

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*mgr Patrycja Bełdzińska*

**Wpływ nanocząstek platyny o różnej  
wielkości na aktywność wybranych leków  
przeciwnowotworowych**  
Influence of platinum nanoparticles of different  
sizes on the activity of selected anticancer drugs

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: dr hab. Jacek Piosik, prof. UG  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu  
Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2025

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi dr hab. Jackowi Piosikowi  
za otwartość, pozytywną energię, cenne uwagi oraz nieocenione  
wsparcie przez cały okres trwania doktoratu.

Dziękuję reszcie zespołu Pracowni Biofizyki za codzienną,  
przyjazną atmosferę, pomoc oraz konstruktywne rady.

Dziękuję również Wszystkim, którzy przyczynili  
się do powstania i wzbogacenia mojej pracy.

## Spis treści

<b>Wykaz skrótów .....</b>	<b>5</b>
<b>Streszczenie.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Wstęp .....</b>	<b>12</b>
1.1. Choroby nowotworowe – aktualny stan wiedzy .....	12
1.1.1. Terapie przeciwnowotworowe .....	12
Chemioterapia .....	12
1.1.2. Charakterystyka wybranych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych .....	13
1.1.2.1. Cisplatyna.....	13
Mechanizm działania .....	14
Wyzwania.....	14
1.1.2.2. Dokсорubicyna i epirubicyna.....	15
Mechanizm działania .....	16
Wyzwania.....	16
1.2. Nanotechnologia.....	17
1.2.1. Wprowadzenie do nanomateriałów .....	17
1.2.2. Nanocząstki platyny (PtNPs).....	19
1.2.2.1. Właściwości przeciwnowotworowe PtNPs .....	19
1.2.3. Systemy dostarczania leków (DDS) na bazie nanocząstek metalicznych.....	20
Przykłady modyfikowanych nanocząstek .....	21
Oddziaływania niekowalencyjne .....	22
1.2.4. Wielkość nanocząstek .....	24
<b>2. Cel pracy.....</b>	<b>26</b>

<b>3. Publikacje naukowe będące podstawą niniejszej rozprawy .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Wkład doktorantki w publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy ...</b>	<b>29</b>
<b>5. Wyniki.....</b>	<b>31</b>
5.1. Publikacja nr 1: Platyna jako lek oraz jego modulator – czy nanocząstki platyny wpływają na aktywność cisplatyny?.....	31
5.2. Publikacja nr 2: Wpływ rozmiaru nanocząstek platyny na aktywność doksorubicyny. ....	32
5.3. Publikacja nr 3 (manuskrypt): Nanocząstki platyny oddziałują z epirubicyną zależnie od ich rozmiaru i wpływają na jej aktywność biologiczną. .	35
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>40</b>
<b>8. Wykaz rycin .....</b>	<b>49</b>
<b>9. Załączniki.....</b>	<b>50</b>
9.1. Publikacja nr 1.....	50
9.1.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 1 .....	61
9.2. Publikacja nr 2.....	70
9.2.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 2 .....	85
9.3. Publikacja nr 3 (manuskrypt) .....	95
9.3.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 3 .....	131
<b>10. Dorobek naukowy .....</b>	<b>140</b>
10.1. Publikacje wchodzące w skład przewodu doktorskiego .....	140
10.2. Publikacje niewchodzące w skład przewodu doktorskiego.....	140
10.3. Doniesienia konferencyjne własne.....	141
10.4. Doniesienia konferencyjne – współautorstwo .....	142
10.5. Kursy i szkolenia .....	143
10.6. Inna działalność .....	144

## Wykaz skrótów

**AFM** (ang. *Atomic Force Microscopy*) - mikroskopia sił atomowych

**ATM** (ang. *Ataxia-Telangiectasia Mutated*) - kinaza serynowo-treoninowa aktywowana przez przerwania obu nici DNA

**ATR** (ang. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related*) - kinaza serynowo-treoninowa aktywowana przez stres replikacyjny i uszkodzenia pojedynczej nici DNA

**AgNPs** (ang. *Silver Nanoparticles*) - nanocząstki srebra

**AgPtNPs** (ang. *Silver and Platinum Nanoparticles*) - nanocząstki srebra i platyny

**AuNPs** (ang. *Gold Nanoparticles*) - nanocząstki złota

**CDDP** (ang. *Cisplatin*) - cisplatyna

**$\Delta H$**  (ang. *enthalpy change*) - zmiana entalpii

**DDR** (ang. *DNA Damage Response*) - odpowiedź na uszkodzenia DNA

**DDS** (ang. *Drug Delivery Systems*) - systemy dostarczania leków

**DLS** (ang. *Dynamic Light Scattering*) - dynamiczne rozpraszanie światła

**DOX** (ang. *Doxorubicin*) - doksorubicyna

**DSC** (ang. *Differential Scanning Calorimetry*) - skaningowa kalorymetria różnicowa

**EMT** (ang. *Epithelial-To-Mesenchymal Transition*) - przejście nabłonkowo-mezenchymalne

**EPI** (ang. *Epirubicin*) - epirubicyna

**EPR** (ang. *Enhanced Permeability and Retention*) - efekt wzmocnionej przepuszczalności i retencji

**FC<sub>60</sub>** (ang. *Fullerene C60*) - fuleren C60

**FTIR** (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

**GO-PtNPs** (ang. *Graphene Oxide and Platinum Nanoparticles*) - nanocząstki tlenku grafenu i platyny

**HaCaT** (ang. *immortalized human keratinocyte cell line*) - unieśmiertleniona ludzka linia komórek keratynocytów

**HEK293** (ang. *human embryonic kidney cell line*) - ludzka linia komórkowa embrionalnych komórek z nerki

**HepG-2** (ang. *human liver cancer cell line*) - ludzka linia komórkowa raka wątroby

**HL-60** (ang. *human acute promyelocytic leukemia cell line*) - ludzka linia komórkowa ostrej białaczki promielocytowej

**ICR-191** (ang. *acridine mutagen ICR-191*) - modelowy mutagen akrydynowy

**ITC** (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) - izotermiczna kalorymetria miareczkowa

**LLC** (ang. *Lewis Lung Carcinoma*) - nowotwór płuc myszy

**LSPR** (ang. *Localized Surface Plasmon Resonance*) - zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy

**MCF-7** (ang. *human breast cancer cell line of luminal type*) - ludzka linia komórkowa raka piersi o charakterze luminalnym

**MCF-7/ADR** (ang. *MCF-7 Adriamycin-resistant breast cancer cell line*) - linia komórkowa raka piersi oporna na adriamycynę (doksorubicynę)

**MDA-MB-231** (ang. *human triple negative breast cancer cell line*) - ludzka linia komórkowa potrójnie ujemnego gruczolaka piersi

**MeJuSo** (ang. *human melanoma cell line*) - ludzka linia komórkowa czerniaka skóry

**MTT** (ang. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy

**NER** (ang. *Nucleotide Excision Repair*) - naprawa przez wycinanie nukleotydu

**NIR** (ang. *Near Infrared Spectroscopy*) - spektroskopia w bliskiej podczerwieni

**NPs** (ang. *Nanoparticles*) - nanocząstki

**PEG** (ang. *Polyethylene Glycol*) - glikol polietylenowy

**PPTT** (ang. *Plasmonic Photothermal Therapy*) - fototermałna terapia plazmonowa

**PtNPs** (ang. *Platinum Nanoparticles*) - nanocząstki platyny

**PTX** (ang. *Pentoxifylline*) - pentoksyfilina

**RA** (ang. *Retinoic Acid*) - kwas retinowy

**ROS** (ang. *Reactive Oxygen Species*) - reaktywne formy tlenu

**SiHa** (ang. *human cervical cancer cell line*) - ludzka linia komórkowa raka szyjki macicy

**SKBR-3** (ang. *human breast cancer cell line overexpressing HER2 receptor*) - ludzka linia komórkowa raka piersi z nadekspresją receptora HER2

## Streszczenie

W 2022 roku na świecie odnotowano prawie 10 milionów zgonów będących następstwem choroby nowotworowej. Pomimo znacznego postępu w dziedzinie terapii przeciwnowotworowych, chemioterapia nadal pozostaje jedną z najczęściej stosowanych, jak również najskuteczniejszych metod leczenia. Niestety, przyjmowanie leków cytostatycznych wiąże się z występowaniem często poważnych skutków ubocznych obejmujących m.in. toksyczność wielonarządową, a także z powstawaniem oporności w komórkach nowotworowych, co znacznie obniża jakość życia pacjentów i ogranicza możliwości leczenia. W związku z tym poszukiwanie modyfikacji terapii stanowi jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny. Jedną z obiecujących dziedzin mogących przyczynić się do poprawy wydajności terapii przeciwnowotworowych jest nanotechnologia, w tym wykorzystanie nanocząstek (NPs). Dzięki unikalnym właściwościom wynikającym przede wszystkim z niewielkich rozmiarów przy wysokim stosunku powierzchni do objętości, NPs mogą być wykorzystywane jako systemy dostarczania leków (DDS) w celu precyzyjnego, kontrolowanego oraz selektywnego wnikania do komórki nowotworowej, co minimalizuje narażenie komórek zdrowych na działanie leku. Co ważne, wielkość nanocząstek może mieć znaczenie przede wszystkim w kontekście penetracji błon komórkowych jak i toksyczności. Nanocząstki platyny (PtNPs), należące do nanocząstek metalicznych, ze względu na szczególne właściwości takie jak działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, ale również przeciwnowotworowe mogą stanowić bardzo obiecujące narzędzie w obszarze medycyny.

W związku z tym celem niniejszej pracy doktorskiej było zweryfikowanie występowania bezpośrednich interakcji pomiędzy nanocząstkami platyny a wybranymi lekami przeciwnowotworowymi takimi jak cisplatyna (CDDP), doksorubicyna (DOX) oraz epirubicyna (EPI). Ponadto, sprawdzono czy wspomniane oddziaływania mają wpływ na aktywność biologiczną, w tym mutagenność oraz cytotoksyczność, badanych związków. Badania zrealizowano w kontekście potencjalnych różnic wynikających z zastosowania nanocząstek o zróżnicowanej wielkości. W projekcie przeprowadzono analizę agregacji PtNPs pod wpływem

wybranych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych. Wykorzystano szereg analiz fizykochemicznych w tym metody spektroskopowe, fluorymetryczne oraz kalorymetryczne, aby potwierdzić występowanie bezpośrednich oddziaływań między badanymi nanocząstkami a wymienionymi lekami. W części biologicznej oceniono jak PtNPs oddziałują na aktywność mutageną wybranych leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium. Ponadto, przeprowadzono badania cytotoksyczności zarówno samych nanocząstek jak i ich wpływu na działanie wybranych cytostatyków wykorzystując ludzkie linie komórkowe raka piersi MDA-MB-231 i SKBR-3 (PtNPs - CDDP), czerniaka MeUuSo (PtNPs - DOX i PtNPs - EPI) oraz unieśmiertelnioną ludzką linię komórek keratynocytów HaCaT (PtNPs - DOX i PtNPs - EPI).

Uzyskane wyniki wskazują na niewątpliwy potencjał zastosowania w przyszłości nanocząstek platyny zarówno w celu zwiększenia efektywności istniejących, jak i opracowania nowych schematów chemioterapii przeciwnowotworowych. Jednym z kluczowych aspektów ich zastosowania może być obniżenie efektów ubocznych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych wobec zdrowych tkanek i komórek. Ponadto, stosowanie nanocząstek o różnej wielkości może przyczynić się do modulacji aktywności leków przeciwnowotworowych, co jest szczególnie istotne zarówno w przypadku terapii nowotworów dotychczas opornych na leczenie jak i rozwijających oporność w trakcie terapii.

## Abstract

In 2022, almost 10 million cancer-related deaths were recorded worldwide. Despite significant progress in anticancer therapies, chemotherapy still remains one of the most commonly employed and most effective treatment methods. Unfortunately, administration of cytostatic drugs is associated with the occurrence of serious side effects, including multi-organ toxicity, as well as the development of resistance in cancer cells, which significantly reduces the quality of patients' life and limits treatment options. Therefore, the search for therapy modifications is one of the key challenges of modern medicine. One of the promising areas that can contribute to improving the efficiency of anticancer therapies is nanotechnology, including the use of nanoparticles (NPs). Due to their unique properties, primarily their small size with a high surface-to-volume ratio, NPs can be used as drug delivery systems (DDS) for precise, controlled, and selective penetration into cancer cells, which minimizes the exposure of healthy cells to the chemotherapeutic agent itself. Importantly, the size of nanoparticles may be particularly relevant in the context of cell membrane penetration and toxicity. Platinum nanoparticles (PtNPs), which belong to metallic nanoparticles, due to their specific properties such as antibacterial, antifungal, but also anticancer activity, may be a very promising tool in the field of medicine.

Therefore, the aim of this doctoral thesis was to investigate the occurrence of direct interactions between platinum nanoparticles and selected anticancer drugs such as cisplatin (CDDP), doxorubicin (DOX) and epirubicin (EPI). In addition, it was examined whether these interactions affect the biological activity, including mutagenicity and cytotoxicity, of the tested compounds. The research was conducted in the context of potential differences resulting from the use of nanoparticles of diverse sizes. The project included analysis of PtNPs aggregation under the influence of selected chemotherapeutic agents. A number of physicochemical analyses, including spectroscopic, fluorometric, and calorimetric methods were employed to confirm the occurrence of direct interactions between the tested nanoparticles and the mentioned drugs. In the biological part, the effect of PtNPs on the mutagenic activity of selected anticancer drugs was assessed using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Additionally, cytotoxicity studies of both

the nanoparticles themselves and their effect on the activity of selected cytostatics were performed using human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR-3 (PtNPs - CDDP), melanoma MeJuSo (PtNPs - DOX and PtNPs - EPI), and a non-cancerous keratinocyte cell line HaCaT (PtNPs - DOX and PtNPs - EPI).

The obtained results indicate the considerable potential of using platinum nanoparticles in the future, both to increase the effectiveness of existing and to develop new anticancer chemotherapy regimens. One of the key aspects of their application may be to reduce the side effects of anticancer chemotherapeutics on healthy tissues and cells. Moreover, employing nanoparticles of different sizes may contribute to the modulation of anticancer drugs' activity, which is particularly significant in the case of the therapy of cancers that are either initially resistant to treatment or acquire resistance during therapy.

## **1. Wstęp**

### **1.1. Choroby nowotworowe – aktualny stan wiedzy**

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Badania przeprowadzone przez Global Cancer Observatory, wskazują, że w 2022 roku na świecie odnotowano około 20 milionów nowych przypadków zachorowania na raka oraz 9,7 miliona zgonów. Najczęściej diagnozowanym nowotworem był rak płuc, a następnie rak piersi u kobiet, rak jelita grubego oraz rak prostaty u mężczyzn. Według przewidywań Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*; WHO), do 2050 roku liczba diagnozowanych zachorowań na nowotwory może wzrosnąć nawet do 35 milionów rocznie. Taka sytuacja wynika m.in. z globalnego starzenia się społeczeństw, jak również narażenia na czynniki ryzyka np. zanieczyszczenie środowiska, palenie tytoniu czy otyłość. Statystyki są alarmujące i podkreślają pilną potrzebę poszukiwania nowych, skutecznych terapii przeciwnowotworowych [1].

#### **1.1.1. Terapie przeciwnowotworowe**

Pomimo niewątpliwego rozwoju terapii przeciwnowotworowych i stosowaniu nowych podejść w leczeniu obejmujących m.in. immunoterapię, terapię celowaną czy wykorzystanie komórek macierzystych, klasyczne metody, w tym chemioterapia, radioterapia i chirurgia, nadal pozostają standardem w leczeniu nowotworów [2–4]. Spośród wymienionych, chemioterapia jest uważana za najszersze stosowaną oraz najbardziej skuteczną metodę leczenia nowotworów w różnych stadiach [4,5].

#### ***Chemioterapia***

Chemioterapia opiera się na podaniu pacjentowi leków zaburzających prawidłowe procesy komórkowe, prowadząc do śmierci komórki. Początki tej metody leczenia nowotworów sięgają 1942 roku, kiedy udokumentowano wpływ pochodnej iperytu azotowego na szpik kostny. W efekcie, stał się on pierwszym lekiem stosowanym w leczeniu chłoniaka. W następnych dekadach wynaleziono skuteczne antymetabolity takie jak 5-fluorouracyl, cytarabina czy metotreksat. Z kolei lata 60 i 70 XX wieku to czas, w którym odkryto naturalnie pozyskiwane antybiotyki

przeciwnowotworowe takie jak dokсорubicyna, jak również wprowadzono cisplatynę, która zrewolucjonizowała leczenie m.in. raka jądra [2,6,7].

