

Autoreferat

(Załącznik 4a)

do cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych **H1–H12**,
pt. „Fizykochemiczne badania wybranych makromolekularnych nośników
leków przeciwnowotworowych”.

dr Adam Buczkowski

Katedra Chemii Fizycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Łódzki

Łódź 2022

1. **Imię i nazwisko:** Adam Buczkowski
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
 - 1) Magister w dyscyplinie nauki chemiczne, 2008, Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii
 - 2) Doktor w dyscyplinie nauki chemiczne, 2012, Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii,
tytuł rozprawy doktorskiej: „Oddziaływanie kationowego dendrymeru PAMAM G4 z wybranymi lekami oraz składnikami płynów ustrojowych”
3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

Od 01.10.2012 r. adiunkt naukowo – dydaktyczny w Katedrze Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.
4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.**

Zgłaszaniem osiągnięciem naukowym jest cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych **H1–H12**, pt. **„Fizykochemiczne badania wybranych makromolekularnych nośników leków przeciwnowotworowych”**.

W skład cyklu wchodzi artykuły **H1–H12** opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

- H1.** **Adam Buczkowski***, Tomasz Olesinki, Elzbieta Zbicinska, Pawel Urbaniak, Bartlomiej Palecz
International Journal of Pharmaceutics 490 (2015) 102 – 111
“Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH₂ and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution”
*autor korespondencyjny
IF(2015)=**3.994** **100 pkt** MEiN (2021)

- H2.** Adam Buczkowski*, Dariusz Waliszewski, Pawel Urbaniak, Bartłomiej Palecz
International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 1 – 13
“Study of the interactions of PAMAM G3-NH₂ and G3-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solutions”
 *autor korespondencyjny
 IF(2016)=**3.649** **100 pkt** MEiN (2021)
- H3.** Adam Buczkowski*, Pawel Urbaniak, Henryk Piekarski, Bartłomiej Palecz*
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 171 (2017) 401–405
“Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction between PAMAM G4-OH and 5-fluorouracil in aqueous solutions”
 *autorzy korespondencyjni
 IF(2017)=**2.880** **140 pkt** MEiN (2021)
- H4.** Adam Buczkowski*, Artur Stepniak, Pawel Urbaniak, Bartłomiej Palecz
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 134 (2018) 595-607
“Calorimetric and spectroscopic investigations of interactions between cucurbituril Q7 and gemcitabine in aqueous solutions”
 *autor korespondencyjny
 IF(2018)=**2.471** **100 pkt** MEiN (2021)
- H5.** Adam Buczkowski*, Bartłomiej Palecz, Grzegorz Schroeder
Journal of Molecular Structure 1178 (2019) 554-563
“Stoichiometry and thermodynamics of gemcitabine and cucurbituril Q7 supramolecular complexes in high acidic aqueous solution”
 *autor korespondencyjny
 IF(2019)=**2.463** **70 pkt** MEiN (2021)
- H6.** Adam Buczkowski*, Paweł Tokarz, Artur Stepniak, Jarosław Lewkowski, Aleksandra Rodacka, Bartłomiej Palecz
Journal of Molecular Liquids 290 (2019) 111190
“Spectroscopic and calorimetric studies of interactions between mitoxantrone and cucurbituril Q7 in aqueous solutions”
 *autor korespondencyjny
 IF(2019)=**5.065** **100 pkt** MEiN (2021)
- H7.** Adam Buczkowski*, Michał Gorzkiewicz, Artur Stepniak, Małgorzata Malinowska-Michalak, Paweł Tokarz, Paweł Urbaniak, Maksim Ionov, Barbara Klajnert-Maculewicz, Bartłomiej Palecz
Bioorganic Chemistry 99 (2020) 103843
*“Physicochemical and in vitro cytotoxicity studies of inclusion complex between gemcitabine and cucurbit[7]uril host”, *autor korespondencyjny*
 IF(2020)=**5.275** **100 pkt** MEiN (2021)

- H8.** Adam Buczkowski*, Małgorzata Malinowska-Michalak, Bayarmaa Erdenebayar, Bartłomiej Palecz*
Journal of Molecular Liquids 313 (2020) 113534
“Spectroscopic, electrochemical and calorimetric studies on the interactions of poly(propyleneimine) G4 dendrimer with 5-fluorouracil in aqueous solutions”
*autorzy korespondencyjni
IF(2020)=**6.165** **100 pkt** MEiN (2021)
- H9.** Adam Buczkowski*, Paweł Tokarz, Bartłomiej Palecz
Journal of Chemical Thermodynamics 153 (2021) 106317
“Thermodynamic study of ethanol impact on gemcitabine binding to cucurbit[7]uril in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
IF(2020)=**3.178** **100 pkt** MEiN (2021)
- H10.** Adam Buczkowski*, Małgorzata Malinowska-Michalak, Artur Stepniak, Paweł Tokarz, Paweł Urbaniak, Bartłomiej Palecz
Journal of Molecular Liquids 334 (2021) 116118
“Calorimetric and spectroscopic studies of interactions of PPI G4 dendrimer with tegafur in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
IF(2020)=**6.165** **100 pkt** MEiN (2021)
- H11.** Adam Buczkowski*, Justyna Dominikowska, Paweł Urbaniak, Paweł Tokarz, Maria Guć, Grzegorz Schroeder
Journal of Molecular Liquids 336 (2021) 116347
“Doubly or triply protonated? Complexes of cucurbit[n]urils (n=6–8) with a tripodal ligand tris(2-aminoethyl)amine (TREN)”
*autor korespondencyjny
IF(2020)=**6.165** **100 pkt** MEiN (2021)
- H12.** Adam Buczkowski*
Journal of Molecular Liquids 345 (2022) 117857
“Thermodynamic study of pH and sodium chloride impact on gemcitabine binding to cucurbit[7]uril in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
IF(2020)=**6.165** **100 pkt** MEiN (2021)

Informacje naukometryczne o cyklu publikacji H1–H12.

Parametr naukometryczny	Publikacje H1–H12
Sumaryczny IF publikacji (zgonie z rokiem opublikowania)	53.635
Suma punktów MNIe (wg wykazu z 2021 r.)	1210 pkt
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest pierwszym autorem	11
Liczba monoautorskich publikacji wnioskodawcy	1
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest autorem korespondencyjnym	12

Merytoryczne ujęcie przedmiotowych osiągnięć
w cyklu publikacji pt. „Fizykochemiczne badania wybranych makromolekularnych nośników leków przeciwnowotworowych”

Wstęp

Leki przeciwnowotworowe (cytostatyki, leki cytostatyczne) to grupa aktywnych biologicznie związków używanych w chemioterapii nowotworów, działających toksycznie na ulegające szybkim podziałom komórki nowotworowe. Cytostatyki zaburzają cykl komórkowy i powodują śmierć komórki lub zahamowanie jej rozwoju i podziałów. Niestety leki te uszkadzają także szybko dzielące się, prawidłowe komórki pacjenta, stąd występują częste skutki uboczne, takie jak: anemia, nudności i wymioty oraz łysienie. Jedną ze strategii obniżania toksyczności leków przeciwnowotworowych jest związanie ich w supramolekularny kompleks z makrocząsteczką nano-przenośnika. Powolne uwalnianie cząsteczek leku z kompleksu powoduje wydłużenie czasu jego krążenia w ustroju, co przedłuża czas jego działania i pozwala podawać lek w większych odstępach czasu. Makrocząsteczka gospodarza ponadto częściowo osłania związany lek, ochraniając go przed degradującym wpływem środowiska zewnętrznego. Makrocząsteczki nośników mogą być dodatkowo modyfikowane chemicznie przez podstawienie specyficznymi grupami funkcyjnymi, które czynnie nakierowują (ang. active targeting) nośnik i tym samym związany z nim ligand–lek do miejsca jego docelowego działania – zmienionej nowotworowo tkanki. O powinowactwie nano-nośnika do cząsteczki leku wciąż jednak często decydują oddziaływania leku z wnęką makrocząsteczki, co pozwala na wykorzystanie podstawowych (niemodyfikowanych powierzchniowo) makromolekuł jako modeli pozwalających wnioskować o oddziaływaniach w bardziej złożonych układach.

Funkcję nośników (supramolekularnych gospodarzy) mniejszych cząsteczek ligandów (supramolekularnych gości) mogą pełnić makromolekuły o różnej strukturze, w tym silnie rozgałęzione makrocząsteczki dendrymerów zdolne transportować wiele cząsteczek liganda oraz szeroka grupa związków makrocyclicznych, między innymi kukurbiturile, w których

wnękach można zamykać (inkludować) i stabilizować ligandy lub ich grupy funkcyjne. Charakter wnęki makrocyklu (rozmiar, rozkład ładunków cząstkowych i charakter hydrofilowo–hydrofobowy) determinuje powinowactwo makrocyklu do konkretnych grup cząsteczek ligandów o komplementarnym charakterze i rozmiarze. Wybrane przeze mnie do badań, oprócz dendrymerów, makrocykle kukurbiturili, posiadają wnęki o wejściach zbudowanych ze spolaryzowanych ujemnie grup karbonylowych. Taka budowa kukurbiturili powoduje, że związki te silnie wiążą cząsteczki gości, które oprócz komplementarnego do wnęki rozmiaru zawierają w swej strukturze centrum kationowe, stabilizowane po inkluzji grupami karbonylowymi makrocyklu. Zatem, oba wybrane przeze mnie do badań typy makrocząsteczek, dendrymery oraz kukurbiturile, istotnie różnią się budową przestrzenną i właściwościami i zostaną krótko przedstawione w kolejnym punkcie.

Wybór obiektów badań: dendrymery, kukurbiturile i ich ligandy

Do badań wybrałem wspomniane wyżej dendrymery i kukurbiturile. Taki dobór obiektów badań umożliwił zbadanie wpływu rozmiaru makrocząsteczek i rodzaju występujących w nich miejsc aktywnych uczestniczących w wiązaniu ligandów, w szczególności wpływu grup funkcyjnych na proces kompleksowania wybranych do badań leków i modelowych związków. Tego rodzaju badania dotyczące termodynamicznej charakterystyki układów supramolekularnych są obecnie w centrum zainteresowań badaczy, o czym świadczy: i) liczba publikacji poświęconych tematyce chemii supramolekularnej, ii) liczba cytowań moich prac, iii) opublikowanie jako współautor rozdziału w monografii wydawnictwa Springer, której część (strony 192-195, 199-210, 210-213 w publikacji [1]), w sposób syntetyczny ujmuje uzyskane przeze mnie wyniki badań termodynamicznych oddziaływań dendrymerów PAMAM i PPI jako nośników leków przeciwnowotworowych, a także iv) uzyskanie finansowania części tych badań z dwóch krajowych grantów, którymi kierowałem: Preludium (NCN) i Iuventus Plus (MNiSW) oraz z grantu Opus (NCN), w którym uczestniczyłem w charakterze wykonawcy.

Dendrymery (ang. dendrimer, z gr. dendron – drzewo oraz meros – część, udział) to grupa oligomerów o specyficznej, wysoce uporządkowanej, rozgałęzionej strukturze molekularnej, w której powtarzają się mery poszczególnych warstw (generacji) w sposób przypominający strukturę drzew lub fraktali. W makrocząsteczce typowego dendrymeru można wyróżnić rdzeń oraz odchodzące od niego gałęzie (dendrony) zbudowane z warstw merów poszczególnych pokoleń (generacji).

Przykładem makrocząsteczek tego typu są komercyjnie dostępne dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) o rdzeniu etylenodiaminy (EDA) i aminowych lub hydroksylowych grupach powierzchniowych oraz prostsze w budowie (w porównaniu z PAMAM) ze względu na brak grup amidowych dendrymery polipropylenoiminowe (PPI), o rdzeniu diaminobutanu (DAB) i powierzchniowych pierwszorzędowych (1°) grupach aminowych. Dendrymery PPI i PAMAM tej samej generacji i o jednakowej wartościowości diaminowego rdzenia posiadają równoważną liczbę wewnętrznych trzeciorzędowych (3°) grup aminowych oraz grup terminalnych [2]. Dla makrocząsteczek dendrymerów PAMAM o rdzeniu EDA i makrocząsteczek dendrymerów PPI o rdzeniu DAB wraz ze wzrostem

generacji G liczba grup funkcyjnych wzrasta wykładniczo (Tabela 1). Wraz ze wzrostem generacji trójwymiarowa struktura makrocząsteczek dendrymerów staje się bardziej globularna.

Tabela 1. Liczby grup funkcyjnych wewnętrznych i powierzchniowych (terminalnych) występujących w makromolekułach dendrymerów PAMAM o rdzeniu etylenodiaminy (EDA) i PPI o rdzeniu diaminobutanu (DAB) generacji G3, G4 i G5.

Typ dendrymeru	PAMAM o rdzeniu EDA			PPI o rdzeniu DAB	
	Generacja dendrymeru	Liczba wewnętrznych 3° grup aminowych	Liczba grup amidowych	Liczba grup terminalnych (1° aminowych lub hydroksylowych)	Liczba wewnętrznych 3° grup aminowych
3	30	60	32	30	32
4	62	124	64	62	64
5	126	252	128	126	128

Dendrymery typu PAMAM i PPI jako poliaminy wykazują w roztworach wodnych charakter kationowy (wskutek protonowania grup aminowych) i zdolność do naruszania struktury błon biologicznych, co pozwala wykorzystać je do wprowadzania do komórek cząsteczek ligandów (np. leku lub fragmentu materiału genetycznego). Do badań wybrałem makrocząsteczki dendrymerów o rdzeniu EDA typu PAMAM-NH₂ (z terminalnymi grupami aminowymi) i PAMAM-OH (z terminalnymi grupami hydroksylowymi) generacji G3, G4 i G5. Wykonałem także badania dla prostszego (brak grup amidowych) dendrymeru PPI-NH₂ o rdzeniu DAB generacji G4 jako związku porównawczego.

Kukurbiturile Q_n (ang. cucurbiturils, z łac. cucurbitacea – dyniowate) są makrocząsteczkami o dyniowatym kształcie zbudowanymi z n reszt glikolurilowych połączonych 2 n grupami metylenowymi. Homologi o liczbie reszt glikolurilu $n = 6-8$ posiadają względnie sztywną strukturę, w której można wyróżnić hydrofobową wnękę i prowadzące do niej dwa hydrofilowe portale utworzone przez grupy ureidowe [3, 4]. Do badań wybrałem siedmioczłonowy kukurbituril (Q7), który lepiej rozpuszcza się w wodzie niż homologi o parzystej liczbie reszt glikolurilowych Q6 i Q8. Kukurbituril Q7 wykazuje niską toksyczność własną [5] i inkluduje kationowe ligandy, w tym sprotonowane aminy aromatyczne. Makrocząsteczki Q7 mogą więc znaleźć zastosowanie jako nano-transportery kationowych leków, osłaniające swój ładunek-lek przez degradacją i wydłużające czas jego krążenia w organizmie [6, 7] oraz ułatwiające jego wniknięcie do komórek [6-10].

Dobór konkretnych makrocząsteczek przenośników zależy od właściwości fizykochemicznych cząsteczek leku, w szczególności od ich ładunku, charakteru kwasowo-zasadowego i hydrofilowo-hydrofobowego. Ligandami, które wybrałem do badań były leki przeciwnowotworowe: 5-fluorouracyl, tegafur, gemcytabina i mitoksantron. Oprócz leków w charakterze modelowego liganda, wybrałem także niebędącą lekiem trójramienną (tridentną) tris(2-aminoetylo)aminę (TREN). Jako nośniki dla 5-fluorouracylu, będącego lekiem przeciwnowotworowym o słabych właściwościach kwasowych wybrałem dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) wykazujące w roztworach wodnych charakter kationowy, które zawierają w swej strukturze zarówno grupy aminowe jak i amidowe. Badania te

wykonałem dla dwóch typów makromolekuł PAMAM trzech generacji G3–G5 odpowiednio zakończonych aminowymi (PAMAM-NH₂) lub hydroksylowymi (PAMAM-OH) grupami terminalnymi.

By ustalić wpływ grup aminowych w makrocząsteczkach dendrymeru PAMAM na proces wiązania 5-fluorouracylu wykonałem również badania fizykochemiczne o charakterze porównawczym dla dendrymeru polipropylenoiminowego (PPI-NH₂) generacji G4 o prostszej niż PAMAM budowie. Makromolekuły PPI-NH₂ zawierają równoważną względem PAMAM-NH₂ tej samej generacji liczbę grup aminowych, lecz nie występują w nich grupy amidowe. Dla dendrymeru PPI-NH₂ G4 oprócz badań kompleksowania 5-fluorouracylu przeprowadziłem również badania z jego pochodną – tegafurem, który (w formie racemicznej) jest stosowany jako prolek 5-fluorouracylu, a z fizykochemicznego punktu widzenia wykazuje silniejsze właściwości hydrofobowe (współczynnik podziału n-oktanol/woda $P = 0.33 \pm 0.01$ [11], 0.54 [12]) w porównaniu z 5-fluorouracylem ($P = 0.11 \pm 0.01$ [11], 0.13 [12]), ze względu na obecny w cząsteczce tegafuru podstawnik tetrahydrofuranowy.

