 (physiological liquid). Critical F -value at significance level of 0.05 is $F_{0.05(1,72)} = 3.97$.

Author Contributions: Conceptualization, D.P., V.K., A.B. and J.J.; methodology, D.P., V.K., M.P.-H., A.S. and J.J.; software, A.B.; validation, D.P., V.K. and J.J.; formal analysis, A.Z. and A.B.; investigation, D.P., V.K., M.P.-H., A.Z. and A.S.; data curation, D.P. and A.B.; writing—original draft preparation, V.K., A.B. and J.J.; writing—review and editing, D.P. and A.B.; visualization, A.B.; project administration, V.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Medical University of Silesia in Katowice, Poland (Grant No. BNW-1-100/K/4/F).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Li, C.; Zhang, D.; Pan, Y.; Chen, B. Human serum albumin based nanodrug delivery systems: Recent advances and future perspective. *Polymers* **2023**, *15*, 3354. [\[CrossRef\]](#)
2. Gatto, M.S.; Johnson, M.P.; Najahi-Missaoui, W. Targeted liposomal drug delivery: Overview of the current applications and challenges. *Life* **2024**, *14*, 672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Nsairat, H.; Ibrahim, A.A.; Jaber, A.M.; Abdelghany, S.; Atwan, R.; Shalan, N.; Abdelnabi, H.; Odeh, F.; El-Tanani, M.; Alshaer, W. Liposome bilayer stability: Emphasis on cholesterol and its alternatives. *J. Liposome Res.* **2024**, *34*, 178–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Fulton, M.D.; Najahi-Missaoui, W. Liposomes in cancer therapy: How did we start and where are we now. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6615. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

5. Atre, P.; Rizvi, A.A.S. A brief overview of quality by design approach for developing pharmaceutical liposomes as nano-sized parenteral drug delivery systems. *RSC Pharm.* **2024**, *1*, 675–688. [\[CrossRef\]](#)
6. Zahednezhad, F.; Allahyari, S.; Sarfraz, M.; Zakeri-Milani, P.; Feyzizadeh, M.; Valizadeh, H. Liposomal drug delivery systems for organ-specific cancer targeting: Early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2024**, *21*, 1363–1384. [\[CrossRef\]](#)
7. Eugster, R.; Luciani, P. Liposomes: Bridging the gap from lab to pharmaceuticals. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2025**, *75*, 101875. [\[CrossRef\]](#)
8. Abboud, H.A.; Zelkó, R.; Kzsoki, A. A systematic review of liposomal nanofibrous scaffolds as a drug delivery system: A decade of progress in controlled release and therapeutic efficacy. *Drug Deliv.* **2025**, *32*, 2445259. [\[CrossRef\]](#)
9. Tao, H.; Wang, R.; Sheng, W.; Zhen, Y. The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *187*, 24–34. [\[CrossRef\]](#)
10. Al-Harathi, S.; Lachowicz, J.I.; Nowakowski, M.E.; Jaremko, M.; Jaremko, L. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *198*, 110716. [\[CrossRef\]](#)
11. Bhushan, B.; Khanadeev, V.; Khlebtsov, B.; Khlebtsov, N.; Gopinath, P. Impact of albumin-based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *246*, 13–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. di Masi, A. Human serum albumin: From molecular aspects to biotechnological applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4081. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439–446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. He, X.M.; Carter, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **1992**, *358*, 209–215. [\[CrossRef\]](#)
15. Olivieri, J.R.; Craievich, A.F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering. *Eur. Biophys. J.* **1995**, *24*, 77–84.