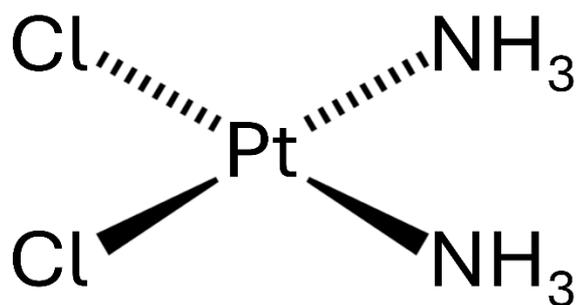
Niestety, pomimo niewątpliwej skuteczności przeciwnowotworowej, leki przeciwnowotworowe nie wykazują selektywnego działania, przez co oddziałują nie tylko na komórki nowotworowe, ale także na komórki zdrowe, co skutkuje występowaniem licznych, często poważnych skutków ubocznych [2,8]. Ponadto, komórki nowotworowe wykorzystują szereg mechanizmów, takich jak zwiększona aktywność pomp efflux, uruchamianie procesów naprawy DNA, hamowanie apoptozy, interakcje z komórkami odpornościowymi czy przejście nabłonkowo-mezenchymalne (*Epithelial-To-Mesenchymal Transition*; EMT), prowadzących do występowania lekooporności, a w konsekwencji ograniczenia skuteczności terapii [9,10].

### **1.1.2. Charakterystyka wybranych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych**

Chemioterapeutyki przeciwnowotworowe można podzielić ze względu na ich sposób działania na kilka grup: cytostatyki alkilujące (w tym pochodne platyny), antymetabolity, antybiotyki przeciwnowotworowe oraz inhibitory mikrotubul i topoizomeraz [11]. W niniejszym projekcie badawczym wybrano trzy leki należące do dwóch grup: cytostatyków alkilujących oraz antybiotyków przeciwnowotworowych.

#### **1.1.2.1. Cisplatyna**

Cisplatyna (CDDP, cis-diaminodichloroplatyna) jest szeroko stosowanym lekiem przeciwnowotworowym z grupy cytostatyków alkilujących, zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*; FDA) w 1978 roku jako pierwszy analog platyny i jednocześnie pierwszy lek zawierający metal ciężki [3,12–14]. CDDP posiada w swojej strukturze platynę na II stopniu utlenienia, a także dwa atomy chloru oraz dwie cząsteczki amoniaku ułożone w konfiguracji *cis*, niezbędnej do wykazywania aktywności nowotworowej (Ryc. 1.) [14]. Jest używana w leczeniu wielu nowotworów, między innymi pęcherza moczowego, piersi, głowy i szyi, jajnika czy jąder [12,13].



**Ryc. 1.** Struktura chemiczna cisplatyny (CDDP).

### ***Mechanizm działania***

Mechanizm działania cisplatyny opiera się na tworzeniu wiązań krzyżowych w obrębie jednej lub pomiędzy sąsiadującymi nićmi DNA. Cząsteczka cisplatyny po wniknięciu do komórki traci jeden lub oba ligandy chlorowe, co umożliwia utworzenie kowalencyjnych wiązań pomiędzy atomem platyny a, najczęściej, pozycją N7 zasad purynowych. W ten sposób dochodzi do powstania wspomnianych wcześniej wiązań krzyżowych, z których za kluczowe uważa się te między sąsiadującymi resztami guaniny [13,15,16]. Powstałe addukty CDDP-DNA powodują zmiany konformacyjne w strukturze DNA, zakłócają procesy replikacji oraz transkrypcji, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i śmierci komórki [16].

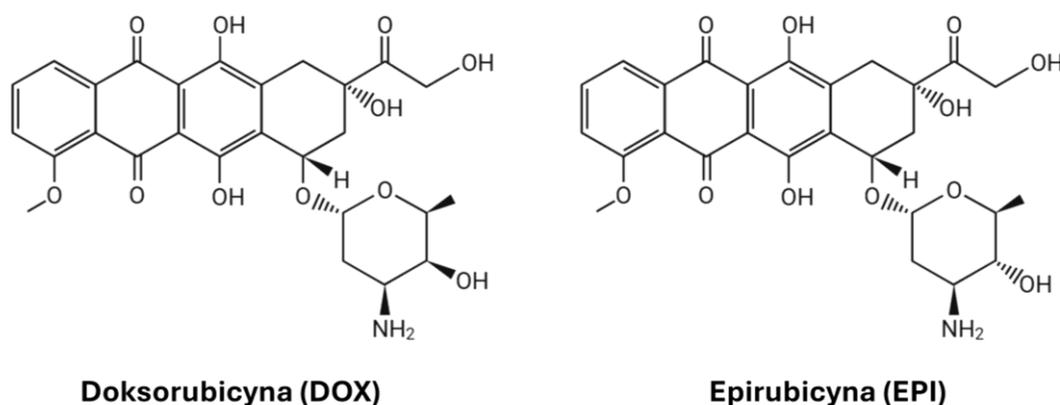
### ***Wyzwania***

Zmiany w obrębie DNA wywołane przez cisplatynę uruchamiają, także odpowiedź na uszkodzenia DNA (DDR), aktywując wiele szlaków sygnałowych. Jednymi z najważniejszych są ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) i ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related*), które m.in. aktywują naprawę przez wycinanie nukleotydu (NER), oraz szlak PI3K/Akt wpływający na proliferację komórek oraz zwiększający ekspresję transporterów odpowiedzialnych za wypompowywanie CDDP z komórki, co jest jednym z mechanizmów prowadzących do oporności lekowej. Do innych mechanizmów ograniczających skuteczność terapii z użyciem cisplatyny należą m.in. zmniejszone wchłanianie leku poprzez mutacje w receptorach lub transporterach błonowych oraz inaktywacja CDDP związana z tworzeniem

nieaktywnych koniugatów z glutationem [10,17,18]. Oporność lekowa nie jest jednak jedynym wyzwaniem związanym z terapią cisplatyną. Pomimo swojej skuteczności, stosowanie CDDP powoduje poważne skutki uboczne, z których najważniejszym jest nefrotoksyczność. Objawia się ona na różne sposoby, m.in. ostrym uszkodzeniem nerek oraz zaburzeniami elektrolitowymi, takimi jak hipomagnezemia i hipokalcemia, co znacząco ogranicza możliwość leczenia poprzez konieczność zmniejszania dawek leku [14]. Ponadto, cisplatyna wpływa na funkcjonowanie innych narządów takich jak wątroba, płuca, a nawet na uszkodzenie słuchu [16].

### 1.1.2.2. Doksorubicyna i epirubicyna

Doksorubicyna (DOX) oraz epirubicyna (EPI) należą do grupy antybiotyków cytostatycznych, dokładnie antracyklin. DOX została po raz pierwszy wyizolowana z bakterii *Streptomyces peucetius* var. *caesius* w 1969 roku, a w 1974 roku została oficjalnie zatwierdzona przez FDA [19,20]. EPI, syntetyczną pochodną DOX, natomiast dopuszczono do stosowania w 1999 roku jako terapię adjuwantową w leczeniu raka piersi [21]. Zarówno cząsteczki DOX jak i EPI składają się z dwóch głównych części – aglikonu oraz aminocukru (Ryc. 2).



**Ryc. 2.** Struktury chemiczne wybranych antybiotyków antracyklinowych.

Różnicę strukturalną stanowi stechiometryczne ułożenie grupy hydroksylowej przy pozycji 4' daunosaminy (aminocukru) w cząsteczce epirubicyny, co czyni ją 4' epimerem doksorubicyny [21]. Ta zmiana powoduje, że EPI jest bardziej lipofilna,

szybciej przenika do komórek, a także jest mniej toksyczna, dzięki czemu może być stosowana w wyższych dawkach [21,22].

### ***Mechanizm działania***

Oba leki działają poprzez trzy główne mechanizmy: interkalację do DNA, hamowanie topoizomerazy II oraz generowanie wolnych rodników [19,23–26]. Czteropierścieniowy chromofor obecny w cząsteczce antracykliny, wnika pomiędzy sąsiednie pary zasad DNA. Interkalacja wpływa na topologię DNA, co może zakłócać aktywność enzymów zaangażowanych w replikację i transkrypcję. Samo wiązanie często nie jest kluczowe dla cytotoksyczności leku – ważniejsze mogą być miejsce i sposób wiązania prowadzące do zahamowania konkretnych funkcji DNA [23–25,27]. Antracykliny wykazują również zdolność wiązania z topoizomerazą II, enzymem niezbędnym do przecinania nici DNA podczas procesów komórkowych takich jak replikacja czy transkrypcja. Tworzenie kompleksu topoizomeraza II – antracyklina – DNA uniemożliwia ponowne łączenie przeciętych nici DNA prowadząc do uruchomienia procesu apoptozy [23,24,26,28]. Trzecim mechanizmem działania antracyklin jest generowanie reaktywnych form tlenu (ROS) podczas wewnątrzkomórkowych cykli utleniania i redukcji. Powstałe wolne rodniki tlenowe narażają jądrowe i mitochondrialne DNA na stres oksydacyjny oraz prowadzą do procesów takich jak peroksydacja lipidów, które uszkodzają błony komórkowe, a w konsekwencji doprowadzają do śmierci komórki [23,24].

### ***Wyzwania***

Podobnie jak w przypadku cisplatyny, stosowanie zarówno doksorubicyny, jak i epirubicyny często wiąże się z występowaniem lekooporności. Przyczyną mogą być mechanizmy związane m.in. z wypompowywaniem (ang. *efflux*) leku, wzmożoną autofagią, zmniejszeniem interakcji leku z komórką, na przykład wskutek mutacji genu topoizomerazy II, a także zmiany w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA [23,27]. Udowodniono także, że doksorubicyna może wzbudzać mechanizm EMT związany z przejściem komórek nabłonkowych do fenotypu mezenchymalnego, co zwiększa ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworowych, a także wiąże się z aktywacją szlaków hamujących apoptozę sprzyjając przeżywaniu komórek

[10,27,29]. Ponadto stosowanie wymienionych antracyklin wiąże się z występowaniem poważnych działań niepożądanych. Terapia dokсорubicyną często prowadzi do ostrej, kardiotoxyczności zależnej od dawki, która objawia się przede wszystkim kardiomiopatią oraz zastoinową niewydolnością serca. Ponadto mogą wystąpić skutki uboczne takie jak supresja szpiku kostnego czy nefrotoksyczność [30–32]. W przypadku epirubicyny, dawki analogiczne do DOX wywołują mniejsze skutki zarówno kardiotoxyczne jak i mielosupresyjne przy utrzymaniu efektywności terapeutycznej [21].

W związku z tym tak ważne jest poszukiwanie metod modyfikacji terapii, które pozwolą zniwelować skutki uboczne i przewyciężyć oporność lekową, jednocześnie utrzymując lub poprawiając efektywność działania chemioterapeutyków przeciwnowotworowych, aby pozytywnie wpłynąć na jakość życia pacjentów onkologicznych. Jednym z obszarów modyfikacji działania stała się szeroko rozumiana dziedzina nanotechnologii.

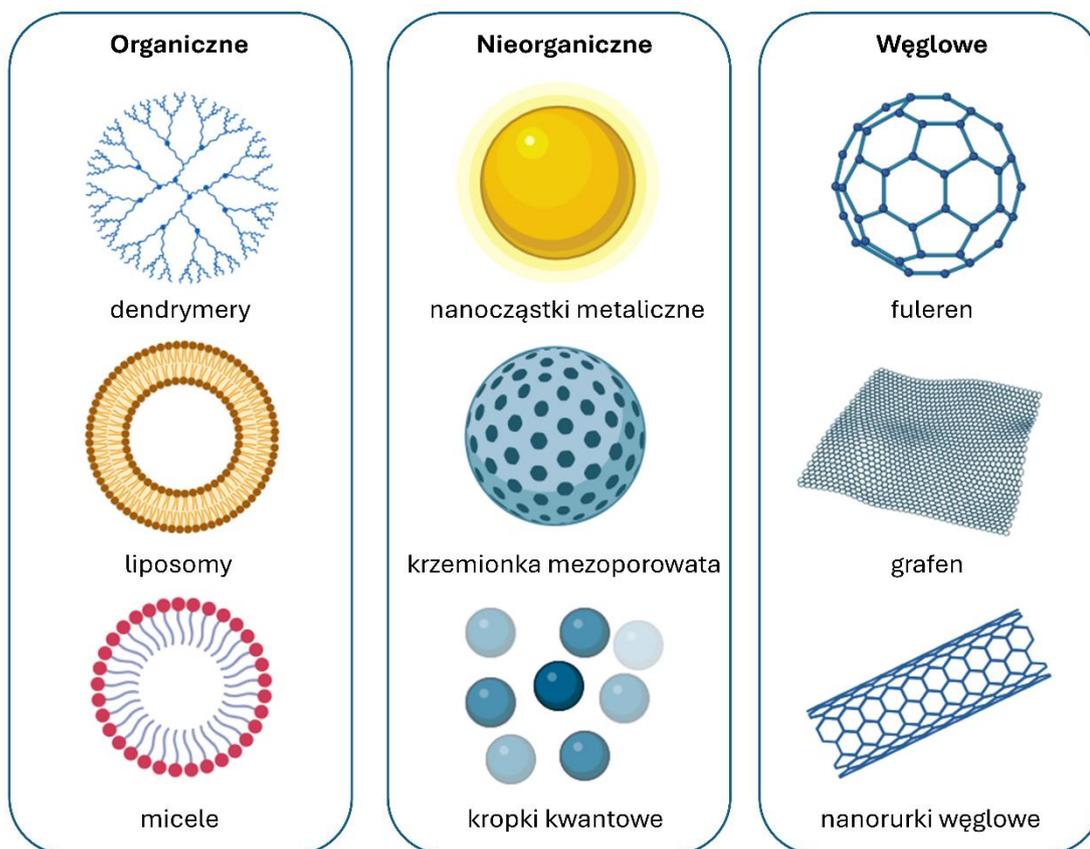
## **1.2. Nanotechnologia**

### **1.2.1. Wprowadzenie do nanomateriałów**

Nanotechnologia, jako dziedzina interdyscyplinarna z pogranicza zarówno fizyki, chemii, biologii jak i medycyny czy inżynierii, zyskała szczególne zainteresowanie badaczy w ciągu ostatnich dwóch dekad. Jej oficjalne początki sięgają jednak połowy XX wieku i słynnego wystąpienia Richarda Feynmana “There’s Plenty of Room at the Bottom”. Laureat Nagrody Nobla przedstawił wtedy wizję, w której możliwa byłaby manipulacja na poziomie atomowym i molekularnym, co otworzyło perspektywę tworzenia nowych narzędzi i maszyn w nanoskali [33–35]. Jak widać po latach, Richard Feynman nie mylił się, a nanotechnologia stała się nie tylko popularną, ale i niezwykle atrakcyjną i dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki.

Nanomateriały definiuje się jako struktury, w których przynajmniej jeden wymiar jest mniejszy niż 100 nm. Wśród nich wyróżnia się m.in. nanocząstki (NPs), materiały zero-wymiarowe, których wszystkie trzy wymiary mieszczą się w zakresie nanoskali. NPs mogą różnić się kształtem, rozmiarem, funkcjonalizacją powierzchni oraz składem, co sprawia, że mogą wykazywać rozmaite właściwości fizykochemiczne

[35,36]. Istnieje kilka podziałów nanomateriałów, jednak bazując na składzie można wyróżnić trzy główne grupy: organiczne (np. dendrymery), nieorganiczne (np. nanocząstki metaliczne) oraz węglowe (np. fuleren) [35,37–39] (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Klasyfikacja nanomateriałów z przykładami.

Nanocząstki metaliczne, do których należą m.in. nanocząstki platyny (PtNPs), srebra (AgNPs), czy złota (AuNPs), wykazują wyjątkowe właściwości optyczne, elektryczne, katalityczne, termiczne, magnetyczne czy mechaniczne [35]. Ze względu na wykazywanie zjawiska zwanego lokalnym rezonansem plazmonowym powierzchni (LSPR) znajdują zastosowanie w biosensorach czy fototermalnej terapii plazmonowej (PPTT) jak również w tworzeniu urządzeń optoelektronicznych [35,36,40–42]. Ponadto, nanocząstki metaliczne mogą być stosowane w technikach obrazowania np. metodą rezonansu magnetycznego (MRI) poprawiając jakość obrazowania [35,36].

### 1.2.2. Nanocząstki platyny (PtNPs)

Nanocząstki platyny, poza wymienionymi wyżej cechami, wykazują również właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [43–49]. W badaniu Nishanti i in. [48] potwierdzono, że nanocząstki platyny nie tylko wykazują aktywność przeciwbakteryjną, ale także wzmacniają działanie antybiotyków. Szczególnie istotny efekt obserwowano w przypadku bakterii *Bacillus* sp. odpornej na streptomycynę, gdzie nanocząstki spowodowały uwrażliwienie bakterii na ten antybiotyk. Ponadto PtNPs wykazywały silną aktywność antybakteryjną wobec szczepu *Escherichia coli* cechującego się wielolekoopornością [46]. Podobnie, grupa badawcza Chwalibog i in. [47] potwierdziła, iż PtNPs działają toksycznie względem bakterii *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Candida albicans* uszkadzając ścianę komórkową, a w konsekwencji powodując wyciek substancji komórkowych i śmierć mikroorganizmów. Aktywność przeciwgrzybicza nanocząstek platyny została również potwierdzona dla innych gatunków m.in. *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus flavus* [45] jak również *Colletotrichum acutatum* czy *Cladosporium fulvum* [44]. Jednak właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze to nie jedyne pozytywne aspekty wykorzystania PtNPs w medycynie.