Funkcję nośnika dla kationowych leków mogą natomiast pełnić makromolekuły zawierające ujemnie spolaryzowane grupy funkcyjne, w szczególności makrocykle kukurbiturili (Q). Do badań wybrałem dwa leki przeciwnowotworowe: i) gemcytabinę będącą słabą monoprotową zasadą, ii) mitoksantron będący słabą wieloprotową dwuramienną (didentną) zasadą oraz dodatkowo jako polikationowy tridentny ligand porównawczy (niebędący lekiem) tris(2-aminoetylo)aminę (TREN). Dla aminy TREN wykonałem badania oddziaływań nie tylko z kukurbiturylem Q7, ale również z homologami Q6 i Q8 w środowisku 50% kwasu mrówkowego, umożliwiające rozpuszczenie trudnorozpuszczalnych w wodzie kukurbiturili Q6 i Q8.

Cel badań

Celem badań było ustalenie mechanizmu procesu kompleksowania wybranych leków przeciwnowotworowych z makrocząsteczkami dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5, PPI-NH₂ G4 oraz kukurbiturilu Q7 w środowisku wodnym. Charakterystyka ta obejmowała w szczególności zbadanie stechiometrii i energetyki (entalpii, entropii i entalpii swobodnej Gibbsa) wiązania (kompleksowania) liganda (cząsteczki leku) przez supramolekularny receptor (makrocząsteczkę dendrymeru lub kukurbiturilu), jak również wyznaczenie stałych tworzenia powstałych kompleksów. Realizacja celu badań obejmowała dwa zadania badawcze, wyodrębnione ze względu na typ badanych makromolekuł.

Pierwszym zadaniem badawczym była charakterystyka oddziaływań ligand – dendrymer, w szczególności określenie wpływu generacji makrocząsteczek, wpływu ilości i rodzaju grup terminalnych (aminowych lub hydroksylowych) na powinowactwo tych makromolekuł do leków, cząsteczek słabych kwasów.

Kolejnym zadaniem badawczym była charakterystyka oddziaływań ligand – kukurbituril Q7, w szczególności określenie wpływu składu roztworu (pH, stężenia chlorku sodu i/lub etanolu w wodnych roztworach) na równowagę inkludowania kationowego liganda

– gemcytabiny oraz polikationowego liganda – mitoksantronu we wnęce Q7. Określono również wpływ wielkości makrocyklu na proces tworzenia kompleksów inkluzyjnych modelowego tridentnego polikationowego liganda (niebędącej lekiem poliaminy TREN) we wnękach trzech kukurbiturili Q6, Q7 i Q8 w roztworze 50% kwasu mrówkowego, umożliwiającemu rozpuszczenie badanych kukurbiturili.

Badania termodynamiczne oddziaływań supramolekularnych w roztworach wymagają użycia odczynników o wysokim stopniu czystości. Potrzebne odczynniki pozyskane zostały ze źródeł komercyjnych (Sigma-Aldrich, SymoChem, Molekula, Toronto Research Chemicals), stopień czystości odczynników określono metodami spektralnymi.

Dobór technik eksperymentalnych do badań poszczególnych układów receptor (PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3-G5, PPI-NH₂ G4, kukurbituril Q7)–ligand (lek lub modelowy związek) wynikał z ich specyficznych właściwości. Do realizacji zamierzonego celu użyłem następujących technik eksperymentalnych: pomiarów rozpuszczalności ligandów w roztworach makromolekuły, pomiarów techniką dializy równowagowej mieszanin makromolekuły i jej liganda (leku), miareczkowania ¹H NMR, miareczkowania spektroskopowego w zakresie UV, pomiarów spektrometrii mas z elektrorozpyleniem (ESI MS), miareczkowania fluorymetrycznego oraz izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC). Dodatkowo zbadałem techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC wpływ kukurbiturilu Q7 oraz jego kompleksu z gemcytabiną na strukturę modelowych błon fosfolipidowych w liposomach.

Oznaczenia rozpuszczalności, dializy równowagowe, miareczkowania spektroskopowe w zakresie UV, izotermiczne miareczkowania kalorymetryczne (ITC) oraz pomiary techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC zostały przeprowadzone w Katedrze Chemii Fizycznej UŁ. Pomiary techniką ¹H NMR zostały przeprowadzone w Pracowni Spektroskopii Molekularnej Katedry Chemii Organicznej UŁ. Miareczkowania fluorymetryczne zostały przeprowadzone w Katedrze Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ. Pomiary techniką spektrometrii mas ESI MS zostały przeprowadzone w dwóch ośrodkach: w Pracowni Spektroskopii Molekularnej Katedry Chemii Organicznej UŁ (wyniki w pracy [H4]) oraz podczas staży badawczych w Zakładzie Chemii Supramolekularnej na Wydziale Chemii w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (wyniki w pracach [H5], [H11] oraz [H12]).

Metody analizy danych eksperymentalnych

Metoda analizy wyników pomiarów rozpuszczalności liganda w roztworach dendrymeru

Zależność rozpuszczalności liganda (leku) w roztworach dendrymeru o wzrastającym stężeniu ma przebieg prostoliniowy i była opisywana metodą regresji liniowej w celu wyznaczenia jej współczynnika kierunkowego wyrażającego średnią liczbę cząsteczek liganda (leku) wiązanych przez makrocząsteczkę badanego dendrymeru w warunkach dużego nadmiaru liganda.

Metody analizy wyników pomiarów dializ równowagowych mieszanin makromolekuly i liganda

Pomiary techniką dializy równowagowej (dializer Harvard Apparatus, USA) umożliwiają wyznaczenie rozkładu stężenia liganda (leku) pomiędzy roztwór makromolekuł o stałym stężeniu r i fazę wodną, rozdzielone błoną nieprzepuszczalną dla makromolekuł, ale przepuszczalną dla cząsteczek liganda. Technika ta pozwala oznaczyć przebieg izotermy wiązania $b(f)$ czyli zależność liczby moli związanego liganda na mol receptora od składu roztworu (np. stężenia wolnego liganda f). Otrzymane izotermy były analizowane metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej w celu wyznaczenia parametrów wiązania wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych (Równanie 1 w pracy [H2]) oraz model dwóch rodzajów miejsc aktywnych.

W modelu dwóch rodzajów miejsc aktywnych w makromolekule o liczbie miejsc aktywnych pierwszego rodzaju n_1 wiążących ligand ze stałą K_1 oraz liczbie miejsc aktywnych drugiego rodzaju n_2 wiążących ligand ze stałą K_2 izotermę wiązania opisuje równanie dwuhyperboliczne [13, 14]:

$$b = \frac{n_1 K_1 f}{1 + K_1 f} + \frac{n_2 K_2 f}{1 + K_2 f} \quad (1)$$

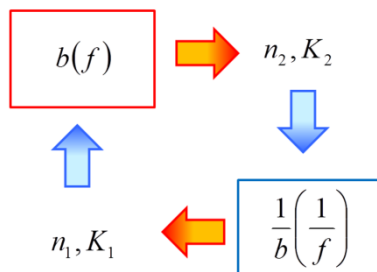
Równanie (1) można przedstawić w układzie dwukrotnie odwrotnie proporcjonalnym w postaci zwanej równaniem Scatcharda-Klotza [14]:

$$\frac{1}{b} = \frac{\left(\frac{1}{f}\right)^2 + (K_1 + K_2)\left(\frac{1}{f}\right) + K_1 K_2}{(n_1 K_1 + n_2 K_2)\left(\frac{1}{f}\right) + K_1 K_2 (n_1 + n_2)} \quad (2)$$

Każde z równań (1) i (2) nie pozwala precyzyjnie wyznaczyć czterech parametrów n_1, K_1, n_2 i K_2 , ponieważ błąd dopasowania metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej przekracza wartość wyznaczonych tak parametrów dla jednej (z dwóch) populacji miejsc. Zauważyłem, że przebieg funkcji zdefiniowanych równaniem (1) jest szczególnie wrażliwy na zmianę parametrów wiązania liganda przez miejsca aktywne o mniejszym powinowactwie, np. n_2, K_2 , natomiast przebieg funkcji zdefiniowanej równaniem (2) jest szczególnie wrażliwy na zmianę parametrów wiązania liganda przez miejsca aktywne o wyższym powinowactwie, np. n_1, K_1 . W celu dokładnego wyznaczenia wartości parametrów wiązania liganda z makromolekułą posiadającą dwa rodzaje miejsc aktywnych wykorzystałem opracowaną przez nas [15] specjalnie w tym celu metodę sprzężonych regresji dwuparametrowych, w której wykonywałem wielokrotnie dwie regresje wieloparametrowe z równaniami (1) i (2) domkniętymi w cykl (Rys. 1).

W metodzie sprzężonych regresji dwuparametrowych parametry wiązania liganda z miejscami o niskim powinowactwie (n_2, K_2) oblicza się wykorzystując równanie dwuhyperboliczne (1) traktując parametry wiązania z miejscami o wyższym powinowactwie (n_1, K_1) jako stałe. Analogicznie parametry wiązania liganda z miejscami o wyższym

powinowactwie (n_1, K_1) obliczane są wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (2) traktując parametry wiązania z miejscami o niższym powinowactwie (n_2, K_2) jako stałe. Zazwyczaj po kilku cyklach iteracyjnych można wówczas otrzymać uzbieżnione (względem obu regresji dwuparametrowych) wartości czterech parametrów wiązania (n_1, K_1, n_2, K_2) [15].



Rys. 1. Schemat obiegu danych wejściowych (parametry ustalone) i wyjściowych (parametry udokładniane) w cyklu sprzężonych regresji dwuparametrowych [15].

Metody analizy wyników miareczkowania ^1H NMR, miareczkowania spektroskopowego UV oraz miareczkowania spektrofluorymetrycznego

Zmiany położenia pików na widmach różnych użytych technik spektroskopowych w funkcji składu miareczkowanego roztworu opisywałem metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych, wyliczając liczbę miejsc aktywnych n w makromolekule oraz stałą wiązania K liganda z miejscem aktywnym makromolekuły. W przypadku niektórych układów ze względu na trudność wyznaczenia parametru n metodą wieloparametrowej regresji, ustalałem wartość tego parametru na podstawie wyników uzyskanych inną techniką eksperymentalną (np. metodą dializy równowagowej). Zmiany przesunięcia chemicznego protonów $\Delta\delta$ na widmie ^1H NMR podczas miareczkowania opisywałem równaniem (Równanie 4 w publikacji [H2]) [16, 17]. Zmiany absorbancji ΔA gemcytabiny wskutek kompleksowania z kukurbiturylem opisywałem równaniem (Równanie 1 w publikacji [H7]) [18-20]. Wyniki miareczkowania spektrofluorymetrycznego roztworu liganda roztworem makromolekuły (kukurbiturilu) opisywałem równaniem (Równanie 4 w publikacji [H6]).

Metoda analizy wyników izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego

Wyznaczony techniką ITC entalpogram efektów cieplnych wiązania liganda przez makromolekułę w funkcji składu miareczkowanego roztworu opisywałem równaniem (Równanie 5 w publikacji [H2]), wyliczając liczbę miejsc aktywnych w makromolekule n , stałą równowagi K oraz standardową entalpię ΔH wiązania liganda z miejscem aktywnym makromolekuły. Następnie obliczałem standardową entalpię swobodną ΔG i entropię ΔS .

Ze względu na dynamiczny charakter pomiarów ITC uzyskiwane tą techniką stałe równowagi K mogą mieć wyższą wartość, a liczba oznaczonych miejsc aktywnych w makromolekule może być niższa w porównaniu z rozwiązaniami uzyskiwanymi technikami statycznymi (jak pomiary rozpuszczalności, dializa równowagowa czy miareczkowanie

¹H NMR). Wynika to przede wszystkim ze względnie krótkiego czasu (około kilkunastu minut) pomiędzy kolejnymi nastrzyknięciami roztworu titranta oraz złożoną, rozbudowaną strukturą makromolekuł, np. dendrymerów, utrudniającą dostęp do głębiej położonych w strukturze i/lub słabiej oddziałujących miejsc aktywnych [H1, H3].

Wyniki badań eksperymentalnych oddziaływań dendrymerów z lekami przeciwnowotworowymi

Wyniki spektroskopowych badań rozpuszczalności 5-fluorouracylu w roztworach dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru w roztworach dendrymeru PPI-NH₂ G4

Dla układów dendrymer–ligand została oznaczona spektroskopowo (w zakresie UV) rozpuszczalność ligandów (wyrażona w jednostkach stężenia molowego) w roztworach makromolekuł dendrymerów o wzrastającym stężeniu od 0 do 100 μM. Uzyskane wyniki dla 5-fluorouracylu [H1, H2, H3] wskazują na w przybliżeniu liniowy wzrost rozpuszczalności tego leku wraz ze wzrostem stężenia makromolekuł badanych dendrymerów i pozwalają wyliczyć średnią liczbę cząsteczek leku wiązanych przez makrocząsteczkę badanego dendrymeru. Uzyskane wyniki (Tabela 2) wskazują, że wzrost generacji od G3 do G5 dendrymerów PAMAM-NH₂ jak i PAMAM-OH powoduje wzrost liczby wiązanych przez dendrymer cząsteczek 5-fluorouracylu, co wynika ze wzrostu liczby dostępnych miejsc aktywnych (grup funkcyjnych) w strukturze dendrymerów kolejnych generacji.

Tabela 2. Wyznaczone z pomiarów rozpuszczalności liczby wiązanych cząsteczek 5-fluorouracylu (5-FU) przez makrocząsteczki dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru (TF) przez makrocząsteczki dendrymeru PPI-NH₂ G4.

Dendrymer	Ligand	n	Ref.
PAMAM-NH ₂ G3	5-FU	30 ± 15	[H2]
PAMAM-NH ₂ G4		75 ± 15	[H3]
PAMAM-NH ₂ G5		100 ± 10	[H1]
PAMAM-OH G3	5-FU	5 ± 4	[H2]
PAMAM-OH G4		12 ± 5	[H3]
PAMAM-OH G5		30 ± 20	[H1]
PPI-NH ₂ G4	5-FU	46 ± 1	[H8]
PPI-NH ₂ G4	TF	63 ± 2	[H10]

Makrocząsteczki kationowego dendrymeru PAMAM-NH₂ danej generacji wiążą więcej cząsteczek 5-fluorouracylu w porównaniu z hydroksylowym dendrymerem PAMAM-OH tej samej generacji (Tabela 2). Wskazuje to na istotny wkład w proces wiązania 5-fluorouracylu

z dendrymerami PAMAM-NH₂ oddziaływań elektrostatycznych, pomiędzy protonowanymi grupami aminowymi makrocząsteczek dendrymerów a spolaryzowanymi i wykazującymi anionowy charakter cząsteczkami 5-fluorouracylu.

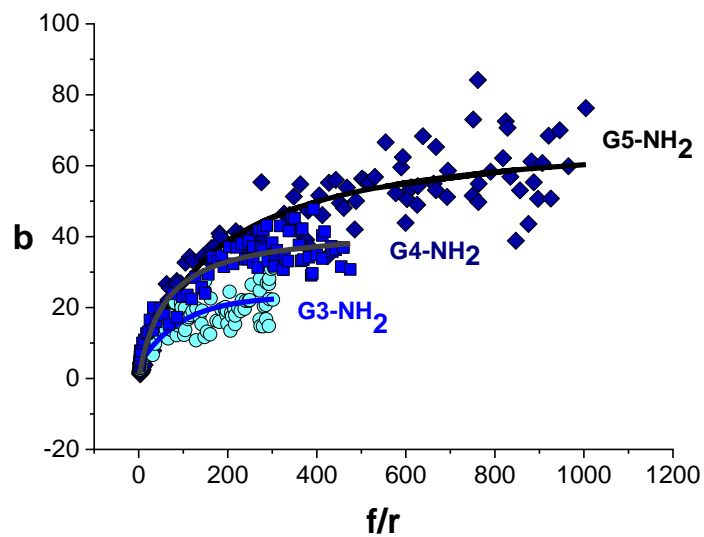
By wyciągnąć wnioski o wpływie struktury makromolekuł dendrymerów na proces wiązania 5-fluorouracylu zostały wykonane również pomiary rozpuszczalności 5-fluorouracylu w wodnych roztworach o wzrastającym stężeniu dendrymeru polipropylenoiminowego (PPI-NH₂) generacji G4 o prostszej budowie, którego makromolekuły zawierają równoważną względem PAMAM-NH₂ generacji G4 liczbę grup aminowych (Tabela 2).