16. Ferrer, M.L.; Duchowicz, R.; Carrasco, B.; de la Torre, J.G.; Acuna, A.U. The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modelling study. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2422–2430. [\[CrossRef\]](#)
17. Zeeshan, F.; Madheswaran, T.; Panneerselvam, J.; Taliyan, R.; Kesharwani, P. Human serum albumin as multifunctional nanocarrier for cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110*, 3111–3117. [\[CrossRef\]](#)
18. Yamasaki, K.; Chuang, V.T.G.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5435–5443. [\[CrossRef\]](#)
19. Dreis, S.; Rothweiler, F.; Michaelis, M.; Cinatl, J., Jr.; Kreuter, J.; Langer, K. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2007**, *341*, 207–214. [\[CrossRef\]](#)
20. Onafuye, H.; Pieper, S.; Mulac, D.; Cinatl, J., Jr.; Wass, M.N.; Langer, K.; Michaelis, M. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles overcome transporter-mediated drug resistance in drug-adapted cancer cells. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2019**, *10*, 1707–1715. [\[CrossRef\]](#)
21. Ivanov, A.I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J.A.; Barnham, K.J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P.J. Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14721–14730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Park, C.R.; Kim, H.Y.; Song, M.G.; Lee, Y.S.; Youn, H.; Chung, J.K.; Cheon, G.J.; Kang, K.W. Efficacy and safety of human serum albumin-cisplatin complex in U87MG xenograft mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7932. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Qu, N.; Sun, Y.; Li, Y.; Hao, F.; Qiu, P.; Teng, L.; Xie, J.; Gao, Y. Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and evaluation. *Biomed. Eng. Online* **2019**, *18*, 11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Shen, Y.; Wang, M.; Wang, H.; Zhou, J.; Chen, J. Multifunctional human serum albumin fusion protein as a docetaxel nanocarrier for chemo-photothermal synergetic therapy of ovarian cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 19907–19917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Hawkins, M.J.; Soon-Shiong, P.; Desai, N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 876–885. [\[CrossRef\]](#)
26. Jackson, D.V.; Nichols, A.P.; Bender, R.A. Interaction of albumin and vincristine with a human lymphoblastic leukemia cell line in vitro. *Cancer Biochem. Biophys.* **1980**, *4*, 133–136.
27. Almond, B.A.; Hadba, A.R.; Freeman, S.T.; Cuevas, B.J.; York, A.M.; Detrisac, C.J.; Goldberg, E.P. Efficacy of mitoxantrone-loaded albumin microspheres for intratumoral chemotherapy of breast cancer. *J. Control. Release* **2003**, *91*, 147–155. [\[CrossRef\]](#)
28. Wang, W.; Sun, Q.; Gan, N.; Zhai, Y.; Xiang, H.; Li, H. Characterizing the interaction between methyl ferulate and human serum albumin by saturation transfer difference NMR. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 32999–33009. [\[CrossRef\]](#)
29. Xie, J.; Wang, J.; Niu, G.; Huang, J.; Chen, K.; Li, X.; Chen, X. Human serum albumin coated iron oxide nanoparticles for efficient cell labeling. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 433–435. [\[CrossRef\]](#)
30. Bychkova, A.V.; Yakunina, M.N.; Lopukhova, M.V.; Degtyarev, Y.N.; Motyakin, M.V.; Pokrovsky, V.S.; Kovarski, A.L.; Gorobets, M.G.; Retivov, V.M.; Khachatryan, D.S. Albumin-functionalized iron oxide nanoparticles for theranostics: Engineering and long-term in situ imaging. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2771. [\[CrossRef\]](#)

31. Pentak, D. Evaluation of the physicochemical properties of liposomes as potential carriers of anticancer drugs: Spectroscopic study. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 126. [\[CrossRef\]](#)
32. Pentak, D.; Ploch-Jankowska, A.; Zięba, A.; Kozik, V. The advances and challenges of liposome-assisted drug release in the presence of serum albumin molecules: The influence of surrounding pH. *Materials* **2022**, *15*, 1586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Spada, A.; Emami, J.; Tuszyński, J.A.; Lavasanifar, A. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 1862–1894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lee, J.; Choi, M.-K.; Song, I.-S. Recent advances in doxorubicin formulation to enhance pharmacokinetics and tumor targeting. *Pharmaceutics* **2023**, *16*, 802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Thakur, R.; Das, A.; Chakraborty, A. Interaction of human serum albumin with liposomes of saturated and unsaturated lipids with different phase transition temperatures: A spectroscopic investigation by membrane probe PRODAN. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 14335–14347. [\[CrossRef\]](#)
36. Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* **2014**, *10*, 853–858. [\[CrossRef\]](#)
37. Nitiss, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 338–350. [\[CrossRef\]](#)
38. Hershman, D.L.; McBride, R.B.; Eisenberger, A.; Tsai, W.Y.; Grann, V.R.; Jacobson, J.S. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3159–3165. [\[CrossRef\]](#)
39. Zięba, A.; Maślankiewicz, A.; Suwińska, K. 1-Alkyl-4-arylamino-quinolinium-3-thiolates and 7-alkyl-12H-quinol[3,4-b]-1,4-benzothiazinium salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *16*, 2947–2953. [\[CrossRef\]](#)
40. Zięba, A.; Kozik, V.; Suwinska, K.; Kawulok, A.; Pluta, T.; Jampilek, J.; Bak, A. Synthesis and structure of 5-methyl-9-(trifluoromethyl)-12H-quinol[3,4-b]-1,4-benzothiazinium chloride as anticancer agent. *Molecules* **2024**, *29*, 4337. [\[CrossRef\]](#)
41. Zięba, A.; Latocha, M.; Sochanik, A.; Nycz, A.; Kuśmierz, D. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel phenylring-substituted 5-alkyl-12H-quinol[3,4-b]-1,4-benzothiazine derivatives. *Molecules* **2016**, *21*, 1455. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zięba, A.; Sochanik, A.; Szurko, A.; Rams, M.; Mrozek, A.; Cmoch, P. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of 5-alkyl-12H-quinol[3,4-b]-1,4-benzothiazinium salts. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4733–4739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Szoka, F., Jr.; Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, *9*, 467–508. [\[CrossRef\]](#)
44. Kozik, V.; Pentak, D.; Paździor, M.; Zięba, A.; Bak, A. From design to study of liposome-driven drug release part 1: Impact of temperature and pH on environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11686. [\[CrossRef\]](#)
45. Jin, Y.; Li, M.; Hou, X. Pyrocatechol violet as a marker to characterize liposomal membrane permeability using the chelation and the first-order derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 379–382. [\[CrossRef\]](#)
46. Pentak, D.; Maciazek-Jurczyk, M.; Zawada, Z.H. The role of nanoparticles in the albumin-cytarabine and albumin-methotrexate interactions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *73*, 388–397. [\[CrossRef\]](#)
47. Siepmann, J.; Siepmann, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 351–362. [\[CrossRef\]](#)
48. Pentak, D.; Maciazek-Jurczyk, M. Self-assembled nanostructures formed by phospholipids and anticancer drugs. Serum albumin-nanoparticle interactions. *J. Mol. Liq.* **2016**, *224*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
49. Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **1987**, *5*, 23–36. [\[CrossRef\]](#)
50. Alavi, S.E.; Alharthi, S.; Alavi, S.Z.; Raza, A.; Ebrahimi Shahmabadi, H. Bioresponsive drug delivery systems. *Drug Discov. Today* **2024**, *29*, 103849. [\[CrossRef\]](#)
51. Taylor, K.; Morris, R.M. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochim. Acta* **1995**, *248*, 289–3012. [\[CrossRef\]](#)
52. Smith, M.C.; Crist, R.M.; Clogston, J.D.; Mcneil, S.E. Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 5779–5787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Herbowski, L.; Gurgul, H.; Staron, W. Experimental determination of the Stern layer thickness at the interface of the human arachnoid membrane and the cerebrospinal fluid. *Z. Med. Phys.* **2009**, *19*, 189–192. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Maja, L.; Željko, K.; Mateja, P. Sustainable technologies for liposome preparation. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *165*, 104984. [\[CrossRef\]](#)
55. Empel, A.; Bak, A.; Kozik, V.; Latocha, M.; Cizek, A.; Jampilek, J.; Suwinska, K.; Sochanik, A.; Zięba, A. Towards property profiling: Synthesis and SAR probing of new tetracyclic diazaphenothiazine analogues. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12826. [\[CrossRef\]](#)
56. Kisiel-Nawrot, E.; Latocha, M.; Bak, A.; Kozik, V.; Jampilek, J.; Zięba, A. Anticancer efficacy of antibacterial quinobenzothiazines. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 2886. [\[CrossRef\]](#)
57. Bertinetto, C.; Engel, J.; Jansen, J. ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *6*, 100061. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.