#### 1.2.2.1. Właściwości przeciwnowotworowe PtNPs

Nanocząstki platyny to niezwykle obiecujące struktury w kontekście terapii przeciwnowotworowych. Mogą być wykorzystywane m.in. jako nośniki leków, ale same również wykazują aktywność przeciwnowotworową, co zostało potwierdzone w wielu interesujących doniesieniach. W badaniu prowadzonym przez Kutwin i in. [50] porównywano aktywność nanocząstek platyny, o średnicach od 2 nm do 19 nm, z lekiem przeciwnowotworowym cisplatyną względem linii komórkowej glejaka wielopostaciowego U87, jak również ich wpływ na tkankę guza w modelu *in ovo*. Potwierdzono, że PtNPs znacząco obniżają żywotność komórek glejaka wywołując efekty podobne do cisplatyny, przy jednocześnie niższym poziomie nekrozy. Ponadto, nanocząstki wpłynęły znacząco na zmniejszenie wagi i objętości guza, a efekty były silniejsze niż w przypadku cisplatyny, co czyni je niezwykle obiecującymi kandydatami w terapii nowotworów mózgu. Innym ciekawym badaniem było

wykorzystanie nanocząstek srebra i platyny (AgPtNPs), w którym wykazano, że nanocząstki w wybranym zakresie stężeń obniżają żywotność komórek czerniaka oraz glejaka wielopostaciowego przy jednoczesnym braku wpływu na zdrowe komórki ludzkie fibroblastów, co prawdopodobnie ma związek z wyższą przepuszczalnością tkanki nowotworowej [51]. W innych pracach naukowych udowodniono, że zarówno same nanocząstki platyny o wielkości około 34 nm [52] jak i PtNPs w połączeniu z tlenkiem grafenu (GO-PtNPs) [53] wykazują znaczną cytotoksyczność względem linii komórkowych raka piersi MCF-7 oraz raka wątroby HepG-2. Z kolei badanie PtNPs o rozmiarach od 30 nm do 60 nm, wytworzonych przy pomocy zielonej syntezy z wykorzystaniem polifenoli, potwierdziło ich zdolność do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M, zahamowania proliferacji komórek oraz indukcji apoptozy w ludzkiej linii komórkowej raka szyjki macicy SiHa [54].

Przytoczone przykłady wskazują nie tylko na niewątpliwy potencjał nanocząstek platyny w terapii przeciwnowotworowej, lecz także na ich szerokie spektrum działania przeciwko nowotworom o różnym pochodzeniu.

### **1.2.3. Systemy dostarczania leków (DDS) na bazie nanocząstek metalicznych**

W ostatnich latach systemy dostarczania leków (DDS) zyskały na znaczeniu jako obiecujące narzędzie w terapiach przeciwnowotworowych. Stosowanie DDS pozwala na zwiększenie skuteczności terapii poprzez precyzyjne dostarczanie leku przy jednoczesnej minimalizacji toksyczności wobec zdrowych komórek. Ponadto, możliwe jest dostosowanie właściwości uwalnianego leku, takich jak rozpuszczalność, biodostępność czy czas półtrwania substancji. W tym kontekście zjawisko Enhanced Permeability and Retention (EPR) odgrywa znaczącą rolę. Efekt EPR polega na tym, że niewielkie struktury, takie jak nanocząstki, kumulują się w tkance nowotworowej przede wszystkim w wyniku nieprawidłowej budowy naczyń krwionośnych nowotworu. Dzięki temu zjawisku nanocząstki mogą nie tylko łatwiej przenikać do środowiska nowotworu, ale również pozostawać tam przez dłuższy czas co przedłuża efekt cytotoksyczny leku przy jednoczesnym ograniczeniu jego działania na zdrowe komórki [55–58].

DDS mogą wykorzystywać różnorodne nośniki, zarówno organiczne, nieorganiczne czy też hybrydowe, w tym nanocząstki metaliczne [59–61]. Najwięcej doniesień w tym kontekście można znaleźć na temat nanocząstek złota i srebra, jednak istnieją także badania wykorzystujące głównie modyfikowane nanocząstki platyny.

### ***Przykłady modyfikowanych nanocząstek***

Jednym z przykładów wykorzystania PtNPs w DDS było zastosowanie mezoporowatych nanocząstek platyny modyfikowanych glikolem polietylenowym (PEG) i załadowanych doksorubicyną [62], które umożliwiły kontrolowane uwalnianie leku poprzez obniżone pH, analogiczne do warunków panujących w środowisku guza. Dzięki takiemu rozwiązaniu lek może być uwalniany przede wszystkim w miejscu nowotworu, co zwiększa jego skuteczność oraz ogranicza toksyczność względem zdrowych tkanek. Ponadto, w badaniu zastosowano linię komórkową raka piersi oporną na doksorubicynę MCF-7/ADR, wykazującą fenotyp oporności wielolekowej, przede wszystkim poprzez podwyższoną ekspresję transporterów błonowych, takich jak P-glikoproteina, która wypompowuje lek z komórek, jak również przez zmniejszone wchłanianie leku [62,63]. Zaobserwowano, że nanocząstki wnikały do opornych komórek umożliwiając przedłużone działanie leku [62]. Podobny system na bazie PtNPs modyfikowanych przy pomocy PEG i połączonych z DOX zaproponowano jako terapię o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu czerniaka. W badaniach wykorzystano linię komórkową czerniaka pochodzącą z myszy B16F10 jak również model zarodka kury. Zaobserwowano skuteczne zahamowanie proliferacji komórek czerniaka oraz indukcję apoptozy, jak również znaczące zmniejszenie wzrostu guza w porównaniu do kontroli z samą doksorubicyną, co wskazuje na wysoką skuteczność stosowania DDS [64]. W innym badaniu skonstruowano również system łączący nanocząstki platyny oraz złota funkcjonalizowany cząstką opartą na chinazolinie, która wykazuje toksyczność względem komórek glejaka. Testy cytotoksyczności metodą MTT z wykorzystaniem zarówno linii zdrowych komórek HEK293 oraz kilku linii komórkowych glejaka, wykazały, że powstały system nie hamuje proliferacji komórek zdrowych, jednak jest toksyczny względem komórek nowotworowych [65].

Z kolei w badaniu Brown i in. [66] wykorzystano sfunkcjonalizowane nanocząstki złota (AuNPs) jako nośnik oksaliplatyny - leku na bazie platyny. Badania przeprowadzono na linii komórkowej raka płuc oraz kilku liniach komórkowych raka jelita grubego. W każdej z badanych linii nowotworowych wykazano, że skuteczność zastosowanego konstruktu była porównywalna lub nawet kilkukrotnie wyższa w porównaniu do zastosowania samej oksaliplatyny. Ponadto, nanocząstki wykazywały zdolność do penetracji jądra komórkowego w komórkach raka płuc, co nie jest obserwowane w przypadku stosowanego leku [66].

W innym badaniu wykorzystano biosyntetyzowane nanocząstki złota oraz srebra opłaszczane glikolem polietylenowym jako systemy dostarczania doksorubicyny. W obu przypadkach zaobserwowano wzmocnione działanie cytotoksyczne, w porównaniu do efektów samego leku, na liniach komórkowych czerniaka myszy B16F10 oraz raka piersi MCF-7. Same nanocząstki nie wykazywały toksyczności względem zdrowych komórek śródbłonka [67].

### ***Oddziaływania niekowalencyjne***

Nanocząstki, ze względu na swoje unikatowe właściwości, takie jak duża powierzchnia właściwa przy niewielkich rozmiarach struktur, mogą wchodzić w niekowalencyjne interakcje z lekami, między innymi oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne, wiązania wodorowe czy siły van der Waalsa. Wspomniane interakcje mogą równie efektywnie wpływać na zwiększenie efektywności dostarczania związków do komórek nowotworowych [58,68,69].

Działalność badawcza zespołu dr. hab. Jacka Piosika, prof. UG, od wielu lat opiera się na identyfikacji potencjalnych oddziaływań pomiędzy substancjami modulującymi, np. metyloksantynami, a związkami biologicznie czynnymi [70–75]. Opracowano model statystyczno – termodynamiczny, który pozwolił na analizę biologicznie czynnego związku – pentoksyfiliny (PTX) jako modulatora DOX [73]. Następnie wykonano badania biologiczne, które potwierdziły, że PTX wykazuje efekt ochronny zmniejszając efekty cytotoksyczne DOX w zdrowych komórkach keratynocytów HaCaT, jednocześnie nie wpływając na działanie leku w komórkach nowotworowych [72]. Otrzymane wyniki wskazywały, że modyfikacje DOX mogą

wpłynąć na zmniejszoną toksyczność leku przy utrzymaniu jej potencjału terapeutycznego. Dzięki otrzymanym wynikom potwierdzającym, że modulacja aktywności związków biologicznie czynnych może przyczynić się do poprawy efektywności ich działania, zespół skupił się na wykorzystaniu nanostruktur.

Jedną z najlepiej przebadanych nanocząstek został fuleren C<sub>60</sub> (FC<sub>60</sub>). Badanie dotyczące interakcji FC<sub>60</sub> i mutagenu akrydynowego ICR-191 [76] wykazało, iż fuleren tworzy agregaty pod wpływem mutagenu. Pozostałe analizy fizykochemiczne, w tym modelowanie molekularne, potwierdziły, że za oddziaływanie, w tym heteroagregację, odpowiadają przede wszystkim oddziaływania stakingowe typu  $\pi$ - $\pi$  oraz elektrostatyczne. W efekcie potwierdzono, iż FC<sub>60</sub> wpływa na obniżenie aktywności mutagennej ICR-191. Ponadto stwierdzono, że fuleren wykazuje silne powinowactwo do komórek bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA98, co może ułatwiać dostarczanie mutagenu na powierzchnię komórki. Inne badania dotyczące fulerenu C<sub>60</sub> oraz cisplatyny [77,78] również potwierdziły występowanie bezpośrednich oddziaływań, prawdopodobnie opierających się na siłach hydrofobowych oraz oddziaływaniach van der Waalsa. Co ciekawe, wspomniane interakcje miały znaczący wpływ na cytotoksyczność kompleksu. Podobnie jak w poprzednim badaniu, fuleren obniżał mutagenność badanej substancji. Ponadto, wykazano, że w porównaniu do działania samej cisplatyny, kompleks FC<sub>60</sub> – CDDP wywołuje znacząco silniejszy efekt toksyczny wobec różnych linii komórkowych, w tym raka okrężnicy, szyjki macicy oraz białaczki. Największą, dwukrotnie wyższą różnicę w toksyczności, zaobserwowano dla ludzkiej linii komórkowej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60). Co więcej, badanie przeprowadzone na modelu mysim guza LLC (ang. *Lewis Lung Carcinoma*) wykazało, że zastosowanie kompleksu FC<sub>60</sub> – CDDP spowodowało dwukrotnie większe zahamowanie wzrostu guza w porównaniu do działania samej cisplatyny oraz fulerenu [77].

Innymi, badanymi przez Pracownię Biofizyki nanostrukturami były nanocząstki srebra (AgNPs). W publikacji dotyczącej wpływu AgNPs na interakcje z doksorubicyną porównano nanocząstki o różnych średnicach 5 nm oraz 50 nm [79]. Wykazano m.in., że nanocząstki obniżają fluorescencję DOX oraz ulegają agregacji

(zwłaszcza większe NPs) po wpływie leku. Ponadto, testy cytotoksyczności MTT na liniach komórkowych raka piersi wykazały, iż AgNPs wspomagają działanie toksyczne DOX wobec linii SKBR-3, podczas gdy nie wpływają na efekty w linii MDA-MB-231. W badaniu zastosowano również model 3D Matrigel, aby ocenić wpływ nanocząstek w warunkach lepiej odzwierciedlających mikrośrodowisko guza. W obu zastosowanych liniach komórkowych kompleks AgNPs - DOX wykazywał wyższą cytotoksyczność w porównaniu do działania samego leku, jednak, podobnie jak w teście MTT, efekty były wyraźniejsze dla linii SKBR-3.

Inne doniesienia literaturowe potwierdzają, że niemodyfikowane i nieprzyłączane chemicznie nanocząstki srebra wspomagają toksyczność paklitakselu względem komórek nowotworowych m.in. MCF-7, natomiast efekt ten nie jest obserwowany dla komórek zdrowych [80,81]. Z kolei wyniki badania zespołu Gurunathan i in. [82] wykazały, że połączenie nanocząstek platyny, zsyntetyzowanych przy pomocy tangeretyny, oraz doksorubicyny znacząco hamowało przeżywalność i proliferację komórek osteosarcomy – złośliwego guza kości. Zaobserwowano również m.in. generację ROS, dysfunkcję mitochondriów oraz zwiększoną ekspresję genów proapoptotycznych. W innym badaniu [83] dotyczącym leczenia neuroblastomy, złośliwego nowotworu układu nerwowego, wykazano, że nanocząstki platyny w połączeniu z kwasem retinowym (RA) znacząco wzmacniają cytotoksyczność, w tym powodują zwiększoną dysfunkcję mitochondriów oraz stres oksydacyjny, w porównaniu do działania samego kwasu.

Przedstawione przykłady jasno wskazują, że systemy oparte na nanocząstkach metalicznych, mają ogromny potencjał, aby znacząco usprawnić terapie przeciwnowotworowe, przede wszystkim dzięki selektywnemu dostarczaniu leku do komórek nowotworowych przy jednoczesnej ochronie komórek zdrowych, co ma potencjał w kontekście ograniczania skutków ubocznych terapii przy utrzymanej lub wzmocnionej efektywności.

#### **1.2.4. Wielkość nanocząstek**

Wielkość nanocząstek może odgrywać kluczową rolę w ich efektywności biologicznej i farmakokinetycznej. Mniejsze nanocząstki, poprzez większą

powierzchnię właściwą w stosunku do ich objętości, wykazują lepszą penetrację do wnętrza komórek. Dzięki temu mogą efektywniej przenikać przez błony komórkowe, co może przekładać się na większy potencjał terapeutyczny. Z drugiej strony, zwiększona penetracja może prowadzić do wyższej toksyczności, co oddziałuje na ogólnosystemowe uszkodzenia DNA czy stres oksydacyjny. Z kolei, większe nanocząstki mogą mieć wpływ na bardziej kontrolowane oraz stopniowe uwalnianie przenoszonej substancji, co może być kluczowe w kontekście terapii nowotworowych i dostarczania leków. Ponadto, większe nanocząstki często wykazują mniejszą toksyczność, także wobec zdrowych tkanek, co daje potencjalne korzyści w zmniejszaniu efektów ubocznych terapii [84–91].

Badanie nanocząstek srebra pod kątem wpływu na ludzkie komórki płucne wykazało toksyczność jedynie dla AgNPs o średnicy 10 nm, natomiast większe nanocząstki o średnicach 40 nm i 75 nm nie były szkodliwe [92]. W innym badaniu *in vitro* wykorzystano AgNPs o wielkościach 20 nm, 80 nm i 130 nm i sprawdzano m.in. ich cytotoksyczność, genotoksyczność czy zdolność do wywoływania stanu zapalnego. We wszystkich analizowanych aspektach toksyczności, potwierdzono, że najmniejsze AgNPs wykazywały największą aktywność, a najbardziej wyraźne efekty dotyczyły obniżenia aktywności metabolicznej komórek oraz uszkodzeń błony komórkowej [93]. Z kolei Lebedová i in. [94] sprawdzili genotoksyczność nanocząstek platyny, srebra i złota o rozmiarach 5 nm i 50 nm. Co ciekawe, dla każdego typu NPs uzyskano odmienne wyniki. AgNPs powodowały znaczne uszkodzenia DNA niezależnie od rozmiaru, AuNPs wykazywały toksyczność tylko w przypadku mniejszych, 5 nm cząstek, natomiast PtNPs wykazywały odwrotny trend – uszkodzenia pojawiały się tylko poprzez działanie większych nanocząstek.

Przytoczone przykłady podkreślają wpływ samych nanomateriałów na toksyczność wobec komórek, jednak w literaturze brakuje doniesień wskazujących czy rozmiar nanocząstek może mieć znaczenie w kontekście modulacji wydajności związków biologicznie czynnych.

## 2. Cel pracy

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Pomimo znacznych postępów w terapii przeciwnowotworowej, leczenie nowotworów jest wciąż utrudnione. Chemioterapia, choć nadal powszechnie stosowana jako jedna z podstawowych i efektywnych metod, jest ograniczona ze względu na występowanie poważnych działań niepożądanych, w tym ciężkiej toksyczności narządowej, a także rozwój lekooporności komórek nowotworowych. W związku z tym poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, które pozwolą na zmniejszenie skutków ubocznych przy jednoczesnym zachowaniu lub zwiększeniu skuteczności leczenia, jest niezwykle istotne. Doniesienia literaturowe przedstawione we wstępie jednoznacznie podkreślają duży potencjał wykorzystania nanocząstek w celu usprawnienia terapii przeciwnowotworowych. Nanocząstki (NPs) mogą służyć jako nośniki leków, co zwiększa selektywność dostarczania substancji do komórek przeciwnowotworowych. Z kolei rozmiar NPs może wpływać ich na wnikanie do komórek oraz biodystrybucję, co ma kluczowe znaczenie w kontekście efektywności terapeutycznej. Wśród nanocząstek nieorganicznych nanocząstki platyny (PtNPs) zyskują na znaczeniu, dzięki unikalnym właściwościom, w tym aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, a także przeciwnowotworowej.