Makromolekuły PPI-NH₂ G4 wiążą mniej cząsteczek 5-fluorouracylu niż PAMAM-NH₂ G4 w warunkach dużego nadmiaru liganda wobec makromolekuły (roztwór nasycony leku), pomimo że makrocząsteczki obu badanych dendrymerów zawierają jednakową liczbę wewnętrznych (62) i powierzchniowych (64) grup aminowych. Odzwierciedla to zapewne większą zawadę steryczną, której doznają wiązane cząsteczki 5-fluorouracylu z mniejszymi makrocząsteczkami PPI-NH₂ G4 (o średnicy 2.8 nm [21, 22]) w porównaniu z większymi makrocząsteczkami PAMAM-NH₂ G4 (o średnicy 4.5–5 nm [23-26]). Drugim czynnikiem powodującym wiązanie przez PPI G4 mniejszej liczby polarnych cząsteczek 5-fluorouracylu jest brak polarnych grup amidowych, które są obecne w strukturze dendrymerów klasy PAMAM.

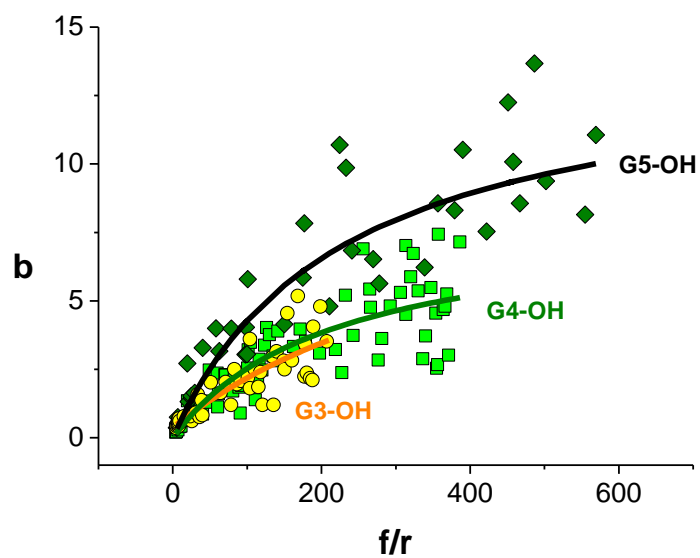
Wpływ dendrymeru PPI-NH₂ G4 na rozpuszczalność liganda zbadano również dla tegafuru, będącego pochodną 5-fluorouracylu, stosowanego jako prolek 5-fluorouracylu (Tabela 2). Wyższa liczba związanych cząsteczek tegafuru ($n=63\pm 2$) przez makromolekułę PPI-NH₂ G4 w porównaniu z liczbą związanych cząsteczek 5-fluorouracylu ($n=46\pm 1$) wskazuje, że hydrofobowy podstawnik tetrahydrofuranu w cząsteczce tegafuru sprzyja oddziaływaniom leku w warunkach dużego (roztwór nasycony) nadmiaru liganda do dendrymeru, zapewne poprzez oddziaływania hydrofobowe z propylenowymi fragmentami struktury PPI-NH₂ G4.

Wyniki badań techniką dializy równowagowej wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymery PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru przez dendrymer PPI-NH₂ G4

Wykorzystując technikę dializy równowagowej wyznaczono izotermy wiązania 5-fluorouracylu z makrocząsteczkami dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5 [H1, H2] (Rys. 2), PAMAM-OH G3–G5 [H1, H2, H3] (Rys. 3) oraz PPI-NH₂ G4 [H8]. Izotermy te opisują zależność stosunku molowego związanych cząsteczek liganda przez makrocząsteczkę dendrymeru b od składu roztworu (np. stężenia niezwiązanego liganda f lub stosunku stężenia niezwiązanego liganda do stężenia dendrymeru f/r). Jak widać (Rys. 2 i 3) uzyskane izotermy wiązania 5-fluorouracyli przez makrocząsteczki badanych dendrymerów można opisać modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych. Wyliczone na tej podstawie metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej parametry wiązania: liczba miejsc aktywnych n w makromolekule i stała równowagi K wiązania leku z miejscem aktywnym makromolekuły, zostały zebrane dla poszczególnych badanych dendrymerów w Tabeli 3.



Rys. 2. Wyznaczone techniką dializy izotermi wiązania 5-fluorouracylu przez dendrimery PAMAM-NH₂ G3–G5 w temperaturze 20°C. Dane do wykresów zostały zaczerpnięte z prac [H1, H2] i dla porównania uzupełnione o dane z pracy [15].



Rys. 3. Wyznaczone techniką dializy izotermi wiązania 5-fluorouracylu przez dendrimery PAMAM-OH G3–G5 w temperaturze 20°C. Dane do wykresów zostały zaczerpnięte z prac [H1, H2, H3].

Tabela 3. Wyznaczone techniką dializy zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych parametry wiązania 5-fluorouracylu (5-FU) z dendrymerami PAMAM-NH₂ G3-G5, PAMAM-OH G3-G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru (TF) z dendrymerem PPI-NH₂ G4 w środowisku wodnym w temperaturze 20°C.

Dendrymer	Ligand	n	K [M ⁻¹]	Ref.
PAMAM-NH ₂ G3	5-FU	26 ± 2	250 ± 60	[H2]
PAMAM-NH ₂ G4		43 ± 2	420 ± 70	[15]
PAMAM-NH ₂ G5		70 ± 2	310 ± 30	[H1]
PAMAM-OH G3	5-FU	6.0 ± 1.6	20 ± 10	[H2]
PAMAM-OH G4		8 ± 1	60 ± 20	[H3]
PAMAM-OH G5		14 ± 2	110 ± 30	[H1]
PPI-NH ₂ G4	5-FU	42 ± 3	220 ± 30	[H8]
PPI-NH ₂ G4	TF	27 ± 3	460 ± 80	[H10]

Uzyskane wyniki wskazują (Tabela 3), że badane dendrymery PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 jak i PPI-NH₂ G4 wiążą samorzutnie ($K > 1$) cząsteczki leku przeciwnowotworowego, 5-fluorouracylu w środowisku wodnym w temperaturze 20°C. W dendrymerach klasy PAMAM liczba grup funkcyjnych (wewnętrznych – amidowych i trzeciorzędowych aminowych oraz zewnętrznych – terminalnych) wzrasta w przybliżeniu dwukrotnie wraz ze wzrostem generacji dendrymeru (Tabela 1). Wraz ze wzrostem generacji makrocząsteczki PAMAM-NH₂ liczba wiązanych cząsteczek lekarstwa wzrasta wolniej niż (w przybliżeniu dwukrotny) wzrost liczby grup funkcyjnych (potencjalnych miejsc aktywnych) w strukturze dendrymeru: $n(G4):n(G3) = 1.7 \pm 0.2$, $n(G5):n(G4) = 1.6 \pm 0.1$. Analogicznie obserwowany wzrost liczby wiązanych cząsteczek 5-fluorouracylu przez kolejne generacje dendrymerów PAMAM-OH jest mniejszy w porównaniu ze wzrostem liczby grup funkcyjnych: $n(G4):n(G3) = 1.3 \pm 0.6$. W obu przypadkach niższy od stechiometrycznego wzrost liczby przyłączanych cząsteczek leku zapewne odzwierciedla wzrost zawady sterycznej wokół miejsc aktywnych makrocząsteczek dendrymerów kolejnych generacji.

Wyznaczone parametry wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymery PAMAM-NH₂ i PAMAM-OH (Tabela 3) wskazują, że makrocząsteczki kationowych dendrymerów PAMAM-NH₂ wiążą więcej cząsteczek leku i z wyższą stałą wiązania w porównaniu z makrocząsteczkami hydroksylowych dendrymerów PAMAM-OH tej samej generacji. Makrocząsteczki dendrymerów PAMAM zakończone takimi samymi (aminowymi lub hydroksylowymi) grupami terminalnymi wykazują zbliżone wartości stałych wiązania, choć można zaobserwować tendencję do silniejszego wiązania leku przez makrocząsteczki PAMAM-NH₂ G4.

Podobnie wyznaczono izotermę wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymer PPI-NH₂ G4 w wodnych roztworach, którą opisano modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych (Tabela 3). Makromolekuły PPI-NH₂ G4 wiążą cząsteczki 5-fluorouracylu ze zbliżoną w granicach niepewności pomiarowej stechiometrią i stałą równowagi, co PAMAM-NH₂ G4.

Techniką dializy równowagowej wyznaczono również izotermę wiązania tegafuru przez dendrymer PPI-NH₂ G4 w środowisku wodnym [H10]. Wyliczone wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych parametry wiązania (Tabela 3) wskazują, że makromolekuły PPI-NH₂ G4 wiążą mniej cząsteczek tegafuru niż 5-fluorouracylu, co odzwierciedla wpływ wyższej zawady sterycznej większych cząsteczek tegafuru. Makrocząsteczka dendrymeru PPI-NH₂ G4 wiąże cząsteczki tegafuru z wyższą stałą równowagi niż cząsteczki 5-fluorouracylu. Cząsteczki tegafuru mają bowiem silniejszy charakter hydrofobowy (współczynnik podziału n-oktanol/woda $P = 0.33 \pm 0.01$ [11], 0.54 [12]) w porównaniu z cząsteczkami 5-fluorouracylu ($P = 0.11 \pm 0.01$ [11], 0.13 [12]) ze względu na obecność w tegafurze pierścienia tetrahydrofuranu, który prawdopodobnie umożliwia dodatkowe oddziaływania hydrofobowe z grupami propylenowymi makrocząsteczek PPI-NH₂ G4.

Wyniki dializ równowagowych 5-fluorouracylu z dendrymerami PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 można przedstawić również w dwukrotnie odwrotnie proporcjonalnym układzie współrzędnych $\frac{1}{b} \left(\frac{1}{f} \right)$. W trzech przypadkach PAMAM-NH₂ G3 [H2], PAMAM-NH₂ G4 [15] i PPI-NH₂ G4 [H8] zależność ta wykazuje nieliniowy przebieg, co wskazuje na zróżnicowanie miejsc aktywnych dendrymerów wiążących 5-fluorouracyl. Analiza tej nieliniowości pozwala obliczyć parametry wiązania (Tabela 4) wykorzystując model dwóch rodzajów miejsc aktywnych metodą sprzężonych regresji dwuparametrowych.

Tabela 4. Parametry wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymery PAMAM-NH₂ G3, PAMAM-NH₂ G4 i PPI-NH₂ G4 wyznaczone techniką dializy równowagowej zgodnie z modelem dwóch rodzajów miejsc aktywnych. Obliczenia zostały wykonane metodą sprzężonych regresji dwuparametrowych wykorzystując równanie (1) i (2).

Dendrymer	Ligand	n_1	K_1	n_2	K_2	Ref.
PAMAM-NH ₂ G3	5-FU	5 ± 1	3890 ± 930	24 ± 3	110 ± 30	[H2]
PAMAM-NH ₂ G4		12 ± 1	5600 ± 600	37 ± 3	154 ± 37	[15]
PPI-NH ₂ G4	5-FU	5 ± 1	16200 ± 3800	39 ± 3	130 ± 20	[H8]

Uzyskane parametry (Tabela 4) wskazują, że makrocząsteczki kationowych dendrymerów PAMAM-NH₂ generacji G3 i G4 oraz PPI-NH₂ G4 posiadają dwie populacje miejsc aktywnych wiążących 5-fluorouracyl. W makrocząsteczkach tych występuje mniej liczny podzbiór n_1 miejsc wykazujących duże powinowactwo (stałą równowagi K_1) do 5-fluorouracylu oraz liczniejszy podzbiór miejsc n_2 o niższym powinowactwie K_2 do tego leku. Parametry te wyznaczone dla dendrymerów PAMAM-NH₂ generacji G3 i G4 potwierdzają tendencje obserwowane już dla wyników opracowanych zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Parametry wiązania 5-fluorouracylu przez miejsca aktywne dendrymeru PPI-NH₂ G4 o wyższym (n_1, K_1) i niższym (n_2, K_2) powinowactwie wskazują, że badany dendrymer PPI-NH₂ G4 silnie wiąże mniej cząsteczek 5-fluorouracylu ($n_1 = 5$) niż dendrymer PAMAM-NH₂ G4 ($n_1 = 12$), co wynika zapewne z większej zawady sterycznej wokół miejsc aktywnych

mniejszej (w porównaniu z PAMAM-NH₂ G4) makrocząsteczki PPI-NH₂ G4. Wyższa stała wiązania leku K_1 przez $n_1 = 5$ miejsc aktywnych dendrymeru PPI-NH₂ G4 w porównaniu z PAMAM-NH₂ G4 zapewne wynika z silniejszych właściwości zasadowych powierzchniowych grup aminowych PPI-NH₂ G4 ($pK_a = 9.75$) [27] w porównaniu z zasadowością powierzchniowych grup aminowych PAMAM-NH₂ G4 ($pK_a = 9-9.23$) [28, 29].

Wyniki badań ¹H NMR wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymery PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru przez dendrymer PPI-NH₂ G4

Do identyfikacji grup funkcyjnych w makrocząsteczkach dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 zaangażowanych w wiązanie cząsteczek 5-fluorouracylu wykorzystano miareczkowanie metodą protonowego rezonansu magnetycznego ¹H NMR. Wykorzystując miareczkowanie ¹H NMR badano serię roztworów o stałym (w danej serii) stężeniu dendrymeru i wzrastającym stężeniu 5-fluorouracylu w środowisku ciężkiej wody. Zmiany położenia sygnałów protonów dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5 [H2, H1], hydroksylowych dendrymerów PAMAM-OH G3–G5 [H2, H3, H1] oraz PPI-NH₂ G4 [H8] w funkcji składu badanej mieszaniny (wzrastające stężenie 5-fluorouracylu) zostały opisane modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych (Tabela 5). W przypadku słabiej oddziałujących dendrymerów PAMAM-NH₂ G5 oraz PAMAM-OH G3–G5 podczas obliczeń przyjęto liczbę miejsc aktywnych wyznaczoną techniką dializy.

Tabela 5. Wyznaczone techniką miareczkowania ¹H NMR zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych parametry wiązania w środowisku ciężkiej wody w temperaturze 20°C: 5-fluorouracylu z dendrymerami PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru z dendrymerem PPI-NH₂ G4. Wartości parametru n zapisane w nawiasie zostały podczas obliczeń przyjęte jako stałe i równe wartościom wyznaczonym techniką dializy równowagowej.

Dendrymer	Ligand	n	K [M ⁻¹]	Ref.
PAMAM-NH ₂ G3		30 ± 13	330 ± 140	[H2]
PAMAM-NH ₂ G4	5-FU	30 ± 10	400 ± 200	[30]
PAMAM-NH ₂ G5		(70)	240 ± 50	[H1]
PAMAM-OH G3		(6)	65 ± 10	[H2]
PAMAM-OH G4	5-FU	(8)	70 ± 10	[H3]
PAMAM-OH G5		(14)	110 ± 40	[H1]
PPI-NH ₂ G4	5-FU	35 ± 5	850 ± 460	[H8]
PPI-NH ₂ G4	TF	30 ± 8	940 ± 470	[H10]

Uzyskane wyniki (Tabela 5) potwierdzają, że makrocząsteczki dendrymerów PAMAM-NH₂ wiążą cząsteczki 5-fluorouracylu z wyższą stałą wiązania w porównaniu z makrocząsteczkami hydroksylowych dendrymerów PAMAM-OH tej samej generacji.

Analiza zaobserwowanych zmian przesunięć protonów pozwala wnioskować o miejscu podstawiania cząsteczek leku w strukturach badanych dendrymerów. Miejscami aktywnymi dendrymerów PAMAM-NH₂ przyłączającymi cząsteczki 5-fluorouracylu są terminalne grupy aminowe oraz wewnętrzne grupy amidowe [H2], podczas gdy w przypadku hydroksylowych dendrymerów PAMAM-OH lek przyłączany jest przez wewnętrzne trzeciorzędowe grupy aminowe [H2].

Wyniki miareczkowania ¹H NMR wiązania 5-fluorouracylu i tegafuru przez makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 w środowisku ciężkiej wody [H8] wskazują na zaangażowanie powierzchniowych aminowych grup dendrymeru w wiązanie tego leku. Obliczone metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych w makromolekule parametry wiązania 5-fluorouracylu przez makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 (Tabela 5) są w granicach niepewności pomiarowej zbliżone do parametrów wyznaczonych tą techniką dla PAMAM-NH₂ G4. Obliczone zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych w makromolekule parametry wiązania cząsteczek tegafuru przez dendrymer PPI-NH₂ G4 w środowisku ciężkiej wody [H10], wskazują że w granicach niepewności pomiarowej (Tabela 5) cząsteczki tegafuru oddziałują z dendrymerem PPI-NH₂ G4 podobnie jak cząsteczki 5-fluorouracylu. Widma ¹H-¹H NOESY mieszanin tegafuru i dendrymeru PPI-NH₂ G4 wskazują na zaangażowanie zarówno pierścienia pirymidynowego jak i pierścienia tetrahydrofuranu w oddziaływanie cząsteczki tegafuru z dendrymerem PPI-NH₂ G4. Wiązanie tegafuru przez makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 potwierdza także niższa wartość wyznaczonego techniką DOSY ¹H NMR współczynnika dyfuzji tegafuru w mieszaninie zawierającej PPI-NH₂ G4 w porównaniu z wartością tego współczynnika dla roztworu tegafuru (bez dendrymeru).

Wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego roztworów dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5, PAMAM-OH G3–G5 i PPI-NH₂ G4 roztworami 5-fluorouracylu oraz roztworu dendrymeru PPI-NH₂ G4 roztworem tegafuru

Techniką miareczkowania kalorymetrycznego w warunkach izotermicznych zbadałem oddziaływania dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5 [H2, H1], PAMAM-OH G3–G5 [H2, H3, H1] oraz PPI-NH₂ G4 [H8] z 5-fluorouracylem w roztworach wodnych w temperaturze 25°C. By wnioskować o wpływie struktury liganda na proces wiązania z dendrymerem, zbadałem również oddziaływania dendrymeru PPI-NH₂ G4 [H10] z tegafurem w roztworach wodnych w tej samej temperaturze. Wyznaczone izotermy wiązania leku z makrocząsteczkami badanych dendrymerów opracowałem zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych w makromolekule, wyliczając parametry wiązania i funkcje termodynamiczne wiązania leku z miejscem aktywnym makromolekuły w środowisku wodnym (Tabela 6).

Tabela 6. Wyznaczone techniką ITC parametry wiązania i standardowe funkcje termodynamiczne (entalpia i entropia) wiązania w środowisku wodnym w temperaturze 25°C: 5-fluorouracylu z miejscami aktywnymi makrocząsteczek dendrymerów PAMAM-NH₂ G3-G5, PAMAM-OH G3-G5 i PPI-NH₂ G4 oraz tegafuru z miejscami aktywnymi makrocząsteczek dendrymeru PPI-NH₂ G4.

Dendrymer	Ligand	n	K [M ⁻¹]	ΔH [kcal mol ⁻¹]	ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	Ref.
PAMAM-NH ₂ G3	5-FU	13 ± 2	1020 ± 160	-10.0 ± 1.9	-19.9 ± 6.7	[H2]
PAMAM-NH ₂ G4		25 ± 3	2800 ± 300	-1.5 ± 0.2	10.7 ± 0.4	[30]
PAMAM-NH ₂ G5		22 ± 8	370 ± 60	-20.2 ± 8.3	-57 ± 29	[H1]
PAMAM-OH G3	5-FU	2.5 ± 0.3	3900 ± 600	-0.65 ± 0.09	14.2 ± 0.6	[H2]
PAMAM-OH G4		5.3 ± 0.6	3180 ± 530	-0,28 ± 0,04	15.0 ± 1.0	[H3]
PAMAM-OH G5		5.0 ± 0.5	6700 ± 5900	-0.64 ± 0.58	15.3 ± 1.0	[H1]
PPI-NH ₂ G4	5-FU	18 ± 2	1120 ± 120	-17.1 ± 2.2	-43.0 ± 1.0	[H8]
PPI-NH ₂ G4	TF	10 ± 2	7300 ± 1200	-14.20 ± 3.5	-30 ± 2	[H10]

Uzyskane parametry (Tabela 6) wskazują, że wiązanie 5-fluorouracylu przez dendrymery PAMAM-NH₂ G3-G5, PAMAM-OH G3-G5 oraz PPI-NH₂ G4 jest procesem samorzutnym termodynamicznie ($K > 1$), zachodzącym z korzystną (egzotermiczną) zmianą standardowej entalpii ($\Delta H < 0$). W przypadku dendrymeru PAMAM-NH₂ G4 stała równowagi wiązania 5-fluorouracylu przez miejsca aktywne jest wyższa niż dla generacji PAMAM-NH₂ G3 i PAMAM-NH₂ G5 za co odpowiada korzystna standardowa entropia wiązania ($\Delta S > 0$). Entropia wiązania leku przez dendrymery PAMAM-NH₂ generacji G3 i G5 jest niekorzystna ($\Delta S < 0$), co wskazuje na wzrost stopnia uporządkowania układu towarzyszący wiązaniu liganda z silnie otwartą strukturą PAMAM-NH₂ G3 (mogącą dostosowywać swą konformację do liganda) oraz silnie upakowaną powierzchnią makrocząsteczek PAMAM-NH₂ G5 (gdzie znaczna sztywność powierzchni utrudnia dostosowanie struktury makrocząsteczki do struktury wiążanego liganda).

Wyliczone parametry wiązania 5-fluorouracylu z hydroksylowymi dendrymerami PAMAM-OH G3-G5 (Tabela 6) wskazują, że wzrostowi generacji dendrymeru towarzyszy wzrost liczby wiązanych cząsteczek 5-fluorouracylu, lecz standardowe funkcje termodynamiczne wiązania są w granicach niepewności zbliżone do siebie dla trzech badanych generacji. Wiązanie 5-fluorouracylu przez makromolekuły PAMAM-OH G3-G5 zachodzi z korzystnymi standardowymi zmianami entropii ($\Delta S > 0$). Hydroksylowe dendrymery PAMAM-OH G3-G5 wiążą mniej cząsteczek 5-fluorouracylu w porównaniu z dendrymerami PAMAM-NH₂ G3-G5.

Opracowane zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych wyniki pomiarów kalorymetrycznych wskazują, że wiązaniu 5-fluorouracylu przez dendrymer PPI-NH₂ G4 towarzyszy wzrost stopnia uporządkowania reagentów ($\Delta S < 0$). Entropia wiązania 5-fluorouracylu różni zatem dendrymer PPI-NH₂ G4 ($\Delta S < 0$) od posiadającego te same terminalne grupy funkcyjne dendrymeru PAMAM-NH₂ G4 ($\Delta S > 0$). Ujemna entropia wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymer PPI-NH₂ G4 prawdopodobnie wynika z bardziej

kompaktowej struktury makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 o średnicy 2.8 nm [21, 22] w porównaniu z większymi makrocząsteczkami PAMAM-NH₂ G4 o średnicy 4.5–5 nm [23–26], co dodatkowo sprzyja porządkowaniu cząsteczek liganda wiązanych z powierzchnią makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 w porównaniu z PAMAM-NH₂ G4. Wiązanie 5-fluorouracylu przez bardziej zasadowe ($pK_a = 9.75$) [27] powierzchniowe grupy aminowe makrocząsteczki PPI-NH₂ G4 determinuje ponad 10-krotnie silniejszą egzotermiczność wiązania 5-fluorouracylu w porównaniu z PAMAM-NH₂ G4 ($pK_a = 9–9.23$) [28, 29].

Wykorzystując technikę izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego zbadałem również wiązanie cząsteczek tegafuru przez makrocząsteczki dendrymeru PPI-NH₂ G4 w środowisku wodnym. Efekty cieplne bezpośredniego oddziaływania obu związków opisałem modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych. Wyliczone parametry wiązania (Tabela 6) wskazują, że proces wiązania cząsteczek tegafuru z miejscami aktywnymi dendrymeru PPI-NH₂ G4 jest samorzutny, egzotermiczny i towarzyszy mu wzrost stopnia uporządkowania reagentów ($\Delta S < 0$). Egzotermiczny efekt entalpowy wiązania cząsteczki tegafuru z miejscem aktywnym makromolekuły PPI-NH₂ G4 jest w granicach niepewności pomiarowej podobny jak w przypadku wiązania 5-fluorouracylu. Odzwierciedla to niższy wkład oddziaływania hydrofobowego pierścienia tetrahydrofuranu w cząsteczce tegafuru w ogólną energetykę oddziaływania ligand–dendrymer w porównaniu z większym wkładem oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych pierścienia pirymidynowego obu porównywanych leków. Podczas wiązania tegafuru przez PPI-NH₂ G4 następuje porządkowanie badanego układu ($\Delta S < 0$). Niższa wartość bezwzględna entropii wiązania tegafuru z dendrymerem PPI-NH₂ G4 w porównaniu z wiązaniem przez ten dendrymer 5-fluorouracylu wskazuje, że związaniu przez makrocząsteczkę PPI-NH₂ G4 większych, bardziej rozbudowanych sterycznie cząsteczek tegafuru towarzyszy pewne zaburzenie struktury dendrymeru (np. wskutek konformacyjnego rozsunęcia dendronów [27, 31–33]), zwiększające entropię przemiany [H10].

Wyznaczona techniką miareczkowania ITC stała wiązania K miejsc aktywnych makromolekuły PPI-NH₂ G4 z cząsteczkami tegafuru jest wyższa niż w przypadku wiązania cząsteczek 5-fluorouracylu przez ten dendrymer. Potwierdza to utworzenie stabilniejszego kompleksu supramolekularnego dendrymeru PPI-NH₂ G4 z tegafurem w porównaniu z 5-fluorouracylem. Utworzony kompleks supramolekularny PPI-NH₂ G4 z tegafurem ma jednak niższą stechiometrię niż w przypadku kompleksu PPI-NH₂ G4 z 5-fluorouracylem, ze względu na bardziej rozbudowaną sterycznie strukturę cząsteczki tegafuru (w porównaniu z 5-fluorouracylem).

Wyniki badań eksperymentalnych oddziaływań kukurbiturilu Q7 z lekami przeciwnowotworowymi

Wyniki badań oddziaływań kukurbiturilu Q7 z gemcytabiną w wodzie

Gemcytabina, lek cytostatyczny z grupy antymetabolitów pirymidynowych, ma ograniczoną trwałość podczas przechowywania, zwłaszcza w kwaśnym środowisku [34], a stosowana podczas terapii wykazuje liczne skutki uboczne. Roztwór gemcytabiny (Gemzar, Eli Lilly) do podawania w formie zastrzyku wykazuje $\text{pH}=2.7\text{--}3.3$ [35]. Jedną ze strategii poprawy trwałości nietrwałych preparatów farmaceutycznych oraz zwiększenia efektywności terapii takimi lekami jest użycie supramolekularnych nano-kontenerów, w tym związków makrocyklicznych. Zdolność gemcytabiny do przyłączania protonu w środowisku wodnym stwarza potrzebę poszukiwania dobrze tolerowanego przez organizm nośnika zdolnego wiązać supramolekularnie ligand (lek) w formie kationu. Funkcję takiego przenośnika może pełnić makrocząsteczka siedmioczłonowego kukurbiturilu Q7.

Stałą równowagi wiązania gemcytabiny we wnętrzu kukurbiturilu Q7 w środowisku wodnym oznaczyłem opisując metodą regresji wieloparametrowej wyniki badań: i) spektroskopowych w zakresie UV, miareczkując wodny roztwór gemcytabiny wodnym roztworem kukurbiturilu Q7 [H7], ii) techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin gemcytabiny i kukurbiturilu Q7 [H7], iii) techniką miareczkowania ^1H NMR w środowisku ciężkiej wody [H7] oraz iv) techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego [H4].

Uzyskane różnymi technikami eksperymentalnymi parametry wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w roztworach wodnych (Tabela 7) wskazują, że gemcytabina jest samorzutnie wiązana przez kukurbituril Q7 tworząc kompleks o stechiometrii 1:1. W roztworze wodnym ustala się stan równowagi pomiędzy kukurbiturilem Q7, jego ligandem (gemcytabiną) oraz kompleksem kukurbituril Q7–lek. Utworzony kompleks jest stosunkowo silny ($\log K > 3$) [36, 37], co oznacza, że w równomolowej mieszaninie gemcytabiny i kukurbiturilu Q7 w środowisku wodnym dominuje skompleksowana forma tego leku.

Analiza widm ^1H NMR mieszanin o stałym stężeniu kukurbiturilu Q7 i wzrastającym stężeniu gemcytabiny w ciężkiej wodzie wskazuje, że w wiązaniu gemcytabiny uczestniczy zarówno wnęka jak i portale kukurbiturilu Q7. Analiza widm ^1H NMR mieszanin o stałym stężeniu gemcytabiny i wzrastającym stężeniu kukurbiturilu Q7 w ciężkiej wodzie wskazuje, że zarówno pierścień zasady nukleinowej jak i pierścień furanozy w cząsteczce gemcytabiny są zaangażowane w wiązanie z makrocyklem Q7 [H7]. Wyniki miareczkowań ITC w wodzie [H4] wskazują, że wiązanie gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w niebuforowanej środowisku wodnym (o $\text{pH}=4.1\text{--}3.8$) zachodzi ze stechiometrią 1:1, jako proces silnie egzotermiczny i towarzyszy mu wzrost stopnia uporządkowania reagentów.

Tabela 7. Wyznaczone różnymi technikami eksperymentalnymi parametry wiązania gemcytabiny (Gem) przez kukurbituril Q7 w roztworach wodnych podczas miareczkowania: roztworu gemcytabiny roztworem kukurbiturilu Q7 (Gem with Q7, pH=4.1–3.8) oraz roztworu kukurbiturilu Q7 roztworem gemcytabiny (Q7 with Gem, pH=4.3–3.8). W nawiasach zapisano wartości parametrów przyjęte jako założone podczas obliczeń metodą wieloparametrowej regresji.

Miareczkowanie spektroskopowe UV, t=20°C					Typ	Ref.
n	logK					
(1)*	3.51 ± 0.06				(Gem with Q7)	[H7]
Dializa równowagowa, t=20°C (Model jednego rodzaju miejsc)						
n	logK					
0.85 ± 0.15	3.09 ± 0.18				(Q7 with Gem)	[H7]
Spektroskopia ¹ H NMR w D ₂ O, t=20°C						
n	logK					
(1)	4.46 ± 0.28				(Gem with Q7)	[H7]
(1)	4.08 ± 0.13				(Q7 with Gem)	[H7]
Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne w wodzie, t=25°C						
n	logK	ΔH [kcal mol ⁻¹]	TΔS [kcal mol ⁻¹]	ΔG [kcal mol ⁻¹]		
1.05 ± 0.06	4.58 ± 0.03	-8.1 ± 0.6	-1.8 ± 0.8	-6.3 ± 0.2	(Gem with Q7)	[H4]
0.85 ± 0.05	4.90 ± 0.17	-9.6 ± 0.3	-2.9 ± 0.5	-6.7 ± 0.2	(Q7 with Gem)	[H4]

Obserwowane różnice w wyznaczonych stałych wiązania logK (Tabela 7) wynikają zapewne z różnej specyfiki użytych technik badawczych: podczas dializy składniki badanych układów mogą oddziaływać z półprzepuszczalną błoną dializacyjną, podczas miareczkowania ¹H NMR stała równowagi wyliczana jest ze zmian przesunięć chemicznych zależnych od zmian lokalnej gęstości elektronowej na wybranej grupie równocennych magnetycznie protonów, natomiast podczas miareczkowania spektroskopowego UV stała równowagi wyliczana jest ze zmian absorbancji, zależnych od zmian gęstości elektronowej układu chromoforowego. Zbliżony rząd wartości stałych równowagi logK wyznaczonych techniką ¹H NMR i miareczkowania ITC potwierdza istotny wkład w proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 oddziaływań elektrostatycznych kationowego centrum leku z posiadającymi cząstkowy ładunek ujemny grupami karbonyłowymi portali makrocząsteczki Q7.

Wyniki badań oddziaływań kukurbiturilu Q7 z gemcytabiną w roztworach: buforu mrówczanowego, kwasu solnego i wodorotlenku sodu

Proces kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 zbadałem również w wodnym środowisku 20 mM buforu mrówczanowego przy pH=pK_a=3.8 (maksymalna pojemność buforowa rozpuszczalnika) [H5]. Wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego roztworów gemcytabiny roztworami kukurbiturilu Q7 (Gem with Q7)

i roztworu kukurbiturilu Q7 roztworami gemcytabiny (Q7 with Gem) w środowisku buforu mrówczanowego o pH=3.8 (Tabela 6 w publikacji [H5]), potwierdzają obserwowaną już w niebuforowanej wodzie (o pH=4.1–3.8) charakterystykę procesu kompleksowania jako samorzutnego, egzotermicznego, któremu towarzyszy wzrost stopnia uporządkowania reagentów. Stałe kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w środowisku buforowym (Tabela 6 w publikacji [H5]) są jednak niższe niż w niebuforowanej wodzie (Tabela 7), pomimo że wartości pH są porównywalne (pH=4.1–3.8 w wodzie oraz pH=3.8 w mieszaninie buforowej). Wskazuje to na utrudniający wiązanie gemcytabiny z kukurbiturilem Q7 wpływ jonów obecnych w mieszaninie buforowej.

Proces kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 zbadałem także w wodnym roztworze kwasu solnego o pH=1.7 [H5]. Wyniki miareczkowania ITC roztworu kukurbiturilu Q7 roztworem gemcytabiny (Tabela 5 w publikacji [H5], Q7 with Gem) wskazują, że samorzutnie powstaje kompleks o stechiometrii 1:1. Wyniki miareczkowania ITC roztworu gemcytabiny roztworem kukurbiturilu Q7 (Tabela 5 w publikacji [H5], Gem with Q7) wskazują, że w warunkach silnego zakwaszenia roztworu i nadmiaru makrocyklu Q7 względem gemcytabiny powstaje kompleks o stechiometrii 1:2 (LQ₂), w którym dwie cząsteczki makrocyklu Q7 kompleksują kation gemcytabiny. W wodnym roztworze kwasu solnego o pH=1.7 kompleksowanie gemcytabiny przebiega samorzutnie z powinowactwem ($\log K > 4$) porównywalnym z obserwowanym w wodnym (niebuforowanym) roztworze. Słabszy egzotermiczny efekt entalpowy wiązania gemcytabiny przez Q7 w roztworze kwasu solnego o pH=1.7 w porównaniu z efektem entalpowym obserwowanym w niebuforowanej wodzie można wyjaśnić częściowym protonowaniem grup karbonylowych ($pK_a \cong 3$ [3], $pK_a = 2.2$ [38]) portali kukurbiturilu Q7 w środowisku o pH=1.7.

Widma ESI MS mieszanin kukurbiturilu Q7 i gemcytabiny ([Q7]/[Gem] = 4/1) w wodnym roztworze kwasu solnego (pH=1.7) pozwoliły zidentyfikować w fazie gazowej (po dehydratacji i jonizacji) agregaty o różnej stechiometrii: 1:1 (LQ), 2:2 (L₂Q₂), 2:3 (L₂Q₃) i 3:2 (L₃Q₂) [H5]. Uzyskane wyniki sugerują, że także w roztworach w warunkach silnie obniżonego pH i przy dużym nadmiarze molowym kukurbiturilu Q7 względem gemcytabiny mogą współistnieć połączenia kukurbiturilu i gemcytabiny o wyższej stechiometrii. Do identyfikacji niektórych pików molekularnych kompleksów gemcytabiny i kukurbiturilu Q7 wykorzystałem tandemową spektroskopię mas MS/MS do identyfikacji wtórnych jonów fragmentacyjnych (daughter ions) MS² otrzymanych w wyniku kolizji jonów macierzystych (parent ions) wyselekcjonowanych po jonizacji MS [H5].

Wyniki miareczkowania ITC roztworu kukurbiturilu Q7 roztworem gemcytabiny w wodnym roztworze wodorotlenku sodu o pH=12.3 wskazują, że makromolekuły Q7 nie wiążą gemcytabiny w tych warunkach [H4], zapewne ze względu na brak możliwości protonowania cząsteczek gemcytabiny przy tak wysokiej wartości pH.

Wyniki badań DSC wpływu wolnego i skompleksowanego z gemcytabiną kukurbiturilu Q7 na strukturę modelowych błon fosfolipidowych DMPC-DPPG

Wpływ kukurbiturilu Q7 i jego kompleksu z gemcytabiną na strukturę modelowych błon dużych jednowarstwowych liposomów LUV (ang. large unilamellar vesicles, średnica

DLS 120 nm, $\zeta = -25$ mV) zbudowanych z: zwitterionowej dimirystynowej fosfatydylocholiny (DMPC) oraz anionowego dipalmitynowego fosfatydyloglicerolu (DPPG) zawieszonych w buforze fosforanowym (pH=7), zbadalem techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC [H7]. Użyte liposomy DMPC-DPPG podobnie jak natywne błony fosfolipidowe, posiadały anionowy charakter. Skany DSC rejestrowane były od 5°C to 40°C dla mieszanin zawierających liposomy DMPC-DPPG i wzrastające stężenie wolnego (Q7) lub skompleksowanego z gemcytabiną kukurbiturilu (Gem-Q7) dla trzech wartości stosunku molowego Q7/lipid lub Gem-Q7/lipid odpowiednio 0.02/1, 0.05/1 i 0.1/1. Analizując parametry opisujące piki przejść fazowych błon DMPC-DPPG: przedprzejścia z lamelarniej fazy żelowej do pofałdowanej fazy żelowej ($T_m \sim 13.4^\circ\text{C}$) i przejścia głównego z pofałdowanej fazy żelowej do lamelarniej fazy ciekłokrystalicznej ($T_m \sim 25.3^\circ\text{C}$) można wnioskować o wpływie dodanego do mieszaniny składnika (Q7 lub Gem-Q7) na strukturę powierzchniową i wewnętrzną błon badanych liposomów.

Analiza zmian parametrów termotropowych pików przedprzejścia i przejścia głównego błon DMPC-DPPG w funkcji rosnącego stężenia Q7 lub Gem-Q7 wskazują, że wpływ kukurbiturilu skompleksowanego z gemcytabiną Gem-Q7 jest słabszy w porównaniu z wolnym (nieskompleksowanym) makrocyklem Q7, o czym świadczy: i) zmniejszenie entalpii przedprzejścia ΔH o 19% przez kompleks Gem-Q7 w porównaniu ze zmniejszeniem entalpii przedprzejścia ΔH o 27% przez Q7, ii) zmniejszeniem entalpii przejścia głównego ΔH o 6% przez kompleks Gem-Q7 w porównaniu ze zmniejszeniem entalpii przejścia głównego ΔH o 10% przez Q7. Zapewne nieskompleksowany makrocykl Q7 może wiązać sprotonowane grupy aminowe cząsteczek DMPC, więc oddziałuje (nieco) silniej z błoną DMPC-DPPG niż kompleks gemcytabiny i kukurbiturilu Q7. Zdolność do łagodnego oddziaływania kompleksu Gem-Q7 ze strukturą liposomu DMPC-DPPG pośrednio wskazuje na możliwość użycia kukurbiturilu Q7 jako nano-nośnika gemcytabiny do komórek nowotworowych, co potwierdziły badania *in vitro* współautorów pracy [H7] na wybranych ludzkich liniach komórek białaczek i chłoniaków.

Wyniki badań kalorymetrycznych ITC wpływu etanolu na proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w wodnych roztworach buforu mrówczanowego

Proces kompleksowania kationu gemcytabiny przez kukurbituril Q7 zbadalem również w wodnym roztworze buforu mrówczanowego (pH= $pK_a = 3.8$) o wzrastającym stężeniu etanolu [H9], wykorzystując technikę miareczkowania kalorymetrycznego ITC. Izotermy opisujące efekty cieplne bezpośrednich oddziaływań kukurbiturilu Q7 z gemcytabiną wyznaczone w badanych rozpuszczalnikach o stężeniu etanolu od 1% do 15% (Rysunek 5 w publikacji [H9]) opisałem modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych, wyliczając stałą równowagi K i standardowe funkcje termodynamiczne ($\Delta H, \Delta S, \Delta G$), opisujące proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 (Tabela 2 w publikacji [H9]).

Zbliżone do jedności wyliczone wartości parametru stechiometrycznego n wskazują, że (w granicach niepewności pomiarowej) we wnęce badanego kukurbiturilu Q7 wiązana jest jedna cząsteczka gemcytabiny. Uzyskane wyniki wskazują, że dodatek etanolu nie wpływa na stechiometrię powstających kompleksów. Proces kompleksowania gemcytabiny przez

kukurbituril Q7 jest termodynamicznie samorzutny ($\Delta G < 0$) i egzotermiczny ($\Delta H < 0$) w środowisku buforu fosforanowego (pH=3.8) w zakresie stężeń etanolu od 0.1% do 15%.

Stopniowe obsadzenie przez cząsteczki etanolu wnęki makrocyklu Q7 utrudnia umieszczenie w niej hydrofobowej reszty liganda (aromatyczny pierścień gemcytabiny) w miarę wzrostu stężenia etanolu w środowisku reakcji. Efekt ten obserwowany jest zarówno jako zmniejszenie powinowactwa makrocyklu kukurbiturilu Q7 do kationu gemcytabiny (maleje stała równowagi K) oraz jako zmniejszenie ilości wydzielanej do otoczenia energii w formie ciepła (której miarą jest entalpia wiązania ΔH).

Wzrastające stężenie etanolu wyraźnie wpływa na człon entropowy $T\Delta S$ opisujący energetykę związaną ze zmianą stopnia nieuporządkowania towarzyszącą kompleksowaniu gemcytabiny we wnęcie kukurbiturilu Q7. Człon entropowy wzrasta od wartości ujemnych ($T\Delta S < 0$) w zakresie niskich stężeń etanolu (0.1% - 2%) do wartości dodatnich ($T\Delta S > 0$), opisując tworzenie coraz słabszych połączeń kompleksowych w wyższym zakresie stężeń alkoholu (5% - 15%). Wynik ten jednoznacznie wskazuje na zmiany strukturalne towarzyszące inkluzji gemcytabiny we wnęcie kukurbiturilu Q7. Na zmiany wartości członu entropowego w funkcji składu mieszanego rozpuszczalnika wpływa efekt strukturalny związany z usuwaniem z wnęki makrocyklu obsadzających ją cząsteczek rozpuszczalnika (stan początkowy) do fazy objętościowej (*bulk solution*) roztworu (stan końcowy).

Obserwowane zmniejszenie stopnia nieuporządkowania reagentów ($T\Delta S < 0$) podczas supramolekularnej inkluzji gemcytabiny we wnęcie kukurbiturilu Q7 w zakresie niskich stężeń etanolu (0.1% - 2%) można przypisać wysokiemu stopniowi nieuporządkowania polarnych cząsteczek wody hydratujących względnie hydrofobową wnękę kukurbiturilu (o względnej przenikalności elektrycznej $\epsilon = 10.3$ [39] - 13.6 [40] porównywalnej z przenikalnością elektryczną n -oktanolu $\epsilon = 10.3$ [41]). Cząsteczki wody wypierane są do fazy objętościowej rozpuszczalnika w wyniku inkluzji gemcytabiny. W zakresie stężeń etanolu nieprzekraczających 5% obserwowane standardowe funkcje termodynamiczne wiązania ($\Delta S < 0, \Delta H < 0$) są charakterystyczne dla tzw. nieklasycznego efektu hydrofobowego (*nonclassical hydrophobic effect*) [42, 43], w którym uczestniczą tzw. wysokoenergetyczne cząsteczki wody (*high-energy water molecules*) [44-48].

W miarę wzrostu stężenia etanolu w środowisku reakcji, coraz więcej cząsteczek solwatujących wnękę stanowią mniej polarne, bardziej lipofilowe cząsteczki etanolu. Te lipofilowe cząsteczki etanolu oddziałują hydrofobowo z wnętrzem klatki makrocyklu, orientując się w niej i tworząc bardziej uporządkowaną mikrofazę (w porównaniu z hydratowaną wnęką). Obserwowany wzrost stopnia nieuporządkowania reagentów ($T\Delta S > 0$) podczas supramolekularnej inkluzji gemcytabiny we wnęcie kukurbiturilu w wodnym rozpuszczalniku o znacznej zawartości etanolu (>5%) można, zatem przypisać wysokiemu stopniowi uporządkowania cząsteczek etanolu we względnie hydrofobowej wnęcie kukurbiturilu. Stopniowe obsadzanie przez cząsteczki etanolu wnęki makrocyklu utrudnia inkluzję gemcytabiny w miarę wzrostu stężenia etanolu w środowisku reakcji, aż do zahamowania inkluzji gemcytabiny, które obserwowałem przy stężeniu etanolu równym 25%. Badania ^1H NMR DOSY współautorów [H9] potwierdzają wiązanie etanolu przez kukurbituril Q7 w środowisku ciężkiej wody. Wyliczona przeze mnie z reguły optymalnego wypełnienia wnęki w 52% [39] maksymalna liczba cząsteczek etanolu solwatujących wnękę Q7 wynosi 3-4 [H9].

Obliczone parametry wskazują, że w zakresie stężeń etanolu tolerowanych przez organizm ludzki ($\leq 5\%$) energetyka oddziaływań kukurbiturilu Q7 z gemcytabiną jest podobna do obserwowanej w środowisku buforowym bez dodatku alkoholu. Sugeruje to, że etanol zawarty w organizmie pacjenta nie jest istotnym przeciwwskazaniem do użycia kukurbiturilu Q7 jako supramolekularnego nano-kontenera gemcytabiny do zastosowań biomedycznych. Jednak wyższe stężenie etanolu wyraźnie osłabia oddziaływania leku z kukurbiturilem Q7. Dlatego do zastosowań technologicznych, wykorzystujących kukurbituril Q7 jako nośnik gemcytabiny, stężenie etanolu powinno być niższe niż 10%.

Wyniki badań kalorymetrycznych ITC wpływu pH na proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w wodnych roztworach buforu mrówczanowego

Badanie wpływu pH na proces kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 wykonałem techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego w wodnym środowisku mieszaniny buforowej HCOOH-HCOONa [H12]. Entalpogramy (Rysunek 3 w publikacji [H12]) bezpośrednich oddziaływań gemcytabiny z kukurbiturilem Q7 w zakresie pH od 5 do 2 opisałem metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej, wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych, wyliczając stałą równowagi K i standardowe funkcje termodynamiczne ($\Delta H, \Delta S, \Delta G$), opisujące proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 (Tabela 1 w publikacji [H12]).

Uzyskane zależności (Rysunek 4 w publikacji [H12]) wskazują, że w badanym zakresie pH środowiska buforowego gemcytabina jest wiązana samorzutnie ($\Delta G < 0$) przez makrocząsteczkę kukurbiturilu Q7 tworząc kompleks o stechiometrii 1:1. Reakcji tej towarzyszy wydzielenie energii do otoczenia w formie ciepła ($\Delta H < 0$) i uporządkowanie ($T\Delta S < 0$) reagentów reakcji kompleksowania. Wraz ze wzrostem stężenia jonów wodorowych w środowisku buforowym następuje wzrost stałej równowagi wiązania gemcytabiny przez makrocząsteczkę kukurbiturilu Q7, ponieważ obniżenie wartości pH środowiska sprzyja protonowaniu grupy aminowej tego leku i tym samym elektrostatycznemu oddziaływaniu kationu leku z ujemnie spolaryzowanym portalem makrocyklu.

Obserwowany kierunek zmian czynnika entalpowego ΔH i czynnika entropowego $T\Delta S$ odzwierciedla wpływ protonowania cząsteczek liganda i makrocyklu na termodynamikę procesu kompleksowania. Poprzedzające właściwą inkluzję gemcytabiny przyłączenie protonu do grupy aminowej tego leku wnosi dodatkowy egzotermiczny wkład, który powiększa obserwowaną w pomiarach kalorymetrycznych egzotermiczną entalpię oddziaływania obu związków w zakresie $\text{pH}=5-4.5$. Uwzględnienie protonu jako dodatkowego substratu kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril w zakresie $\text{pH}=5-4.5$ pozwala również wyjaśnić obserwowany silny i niekorzystny efekt entropowy przemiany w tym zakresie pH. Zawarty w fazie objętościowej mieszaniny buforowej proton zostaje uporządkowany po przyłączeniu do cząsteczki liganda, która sama zostaje zainkludowana we wnęce makrocyklu. W środowiskiem o większej kwasowości ($\text{pH}=4-2$) wzrasta udział protonowanych cząsteczek gemcytabiny, które są inkludowane we wnęce Q7, czemu towarzyszy mniejszy (w porównaniu ze środowiskiem o $\text{pH}=5-4.5$) wzrost stopnia

uporządkowania reagentów, słabsza egzotermiczność przemiany i wypadkowo wyższa stała równowagi kompleksowania K .

Wyniki badań kalorymetrycznych ITC wpływu chlorku sodu na proces wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 w wodnych roztworach buforu mrówczanowego

Wyzaczyłem wpływ chlorku sodu, modelowego elektrolitu na proces kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 [H12], przeprowadzając serię miareczkowań kalorymetrycznych w mieszaninach buforowych HCOOH-HCOONa o pH=4 i wzrastającym stężeniu NaCl w zakresie od 10 do 4000 mM (Rysunek 5 w publikacji [H12]). Wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych obliczyłem metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej parametry wiązania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 (Tabela 2 w publikacji [H12]).

W granicach niepewności pomiarowej wzrost stężenia NaCl w badanym zakresie stężenia tej soli, nie powoduje istotnych statystycznie zmian członu entropowego $T\Delta S$. Wraz ze wzrostem stężenia NaCl w środowisku buforowym (pH=4) następuje natomiast gwałtowne zmniejszenie wartości stałej równowagi wiązania K gemcytabiny przez makrocząsteczkę kukurbiturilu Q7 oraz zmniejszenie wartości bezwzględnej entalpii wiązania (Rysunek 6 w publikacji [H12]). Wskazuje to na tłumienie oddziaływań wiążących gemcytabiny i kukurbiturilu Q7 przez obecny w roztworze chlorek sodu. Kationy sodu pochodzące z dysocjacji tej soli są związane przez grupy karbonyłowe portali Q7 [49-52]. Kompleksowanie gemcytabiny przez Q7 wymaga zatem wyparcia przez inkludowany lek kationów sodu wysycających portale makrocyklu, co obserwujemy jako zmniejszenie siły napędowej kompleksowania ΔG , której wartość bezwzględna maleje.