Dlatego głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zweryfikowanie czy nanocząstki platyny oddziałują bezpośrednio z wybranymi chemioterapeutykami, w konsekwencji wpływając na ich aktywność biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem różnic wynikających z rozmiaru nanocząstek. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępne PtNPs o średnicach 5 nm, 30 nm, 50 nm i 70 nm oraz leki przeciwnowotworowe z dwóch grup – cytostatyków alkilujących (cisplatyna - CDDP) oraz antybiotyków antracyklinowych (doksorubicyna – DOX i epirubicyna – EPI).

W projekcie doktorskim zrealizowano następujące cele:

- I. Analiza agregacji PtNPs oraz wybranych leków przeciwnowotworowych.
- II. Ocena termodynamiki oddziaływań pomiędzy PtNPs a wybranymi lekami.
- III. Analizy spektroskopowe zmian wynikających z interakcji pomiędzy PtNPs a lekami.
- IV. Ocena wpływu PtNPs na właściwości fluorescencyjne antracyklin.
- V. Badania wpływu nanocząstek na aktywność mutagenną wybranych chemioterapeutyków.
- VI. Badania cytotoksyczności PtNPs, a także ich wpływu na cytotoksyczność cisplatyny, doksorubicyny oraz epirubicyny wobec wybranych linii komórkowych.
- VII. Obrazowanie wpływu PtNPs oraz DOX na hodowlę komórek wybranych linii.

### 3. Publikacje naukowe będące podstawą niniejszej rozprawy

**Publikacja nr 1: Bętdzińska, P.**, Galikowska-Bogut, B., Zakrzewski, M., Bury, K., Jamrógiwicz, M., Wyrzykowski, D., Gołuński, G., Sądej, R., Piosik, J., 2025. Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity? *Chemico-Biological Interactions*, 407, 111365. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2024.111365>. IF<sub>2023</sub> 4.7, MNiSW<sub>2024</sub> 100

**Publikacja nr 2: Bętdzińska, P.**, Zakrzewski, M., Mruk, I., Bogustawski, M., Derewońko, N., Bury K., Wyrzykowski, D., Gołuński, G., Rychłowski, M., Piosik, J. 2025. Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 209: 107094. doi:10.1016/J.EJPS.2025.107094. IF<sub>2023</sub> 4.3, MNiSW<sub>2024</sub> 100

**Publikacja nr 3 (manuskrypt): Bętdzińska, P.**, Zakrzewski, M., Grzyb, K., Hauer, A., Jamrógiwicz, M., Wyrzykowski, D., Bury, K., Gołuński, G., Piosik, J. 2025. Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity. - gotowy manuskrypt; w procesie recenzji w czasopiśmie z listy JCR

#### **4. Wkład doktorantki w publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy**

##### **Publikacja nr 1:**

Mój wkład w niniejszą publikację polegał na zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przygotowaniu próbek oraz pomocy w interpretacji wyników spektrometrii w podczerwieni (FTIR i NIR) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, dla samych nanocząstek oraz mieszanin nanocząstek z lekiem, a także wykonaniu testów MTT z użyciem linii komórkowych MDA-MB-231 oraz SKBR3 oraz pomocy w analizie wyników i ich interpretacji. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

##### **Publikacja nr 2:**

Mój wkład w niniejszą publikację polegał na zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników spektrometrii fluorescencyjnej oraz UV-Vis, przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, przygotowaniu próbek i interpretacji wyników testów cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórkowych MeUuSo i HaCaT, a także przygotowaniu próbek i pomocy w interpretacji obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

**Publikacja nr 3 (manuskrypt):**

Mój wkład w niniejszą publikację polegał na zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników spektrometrii fluorescencyjnej, przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przygotowaniu próbek oraz pomocy w interpretacji wyników spektrometrii w podczerwieni (FTIR i NIR) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), przeprowadzeniu pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), przygotowaniu próbek i interpretacji wyników pomiarów potencjału zeta, wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, przygotowaniu próbek, opracowaniu danych oraz interpretacji wyników testów cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórkowych MeUuSo i HaCaT. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

## 5. Wyniki

### 5.1. Publikacja nr 1: Platyna jako lek oraz jego modulator – czy nanocząstki platyny wpływają na aktywność cisplatyny?

W pierwszym etapie badań wykorzystano cisplatynę, pochodną platyny z grupy cytostatyków alkilujących, oraz komercyjnie dostępne nanocząstki platyny o średnicach 5 nm i 50 nm.

Na początku przy pomocy dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM) wykonano analizę potencjalnej agregacji nanocząstek pod wpływem użytego leku. W przypadku większych nanocząstek 50 nm nie zaobserwowano różnic w średnicach przed i po dodaniu cisplatyny. Pomiar dla 5 nm PtNPs stanowił wyzwanie, ze względu na tendencję do samoagregacji małych cząstek. Pomiar przy pomocy DLS wykazał zwiększenie średnic hydrodynamicznych po dodaniu leku, jednak mikroskopia AFM nie wykazała takich zmian (Załącznik 1, Fig. 1). Może to wynikać z różnic w środowiskach badanych próbek – DLS próbka płynna, AFM próbka osuszona na mące, jednak ze względu na widoczne agregaty w pomiarze średnicy hydrodynamicznej dla samych nanocząstek, wnioski o agregacji pod wpływem leku są niejednoznaczne. W celu pogłębienia analizy w kolejnych etapach wykonano szczegółowe pomiary termodynamiczne z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC). Wykazano, że zmiany entalpii ( $\Delta H$ ) dla obu rozmiarów PtNPs wynoszą około -0,5 kcal/mol co wskazuje na spontaniczny, egzotermiczny charakter reakcji spowodowany prawdopodobnie występowaniem wiązań niekowalencyjnych np. van der Waalsa czy wiązań wodorowych (Załącznik 1, Fig. 2). Następnie, aby lepiej zrozumieć charakter zachodzących interakcji wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz spektroskopię w bliskiej podczerwieni (NIR). Obie zastosowane metody potwierdziły występowanie zmian strukturalnych, świadczących o powstawaniu kompleksów pomiędzy PtNPs a CDDP, a także występowaniu oddziaływań w postaci wiązań wodorowych (Załącznik 1, Fig. 3). Dodatkowo, wyniki skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) wykazały zmiany termiczne potwierdzające modyfikacje strukturalne wynikające z tworzenia agregatów. (Załącznik 1, Fig. 4).

Po niejednoznacznych wynikach w części fizykochemicznej, przeprowadzono testy mutagenności z wykorzystaniem szczepu bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA102. Wyniki wskazywały, iż PtNPs wpływają na obniżenie poziomu mutagenności cisplatyny zależnie od stężenia nanocząstek – im wyższe ich stężenie tym mniejsza mutagenność leku (Załącznik 1, Fig. 5). Co ważne, same nanocząstki nie wykazały oznak aktywności mutagennej w badanym zakresie stężeń. W ostatniej części badań wybrano dwie linie nowotworowe raka piersi: MDA-MB-231 (potrójnie ujemna, wykazująca oporność na cisplatynę) oraz SKBR3 (HER2+), aby wykonać testy cytotoksyczności MTT. Przeprowadzone badania zarówno dla 5 nm jak i 50 nm PtNPs wykazały, że nanocząstki wzmacniają cytotoksyczność w porównaniu do działania samego leku, a różnica przy najwyższych zastosowanych stężeniach nanocząstek wynosiła odpowiednio, około 14 – 17 % dla linii MDA-MB-231 oraz 9 – 12 % dla linii SKBR3 (Załącznik 1, Fig. 6).

Podsumowując, pomimo niejednoznacznych wyników oznaczeń agregacji PtNPs pod wpływem cisplatyny, pozostałe metody potwierdziły występowanie oddziaływań między badanymi czynnikami. Ponadto, stwierdzono wpływ obu rozmiarów nanocząstek na mutagenność leku, jak również niewielkie wzmocnienie efektów cytotoksycznych na wybranych liniach raka piersi.

## **5.2. Publikacja nr 2: Wpływ rozmiaru nanocząstek platyny na aktywność dokсорubicyny.**

Ze względu na niejednoznaczne wyniki otrzymane w toku badań nad nanocząstkami platyny i cisplatyną, w kolejnym etapie postanowiono zająć się lekiem z innej grupy, mianowicie dokсорubicyną – antybiotykiem należącym do grupy antracyklin. W badaniu wykorzystano komercyjnie dostępne nanocząstki platyny o średnicach 5 nm, 30 nm, 50 nm i 70 nm.

W pierwszym etapie wykonano pomiary za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej, aby ocenić czy PtNPs będą miały wpływ na właściwości fluorescencyjne dokсорubicyny. Dla każdego z badanych rozmiarów nanocząstek zaobserwowano wygaszanie fluorescencji leku w porównaniu do pomiarów kontrolnych sprawdzających wpływ rozcieńczenia DOX na jej fluorescencję (Załącznik 2, Fig. 1).

Co więcej, efekt był zależny od średnicy PtNPs, wskazując, że spadek poziomu fluorescencji był większy wraz ze spadkiem średnicy nanocząstek. Taki efekt może być związany z przeniesieniem energii obserwowanym dla metalicznych nanocząstek, gdyż mogą działać jako akceptory energii dla wzbudzonej cząstki doksorubicyny. Następnie, w celu szczegółowego sprawdzenia termodynamiki oddziaływań pomiędzy nanocząstkami platyny a doksorubicyną przeprowadzono analizę metodą ITC. Zmiany entalpii zarejestrowane dla DOX z 5 nm, 30 nm i 50 nm PtNPs wynosiły około -3 do -4 kcal/mol co wskazuje egzotermiczny charakter i prawdopodobne występowanie oddziaływań takich jak wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne lub van der Waalsa (Załącznik 2, Fig. 2). W przypadku 70 nm PtNPs zmiana entalpii wynosiła około 0,88 kcal/mol, co wskazuje na endotermiczny efekt, jednak przypuszczalnie mogło to być związane z zastosowaniem innego buforu dla największych nanocząstek. W kolejnym kroku zastosowano metody DLS oraz AFM w celu analizy potencjalnej agregacji nanocząstek pod wpływem leku. Przeprowadzone analizy pozwoliły potwierdzić, iż DOX jest czynnikiem wywołującym agregację nanocząstek w każdym rozmiarze (Załącznik 2, Fig. 3). Wyniki dla obu metod nie są identyczne ze względu na różne środowiska pomiarów (DLS próbki badane w roztworze, AFM próbki osuszone na mice).

W związku z potwierdzeniem występowania interakcji pomiędzy nanocząstkami platyny a doksorubicyną w kolejnych etapach sprawdzono jaki jest ich wpływ na aktywność biologiczną badanej substancji. Najpierw wykorzystano bakterie *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA98, aby zbadać wpływ PtNPs na właściwości mutagenne leku. Badanie wykazało, iż nanocząstki w każdym badanym rozmiarze wpływają istotnie na obniżenie mutagenności DOX (Załącznik 2, Fig. 4). Taki efekt może wynikać z obserwowanej wcześniej agregacji PtNPs pod wpływem leku, w związku z czym część leku zostaje związana w agregatach lub/oraz na ich powierzchni i prawdopodobnie staje się nieaktywna. Ponadto, same nanocząstki w badanych stężeniach nie wykazały potencjału mutagennego. Aby porównać wpływ nanocząstek platyny zarówno na komórki nowotworowe jak i komórki zdrowe wybrano dwie linie komórkowe: MeJuSo - ludzka linia komórkowa czerniaka skóry oraz HaCaT - nieśmiertlniona ludzka linia komórek keratynocytów, do wykonania

testów żywotności komórek z wykorzystaniem resazury (AlamarBlue). Wyniki otrzymane dla samych nanocząstek wykazały, iż w linii nienowotworowej, wzrastające stężenia 5 nm i 30 nm PtNPs nieznacznie wspomagają wzrost komórek, natomiast większe nanocząstki nie wpływają na wzrost komórek. W linii nowotworowej, jedynie najmniejsze nanocząstki zmniejszyły przeżywalność komórek. Mimo to, warto zaznaczyć, że dla 70 nm PtNPs efekty różniły się znacząco od pozostałych nanocząstek, gdyż we wszystkich stężeniach przeżywalność komórek linii HaCaT była wyższa niż MeJuSo, podczas gdy dla 30 nm i 50 nm efekt był odwrotny, a dla 5 nm zależał od stężenia (Załącznik 2, Fig. 5). Następnie wykonano testy dla samej doksorubicyny oraz ze wzrastającymi stężeniami nanocząstek platyny. Dla linii nienowotworowej w przypadku każdego rozmiaru nanocząstek zaobserwowano spadek cytotoksyczności zależny od stężenia PtNPs w porównaniu do działania samej doksorubicyny. W przypadku nowotworowej linii MeJuSo, nie zaobserwowano różnic w cytotoksyczności dla 5 nm, 30 nm oraz 50 nm PtNPs, jednak większe nanocząstki 70 nm wzmocniły istotnie efekty cytotoksyczne leku (Załącznik 2, Fig. 6). Na podstawie wyników testu cytotoksyczności ustalono, że 70 nm PtNPs są najbardziej obiecujące w kontekście wzmocnienia efektów w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym efekcie ochronnym komórek nienowotworowych, dlatego w kolejnym etapie zobrazowano wpływ jedynie największych nanocząstek. Na podstawie zdjęć wykonanych przy pomocy mikroskopu konfokalnego nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek HaCaT oraz MeJuSo pod wpływem różnych stężeń 70 nm nanocząstek platyny w porównaniu do hodowli kontrolnych (Załącznik 2, Fig. 7A). Następnie, porównano działanie samej doksorubicyny oraz nanocząstek we wzrastających stężeniach. Dla linii komórkowej HaCaT, potwierdzono pozytywny wpływ PtNPs zarówno na morfologię jak i zagęszczenie hodowli komórek keratynocytów w porównaniu do komórek traktowanych samym lekiem. Co więcej, przy najwyższym stężeniu nanocząstek zaobserwowano wygaszanie fluorescencji doksorubicyny. Odwrotne wyniki otrzymano w przypadku nowotworowej linii MeJuSo, gdzie dodanie nanocząstek platyny spowodowało zmniejszenie gęstości hodowli jak i znaczące zmiany w morfologii – im wyższe stężenie nanocząstek tym bardziej zaokrąglone

komórki z widocznymi pęcherzykami błonowymi charakterystycznymi dla procesu apoptozy (Załącznik 2, Fig. 7B).

Podsumowując, badania fizykochemiczne potwierdziły występowanie bezpośrednich oddziaływań pomiędzy PtNPs a dokсорubicyną, w tym występowanie efektu agregacji nanocząstek pod wpływem leku oraz obniżanie fluorescencji DOX przez nanocząstki. W części biologicznej potwierdzono, iż PtNPs wpływają na obniżenie aktywności mutagennej leku względem bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA98. Ponadto, w porównaniu do efektów cytotoksycznych samej dokсорubicyny, dodanie nanocząstek we wszystkich badanych rozmiarach wspomogło metabolizm zdrowych komórek linii HaCaT, natomiast największe nanocząstki o średnicy 70 nm znacząco zmniejszyły przeżywalność komórek nowotworowych MeJuSo. Wyniki zostały potwierdzone za pomocą obrazowania fluorescencyjnego, w którym zaobserwowano, że obecność 70 nm PtNPs powoduje drastyczne zmiany w morfologii oraz zmniejszenie gęstości komórek nowotworowych, a w przypadku komórek zdrowych efekt jest odwrotny.

### **5.3. Publikacja nr 3 (manuskrypt): Nanocząstki platyny oddziałują z epirubicyną zależnie od ich rozmiaru i wpływają na jej aktywność biologiczną.**

Niezwykle obiecujące wyniki potwierdzające wpływ nanocząstek platyny na aktywność dokсорubicyny sprawiły, że w kolejnej części badań postanowiono wykorzystać inny lek z grupy antracyklin – epirubicynę. Podobnie jak w przypadku DOX, w badaniu zastosowano komercyjnie dostępne nanocząstki platyny o średnicach 5 nm, 30 nm, 50 nm i 70 nm.