W wodnych 10 – 250 mM roztworach chlorku sodu gemcytabina jest wydajnie wiązana ($\log K \geq 3$) przez kukurbituril Q7. Makrocząsteczki Q7 można zatem użyć jako czynnik stabilizujący ten lek w preparatach farmaceutycznych w roztworze soli fizjologicznej (154 mM). W roztworach o stężeniu NaCl w zakresie 250 – 1000 mM powinowactwo gemcytabiny do Q7 jest istotnie ograniczone ($2 \leq \log K \leq 3$), natomiast w roztworze o stężeniu NaCl równym 4000 mM makrocykl Q7 wykazuje już bardzo słabe powinowactwo do gemcytabiny ($\log K \leq 2$) wskutek konkurencyjnego oddziaływania portali Q7 z kationami sodu. Wzrost stężenia NaCl w środowisku reakcji, podobnie jak podwyższenie pH, sprzyjają zatem uwalnianiu gemcytabiny zainkludowanej we wnęce makrocząsteczki Q7 w środowisku wodnym.

Wpływ NaCl na stabilność utworzonych kompleksów zbadałem również techniką spektrometrii mas z elektrorozpyleniem [H12], rejestrując widma ESI MS w trybie jonów dodatnich wodnych mieszanin kukurbiturilu Q7 (0.5 mM) i gemcytabiny (0.2 mM) bez dodatku NaCl oraz w mieszaninach zawierających odpowiednio wzrastające stężenie chlorku sodu. W zastosowanej procedurze badawczej, stężony roztwór NaCl dodawany był do mieszaniny zawierającej gemcytabinę związaną przez nadmiar kukurbiturilu Q7. Wzrost stężenia NaCl w badanej mieszaninie pozwala więc obserwować wpływ jonów sodowych na stabilność już utworzonego kompleksu Q7 z gemcytabiną (Gem). Wzrost stężenia jonów Na^+ wywołany wprowadzeniem do badanej mieszaniny NaCl powoduje zmniejszenie

Wyniki badań oddziaływań kukurbiturilu Q7 z mitoksantronem w wodnych roztworach kwasu solnego

Mitoksantron w badanych wodnych roztworach kwasu solnego o pH=5 i pH=4 występuje jako dikation, w którym centra kationowe zlokalizowane są w dwóch łańcuchach alifatycznych. Opisując gaszenie fluorescencji mitoksantronu wywołane wzrastającym stężeniem kukurbiturilu Q7 (wygaszacza), wyliczyłem liczbę miejsc aktywnych n w cząsteczce mitoksantronu wiążących kukurbituril Q7 ze stałą wiązania K [H6]. Następnie wykorzystując wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego roztworów mitoksantronu roztworami kukurbiturilu Q7, wyliczyłem metodą regresji liniowej dla ustalonej (oznaczonej fluorymetrycznie) liczby miejsc aktywnych $n=2$ w cząsteczce mitoksantronu stałą równowagi K wiązania kukurbiturilu Q7 przez miejsce aktywne mitoksantronu (Tabela 1 w publikacji [H6]).

Uzyskane wyniki spektrofluorymetryczne wskazują, że cząsteczka mitoksantronu jest kompleksowana przez dwie cząsteczki kukurbiturilu Q7 w wodnym roztworze HCl o pH=5 i pH=4. Związaniu przez makrocykle Q7 ulegają zapewne dwie alifatyczne sprotonowane grupy aminowe cząsteczki leku, co prowadzi do utworzenia kompleksu supramolekularnego o stechiometrii 1:2 (LQ_2). Zgodnie z wynikami ITC, proces kompleksowania mitoksantronu przez makrocząsteczki kukurbiturilu Q7 jest termodynamicznie samorzutny ($\Delta G < 0$), silnie egzotermiczny ($\Delta H < 0$) i towarzyszy mu wzrost stopnia uporządkowania reagentów ($T\Delta S < 0$). Proces wiązania mitoksantronu przez makrocząsteczki kukurbiturilu Q7 jest silniej egzotermiczny w roztworze kwasu solnego przy pH=4 w porównaniu z pH=5, lecz mniej korzystny czynnik entropowy przy pH=4 powoduje, że wyznaczone techniką ITC stałe wiązania $\log K$ przy obu wartościach pH środowiska są jednakowe w granicach niepewności ich wyznaczenia. Wprowadzenie do roztworu o pH=4 chlorku sodu (140 mM) tłumi oddziaływanie mitoksantronu z kukurbiturilem Q7.

Różnice w oznaczonych spektrofluorymetrycznie i kalorymetrycznie stałych $\log K$ mogą wynikać z różnych stężeń mitoksantronu użytych do pomiaru fluorymetrycznego (15 μM) i kalorymetrycznego ITC (120 μM), co skutkowało samoasocjacją cząsteczek mitoksantronu w wyższych zakresach stężeń leku [54].

Wyniki badań eksperymentalnych oddziaływań kukurbiturili z modelową poliaminą TREN w wodnych roztworach kwasu mrówkowego

By wyciągnąć wnioski o wpływie struktury na oddziaływanie kukurbiturili z polidentnymi ligandami wybrałem symetryczną (niebędącą lekiem) trójramienną (tridentną) poliaminę TREN w charakterze modelowego związku, którego oddziaływanie z kukurbiturilami Q6, Q7 i Q8 zbadałem techniką miareczkowania kalorymetrycznego ITC. Wykonałem serię miareczkowań roztworów kukurbiturili Q6, Q7 i Q8 roztworami TREN w wodnym 50% roztworze kwasu mrówkowego (pH=1.52) w temperaturze 25°C [H11]. Użyty jako rozpuszczalnik wodny 50% roztwór kwasu mrówkowego umożliwił rozpuszczenie trudnorozpuszczalnych w wodzie kukurbiturili Q6 i Q8. Etalogramy efektów bezpośredniego oddziaływania trzech badanych kukurbiturili Q6, Q7 i Q8 z poliaminą TREN

opisałem modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych dla potwierdzonej wynikami badań współautorów [H11] stechiometrii 1:1. Uzyskane wyniki (Tabela 2 w publikacji [H11]) wskazują, że w fazie ciekłej proces wiązania jest egzotermiczny ($\Delta H < 0$) i termodynamicznie samorzutny ($\Delta G < 0$) w przypadku badanych kukurbiturili Q6, Q7 i Q8. Entalpia wiązania ΔH i czynnik entropowy $T\Delta S$ w różnym stopniu wnoszą wkład w trwałość tworzonych kompleksów kukurbiturili z poliaminą TREN w zależności od wielkości makrocyklu.

Entalpia wiązania TREN jest najkorzystniejsza w przypadku najmniejszego kukurbiturilu Q6. Jednocześnie utworzeniu kompleksu Q6 z TREN towarzyszy niekorzystna zmiana członu entropowego ($T\Delta S < 0$). Czynnik entropowy wiązania TREN jest korzystny ($T\Delta S > 0$) dla wyższych homologów Q7 i Q8. Wynik ten potwierdza, że homologi Q7 i Q8 inkludują w swych wnękach (i portalach [55]) większą liczbę cząsteczek rozpuszczalnika [39, 56, 57], których uwolnienie poprzedza supramolekularną inkluzję liganda [44, 47, 58]. Badania kalorymetryczne ITC wskazują, że w fazie ciekłej kompleks kukurbiturilu Q7 z poliaminą TREN jest bardziej stabilizowany entropowo niż kompleks kukurbiturilu Q8. Silnie stabilizowany entalpowo kompleks kukurbiturilu Q6 z TREN jest natomiast destabilizowany entropowo. Makrocykl Q7 wiąże ligand TREN z wyższą stałą równowagi, tworząc trwalszy termodynamicznie kompleks w porównaniu z kompleksami tworzonymi z poliaminą TREN przez kukurbiturile Q6 i Q8. Wyniki badań współautorów [H11] techniką ESI MS, DOSY oraz obliczenia DFT potwierdzają, że rozmiar wnęki makrocyklu wywiera wpływ na proces kompleksowania poliaminy TREN przez kukurbiturile Q6, Q7 i Q8.

Główne osiągnięcia

- 1) Wyzaczyłem mechanizm procesu kompleksowania cząsteczek 5-fluorouracylu przez makromolekuły dendrymerów PAMAM-NH₂ G3–G5 [H1, H2], PAMAM-OH G3–G5 [H1, H2, H3] oraz PPI-NH₂ G4 [H8] oraz cząsteczek tegafuru przez makromolekuły dendrymeru PPI-NH₂ G4 [H10]. Dla badanych układów wyliczyłem liczbę miejsc wiążących ligand w makromolekule, stałą wiązania leku z miejscem aktywnym makromolekuły oraz standardowe funkcje termodynamiczne tworzenia kompleksów. Uzyskane dane pozwoliły mi scharakteryzować energetykę procesu kompleksowania makromolekuł dendrymerów cząsteczkami leku i wnioskować o trwałości powstających kompleksów supramolekularnych, w tym o wpływie na proces kompleksowania: i) rodzaju grup terminalnych makrocząsteczek dendrymerów PAMAM (aminowe lub hydroksylowe), ii) generacji makrocząsteczek PAMAM, iii) grup funkcyjnych makrocząsteczek badanych dendrymerów bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie cząsteczek leku oraz iv) rodzaju struktury dendrymeru (PAMAM lub PPI), v) hydrofobowo–hydrofilowego charakteru cząsteczki liganda (5-fluorouracylu i tegafuru).

- 2) Wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych wykazałem, że:
- makrocząsteczki aminowych dendrymerów PAMAM-NH₂ wiążą więcej cząsteczek 5-fluorouracylu i z wyższą stałą wiązania w porównaniu z makrocząsteczkami hydroksylowych dendrymerów PAMAM-OH tej samej generacji [H1, H2, H3],
 - wraz ze wzrostem generacji makrocząsteczki PAMAM-NH₂ i PAMAM-OH liczba wiązanych cząsteczek 5-fluorouracylu wzrasta wolniej niż wzrost liczby grup funkcyjnych (potencjalnych miejsc aktywnych) w strukturze dendrymeru, co przypisałem wpływowi zawady sterycznej wokół miejsc aktywnych makromolekuł wyższej generacji [H2, H3],
 - dendrymery PAMAM-NH₂ wiążą 5-fluorouracyl poprzez grupy aminowe i amidowe, natomiast dendrymery PAMAM-OH i PPI-NH₂ poprzez grupy aminowe [H1, H2, H3],
 - makromolekuły PPI-NH₂ G4 i PAMAM-NH₂ G4 wiążą zbliżoną liczbę cząsteczek 5-fluorouracylu, lecz stała wiązania tego leku przez PPI-NH₂ G4 jest niższa w porównaniu z PAMAM-NH₂ G4 ze względu na mniejszy rozmiar makromolekuł PPI-NH₂ G4 [H8],
 - makrocząsteczki dendrymeru PPI-NH₂ G4 wiążą bardziej hydrofobowy tegafur z wyższą stałą wiązania niż mniej hydrofobowy 5-fluorouracyl [H10].
- 3) Wykazałem, że w układach PAMAM-NH₂ G3–5-fluorouracyl [H2], PAMAM-NH₂ G4–5-fluorouracyl oraz PPI-NH₂ G4–5-fluorouracyl [H8] występuje zróżnicowanie sposobu wiązania tego leku z makromolekułami dendrymerów, które posiadają dwa rodzaje miejsc aktywnych wiążących 5-fluorouracyl, obejmujących odpowiednio mniej liczny podzbiór (n_1) miejsc wykazujących duże powinowactwo (stałą równowagi K_1) do 5-fluorouracylu oraz liczniejszy podzbiór miejsc (n_2) o niższym powinowactwie (K_2) do tego leku.
- 4) Uzyskałem pełną termodynamiczną charakterystykę procesu wiązania wybranego leku przeciwnowotworowego, gemcytabiny przez makromolekuły kukurbiturilu Q7 w wodzie [H4, H7] oraz w środowisku wodnym, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu: i) pH wodnego niebuforowanego [H4, H5] i buforowanego [H4, H12] roztworu, ii) stężenia etanolu [H9] oraz iii) stężenia chlorku sodu [H12] w środowisku reakcji. Wyzaczyłem stochiometrię, stałą równowagi kompleksowania gemcytabiny przez kukurbituril Q7 oraz standardowe funkcje termodynamiczne tworzenia kompleksu supramolekularnego w badanych rozpuszczalnikach.
- 5) Określiłem wpływ kilku czynników na termodynamiczną trwałość tworzonego kompleksu supramolekularnego kukurbiturilu Q7 i gemcytabiny. W szczególności wykazałem wpływ pH i stężenia etanolu w wodnym środowisku reakcji na wartość standardowego członu entropowego opisującego proces supramolekularnej inkluzji, co zinterpretowałem jako wynik protonowania cząsteczek gemcytabiny i protonowania portali makrocycyku Q7 [H12] oraz wynik solwatacji wnęki kukurbiturilu Q7 cząsteczkami etanolu [H9]. Wykazałem również wpływ chlorku sodu na termodynamiczną trwałość kompleksu gemcytabiny i kukurbiturilu Q7, co przypisałem asocjacji kationów sodu z portalami kukurbiturilu Q7 [H12]. Stwierdziłem, że wzrost stężenia jonów wodorowych powoduje powstawanie stabilniejszych kompleksów gemcytabiny i kukurbiturilu Q7 (wyższa stała K)

- [H12]. Wzrost stężenia etanolu [H9] jak i wzrost stężenia chlorku sodu [H12] utrudnia wiązanie gemcytabiny przez makrocykl Q7 w środowisku wodnym, a w przypadku już utworzonego kompleksu gemcytabiny i kukurbiturilu sprzyja uwalnianiu zainkludowanej gemcytabiny.
- 6) Wykazałem również, że kukurbituril Q7 skutecznie wiąże gemcytabinę ($\log K \geq 3$) zarówno w środowisku roztworu soli fizjologicznej (154 mM NaCl) [H12] jak i w wodnym roztworze o tolerowanej fizjologicznie zawartości etanolu ($\leq 5\%$) [H9]. Wniosek ten ma istotne znaczenie ze względu na rozpoznany już hamujący wpływ etanolu na dokomórkowy transport nukleozydów i ich pochodnych, w tym gemcytabiny, poprzez występujący w błonie komórkowej transporter hENT1 [59-61].
 - 7) Wykorzystując wyniki badań DSC [H7] wyjaśniłem, że skompleksowana z kukurbiturilem Q7 gemcytabina narusza strukturę anionowej błony fosfolipidowej DMPC-DPPG będącej modelem natywnych błon fosfolipidowych żywych komórek. Pozwala to pośrednio wnioskować o użyteczności kukurbiturilu Q7 jako nano-transportera gemcytabiny, umożliwiającego bezpośrednio przeniesienie tego leku przez błonę komórkową, co może znaleźć zastosowanie w terapii pacjentów lekoopornych na gemcytabinę. Wniosek ten został potwierdzony również w badaniach biochemicznych współautorów [H7] na wybranych ludzkich liniach komórkowych białaczek i chłoniaków, które wskazują że skompleksowana z kukurbiturilem Q7 gemcytabina wnika nieklasycznie do badanych komórek w warunkach *in vitro*, pomimo biochemicznego zablokowania transportera hENT1.
 - 8) Uzyskałem pełną termodynamiczną charakterystykę procesu wiązania didentnego polikationowego leku przeciwnowotworowego, mitoksantronu przez kukurbituril Q7 [H6]. Wykazałem, że mitoksantron tworzy z kukurbiturilem Q7 kompleks o stechiometrii 1:2 (LQ_2), w którym dwie alifatyczne protonowane grupy aminowe leku ulegają inkluzji we wnękach dwóch makrocząsteczek Q7. Stwierdziłem ponadto, że chlorek sodu o stężeniu porównywalnym z występującym w roztworze soli fizjologicznej wywiera silny destabilizujący wpływ na powstawanie kompleksu mitoksantron–kukurbituril Q7 [H6], co ogranicza możliwość wykorzystania kukurbiturilu Q7 jako nano-nośnika mitoksantronu do zastosowań biomedycznych.
 - 9) Wyniki moich badań termodynamicznych procesu kompleksowania trzech kukurbiturili Q6–Q8 przez modelową (niebędącą lekiem) tridentną poliaminę TREN [H11] w zakwaszonych roztworach wodnych wskazują, że zarówno wzrost ładunku polikationu jak i możliwość dostosowania konformacji polidentnego liganda do rozmiaru wnęki receptora Q6-Q7 zwiększają wydajność kompleksowania. W szczególności wykazałem, że makrocykl Q7 wiąże tridentny polikationowy ligand TREN z wyższą stałą równowagi niż makrocykle Q6 i Q8 [H11] ze względu na kompromis między efektem entalpowym, który sprzyja wiązaniu tego liganda z mniejszym makrocyklem Q6, a korzystnym efektem entropowym, który sprzyja kompleksowaniu TREN we wnękach większych makrocykli Q7 i Q8.

Pozostała cytowana literatura

- [1] M. Gorzkiewicz, A. Buczkowski, B. Palecz, B. Klajnert-Maculewicz. PAMAM and PPI dendrimers in biophysical and thermodynamic studies on the delivery of therapeutic nucleotides, nucleosides and nucleobase derivatives for anticancer applications. In: Demetzos C, Pippa N, editors. *Thermodynamics and biophysics of biomedical nanosystems: Applications and Practical Considerations*. Singapore Pte: Springer Nature, 2019. p. 183-243.
- [2] D.A. Tomalia, M. Rookmaker. *Polymer Data Handbook*. New York: Oxford University Press, 2009.
- [3] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaac, The cucurbit[n]uril family, *Angew. Chem.* 44 (2005) 4844-4870.
- [4] H. Cong, X.L. Ni, X. Xiao, Y. Huang, Q.-J. Zhu, S.-F. Xue, Z. Tao, L.F. Lindoy, G. Wei, Synthesis and separation of cucurbit[n]urils and their derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 4335–4364.
- [5] V.D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W.M. Nau, A.I. Day, Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 2037–2042.
- [6] I. Ghosh, W.M. Nau, The strategic use of supramolecular pKa shifts to enhance the bioavailability of drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 764–783.
- [7] O.A. Gerasko, E.A. Kovalenko, V.P. Fedin, Macrocyclic cavitands cucurbit[n]urils: prospects for application in biochemistry, medicine and nanotechnology, *Russ. Chem. Rev.* 85 (2016) 795-816.
- [8] L. Liu, Controlled release from cucurbituril, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 87 (2017) 1–12.
- [9] N.i. Saleh, I. Ghosh, W.M. Nau. Cucurbiturils in drug delivery and for biomedical applications. In: Schneider H-J, editor. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields: The Royal Society of Chemistry*, 2013. p. 164-212.
- [10] H. Yin, R. Wang, Applications of cucurbit[n]urils (n=7 or 8) in pharmaceutical sciences and complexation of biomolecules, *Isr. J. Chem.* 58 (2018) 188 –198.
- [11] S. Sato, Y. Hirota, N. Ogura, E. Sasaki, S. Kitagawa, Enhancing effect of N-dodecyl-2-pyrrolidone on the parcutaneous absorption of 5-fluorouracil derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998) 831-836.
- [12] L. Wang, L. Chen, G. Lian, L. Han, Determination of partition and binding properties of solutes to stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 398 (2010) 114–122.
- [13] L. Soltes, M. Mach, Estimation of drug-protein binding parameters on assuming the validity of thermodynamic equilibrium, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 113-119.
- [14] S.A. Bobrovnik, Ligand–receptor interaction. Klotz–Hunston problem for two classes of binding sites and its solution, *J. Biochem. Biophys. Methods* 52 (2002) 135-143.
- [15] A. Buczkowski, H. Piekarski, B. Palecz, Stoichiometry and equilibrium constant of the complex of PAMAM-NH₂ G4 and 5-fluorouracil, *J. Mol. Liq.* 173 (2012) 8-12.
- [16] J. Hu, M. Fang, Y. Cheng, J. Zhang, Q. Wu, T. Xu, Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 4. An in-depth look into the binding/encapsulation of guanosine monophosphate by dendrimers, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 7148-7157.
- [17] L. Fielding, NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* 51 (2007) 219–242.
- [18] P. Thordarson, Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1305–1323.
- [19] C. Tablet, I. Matei, M. Hillebrand. The determination of the stoichiometry of cyclodextrin inclusion complexes by spectral methods: possibilities and limitations. In: Innocenti A, editor. *Stoichiometry and research - The Importance of quantity in biomedicine: InTech*, 2012. p. 47-76.
- [20] D.B. Hibbert, P. Thordarson, The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis, *Chem. Commun.* 52 (2016) 12792-12805.

- [21] R.M. Crooks, V. Chechik, B.I. Lemon, L. Sun, L.K. Yeung, M. Zhao. Synthesis, characterization and applications of dendrimer-encapsulated metal and semiconductor nanoparticles. In: Fedlheim DL, Foss CA, editors. Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications. first ed. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. p. 266.
- [22] L.P. Mendes, J. Pan, V.P. Torchilin, Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy, *Molecules* 22 (2017) 1401.
- [23] J. Li, D. Qin, J.R. Baker, D.A. Tomalia, The characterization of high generation poly(amidoamine) G9 dendrimers by atomic force microscopy, *Macromol. Symp.* 166 (2001) 257-269.
- [24] R.W.J. Scott, O.M. Wilson, R.M. Crooks, Synthesis, characterization and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 692-704.
- [25] Y. Cheng, T. Xu, Solubility of nicotinic acid in polyamidoamine dendrimer solutions, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1384-1389.
- [26] M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka, In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjugate Chem.* 7 (1996) 703-714.
- [27] V. Jain, V. Maingi, P.K. Maiti, P.V. Bharatam, Molecular dynamics simulations of PPI dendrimer–drug complexes, *Soft Matter* 9 (2013) 6482–6496.
- [28] D. Cakara, J. Kleimann, M. Borkovec, Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations, *Macromolecules* 36 (2003) 4201-4207.
- [29] Y. Niu, L. Sun, R.M. Crooks, Determination of the intrinsic proton binding constants for poly(amidoamine) dendrimers via potentiometric pH titration, *Macromolecules* 36 (2003) 5725-5731.
- [30] A. Buczkowski, P. Urbaniak, B. Palecz, Thermochemical and spectroscopic studies on the supramolecular complex of PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 428 (2012) 178– 182.
- [31] P. Welch, M. Muthukumar, Tuning the density profile of dendritic polyelectrolytes, *Macromolecules* 31 (1998) 5892-5897.
- [32] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, About dendrimers: structure, physical properties and applications, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1665-1688.
- [33] D.A. Tomalia, L.S. Nixon, D.M. Hedstrand, The role of branch cell symmetry and other critical nanoscale design parameters in the determination of dendrimer encapsulation properties, *Biomolecules* 10 (2020) 642.
- [34] P.J. Jansen, M.J. Akers, R.M. Amos, S.W. Baertschi, G.G. Cooke, D.E. Dorman, C.A.J. Kemp, S.R. Maple, K.A. Mccune, The degradation of the antitumor agent gemcitabine hydrochloride in an acidic aqueous solution at pH 3.2 and identification of degradation products, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 885-891.
- [35] Eli Lilly and Company, Gemzar® (gemcitabine HCl) for injection, FDA revised label – version 082598, Indianapolis, IN 46285, USA, PA 1634 AMP.
- [36] L. Jones, P. Atkins. *Chemistry. Molecules, matter and change.* New York: W.H. Freeman and Company, 2000.
- [37] A. Buczkowski, S. Sekowski, A. Grala, D. Palecz, K. Milowska, P. Urbaniak, T. Gabryelak, H. Piekarski, B. Palecz, Interaction between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 266-270.
- [38] I. Hwang, W.S. Jeon, H.-J. Kim, D. Kim, H. Kim, N. Selvapalam, N. Fujita, S. Shinkai, K. Kim, Cucurbit[7]uril: a simple macrocyclic, pH-triggered hydrogelator exhibiting guest-induced stimuli-responsive behavior, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 210 –213.
- [39] K.I. Assaf, W.M. Nau, Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis, *Chem Soc Rev.* 44 (2015) 394-418.
- [40] A.S. Stepko, N.A. Lobova, P.V. Lebedev-Stepanov, Studying the dielectric properties of the cucurbituril cavity on the basis of the solvatochromic effect of styryl dye upon the formation of an inclusion complex, *Opt. Spectrosc.* 126 (2019) 309–315.
- [41] J. Mohanty, W.M. Nau, Ultrastable rhodamine with cucurbituril, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 3750 –3754.

- [42] B.K. Paul, N. Ghosh, S. Mukherjee, Direct insight into the nonclassical hydrophobic effect in bile salt: β -cyclodextrin interaction: role of hydrophobicity in governing the prototropism of a biological photosensitizer, *RSC Adv.* 6 (2016) 9984–9993.
- [43] T. Mizutani. Thermodynamics of supramolecular structure formation in water. In: Mizutani T, editor. Application of thermodynamics to biological and materials science. Rijeka: InTech, 2011. p. 111-128.
- [44] W.M. Nau, M. Florea, K.I. Assaf, Deep inside cucurbiturils: physical properties and volumes of their inner cavity determine the hydrophobic driving force for host–guest complexation, *Isr. J. Chem.* 51 (2011) 559 – 577.
- [45] H.-J. Schneider, Binding mechanisms in supramolecular complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 3924 – 3977.
- [46] F. Biedermann, V.D. Uzunova, O.A. Scherman, W.M. Nau, A. De Simone, Release of high-energy water as an essential driving force for the high-affinity binding of cucurbit[n]urils, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15318–15323.
- [47] F. Biedermann, H.-J. Schneider, Experimental binding energies in supramolecular complexes, *Chem. Rev.* 116 (2016) 5216–5300.
- [48] K. Kim, J. Murray, N. Selvapalam, Y.H. Ko, I. Hwang. Cucurbiturils: chemistry, supramolecular chemistry and applications. New Jersey: World Scientific Publishing Europe Ltd., 2018.
- [49] X.-L. Ni, X. Xiao, H. Cong, Z. Tao. Supramolecular assemblies of cucurbit[n]urils with metal ions. Coordination, structures and properties: Springer, 2015.
- [50] S.D. Choudhury, J. Mohanty, H. Pal, A.C. Bhasikuttan, Cooperative metal ion binding to a cucurbit[7]uril-thioflavin T complex: demonstration of a stimulus-responsive fluorescent supramolecular capsule, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1395–1401.
- [51] A.C. Bhasikuttan, S.D. Choudhury, H. Pal, J. Mohanty, Supramolecular assemblies of thioflavin T with cucurbiturils: prospects of cooperative and competitive metal ion binding, *Isr. J. Chem.* 51 (2011) 634 – 645.
- [52] Z. Miskolczy, M. Megyesi, L. Biczók, A. Prabodh, F. Biedermann, Kinetics and mechanism of cation-induced guest release from cucurbit[7]uril, *Chem. Eur. J.* 26 (2020) 7433–7441.
- [53] M.V. Rekharsky, Y. Inoue, Complexation thermodynamics of cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1875-1917.
- [54] M. Enache, E. Volanschi, Spectral characterization of self-association of antitumor drug mitoxantrone, *Rev. Roum. Chim.* 55 (2010) 255-262.
- [55] X. Ling, S. Saretz, L. Xiao, J. Francescon, E. Masson, Water vs. cucurbituril rim: a fierce competition for guest solvation, *Chem. Sci.* 7 (2016) 3569–3573.
- [56] N.S. Venkataramanan, A. Suvitha, R. Sahara, Structure, stability, and nature of bonding between high energy water clusters confined inside cucurbituril: a computational study, *Comput. Theor. Chem.* 1148 (2019) 44-54.
- [57] T.N. Grishaeva, A.N. Masliy, A.M. Kuznetsov, Water structuring inside the cavities of cucurbit[n]urils (n = 5–8): a quantum-chemical forecast, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 89 (2017) 299–313.
- [58] F. Biedermann, W.M. Nau, H.-J. Schneider, The hydrophobic effect revisited—studies with supramolecular complexes imply high-energy water as a noncovalent driving force, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 2-16.
- [59] L.E. Nagy, Ethanol metabolism and inhibition of nucleoside uptake lead to increased extracellular adenosine in hepatocytes, *Am. J. Physiol.* 262 (1992) C1175–C1180.
- [60] A. Ramadan, Z. Naydenova, K. Stevanovic, J.B. Rose, I.R. Coe, The adenosine transporter, ENT1, in cardiomyocytes is sensitive to inhibition by ethanol in a kinase-dependent manner: implications for ethanol-dependent cardioprotection and nucleoside analog drug cytotoxicity, *Purinergic Signal.* 10 (2014) 305–312.
- [61] R.C. Boswell-Casteel, F.A. Hays, Equilibrative nucleoside transporters - a review, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36 (2017) 7-30.

Indywidualny wkład w powstanie prac H1–H12:

- H1.** A. Buczkowski*, T. Olesinki, E. Zbicinska, P. Urbaniak, B. Palecz
International Journal of Pharmaceutics 490 (2015) 102 – 111
“Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH₂ and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H1 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu części pomiarów rozpuszczalności i dializ równowagowych, wykonaniu izotermicznych miareczkowań kalorymetrycznych, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H2.** A. Buczkowski*, D. Waliszewski, P. Urbaniak, B. Palecz
International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 1 – 13
“Study of the interactions of PAMAM G3-NH₂ and G3-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H2 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu części pomiarów rozpuszczalności, wykonaniu pomiarów techniką dializ równowagowych i izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H3.** A. Buczkowski*, P. Urbaniak, H. Piekarski, B. Palecz*
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 171 (2017) 401–405
“Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction between PAMAM G4-OH and 5-fluorouracil in aqueous solutions”
*autorzy korespondencyjni
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H3 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów rozpuszczalności, wykonaniu pomiarów techniką dializ równowagowych i izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.

- H4.** **A. Buczkowski***, A. Stepniak, P. Urbaniak, B. Palecz
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **134** (2018) 595-607
“Calorimetric and spectroscopic investigations of interactions between cucurbituril Q7 and gemcitabine in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H4 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu izotermicznych miareczkowań kalorymetrycznych, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H5.** **A. Buczkowski***, B. Palecz, G. Schroeder
Journal of Molecular Structure **1178** (2019) 554-563
“Stoichiometry and thermodynamics of gemcitabine and cucurbituril Q7 supramolecular complexes in high acidic aqueous solution”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H5 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką spektrometrii mas z elektrorozpyleniem (ESI MS) oraz techniką tandemowej spektroskopii mas MS/MS, wykonaniu pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H6.** **A. Buczkowski***, P. Tokarz, A. Stepniak, J. Lewkowski, A. Rodacka, B. Palecz
Journal of Molecular Liquids **290** (2019) 111190
“Spectroscopic and calorimetric studies of interactions between mitoxantrone and cucurbituril Q7 in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H6 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników miareczkowań spektrofluorymetrycznych i kalorymetrycznych, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H7.** **A. Buczkowski***, M. Gorzkiewicz, A. Stepniak, M. Malinowska-Michalak, P. Tokarz, P. Urbaniak, M. Ionov, B. Klajnert-Maculewicz, B. Palecz
Bioorganic Chemistry **99** (2020) 103843
“Physicochemical and in vitro cytotoxicity studies of inclusion complex between gemcitabine and cucurbit[7]uril host”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H7 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu

badania (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką dializ równowagowych, wykonaniu miareczkowania spektroskopowego UV i ¹H NMR, wykonaniu pomiarów DSC, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.

- H8. A. Buczkowski***, M. Malinowska-Michalak, B. Erdenebayar, B. Palecz*
Journal of Molecular Liquids 313 (2020) 113534
“Spectroscopic, electrochemical and calorimetric studies on the interactions of poly(propyleneimine) G4 dendrimer with 5-fluorouracil in aqueous solutions”
*autorzy korespondencyjni
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H8 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H9. A. Buczkowski***, P. Tokarz, B. Palecz
Journal of Chemical Thermodynamics 153 (2021) 106317
“Thermodynamic study of ethanol impact on gemcitabine binding to cucurbit[7]uril in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H9 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu izotermicznych miareczkowań kalorymetrycznych, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H10. A. Buczkowski***, M. Malinowska-Michalak, A. Stepniak, P. Tokarz, P. Urbaniak, B. Palecz
Journal of Molecular Liquids 334 (2021) 116118
“Calorimetric and spectroscopic studies of interactions of PPI G4 dendrimer with tegafur in aqueous solutions”
*autor korespondencyjny
Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H10 polegał na:
sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H11. A. Buczkowski***, J. Dominikowska, P. Urbaniak, P. Tokarz, M. Guć, G. Schroeder
Journal of Molecular Liquids 336 (2021) 116347
“Doubly or triply protonated? Complexes of cucurbit[n]urils (n=6–8) with a tripodal ligand tris(2-aminoethyl)amine (TREN)”
*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład w powstanie pracy H11 polegał na:

sformułowaniu koncepcji badań, wyborze technik badawczych i zaplanowaniu badań ^1H NMR, DOSY oraz ITC (pomysłodawca badań), wykonaniu pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.

H12. A. Buczkowski*

Journal of Molecular Liquids 345 (2022) 117857

“Thermodynamic study of pH and sodium chloride impact on gemcitabine binding to cucurbit[7]uril in aqueous solutions”

*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład w powstanie monoautorskiej pracy H12 polegał na:

zaplanowaniu, wykonaniu i analizie wszystkich eksperymentów oraz napisaniu manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi na pytania recenzentów.

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

Moja aktywność naukowa w zagranicznych jednostkach naukowych obejmowała:

- 1) **Tygodniowy staż badawczy pod kierunkiem prof. Concetty Giancoli w Neapolu – Włochy w maju 2019 r. na Wydziale Farmacji Università degli Studi di Napoli Federico II**, Scuola di Medicina e Chirurgia, Via Domenico Montesano 49. Ośrodek posiada wyróżnienie „Dipartimento di Eccellenza 2018-2022, Area “03 – Scienze Chimiche”. Tematyka stażu dotyczyła zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej do separacji mieszanin nukleotydów. W wyniku badań potwierdziłem wysoką czystość chlorowodoru gemcytabiny – odczynnika używanego w dalszych badaniach termodynamicznych kompleksowania z kukurbiturilem Q7.