W pierwszym etapie zastosowano spektroskopię fluorescencyjną, której wyniki potwierdziły wygaszanie fluorescencji epirubicyny pod wpływem PtNPs różniących się rozmiarem. Ponadto, wygaszenie fluorescencji było zależne od średnicy nanocząstki, gdzie im mniejsza średnica tym silniejszy efekt był obserwowany (Załącznik 3, Fig. 1). Następnie zastosowano techniki spektroskopowe, FTIR oraz NIR, które wykazały niewielkie zmiany wibracyjne, szczególnie w próbkach z 50 nm i 70 nm PtNPs, wskazujące na silniejsze interakcje leku z większymi nanocząstkami

(Załącznik 3, Fig. 2). W kolejnym etapie zastosowano pomiary kalorymetryczne z użyciem DSC oraz ITC. Wyniki otrzymane dla pierwszej z metod wskazały na najsilniejsze oddziaływania z największymi nanocząstkami o średnicy 70 nm (Załącznik 3, Fig. 3I-III). Zmiany entalpii wyznaczone dzięki pomiarom ITC, podobnie jak w przypadku oddziaływań z doksorubicyną, wskazały na występowanie reakcji egzotermicznych dla 5 nm, 30 nm i 50 nm PtNPs, podczas gdy dla 70 nm PtNPs efekt był odwrotny (Załącznik 3, Fig. 3IV-VII). Po potwierdzeniu oddziaływań między PtNPs a EPI, przeprowadzono analizę agregacji z wykorzystaniem DLS oraz AFM. Obie metody potwierdziły formowanie agregatów nanocząstek pod wpływem leku. W przypadku samych 5 nm PtNPs, które wykazywały polidispersyjność z powodu niewielkich rozmiarów, zaobserwowano występowanie 3 populacji nanocząstek o różnej średnicy hydrodynamicznej. Jednak po dodaniu EPI liczba populacji uległa redukcji do jednego rozmiaru, a wskaźnik Pdl spadł z 0,49 do 0,24 (Załącznik 3, Fig. 4; Tabela 1). Następnie zbadano potencjał zeta dla nanocząstek przed i po dodaniu epirubicyny. Wyniki dla samych nanocząstek o średnicach 30 nm, 50 nm i 70 nm, na poziomie około -30 do -50 mV, wskazywały na dobrą stabilność układu. Dodanie leku spowodowało zmianę potencjału w kierunku wartości dodatnich około 2 do 5 mV, co potwierdza występowanie zjawiska agregacji. W przypadku 5 nm PtNPs sytuacja, podobnie jak przy pomiarach dynamicznego rozpraszania światła, była inna, gdyż same nanocząstki posiadały potencjał na poziomie -0,5 mV, co oznacza słabą stabilność i prawdopodobną agregację w układzie. Dodanie leku również spowodowało przesunięcie potencjału w kierunku dodatnim, co potwierdza zmianę ładunku na powierzchni nanocząstek (Załącznik 3, Tabela 2).

Badanie biologiczne obejmujące test mutagenności Amesa przeprowadzony z użyciem bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA98 wykazało, iż nanocząstki we wszystkich rozmiarach wpływają na obniżenie mutagenności epirubicyny, jednak tylko w przypadku największych nanocząstek o średnicy 70 nm zmiana była zależna od stężenia PtNPs (Załącznik 3, Fig. 5). W ostatnim etapie przeprowadzono testy cytotoksyczności z użyciem resazuryny (AlamarBlue). W celu porównania wpływu nanocząstek na komórki nowotworowe oraz zdrowe zastosowano dwie linie komórkowe: MeJuSo - ludzka linia komórkowa czerniaka

skóry oraz HaCaT - nieśmiertelna ludzka linia komórek keratynocytów. Wyniki otrzymane dla linii nowotworowej potwierdziły, iż nanocząstki platyny we wszystkich badanych rozmiarach znacząco wspomagają cytotoksyczność leku, w porównaniu do działania samej EPI, a największe efekty zarejestrowano w przypadku większych nanocząstek o średnicach 50 nm i 70 nm (Załącznik 3, Fig. 6B). Ponadto, w linii zdrowych komórek, dla większości zastosowanych stężeń epirubicyny, odnotowano istotny wzrost widoczności komórek w stosunku do działania samego leku. W przypadku najniższego zastosowanego stężenia epirubicyny nie zaobserwowano zmian w przypadku nanocząstek o średnicach od 30 nm do 70 nm, natomiast dla 5 nm PtNPs zauważono niewielki spadek przeżywalności komórek (Załącznik 3, Fig. 6A).

Podsumowując, zastosowane metody fizykochemiczne pozwoliły zaobserwować występowanie bezpośrednich oddziaływań pomiędzy nanocząstkami platyny a epirubicyną. Obrazowanie AFM jak również pomiary DLS i zeta potencjału potwierdziły zachodzenie procesu agregacji PtNPs pod wpływem EPI. Ponadto, wykazano, że PtNPs obniżają fluorescencję EPI, a siła efektu zależy od wielkości nanocząstek. Metody kalorymetryczne potwierdziły występowanie interakcji między badanymi nanocząstkami a lekiem, z czego wyniki DSC wskazały na silniejsze oddziaływanie z większymi NPs. Badania biologiczne z użyciem bakterii *Salmonella enterica* pozwoliły stwierdzić, że nanocząstki platyny wpływają na obniżenie mutagenności EPI. Ponadto, PtNPs, szczególnie o średnicach 50 nm i 70 nm wpływały znacząco na wzmocnienie cytotoksyczności epirubicyny wobec linii komórek nowotworowych MeUuSo. Jednocześnie, nanocząstki w większości zastosowanych konfiguracji, wspomagały wzrost komórek zdrowych HaCaT w porównaniu do zastosowania samej EPI.

## 6. Wnioski

Przeprowadzone badania obejmujące identyfikację występowania potencjalnych interakcji pomiędzy nanocząstkami platyny, o różnych wielkościach (5 nm, 30 nm, 50 nm, i 70 nm), a wybranymi lekami przeciwnowotworowymi, jak również zweryfikowanie ich wpływu na aktywność biologiczną badanych związków doprowadziły do następujących wniosków.

- I. Badane antracykliny (DOX i EPI) powodują agregację nanocząstek platyny, jednak efekt ten nie jest jednoznacznie zaobserwowany w przypadku cisplatyny.
- II. Nanocząstki platyny powodują wygaszanie fluorescencji (ang. *quenching*) doksorubicyny oraz epirubicyny, a intensywność obserwowanego efektu rośnie wraz ze zmniejszaniem wielkości nanocząstek.
- III. Badania fizykochemiczne z zakresu spektrometrii i kalorymetrii wykazały, iż nanocząstki platyny oddziałują bezpośrednio z badanymi lekami.
- IV. Nanocząstki platyny nie są mutagenne względem szczepów bakterii *Salmonella enterica* serowar Typhimurium TA98 oraz TA102.
- V. Nanocząstki platyny wpływają na obniżenie potencjału mutagennego cisplatyny, doksorubicyny oraz epirubicyny.
- VI. Nanocząstki platyny o średnicach 5 nm i 50 nm wpływają nieznacznie na wzmocnienie cytotoksyczności cisplatyny wobec linii komórkowych raka piersi MDA-MB-231 oraz SBKR-3.
- VII. Nanocząstki platyny o średnicy 70 nm wpływają istotnie na wzmocnienie cytotoksyczności doksorubicyny wobec komórek nowotworowych czerniaka skóry MeUuSo, natomiast 5 nm, 30 nm i 50 nm NPs nie wykazują widocznego wpływu.
- VIII. Wszystkie badane wielkości nanocząstek platyny wpływają istotnie na obniżenie cytotoksyczności doksorubicyny w ludzkich komórkach keratynocytów linii HaCaT.
- IX. Nanocząstki platyny o średnicach 5 nm, 30 nm, 50 nm, 70 nm wpływają istotnie na wzmocnienie cytotoksyczności epirubicyny wobec komórek nowotworowych czerniaka skóry MeUuSo.

- X. Jednocześnie badane nanocząstki wykazują działanie ochronne na komórki zdrowe keratynocytów HaCaT w większości badanych konfiguracji stężeń wspomagając wzrost komórek w stosunku do działania samej epirubicyny.

Uzyskane wyniki niewątpliwie wskazują na ogromny potencjał nanocząstek platyny, szczególnie tych o większych rozmiarach, jako potencjalnych czynników do modyfikacji terapii przeciwnowotworowych, zwłaszcza z użyciem antracyklin, w celu zwiększenia skuteczności leczenia przy jednoczesnej ochronie komórek zdrowych. Przeprowadzone badania uzupełniają dotychczasowy stan wiedzy w zakresie zastosowania nanocząstek platyny, zwracając szczególną uwagę na różnice wynikające z ich rozmiarów oraz podkreślając rolę oddziaływań niekwalencyjnych w optymalizacji efektów cytotoksycznych.

## 7. Bibliografia

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74: 229–263. doi:10.3322/CAAC.21834
2. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*. 2008;36: 24–28. doi:10.1016/J.MPMED.2007.10.012
3. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019;88: 102925. doi:10.1016/J.BIOORG.2019.102925
4. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med*. 2021;9: 20503121211034370. doi:10.1177/20503121211034366
5. El-Hussein A, Manoto SL, Ombinda-Lemboumba S, Alrowaili ZA, Mthunzi-Kufa P. A Review of Chemotherapy and Photodynamic Therapy for Lung Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;21: 149–161. doi:10.2174/1871520620666200403144945
6. Nygren P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol (Madr)*. 2001;40: 166–174. doi:10.1080/02841860151116204
7. Fenn JE, Udelsman R. First use of intravenous chemotherapy cancer treatment: Rectifying the record. *J Am Coll Surg*. 2011;212: 413–417. doi:10.1016/J.JAMCOLLSURG.2010.10.018
8. Katta B, Vijayakumar C, Dutta S, Dubashi B, Ramakrishnaiah VPN. The Incidence and Severity of Patient-Reported Side Effects of Chemotherapy in Routine Clinical Care: A Prospective Observational Study. *Cureus*. 2023;15: e38301. doi:10.7759/CUREUS.38301
9. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575: 299–309. doi:10.1038/S41586-019-1730-1;SUBJMETA=1059,153,2326,631,67;KWRD=CANCER+THERAPEUTIC+RESISTANCE,DRUG+DEVELOPMENT
10. Haider T, Pandey V, Banjare N, Gupta PN, Soni V. Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacological Reports* 2020 72:5. 2020;72: 1125–1151. doi:10.1007/S43440-020-00138-7
11. Shields M. Chemotherapeutics. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. 2017; 295–313. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00014-7

12. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740: 364. doi:10.1016/J.EJP HAR.2014.07.025
13. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.* 2019;11: 97. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7059781/>
14. Zhang J, Ye Z wei, Tew KD, Townsend DM. Cisplatin chemotherapy and renal function. *Adv Cancer Res.* 2021;152: 305–327. doi:10.1016/BS.ACR.2021.03.008
15. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J Nucleic Acids.* 2010;2010: 201367. doi:10.4061/2010/201367
16. Elmorsy EA, Saber S, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, El-kott AF, AlShehri MA, et al. Advances in understanding cisplatin-induced toxicity: Molecular mechanisms and protective strategies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024;203: 106939. doi:10.1016/J.EJPS.2024.106939
17. Navaei ZN, Khalili-Tanha G, Zangouei AS, Abbaszadegan MR, Moghbeli M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of Cisplatin response in tumor cells. *Oncol Res.* 2021;29: 235–250. doi:10.32604/OR.2022.025323,
18. Kiss RC, Xia F, Acklin S. Targeting DNA Damage Response and Repair to Enhance Therapeutic Index in Cisplatin-Based Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22: 8199. doi:10.3390/IJMS22158199
19. Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today.* 2017;22: 270–281. doi:10.1016/J.DRUDIS.2016.11.005
20. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci.* 2021;278: 119527. doi:10.1016/J.LFS.2021.119527
21. Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast.* 2012;21: 142–149. doi:10.1016/J.BREAST.2011.12.012
22. Bonadonna G, Gianni L, Santoro A, Bonfante V, Bidoli P, Casali P, et al. Drugs ten years later: Epirubicin. *Annals of Oncology.* 1993;4: 359–369. doi:10.1093/oxfordjournals.annonc.a058514
23. Beretta GL, Zunino F. Molecular Mechanisms of Anthracycline Activity. *Top Curr Chem.* 2007;283: 1–19. doi:10.1007/128\_2007\_3
24. Butowska K, Woziwodzka A, Borowik A, Piosik J. Polymeric Nanocarriers: A Transformation in Doxorubicin Therapies. *Materials.* 2021;14: 2135. doi:10.3390/MA14092135

25. Box VGS. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin. *J Mol Graph Model.* 2007;26: 14–19. doi:10.1016/J.JMGM.2006.09.005
26. Marinello J, Delcuratolo M, Capranico G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol 19, Page 3480. 2018;19: 3480. doi:10.3390/IJMS19113480
27. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 2023, Vol 12, Page 659. 2023;12: 659. doi:10.3390/CELLS12040659
28. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Res.* 2006;66: 4863–4871. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3410
29. Hu X, Zhang H. Doxorubicin-Induced Cancer Cell Senescence Shows a Time Delay Effect and Is Inhibited by Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Medical Science Monitor.* 2019;25: 3617–3623. doi:10.12659/MSM.914295
30. Butowska K, Woziwodzka A, Borowik A, Piosik J. Polymeric Nanocarriers: A Transformation in Doxorubicin Therapies. *Materials.* 2021;14: 2135. doi:10.3390/MA14092135
31. Liu C, Ma X, Zhuang J, Liu L, Sun C. Cardiotoxicity of doxorubicin-based cancer treatment: What is the protective cognition that phytochemicals provide us? *Pharmacol Res.* 2020;160: 105062. doi:10.1016/J.PHRS.2020.105062
32. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem.* 2009;16: 3267–3285. doi:10.2174/092986709788803312
33. Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology. *Hum Exp Toxicol.* 2015;34: 1318–1321. doi:10.1177/0960327115603588
34. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. 1960 [cited 9 Jun 2025]. Available: <https://resolver.caltech.edu/CaltechES:23.5.1960Bottom>
35. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology* 2022 20:1. 2022;20: 1–29. doi:10.1186/S12951-022-01477-8
36. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry.* 2019;12: 908–931. doi:10.1016/J.ARABJC.2017.05.011

37. Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol.* 2023;14: 1155622. doi:10.3389/FMICB.2023.1155622/BIBTEX
38. Burlec AF, Corciova A, Boev M, Batir-Marin D, Mircea C, Cioanca O, et al. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. *Pharmaceuticals* 2023, Vol 16, Page 1410. 2023;16: 1410. doi:10.3390/PH16101410
39. Saker R, Regdon G, Sovány T. Pharmacokinetics and toxicity of inorganic nanoparticles and the physicochemical properties/factors affecting them. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2024;99: 105979. doi:10.1016/J.JDDST.2024.105979
40. Kunwar S, Pandey P, Lee J. Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance of Fully Alloyed AgAuPdPt, AgAuPt, AuPt, AgPt, and Pt Nanocrystals: Systematical Investigation on the Morphological and LSPR Properties of Mono-, Bi-, Tri-, and Quad-Metallic Nanoparticles. *ACS Omega.* 2019;4: 17340–17351. doi:10.1021/ACSOMEGA.9B02066
41. Dhumal N, Shirote P, Ghorpade R, Galande P. Metallic Nanoparticles: A Novel Approach in Nanotechnology. *www.ijsdr.org International Journal of Scientific Development and Research.* 2023;8. Available: [www.ijsdr.org](http://www.ijsdr.org)
42. Khan MAR, Mamun MS Al, Ara MH. Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Microchemical Journal.* 2021;171: 106840. doi:10.1016/J.MICROC.2021.106840
43. Jeyaraj M, Gurunathan S, Qasim M, Kang MH, Kim JH. A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials* 2019, Vol 9, Page 1719. 2019;9: 1719. doi:10.3390/NANO9121719
44. Velmurugan P, Shim J, Kim K, Oh BT. Prunus × yedoensis tree gum mediated synthesis of platinum nanoparticles with antifungal activity against phytopathogens. *Mater Lett.* 2016;174: 61–65. doi:10.1016/J.MATLET.2016.03.069
45. Godugu D, Beedu SR. Biopolymer-mediated synthesis and characterisation of platinum nanocomposite and its anti-fungal activity against *A. parasiticus* and *A. flavus*. *Micro Nano Lett.* 2018;13: 1491–1496. doi:10.1049/MNL.2018.5097
46. Rehman KU, Khan SU, Tahir K, Zaman U, Khan D, Nazir S, et al. Sustainable and green synthesis of novel acid phosphatase mediated platinum nanoparticles (ACP-PtNPs) and investigation of its in vitro antibacterial, antioxidant, hemolysis and photocatalytic activities. *J Environ Chem Eng.* 2022;10: 107623. doi:10.1016/J.JECE.2022.107623

47. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, Szeliga J, Mitura S, Mitura K, et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int J Nanomedicine*. 2010;5: 1085–1094. doi:10.2147/IJN.S13532
48. Nishanthi R, Malathi S, S. JP, Palani P. Green synthesis and characterization of bioinspired silver, gold and platinum nanoparticles and evaluation of their synergistic antibacterial activity after combining with different classes of antibiotics. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;96: 693–707. doi:10.1016/J.MSEC.2018.11.050
49. Gutiérrez de la Rosa SY, Muñoz Diaz R, Villalobos Gutiérrez PT, Patakfalvi R, Gutiérrez Coronado Ó. Functionalized Platinum Nanoparticles with Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 9404. 2022;23: 9404. doi:10.3390/IJMS23169404
50. Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Hinzmann M, Wierzbicki M, Hotowy A, et al. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. *Archives of Medical Science*. 2017;13: 1322–1334. doi:10.5114/AOMS.2016.58925
51. Ruiz AL, Garcia CB, Gallón SN, Webster TJ. Novel silver-platinum nanoparticles for anticancer and antimicrobial applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15: 169–179. doi:10.2147/IJN.S176737
52. Mohammadi H, Abedi A, Akbarzadeh A, Mokhtari MJ, Shahmabadi HE, Mehrabi MR, et al. Evaluation of synthesized platinum nanoparticles on the MCF-7 and HepG-2 cancer cell lines. *International Nano Letters* 2013 3:1. 2013;3: 1–5. doi:10.1186/2228-5326-3-28
53. Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, et al. Nanocomplexes of Graphene Oxide and Platinum Nanoparticles against Colorectal Cancer Colo205, HT-29, HTC-116, SW480, Liver Cancer HepG2, Human Breast Cancer MCF-7, and Adenocarcinoma LNCaP and Human Cervical Hela B Cell Lines. *Materials* 2019, Vol 12, Page 909. 2019;12: 909. doi:10.3390/MA12060909
54. Alshatwi AA, Athinarayanan J, Vaiyapuri Subbarayan P. Green synthesis of platinum nanoparticles that induce cell death and G2/M-phase cell cycle arrest in human cervical cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26: 1–9. doi:10.1007/S10856-014-5330-1
55. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med*. 2021;11: 771. doi:10.3390/JPM11080771
56. Yin H, Liao L, Fang J. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect. *;*2(1):1-5. 2014;2: 1–5. doi:10.47739/1010

57. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics*. 2013;4: 81. doi:10.7150/THNO.7193
58. Hheidari A, Mohammadi J, Ghodousi M, Mahmoodi M, Ebrahimi S, Pishbin E, et al. Metal-based nanoparticle in cancer treatment: lessons learned and challenges. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12: 1436297. doi:10.3389/FBIOE.2024.1436297
59. Ezike TC, Okpala US, Onoja UL, Nwike CP, Ezeako EC, Okpara OJ, et al. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon*. 2023;9: e17488. doi:10.1016/J.HELIYON.2023.E17488
60. Neha Desai, Momin M, Khan T, Gharat S, Ningthoujam RS, Omri A. Metallic nanoparticles as drug delivery system for the treatment of cancer. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021;18: 1261–1290. doi:10.1080/17425247.2021.1912008
61. Chandrakala V, Aruna V, Angajala G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials* 2021 5:6. 2022;5: 1593–1615. doi:10.1007/S42247-021-00335-X
62. Fu B, Dang M, Tao J, Li Y, Tang Y. Mesoporous platinum nanoparticle-based nanoplatforms for combined chemo-photothermal breast cancer therapy. *J Colloid Interface Sci*. 2020;570: 197–204. doi:10.1016/J.JCIS.2020.02.051
63. Tsou SH, Chen TM, Hsiao HT, Chen YH. A Critical Dose of Doxorubicin Is Required to Alter the Gene Expression Profiles in MCF-7 Cells Acquiring Multidrug Resistance. *PLoS One*. 2015;10: e0116747. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0116747
64. Mukherjee S, Kotcherlakota R, Haque S, Bhattacharya D, Kumar JM, Chakravarty S, et al. Improved delivery of doxorubicin using rationally designed PEGylated platinum nanoparticles for the treatment of melanoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;108: 110375. doi:10.1016/J.MSEC.2019.110375
65. Stavropoulou AP, Theodosiou M, Sakellis E, Boukos N, Papanastasiou G, Wang C, et al. Bimetallic gold-platinum nanoparticles as a drug delivery system coated with a new drug to target glioblastoma. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;214: 112463. doi:10.1016/J.COLSURFB.2022.112463
66. Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, et al. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J Am Chem Soc*. 2010;132: 4678–4684. doi:10.1021/JA908117A
67. Patra S, Mukherjee S, Barui AK, Ganguly A, Sreedhar B, Patra CR. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their

- potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;53: 298–309. doi:10.1016/J.MSEC.2015.04.048
68. Doane T, Burda C. Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;65: 607. doi:10.1016/J.ADDR.2012.05.012
  69. Wei Y, Ma L, Zhang L, Xu X. Noncovalent interaction-assisted drug delivery system with highly efficient uptake and release of paclitaxel for anticancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12: 7039. doi:10.2147/IJN.S144322
  70. Woziwodzka A, Gwizdek-Wiśniewska A, Piosik J. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines. *Bioorg Chem*. 2011;39: 10–17. doi:10.1016/J.BIOORG.2010.11.001
  71. Gołuński G, Borowik A, Lipińska A, Romanik M, Derewońko N, Woziwodzka A, et al. Pentoxifylline affects idarubicin binding to DNA. *Bioorg Chem*. 2016;65: 118–125. doi:10.1016/J.BIOORG.2016.02.005
  72. Gołuński G, Borowik A, Derewońko N, Kawiak A, Rychtowski M, Woziwodzka A, et al. Pentoxifylline as a modulator of anticancer drug doxorubicin. Part II: Reduction of doxorubicin DNA binding and alleviation of its biological effects. *Biochimie*. 2016;123: 95–102. doi:10.1016/J.BIOCHI.2016.02.003
  73. Gołuński G, Borowik A, Wyrzykowski D, Woziwodzka A, Piosik J. Pentoxifylline as a modulator of anticancer drug doxorubicin. Part I: Reduction of doxorubicin DNA binding. *Chem Biol Interact*. 2015;242: 291–298. doi:10.1016/J.CBI.2015.10.008
  74. Gołuński G, Woziwodzka A, Iermak I, Rychtowski M, Piosik J. Modulation of acridine mutagen ICR191 intercalation to DNA by methylxanthines—Analysis with mathematical models. *Bioorg Med Chem*. 2013;21: 3280–3289. doi:10.1016/J.BMC.2013.03.043
  75. Piosik J, Ulanowska K, Gwizdek-Wiśniewska A, Czyz A, Kapuściński J, Węgrzyn G. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR-191 and ICR-170) by caffeine and pentoxifylline. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;530: 47–57. doi:10.1016/S0027-5107(03)00136-2
  76. Borowik A, Prylutsky Y, Kawelski Ł, Kyzyma O, Bulavin L, Ivankov O, et al. Does C60 fullerene act as a transporter of small aromatic molecules? *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;164: 134–143. doi:10.1016/J.COLSURFB.2018.01.026
  77. Prylutska S, Panchuk R, Gołuński G, Skivka L, Prylutsky Y, Hurmach V, et al. C60 fullerene enhances cisplatin anticancer activity and overcomes tumor cell drug resistance. *Nano Res*. 2017;10: 652–671. doi:10.1007/S12274-016-1324-2/METRICS

78. Prylutskyi YI, Cherepanov V V., Evstigneev MP, Kyzyma OA, Petrenko VI, Styopkin VI, et al. Structural self-organization of C60 and cisplatin in physiological solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015;17: 26084–26092. doi:10.1039/C5CP02688A
79. Gołuński G, Konkel K, Galikowska Bogut B, Bętdzińska P, Bury K, Zakrzewski M, et al. Influence of silver nanoparticles' size on their direct interactions with doxorubicin and its biological effects. *Sci Rep*. 2024;14: 1–12. doi:10.1038/S41598-024-69724-6
80. Tunç T, Hepokur C, Kariper A. Synthesis and Characterization of Paclitaxel-Loaded Silver Nanoparticles: Evaluation of Cytotoxic Effects and Antimicrobial Activity. *Bioinorg Chem Appl*. 2024;2024: 9916187. doi:10.1155/2024/9916187
81. Danişman-Kalındemirtaş F, Kariper A, Hepokur C, Erdem-Kuruca S. Selective cytotoxicity of paclitaxel bonded silver nanoparticle on different cancer cells. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;61: 102265. doi:10.1016/J.JDDST.2020.102265
82. Gurunathan S, Jeyaraj M, Kang MH, Kim JH. Tangeretin-Assisted Platinum Nanoparticles Enhance the Apoptotic Properties of Doxorubicin: Combination Therapy for Osteosarcoma Treatment. *Nanomaterials* 2019, Vol 9, Page 1089. 2019;9: 1089. doi:10.3390/NANO9081089
83. Gurunathan S, Jeyaraj M, Kang MH, Kim JH. Anticancer Properties of Platinum Nanoparticles and Retinoic Acid: Combination Therapy for the Treatment of Human Neuroblastoma Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 6792. 2020;21: 6792. doi:10.3390/IJMS21186792
84. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14: 1–16. doi:10.1146/ANNUREV-BIOENG-071811-150124
85. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7: 5577–5591. doi:10.2147/IJN.S36111
86. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83: 761–769. doi:10.1038/SJ.CLPT.6100400
87. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006;6: 662–668. doi:10.1021/NL052396O
88. Elumalai K, Srinivasan S, Shanmugam A. Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomedical Technology*. 2024;5: 109–122. doi:10.1016/J.BMT.2023.09.001

89. Batir-Marin D, Boev M, Cioanca O, Lungu II, Marin GA, Burlec AF, et al. Exploring Oxidative Stress Mechanisms of Nanoparticles Using Zebrafish (*Danio rerio*): Toxicological and Pharmaceutical Insights. *Antioxidants* 2025, Vol 14, Page 489. 2025;14: 489. doi:10.3390/ANTIOX14040489
90. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 942916. doi:10.1155/2013/942916
91. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 2015 33:9. 2015;33: 941–951. doi:10.1038/nbt.3330
92. Gliga AR, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11: 1–17. doi:10.1186/1743-8977-11-11
93. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2011;32: 9810–9817. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.08.085
94. Lebedová J, Hedberg YS, Odnevall Wallinder I, Karlsson HL. Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis.* 2018;33: 77–85. doi:10.1093/MUTAGE/GEX027

## **8. Wykaz rycin**

Ryc. 1. Struktura chemiczna cisplatyny (CDDP).

Ryc. 2. Struktury chemiczne wybranych antybiotyków antracyklinowych.

Ryc. 3. Klasyfikacja nanomateriałów z przykładami.

## **9. Załączniki**

### **9.1. Publikacja nr 1**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chembioint](http://www.elsevier.com/locate/chembioint)

Research paper

## Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?



Patrycja Bełdzińska<sup>a,\*,</sup>, Barbara Galikowska-Bogut<sup>b,</sup>, Marcin Zakrzewski<sup>a,\*,</sup>,  
Katarzyna Bury<sup>c,</sup>, Marzena Jamrógiewicz<sup>d,</sup>, Dariusz Wyrzykowski<sup>e,</sup>, Grzegorz Goluński<sup>a,\*,</sup>,  
Rafał Sądej<sup>b,</sup>, Jacek Piosik<sup>a,\*,</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biophysics, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>b</sup> Laboratory of Molecular Enzymology and Oncology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>c</sup> Laboratory of Molecular Biology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>d</sup> Department of Physical Chemistry, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>e</sup> Department of General and Inorganic Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Platinum nanoparticles  
Cisplatin  
Direct interactions  
Ames test  
Mutagenicity  
Cytotoxicity

## ABSTRACT

Breast cancer was the most frequent cause of cancer death in females in 2022. Despite the development of personalized therapies, chemotherapy frequently remains the only available treatment method. However, the administration of classic antineoplastic drugs, like cisplatin (CDDP), often causes severe side effects and may lead to drug resistance making the therapy inefficient. Therefore, there is a great need for new, effective treatment regimens development. For this reason, we applied platinum nanoparticles (PtNPs) to verify if they can influence the CDDP activity with particular emphasis on the differences due to nanoparticles' sizes.

We employed a broad spectrum of physicochemical methods, including Dynamic Light Scattering, Atomic Force Microscopy, Isothermal Titration Calorimetry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, and Near Infrared Spectroscopy and also Differential Scanning Calorimetry, to characterize the possible interactions between nanoparticles and CDDP. Moreover, the impact of PtNPs on CDDP biological activity was investigated using the Ames mutagenicity test on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102 and MTT assay on two breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3.

The obtained results revealed PtNPs direct interactions with CDDP dependent on the nanoparticles' size. Despite the lack of explicit confirmation of PtNPs aggregation by AFM imaging and DLS, further physicochemical methods indicated structural changes between nanoparticles alone and PtNPs-CDDP mixtures. Moreover, the biological assays confirmed that PtNPs decrease CDDP mutagenicity and also slightly increase its cytotoxicity on the chosen cell lines. The latter effects are ambiguous, nevertheless, provide a valuable basis for further research.

## 1. Introduction

Breast cancer, the leading type of cancer in women, is, unfortunately, also associated with high mortality representing the most frequent cause of cancer death in females in 2022 [1]. Breast carcinomas are subtyped based on the presence of estrogen, progesterone, and human epidermal growth factor receptors (HER) on the cells' surface [2]. Cancers over-expressing any of these receptors are routinely treated with targeted therapy. However, there is a vast number of cases where cancer cells are triple-negative, which means they have none of these receptors. Their therapy is restricted to surgical intervention and classic chemotherapy,

and, additionally, these cases are usually associated with greater aggressiveness and worse prognosis [2,3]. All these reasons make the search for a more efficacious therapy a matter of utmost importance.

Cisplatin (CDDP; *cis*-diammineplatinum (II) dichloride) is one of the most effective and commonly used chemotherapeutics which belongs to the group of alkylating agents [4,5]. CDDP is still used as a first-line therapy for many cancers such as breast, ovarian, testicular, head and neck, bladder, or lung cancers [4,6–8]. As a coordination complex, its structure consists of divalent platinum atom with two chloride groups and two amine ligands [4]. What is important, the *cis* configuration of its substituents is required to exhibit the antitumor activity [9]. After

\* Corresponding author.

E-mail address: [jacek.piosik@ug.edu.pl](mailto:jacek.piosik@ug.edu.pl) (J. Piosik).<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2024.111365>

Received 18 November 2024; Received in revised form 19 December 2024; Accepted 29 December 2024

Available online 30 December 2024

0009-2797/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

entering the cell, the chloride ligands from CDDP are displaced by water molecules, and the platinum complex can form covalent bonds with the N-7 position of guanine. That results are the creation of crosslinks, either inter- or intrastrand, the latter believed to be crucial for CDDP cytotoxicity. As a result, the crosslinks disrupt the DNA structure which leads to cell cycle arrest and apoptosis [4–7,10]. Unfortunately, the DNA damage induced by CDDP is recognized by repair proteins, and, in consequence, enhanced repair is one of the mechanisms leading to drug resistance [4,7,11]. Moreover, there are other mechanisms of the resistance such as the increased drug efflux [12], intracellular accumulation of the drug, or the cytosolic inactivation [7]. Furthermore, despite its efficiency, CDDP triggers severe side effects beginning with the most common nausea, vomiting, and acute nephrotoxicity up to neuro-, cardio-, or hepatotoxicity leading to the limitations of CDDP usage [4,6–8]. Hence, the researchers try to analyze other approaches such as the combination therapies with other chemotherapeutics or different substances to overcome the resistance and improve the efficiency of the drugs [13–15].

Over the last decades, nanotechnology, as a multidisciplinary field, has attracted more attention in many areas i.e. broadly defined technology, environmental science, chemistry but also in medicine [16]. For over 20 years nanoparticles research has been aimed at developing nanomedicines, delivery systems, and diagnostics tools against conditions such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes, or human immunodeficiency virus [16–21]. Noble-metal nanoparticles, including platinum nanoparticles (PtNPs) based on the platinum atoms in oxidation state 0 ( $Pt^0$ ), are in the spotlight due to their distinct features. They are characterized by a large surface to mass ratio [22,23] and high reactivity, but also catalytic and enzymatic activity [11,17]. Interestingly, they can transform radio frequencies into heat, a mechanism that can be exploited in cancer diagnosis via imaging [24]. Furthermore, PtNPs can be used as nanodelivery devices which can provide several benefits such as delivering the drug to the specific targeted area, improving the drug's anticancer efficiency associated with lower toxicity in healthy tissues, and/or accumulation at the tumor site [11, 17]. Entering the cancerous cells by nanoparticles leads to the inhibition of replication, cell cycle arrest, and apoptosis. Moreover, some researchers show the anticancer effect of PtNPs but no toxicity against healthy tissue [20,25–28]. Furthermore, PtNPs generate hydroxyl radicals and may inhibit cell metabolic activity [17,29]. What is important, the size of nanoparticles not only influences their active surface but has also an impact on their solubility and bioavailability [17,30]. Additionally, a few research groups confirmed that nanoparticles' size can be crucial for their mutagenicity, cytotoxicity, or genotoxicity [22,30–32].

As mentioned above, current studies are focused on drug nanodelivery systems or diagnostics applications, however, the possible modulation of chemotherapeutics by nanoparticles via direct interactions and nanoformulations arrangement assessing differences arising from nanoparticles' sizes have not been investigated yet. Therefore, research into the possible PtNPs size influence on chemotherapeutics locates itself in the existing gap, bridging chemotherapeutics and nanoparticles research, which should be filled to fully utilize nanoparticles' potential in cancer treatment.