Efektom współpracy kontynuowanej po zakończeniu stażu był również wniosek o długoterminowy grant wyjazdowy do Uniwersytetu im. Federico II (Wydział Farmacji) w Neapolu złożony w czerwcu 2019 roku (niezakwalifikowany do finansowania w grudniu 2019 roku) do Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) w programie imienia Bekkera pt. „Production and characterization of nanoparticles loaded with supramolecular drug carriers” (PPN/BEK/2019/1/00155), poświęcony syntezie i fizykochemiczno-biofizycznej charakterystyce biodegradowalnych nanocząstek o rdzeniu kopolimeru polilaktyd-glikolid (PLGA) modyfikowanych powierzchniowo resztami kwasu hialuronowego (HA) jako nanotransporterów (nieskompleksowanej i skompleksowanej z kukurbiturilem Q7) gemcytabiny do zastosowań biomedycznych w terapii raka trzustki. Tygodniowy pobyt badawczy na Wydziale Farmacji Università degli Studi di Napoli Federico II w maju 2019 r. został zrealizowany w ramach podpisanej 30.01.2018 r. umowy o współpracy na lata 2018-2022 pomiędzy Wydziałem Chemii Uniwersytetu Łódzkiego i Uniwersytetem im. Federico II w Neapolu.

- 2) **Tygodniowy staż badawczy pod kierunkiem dr. Dzmitra Shcharbina w Mińsku – Białoruś w październiku 2016 r. w Laboratorium Proteomiki Instytutu Biofizyki i Inżynierii Komórkowej Narodowej Akademii Nauk Białorusi.** Tematyka stażu dotyczyła badań przesiewowych makromolekuł dendrymerów do zastosowań biomedycznych ("Screening macromolecules for biomedical applications"). Prace eksperymentalne obejmowały badania technikami: fluorymetrii steady-state, mikrosekundowej fosforescencji czasowo-rozdzielczej i badań in vitro na wybranych liniach komórek białaczek.
Staż badawczy został zrealizowany w ramach umowy o współpracy pomiędzy Katedrą Chemii Fizycznej Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutem Biofizyki i Inżynierii Komórkowej Narodowej Akademii Nauk Białorusi podpisaney w dniu 06.06.2016 r.
- 3) **Tygodniowy staż dydaktyczno-badawczy w marcu 2022 roku pod kierunkiem prof. Rinny Aav na Wydziale Chemii i Biotechnologii Uniwersytetu Technicznego w Tallinnie, Estonia.** Tematyka stażu dotyczyła badania właściwości supramolekularnych kukurbiturilu Q7 jako nośnika leków przeciwnowotworowych. Prace eksperymentalne obejmowały badania spektroskopowe techniką dichroizmu kołowego CD (w zakresie UV). Staż dydaktyczno-badawczy został zrealizowany w ramach programu Erasmus+ STA KA103 na rok 2021/2022.

Moja aktywność naukowa w krajowych jednostkach naukowych obejmowała:

- 1) **Miesięczny staż naukowy pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Schroedera w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na Wydziale Chemii w Zakładzie Chemii Supramolekularnej w październiku 2017 r.** Tematyka stażu dotyczyła: (i) badań nad opracowaniem optymalnej metody syntezy hydroksylowych pochodnych kukurbiturili o różnej stechiometrii za pomocą silnych utleniaczy: ozonu, $K_2S_2O_8$ oraz $Na_2S_2O_8$ w wodzie oraz w mieszaninach wody i kwasu mrówkowego, (ii) analizy metodą spektrometrii mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI MS Electrospray Ionization) – w trybie jonów dodatnich i ujemnych związków chemicznych będących produktami reakcji, (iii) zastosowania tandemowej spektroskopii mas MS/MS w analizie związków chemicznych i kompleksów gość-gospodarz, w szczególności identyfikacji wtórnych jonów fragmentacyjnych (daughter ions) MS^n otrzymanych w wyniku kolizji jonów macierzystych (parent ions) wyselekcjonowanych po jonizacji MS.

Wyniki kwerendy dotyczącej syntezy hydroksylowych pochodnych kukurbiturili Q6, Q7 i Q8 zostały opublikowane w formie rozdziału: **A. Buczkowski, G. Schroeder** „Synteza, właściwości i perspektywy zastosowań hydroksylowych pochodnych kukurbiturili” w monografii „Środowisko i Przemysł. Tom VII”, pod red. G. Schroedera i P. Grzesiaka, Wyd. Cursiva, Poznań, 2017, strony 301-325. ISBN 978-83-62108-37-4.

Uzyskane podczas stażu wyniki badań eksperymentalnych techniką ESI MS oraz MS/MS zostały opublikowane w Journal of Molecular Structure 1178 (2019) 554-563, **A. Buczkowski, B. Palecz, G. Schroeder** “Stoichiometry and thermodynamics of gemcitabine and cucurbituril Q7 supramolecular complexes in high acidic aqueous solution” (H5, 70 pkt MEiN, IF(2019)=2.463).

- 2) **Tygodniowy staż badawczy** pod kierunkiem **prof. dr hab. Grzegorza Schroedera w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na Wydziale Chemii w Zakładzie Chemii Supramolekularnej w styczniu 2018 roku**, dotyczący analizy metodą spektrometrii mas mieszanin wodnych kukurbiturilu Q7 i chlorku sodu. Uzyskane przeze mnie podczas stażu wyniki badań eksperymentalnych techniką ESI MS wpływu wzrastającego stężenia chlorku sodu na trwałość kompleksu supramolekularnego kukurbiturilu Q7 z gemcytabiną w roztworach wodnych zostały opublikowane w *Journal of Molecular Liquids* 345 (2022) 117857, **A. Buczkowski** “*Thermodynamic study of pH and sodium chloride impact on gemcitabine binding to cucurbit[7]uril in aqueous solutions*” (H12, 100 pkt MEiN, IF(2020)=6.165) .
- 3) **Tygodniowy staż badawczy** pod kierunkiem **prof. dr hab. Grzegorza Schroedera w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na Wydziale Chemii w Zakładzie Chemii Supramolekularnej we wrześniu 2019 r.** dotyczący syntezy kompleksów supramolekularnych poliamin i kukurbiturili Q6, Q7 i Q8. Badania otrzymanych podczas stażu kompleksów tripodalnej poliaminy TREN (tris(2-aminoetylo)aminy) z kukurbiturilami Q6, Q7 i Q8 były następnie kontynuowane w Katedrze Chemii Fizycznej Uniwersytetu Łódzkiego m.in. techniką kalorymetryczną. Uzyskane wyniki badań spektrometrycznych, spektroskopowych i kalorymetrycznych zostały opublikowane w *Journal of Molecular Liquids* 336 (2021) 116347, **A. Buczkowski**, J. Dominikowska, P. Urbaniak, P. Tokarz, M. Guć, **G. Schroeder** “*Doubly or triply protonated? Complexes of cucurbit[n]urils (n=6–8) with a tripodal ligand tris(2-aminoethyl)amine (TREN)*” (H11, 100 pkt MEiN, IF(2020)=6.165).

Współpracuję także z dr. Szymonem Sękowskim z Laboratorium Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku. Tematyka współpracy dotyczy badań oddziaływania białek z ich ligandami. Wyniki wspólnych badań zostały opublikowane w: *Journal of Molecular Liquids* 299 (2020) 112112, S. Sekowski, A. Buczkowski, B. Palecz, N. Abdulladjanova „*Inhibitory effect of Euphorbia tannins on α -synuclein aggregation in aqueous solutions*” (IF(2020)=6.165, 100 pkt MNiSW).

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

Zajęcia dydaktyczne

Od 2012 roku jestem zatrudniony na stanowisku adiunkta naukowo–dydaktycznego i prowadzę/prowadzę zajęcia:

- 1) konwersatoryjne z:
 - chemii ogólnej
 - chemii fizycznej
 - matematyki
- 2) laboratoryjne z:
 - chemii fizycznej
 - statystyki i technologii informacyjnej

3) wykłady:

- „Wstęp do chemii biofizycznej naturalnych i syntetycznych makromolekuł” dla studentów studiów stacjonarnych I roku II stopnia kierunku „Chemia w nauce i gospodarce”.

Jestem laureatem Dyplomu uznania za zajęcie II miejsca „Srebrna kolba” w kategorii „Najciekawsze zajęcia” przyznanego w 2017 roku przez Studenckie Koło Naukowe Chemików Uniwersytetu Łódzkiego.

Byłem opiekunem 4 prac licencjackich oraz 6 prac magisterskich.

Od 2018 roku jestem promotorem pomocniczym w postępowaniu o nadanie stopnia doktora na podstawie rozprawy pt „Badania oddziaływań kwasu cynamonowego i jego pochodnych z α - i β -cyklodekstryną w wodzie” mgr Ilony Trzcńskiej pod promotorstwem prof. dr hab. Bartłomieja Pałecza.

Od 2020 roku jestem promotorem pomocniczym w postępowaniu o nadanie stopnia doktora na podstawie rozprawy pt „Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami i aminokwasami w środowisku wodnym” mgr Małgorzaty Malinowskiej pod promotorstwem prof. dr hab. Bartłomieja Pałecza.

Wygłosiłem następujące wykłady popularnonaukowe:

- 1) Wykład popularnonaukowy dla uczniów szkół średnich podczas Akademii Ciekawej Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, **A. Buczkowski**, S. Belica „Chemiczne puzzle – czy cząsteczki mogą wiązać się bez wiązań atomowych” (Łódź, 07.12.2021 r.)
- 2) XX Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi
Wystąpienie w formie e-wykładu: A. Buczkowski
„Aminokwasy – cegiełki życia” (18–25 październik 2021, Łódź)
- 3) XVIII Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi
Wystąpienie w formie wykładu: A. Buczkowski
„Cząsteczki w cząsteczkach – farmaceutyczne i kosmetyczne perspektywy zastosowań chemii nadcząsteczkowej” (16-23 kwiecień 2018, Łódź)
- 4) Wykład **A. Buczkowski**, „Lepkość”, podczas spotkania wydziałowego w ramach Światowego Zjazdu Absolwentów Uniwersytetu Łódzkiego (Łódź, 23.05.2015 r.)
- 5) Wykład popularnonaukowy dla uczniów szkół średnich podczas Akademii Ciekawej Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
A. Buczkowski „Co trze w cieczy – poznajemy lepkość” (Łódź, 17.12.2014 r.)
- 6) Wykład popularnonaukowy dla uczniów szkół średnich podczas Akademii Ciekawej Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
A. Buczkowski, S. Belica, „Chemiczne puzzle – czy cząsteczki mogą wiązać się bez wiązań atomowych” (Łódź, 12.03.2014 r.)

Współpracuję także z biologami z Zakładu Biofizyki Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego: prof. dr hab. Marią Bryszewską, prof. dr hab. Barbarą Klajnert-Maculewicz, dr hab. Maksimem Ionovem, dr hab. Aleksandrą Rodacką oraz

dr Michałem Gorzkiewiczem. Wyniki wspólnych badań zostały opublikowane w [H6, H7] oraz w:

- Scientific Reports 11 (2021) 16810
K. Milowska, **A. Rodacka**, S. Melikishvili, **A. Buczkowski**, B. Pałecz, I. Waczulikova, T. Hianik, J. P. Majoral, **M. Ionov**, **M. Bryszewska**
„Dendrimeric HIV-peptide delivery nanosystem affects lipid membranes structure”
- International Journal of Pharmaceutics 544 (2018) 83–90
M. Gorzkiewicz, **A. Buczkowski**, D. Appelhans, B. Voit, Ł. Pułaski, B. Pałecz, **B. Klajnert-Maculewicz**
“Poly(propyleneimine) glycodendrimers non-covalently bind ATP in a pH and salt-dependent manner – model studies for adenosine analogue drug delivery”
- PLOS One 13(1): e0190656, 2018, strony 1-18
J. Gerszon, E. Serafin, **A. Buczkowski**, S. Michlewska, J. A. Bielnicki, **A. Rodacka**
“Functional consequences of piceatannol binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”

Granty

Dwa razy kierowałem grantami zewnętrznymi:

- 1) „**PRELUDIUM**” (NCN) w 2013–2015 (UMO-2012/05/N/ST4/00214)
pt. „Badanie oddziaływań dendrymerów PAMAM G5 i PAMAM G5-OH z wybranymi lekami onkologicznymi”
- 2) „**IUVENTUS PLUS**” (MNiSW) w 2013-2015 (0223/IP3/2013/72)
pt. „Badanie oddziaływań dendrymerów PAMAM G3 i PAMAM G3-OH z wybranymi lekami onkologicznymi”

Byłem wykonawcą w grantzie zewnętrznym OPUS (NCN) w 2013-2016 (UMO-2012/07/B/ST4/00509) pt. „Dendrymery PAMAM G4 i G3,5 jako potencjalne przenośniki leków onkologicznych”

Trzy razy kierowałem wewnętrznymi grantami wydziałowymi – projektami badawczymi finansowanym przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego:

- 1) „Strukturalne i fizykochemiczne badania wybranych związków chemicznych pod kątem ich potencjalnych zastosowań w przemyśle, biologii i medycynie” (2018 r.)
- 2) „Termodynamiczne badania wybranych makrocząsteczek pod kątem ich zastosowań w przemyśle, ochronie środowiska i medycynie” (2017 r.)
- 3) „Badanie oddziaływań wybranych makrocząsteczek i ich ligandów o znaczeniu biochemicznym, medycznym lub kosmetycznym w roztworach wodnych” (2016 r.)

Recenzje artykułów dla redakcji międzynarodowych czasopism naukowych

Od 2013 roku wykonałem **28 recenzji** dla czasopism o obiegu międzynarodowym:

- 1) ELSEVIER (International Journal of Biological Macromolecules, Journal of Molecular Liquids, International Journal of Pharmaceutics, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Food Research International)
- 2) TAYLOR & FRANCIS LTD (Pharmaceutical Development and Technology, Drug Development and Industrial Pharmacy, Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology)
- 3) SPRINGER (Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Chemical Papers)
- 4) ROYAL SOC CHEMISTRY (Photochemical & Photobiological Sciences, RSC Advances, Physical Chemistry Chemical Physics, Nanoscale, Biomaterials Science)
- 5) AMER CHEMICAL SOC (Langmuir, Journal of Physical Chemistry A, Molecular Pharmaceutics)
- 6) CHEM SOC PAKISTAN (Journal of the Chemical Society of Pakistan)

Działalność organizacyjna

- 1) Byłem zaangażowany w prace Zespołu Wydziału Chemii UŁ zajmującego się organizacją przetargu na nowy kalorymetr miareczkujący Affinity ITC Low Volume – Gold Cells, dla Katedry Chemii Fizycznej UŁ.
- 2) Ponadto opiekuję się i koordynuję prace w pracowni mikrokalorymetrycznej.
- 3) Brałem udział w modernizacji pracowni spektrofotometrycznej.
- 4) Uczestniczyłem w przygotowaniu wniosku infrastrukturalnego na zakup nowej aparatury badawczej dla Katedry Chemii Fizycznej UŁ.
- 5) Pełniłem funkcje recenzenta w Konkursie na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi działalności naukowej studentów Uniwersytetu Łódzkiego – „Stypendium Studencki Grant Badawczy”.
- 6) Pełniłem funkcje recenzenta w Konkursie Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza („IDUB”) na projekty badawcze prowadzone przez uczestników studiów doktoranckich i szkół doktorskich „Doktoranckie Granty Badawcze”.
- 7) Brałem udział w przygotowaniu materiałów promocyjnych i uczestniczyłem w prezentacji osiągnięć naukowych Zakładu Chemii Biofizycznej dla Studenckiego Koła Naukowego Chemików Orbital.
- 8) Uczestniczyłem w organizacji nowej pracowni mikrokalorymetrycznej w Katedrze Chemii Fizycznej UŁ.
- 9) Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Otrzymałem następujące wyróżnienia i stypendia:

- Medal za chlubne studia przyznany przez Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za wyróżniające się wyniki w nauce podczas 5-letnich jednolitych studiów magisterskich
- Stypendium w ramach projektu pt. „Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych Naukowców D-RIM” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet VIII, Poddziałanie 8.2.1
- Wyróżnienie rozprawy doktorskiej uchwałą Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego z 23 stycznia 2013 r. nr 4.2013
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego zespołowa stopnia drugiego za cykl publikacji pt. „Oddziaływania nano-nośników z substancjami biologicznie aktywnymi stosowanymi w medycynie oraz ochronie środowiska” (14.10.2017)
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego zespołowa stopnia pierwszego za cykl publikacji pt. „Termochemiczne badania modelowych układów biologicznych” (14.10.2014)



.....
(podpis wnioskodawcy)