Elucidation of the phenomenon of how the size of nanoparticles can influence their heteroaggregation with model anticancer drug - CDDP, appears as an important challenge that may help understand such complex interactions. To achieve this goal, we employed a broad range of physicochemical methods. Moreover, we conducted biological *in vitro* assays using pro- and eukaryotic cells to assess the influence of heteroaggregation between PtNPs and CDDP on the biological activity of investigated compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Cisplatin (CDDP) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Stock solutions were prepared by dissolving CDDP weight amounts in 2 mM sodium citrate (Sigma Aldrich Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) for physicochemical methods, and in distilled water for biological methods. Platinum nanoparticles (PtNPs) in two dimensions 5 nm and 50 nm in concentration 0.05 mg/mL (NanoXact) for physicochemical methods and PtNPs in concentration 1 mg/mL (BioPure) for biological assays, both in 2 mM sodium citrate, were acquired from nanoComposix (San Diego, California, USA). Samples were lyophilized by using freeze dryer Christ ALPHA 1–2 LD Plus apparatus (Christ, Martin GmbH & Co. KG) at a temperature of  $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The vacuum was maintained at 0.180 mbar. Mixtures and nanoparticles were subsequently placed in vacuum-controlled lyophilizing tubes. The lyophilized nanoparticles were eluted from sodium citrate solution after 24 h, then pooled, and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Cysteamine hydrochloride used in AFM imaging was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102 strain was purchased from Xenometrics AG (Allschwil, Switzerland). Nutrient Agar, Nutrient Broth and Biological Agar media were purchased from BioMaxima S.A. (Gdansk, Poland). Histidine, biotin, ampicillin and tetracycline used in Ames mutagenicity test were acquired from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). MDA-MB-231 and SKBR3 cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, Virginia, USA) collection. Media and substrates for cell culture were purchased as follows: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) from Biowest (Nuaille, France), Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics (penicillin and streptomycin), and trypsin from Sigma Aldrich Chemical Company. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT bromide) was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA).

### 2.2. Dynamic Light Scattering (DLS)

The examination of the hydrodynamic diameters for PtNPs alone and PtNPs with CDDP (PtNPs initial concentration 2.38  $\mu\text{g/mL}$ ; CDDP concentration 0.08 mM) were performed on Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) by measuring the intensity of the scattered light. Measurements were conducted in polystyrene cuvettes at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a He-Ne laser (633 nm, 4 mW), at a  $173^{\circ}$  scattering angle. All measurements were conducted in 2 mM sodium citrate.

### 2.3. Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy visualization of the PtNPs nanoparticles and PtNPs-CDDP mixtures was performed at  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  in air, in PeakForce Tapping mode, using BioScope Resolve AFM (Bruker, Bremen, Germany). PtNPs-CDDP mixtures were obtained via the reaction of 0.05 mg/mL PtNPs with 158.6  $\mu\text{M}$  CDDP at room temperature. Subsequently, 100 mM cysteamine was deposited onto a freshly cleaned mica surface for 5 min and afterwards the solution was aspirated. Then samples were added on mica and incubated for 5 min at room temperature, followed by washing with deionized water and drying with streams of nitrogen gas prior to AFM imaging. The ScanAsyst-Fluid + probe (Bruker) was used for PtNPs and PtNPs-CDDP mixtures imaging (resonant frequency  $f_0 = 150\text{ kHz}$ ; spring constant  $k = 0.7\text{ N/m}$ ). Images were registered at  $512 \times 512$  pixels with a PeakForce Tapping frequency of 1 kHz and amplitude of 150 nm. A height sensor signal was used to display the image using NanoScope Analysis v1.9.

### 2.4. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

The ITC measurements were performed in 2 mM sodium citrate

solution at 25 °C using AutoITC isothermal titration calorimeter (MicroCal Inc. GE Healthcare, Northampton, USA). The volumes of the sample and reference cells were 1.4491 mL. The experiment consists of multiple injections of 10.02 µL (15 injections, 2 µL for the first injection only) of CDDP solution (concentration range 0.002–0.029 mM) into the sample cell containing PtNPs (initial concentration 0.05 mg/mL). Background titrations were performed by injecting CDDP to 2 mM sodium citrate solution and 2 mM sodium citrate solution to PtNPs. The results of the background titrations were subtracted from each experimental result to account for the heat of dilution. Each injection lasted 20 s. To reach a homogenous mixing in the sample cell, the stirrer speed was kept constant at 300 rpm.

### 2.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Near Infrared Spectroscopy (NIR)

FTIR and NIR spectra of complexes formed between cisplatin and platinum nanoparticles were recorded on Jasco-4700 instrument (IR: 4000–400 cm<sup>-1</sup> NIR: 8200–4000 cm<sup>-1</sup>) with 32 scans, 4 cm<sup>-1</sup> resolution; Jasco Company, Tokyo, Japan). NIR Transmission technique was applied using dry salt KBr and dry samples of cisplatin and other components obtained by evaporation of water. The materials were compressed with potassium bromide to form a disc. All spectra were recorded as a background and analysis of spectra was performed using Spectra Analysis software (Jasco Company, Tokyo, Japan).

### 2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC), the constant pressure heat capacities

For performing the DSC analysis, 1–5 mg of samples were weighed into aluminum pans. DSC curves were recorded and analyzed by the STAR-1 System (Mettler Toledo, Switzerland) combined with the intercooler system. Samples were heated in the temperature range of 20 °C–300 °C, at the heating rate of 10 °C/min. Nitrogen was used as a drying gas, with a flow rate of 60 mL/min, and the reference material was indium. All tests were standardized to each sample size.

### 2.7. Ames mutagenicity test

The Ames mutagenicity test was performed with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102, in accordance with the procedure described by Woźniowiczka et al. [33]. A mixture containing 300 µL of the overnight bacteria culture, 150 µL of 3 % NaCl, and 300 µL of the tested solution (or sterile distilled water as a negative control) was incubated for 4 h in darkness at 37 °C and 220 rpm. Afterwards, the mixture was centrifuged at 11840 g, the bacterial pellet was washed with 0.75 % NaCl, and resuspended in 300 µL of 0.75 % NaCl solution containing 0.1 µmol histidine and 0.1 µmol biotin. The bacterial suspension was spread on a glucose minimal agar plate and incubated at 37 °C in darkness. After 48h incubation, the number of revertant colonies was calculated. All experiments were performed in triplicate. The optimal concentration for CDDP (200 ng per plate) was selected after testing CDDP mutagenic activity in a broad concentration range.

### 2.8. Cell culture

Cell lines MDA-MB-231 and SKBR3 were cultured in DMEM medium with 10 % FBS and antibiotics - penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The cultures were incubated at 37 °C.

### 2.9. MTT proliferation assay

Cells were seeded into a 96-well plate in triplicates and on the following day treated with cisplatin and platinum nanoparticles (concentration ranges: MDA-MB-231 CDDP 0–20 µM, 5 nm PtNPs 0–20 µg/mL, 50 nm PtNPs 0–1 µg/mL; SKBR3 CDDP 0–10 µM, 5 nm PtNPs 0–20

µg/mL, 50 nm PtNPs 0–1 µg/mL). After 72 h, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) was added into each well (0.6 mg/mL) and incubated for 2 h at 37 °C. The medium was discarded and formazan crystals were dissolved in DMSO. The absorbance was measured at 590 nm.

### 2.10. Statistical analysis

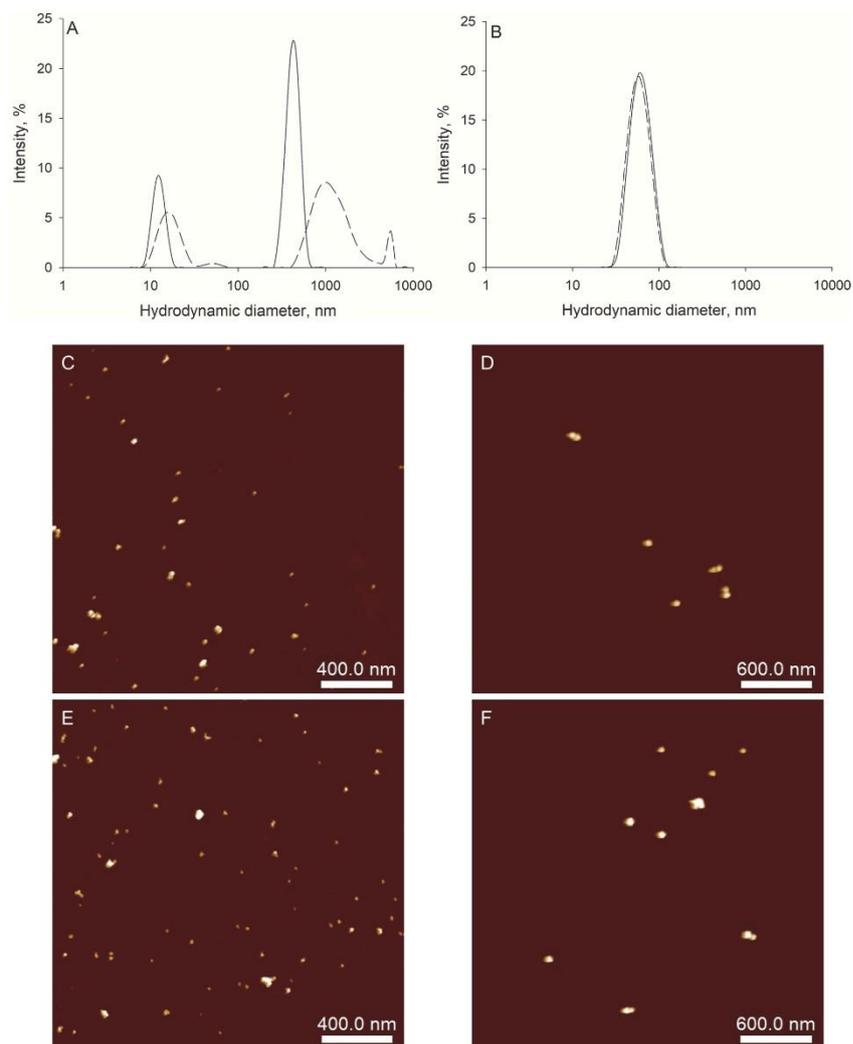
Ames mutagenicity test results were evaluated statistically with Statistica 14.0 (StatSoft) software. One-way variance analysis (ANOVA) followed by the post-hoc RIR Tukey's test was applied. The significance level was established at  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Results

To determine the hydrodynamic diameters of platinum nanoparticles and mixtures of PtNPs with CDDP, Dynamic Light Scattering (DLS) was performed. In the case of 5 nm PtNPs, two different peaks 12.37 nm and 431.40 nm were observed. The addition of CDDP to the solution resulted in the appearance of three peaks with average diameters 16.81 nm, 1208.67 nm and 5266.67 nm (Fig. 1A). Unfortunately, the polydispersity index (PDI) of 5 nm PtNPs alone was high and equaled 0.67, while the introduction of CDDP resulted in the increase of PDI, reaching 0.855 (Table 1) which is characteristic of suspensions of great heterogeneity. This phenomenon is responsible for the lack of Z-average values for 5 nm PtNPs and the mixture of 5 nm PtNPs and CDDP, as this parameter is non-informative for heterogeneous solutions. On the other hand, in the case of 50 nm PtNPs, the addition of CDDP did not alter both the hydrodynamic diameters (Fig. 1B) and the PDI (Table 1). Moreover, to confirm the DLS results images from Atomic Force Microscope (AFM) were recorded. In the case of nanoparticles alone, the sample was dominated by the nanoparticles' populations in size  $32.6 \pm 13.9$  nm for 5 nm PtNPs (Figs. 1C) and  $117.7 \pm 67.9$  nm for 50 nm PtNPs (Fig. 1D). The addition of CDDP to the nanoparticles did not change the aggregation pattern of both 5 nm and 50 nm PtNPs (Fig. 1E and F) - observed nanoparticles had  $29.1 \pm 10.9$  nm and  $119.3 \pm 62.9$  nm on average, respectively.

To investigate the thermal effects of PtNPs with CDDP, the Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was performed. Fig. 2 demonstrates the thermograms and enthalpy changes for PtNPs – CDDP, sodium citrate – CDDP and PtNPs – sodium citrate titrations. The heat for control samples were subtracted from the heat of PtNPs – CDDP titrations and the enthalpy change ( $\Delta H$ ) values were calculated by the linear regression of experimental points for CDDP concentration tending to zero. The values obtained for the interactions of CDDP with 5 nm PtNPs (Fig. 2C) and CDDP with 50 nm PtNPs (Fig. 2D) were equal to  $-0.538 \pm 0.06$  ( $\pm$ SE) kcal/mol and  $-0.478 \pm 0.07$  ( $\pm$ SE) kcal/mol, respectively.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Near Infrared Spectroscopy (NIR) were used as invaluable tools for studying intermolecular interactions [34]. The FTIR spectra of the studied complexes of CDDP with PtNPs are shown in Fig. 3 together with the pure PtNPs sample spectrum. The region of particular interest, marked as "A1" and "A2" (Fig. 3A), corresponds to the amine stretching mode of CDDP at 3286 and 3206 cm<sup>-1</sup> and is distinctly sensitive to hydrogen bonding. Sodium citrate specific O–H (–COOH) stretching vibration band is observed at 3419 cm<sup>-1</sup> (Fig. 3A, band "B"). CDDP bands assigned with "C", "D" are shown as asymmetric amine bending mode at 1624 and 1540 cm<sup>-1</sup> respectively, while the symmetric amine bending mode, shown at 1300 cm<sup>-1</sup> (Fig. 3A, band "E") corresponds with nanoparticles solution with sodium citrate and strong C–O stretching. The red spectrum in Fig. 3 shows the characteristic vibration band of platinum and chloride bond characteristic for CDDP at 798 cm<sup>-1</sup> (Fig. 3A, band "F"). Hydrogen bond interactions and the shift of its vibration peak at 1438 cm<sup>-1</sup> and 1405 cm<sup>-1</sup> corresponding to O–H stretching (COOH) (Fig. 3A, "G"–"G" shift) are specific for sodium citrate (from buffer solution). The NIR results, presented in Fig. 3B, letters "K", "K" indicate bands



**Fig. 1.** Aggregation of platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes with cisplatin (CDDP). (A) Hydrodynamic diameters of 5 nm PtNPs (solid line) and 5 nm PtNPs - CDDP mixtures (dashed line). Peaks' sizes: PtNPs  $12.37 \pm 1.38$  and  $431.40 \pm 49.36$ ; mixture  $16.81 \pm 0.4$  and  $1208.67 \pm 465.1$  and  $5266.67 \pm 300.4$ . (B) Hydrodynamic diameters of 50 nm PtNPs (solid line) and 50 nm PtNPs - CDDP mixtures (dashed line). Peaks' sizes:  $56.30 \pm 1.7$ ; mixture  $55.77 \pm 0.9$ . CDDP concentration 0.08 mM; PtNPs initial concentration 2.38  $\mu\text{g/ml}$ . Results are reported as the average hydrodynamic diameter. (C) AFM image of 5 nm PtNPs alone. (D) AFM image of 50 nm PtNPs alone. (E) AFM image of 5 nm PtNPs with CDDP. (F) AFM image of 50 nm PtNPs with CDDP.

characteristic for asymmetric amine bending mode of cisplatin at  $4808$  and  $4567 \text{ cm}^{-1}$  respectively. Platinum and chloride bond was observed at  $4077 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3B, band "L") which proves the formation of the aggregates, and what is interesting it is observed in the spectrum of complex with 50 nm PtNPs. Both O-H and N-H bending or their interaction effect at  $5156$  and  $4347 \text{ cm}^{-1}$  are denoted by "M" and "N" in Fig. 3B.

After confirming the formation of the complex formation, we used the Differential Scanning Calorimetry (DSC) technique, which is essential for observing the phase transition temperature of materials. CDDP with PtNPs and their thermal properties were investigated to measure the melting temperature of bulk and mixed components. DSC thermograms (Fig. 4) demonstrated that describing the substrates, pure sodium citrate is characterized by a crystallization peak at  $t = 164 \text{ }^\circ\text{C}$ , CDDP's

**Table 1**  
Parameters for platinum nanoparticles (PtNPs) with cisplatin (CDDP) aggregation in DLS experiment. CDDP concentration 0.08 mM; PtNPs concentration 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . SD – standard deviation; Pdl – polydispersity index.

	Z-average, nm $\pm$ SD	Peak Mean, nm $\pm$ SD	Pdl average
5 nm PtNPs	–	12.37 $\pm$ 1.38 431.40 $\pm$ 49.36	0.67
CDDP + 5 nm PtNPs	–	16.81 $\pm$ 0.4 1208.67 $\pm$ 465.1 5266.67 $\pm$ 300.4	0.855
50 nm PtNPs	56.30 $\pm$ 1.7	60.14 $\pm$ 1.2	0.047
CDDP + 50 nm PtNPs	55.77 $\pm$ 0.9	59.89 $\pm$ 1.0	0.048

melting peak is observed at 280 °C (red curve) and identified as slightly deformed and not specific in both samples with PtNPs' complexes: 5 nm (black curve) and 50 nm (green curve). The melting peak is also well visible for PtNPs at 65–70 °C.

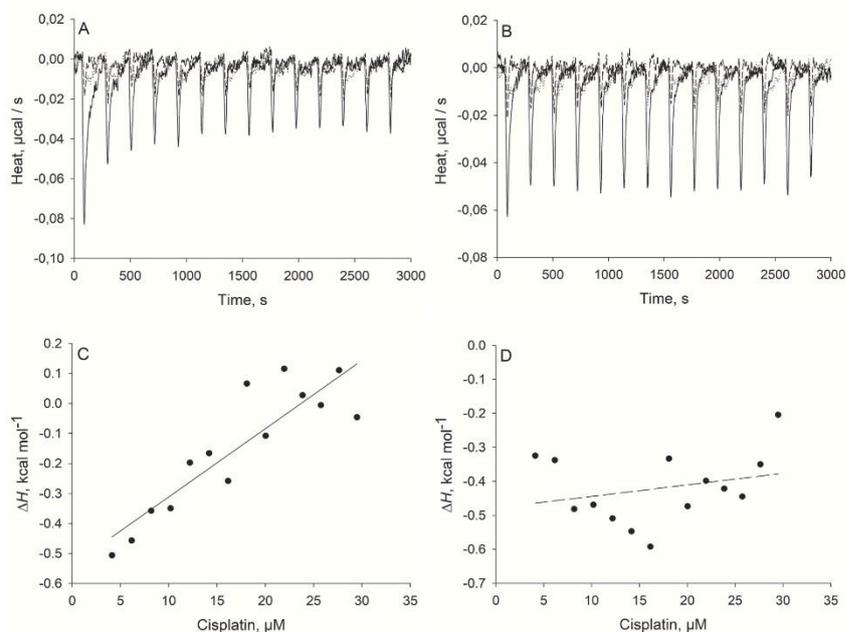
In the next step, after confirmation of direct CDDP-PtNPs interactions and structural changes, we used the prokaryotic model to investigate whether these interactions could influence the biological activity of the tested compounds. To analyze the possible impact of

PtNPs on CDDP mutagenic activity, the Ames Mutagenicity Assay was performed. The data recorded for both sizes of PtNPs, 5 nm and 50 nm, revealed the reduction of CDDP mutagenic activity by PtNPs with the increasing concentration of nanoparticles (0.001–1  $\mu\text{g}$  per plate). PtNPs alone showed no mutagenic activity in all analyzed concentrations (data not shown).

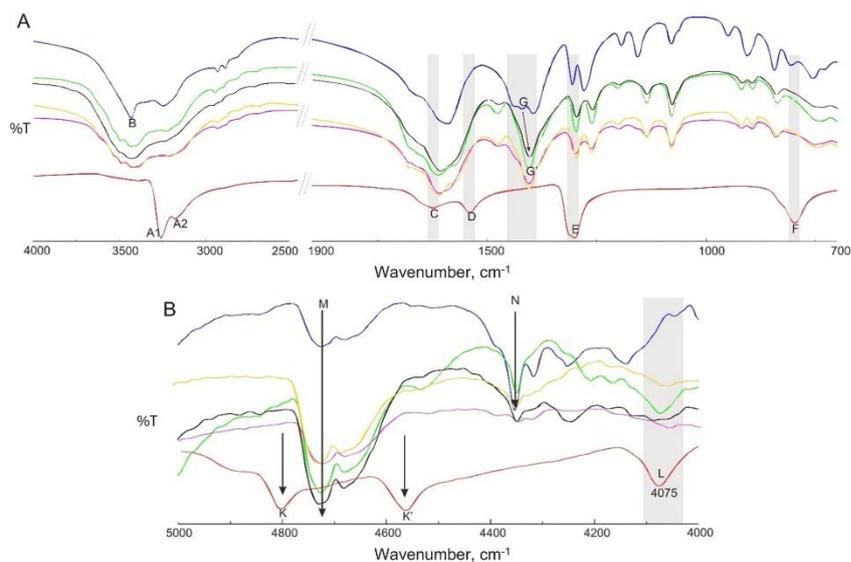
To get further insight into the biological effects of PtNPs on CDDP, the cytotoxicity MTT assays were performed on two breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3 isolated from triple-negative and HER2-positive breast cancer, respectively, i.e. subtypes treated with chemotherapeutics. PtNPs alone reduced cells viability by approx. 15 % and the effect did not depend on its size or concentration. Importantly, the results show a consistent additive effect of both 5 nm and 50 nm PtNPs on CDDP-reduced cell viability. The combination of CDDP with 5 nm and 50 nm PtNPs in the highest concentrations impaired the cell viability to 46 % and 45 %, in MDA-MB-231 cell line, while CDDP alone reduced the viability to 62 % (Fig. 6A–B). In the case of SKBR3 cells, the reduction was up to 46 % and 47 % regarding the CDDP combination with 5 nm and 50 nm PtNPs respectively, whereas for CDDP alone it was up to 60 % (Fig. 6C–D).

#### 4. Discussion

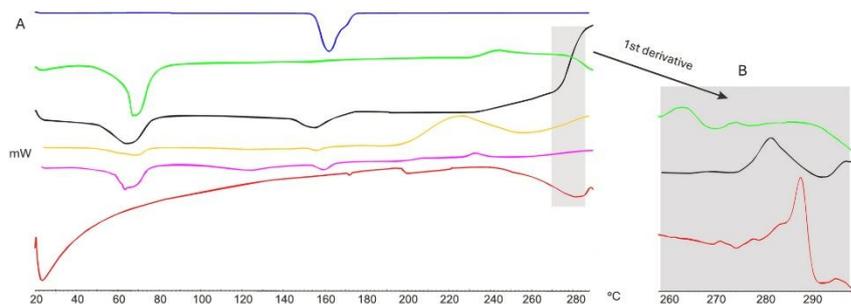
Cisplatin (CDDP), as one of the most commonly used anticancer



**Fig. 2.** Determination of enthalpy change ( $\Delta H$ ) values for platinum nanoparticles (PtNPs) – cisplatin (CDDP) interactions. (A) Thermograms presenting microcalorimetric titrations of 5 nm PtNPs with CDDP (solid line), sodium citrate solution with CDDP (dotted line) and 5 nm PtNPs with sodium citrate solution (dashed line), shown as heat released in time. (B) Thermograms presenting microcalorimetric titrations of 50 nm PtNPs with CDDP (solid line), sodium citrate solution with CDDP (dotted line) and 50 nm PtNPs with sodium citrate solution (dashed line), shown as heat released in time. (C)  $\Delta H$  of 5 nm PtNPs-CDDP interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $-0.538 \pm 0.06$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected cisplatin. (D)  $\Delta H$  of 50 nm PtNPs-CDDP interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $-0.478 \pm 0.07$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected cisplatin. CDDP concentration range: 0.002–0.029 mM.



**Fig. 3.** FTIR and NIR spectra of the investigated complexes of cisplatin (CDDP) and platinum nanoparticles (PtNPs). (A) FTIR spectra. (B) NIR spectra. Sodium citrate pure - blue, 50 nm PtNPs - CDDP complex - green, 5 nm PtNPs - CDDP complex - black, 5 nm PtNPs solution lyophilized - yellow, 50 nm PtNPs solution lyophilized - pink, CDDP pure - red. Capital letters indicate the characteristic bands and interactions described in the text.

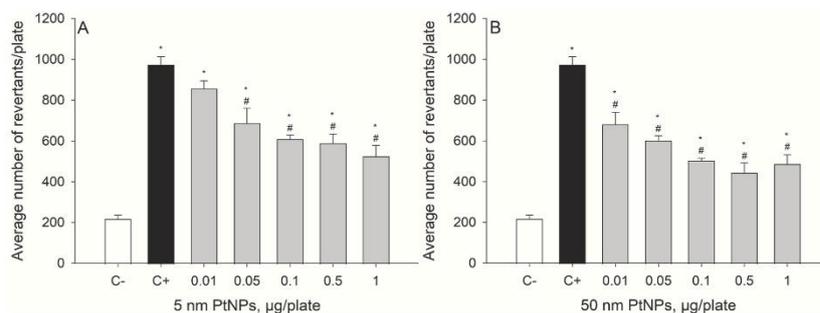


**Fig. 4.** DSC curves obtained for cisplatin (CDDP) mixtures with platinum nanoparticles (PtNPs). (A) Whole spectrum of DSC curves. (B) First derivative of DSC curves. Sodium citrate pure - blue, 50 nm PtNPs - CDDP complex - green, 5 nm PtNPs - CDDP complex - black, 5 nm PtNPs solution lyophilized - yellow, 50 nm PtNPs solution lyophilized - pink, CDDP pure - red.

drugs, is highly effective but toxic at the same time. Serious side effects, especially nephrotoxicity, make the treatment difficult and may account for a substantial additional health burden. Moreover, the administration of CDDP often leads to drug resistance and, in consequence, the inefficiency of the chemotherapy. Therefore, looking for new approaches for existing drugs applications of nanotechnology appears to be truly required. Current studies about nanoparticles in cancer treatment are focused on drug transport, mostly by loading the biologically active substances into the particles [35–38] or other nanoparticles' modifications [16,20]. Despite this approach, the possible interactions between nanoparticles and CDDP have not been investigated yet. Therefore, in this study, we focused on the possible modulation of CDDP activity by platinum nanoparticles (PtNPs) and, importantly, the alterations arising

from different nanoparticles' sizes.

Firstly, to verify the possible aggregates formation, we employed Dynamic Light Scattering (DLS). Depending on the nanoparticles' size, we observed different patterns. In the case of 50 nm PtNPs, there was no change in nanoparticles diameter after adding CDDP, which could suggest the lack of interactions. However, both 5 nm PtNPs alone and after adding CDDP, were polydisperse so the comparison of diameter change was hardly possible. Instead of the two peaks visible for the nanoparticles at 12 nm and 431 nm, after adding the drug we observed three peaks at approximately 17 nm, 1209 nm, and 5267 nm, with the third peak potentially being an artifact of solvent fluctuation. The literature data is contradictory, some reports show the increase of the hydrodynamic diameter after adding CDDP to C60 fullerene [39], acridine

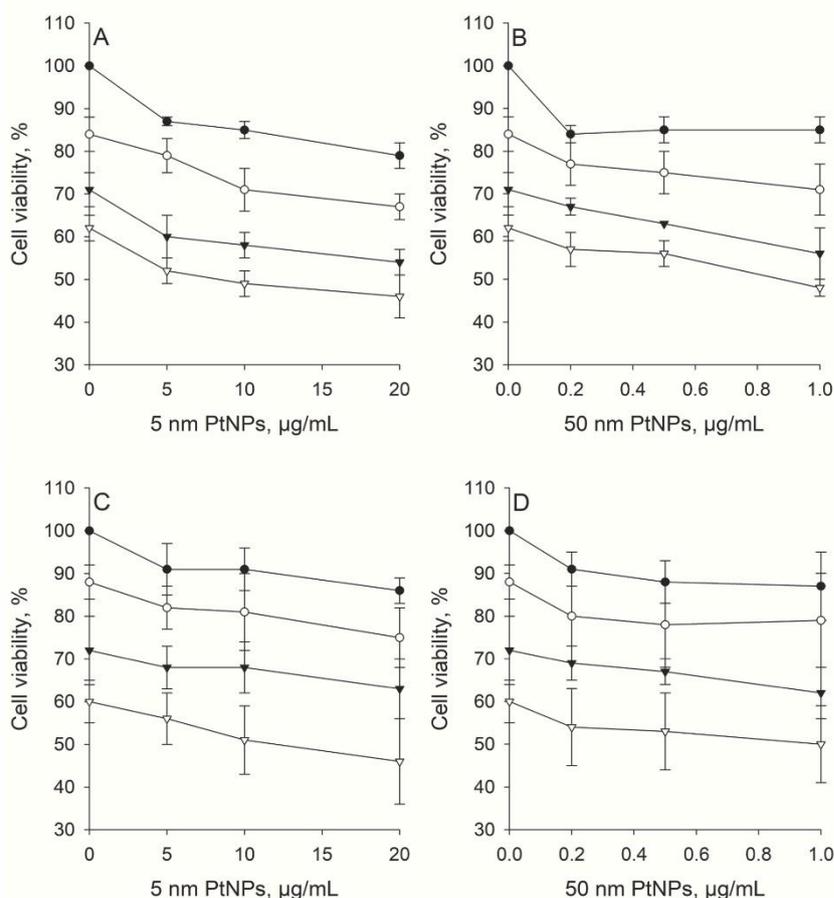


**Fig. 5.** Influence of platinum nanoparticles (PtNPs) on cisplatin (CDDP) mutagenic activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102 Ames mutagenicity test. (A) Mutagenic activity of CDDP and CDDP - 5 nm PtNPs mixtures. (B) Mutagenic activity of CDDP and CDDP - 50 nm PtNPs mixtures. C - negative control (sterile water; white color), C + - positive control (CDDP 200 ng per plate; black color), CDDP - PtNPs mixtures (CDDP 200 ng per plate constantly, PtNPs range: 0.001–1 µg per plate; grey color). Results are reported as the average number of revertants  $\pm$  SD. \* - values significantly different from negative control; # - values significantly different from positive control ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

mutagen ICR-191 to PtNPs [25] or anthracycline antibiotics to gold nanoparticles (AuNPs) [40]. However, Wroblewska et al. [41] did not observe any significant changes in the hydrodynamic diameter following the addition of CDDP to AuNPs. The results for 50 nm PtNPs were consistent with AFM data (Fig. 1D and F), where the average nanoparticle's size was similar before and after the addition of CDDP. What is important, compared to DLS, employing this method we did not observe 5 nm PtNPs aggregates above 400 nm for both PtNPs alone and with the addition of the drug which may result from the conditions of both experiments (Fig. 1C and E). Prylutskyy's research group investigated another nanostructure, C60 fullerene, alone [42] and with doxorubicin (DOX) addition [43]. The results reported the formation of new island-like objects in C60-DOX mixtures at 20-fold dilution [43] compared to C60 alone [42]. The first results forced us to apply more detailed methods, therefore, in the next step we performed Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to verify the thermal changes induced by potential interactions. The results for both PtNPs diameters suggest spontaneous, exothermic reactions for both PtNPs diameters. Obtained enthalpy changes were low, which could be attributed to interactions masking by water. A similar phenomenon was observed for C60 fullerene with CDDP, where the thermal effect was also low [44]. Similarly, the interactions of DOX with C60, which were not shown clearly with any method employed, were confirmed after careful analysis of data obtained using various physicochemical methods [43]. However, Borowik et al. observed higher enthalpy change values for interactions between PtNPs and ICR-191 [25]. In light of ambiguous prior results and to provide reliable evidence of the possible direct interactions between PtNPs and CDDP, we performed Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Near Infrared Spectroscopy (NIR) to compare the spectral changes for CDDP and PtNPs alone and in mixtures. The infrared spectroscopy characteristic of CDDP was previously described in great detail [45–47]. The obtained results partially correspond with these data, however CDDP vibration is hidden and not directly observed due to aggregation with PtNPs. The results of FTIR are further confirmed with NIR analysis, which is currently the fastest-growing analytical method in pharmaceutical sciences as well as a versatile technique with wide applications also in the industry. What is highly important, molecular interactions of ground solids using NIR were estimated and studied previously [48]. The DSC analysis was performed to check the crystalline/amorphous nature of the CDDP molecule in the formulations as well as to describe some important interactions between cisplatin and the nanoparticles. CDDP's melting peak was observed at 280 °C (red curve) and detected in both samples with

PtNPs' complexes: 5 nm (black curve) and 50 nm (green curve) and some deformation was observed at the range of temperature between 260 and 300 °C. It is better visualized in Fig. 4B where the first derivatives of these curves are presented. The green curve containing 50 nm PtNPs is less influenced and the deformation is smaller, which might be explained by more amorphous state of this sample [49]. Nevertheless, there was no sharp endothermic peak of CDDP in the nanoparticle formulation, attributable to a loss of its crystalline nature in the hybrid nanoparticle formulation, as reported in a previous study [50].

Literature shows the usage of Ames assay as an indicator of biologically active compounds' impact. For instance, Wozniowicz et al. showed that caffeine decreases the mutagenicity of IQ-type heterocyclic amines [33]. That is why, the mutagenicity Ames tests on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102 were performed. The results presented in Fig. 5 confirmed that both 5 nm and 50 nm PtNPs decrease the mutagenic activity of CDDP. The detected pattern corresponds to the results obtained by Borowik et al. [25], where the increasing concentrations of PtNPs decrease the mutagenicity of acridine mutagen ICR-191. Importantly, the mutagenic activity of the 5 nm and 50 nm PtNPs alone was not observed in the tested concentrations range towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA102 (data not shown). Other results confirmed the lack of mutagenic activity of PtNPs on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 [25], or iron-platinum nanoparticles on TA98 and TA100 [51]. As mentioned above, despite the efficiency of antineoplastic drugs, conventional chemotherapy is non-specific and, in consequence, highly toxic not only for cancer tissue but also for healthy cells. PtNPs application can influence the precision of drug delivery and the accumulation in the tumor site making the treatment more effective and less harmful [17,52]. Moreover, the literature reports indicate that PtNPs have anticancer abilities on their own [53–55]. Therefore, in the last step, we decided to perform MTT assay on two different human breast cancer cell lines. The overall pattern for both nanoparticles' diameters was similar, where the cell viability was decreasing with the increasing amount of PtNPs. The average reduction in cell viability between CDDP alone and in combination with the highest nanoparticles concentration was up to 17 % and 14 % in MDA-MB-231 cell line and 12 % and 9 % in SKBR3 cell line for 5 nm and 50 nm PtNPs, respectively. The results are in conformity with research for mesoporous PtNPs modified with polyethylene glycol (PEG) with DOX, where the cell viability of MCF-7/ADR cells was lower in the case of DOX with modified PtNPs than with DOX alone [21]. Moreover, Bhatt et al. [56] studied the cytotoxicity of raloxifene hydrochloride-loaded poly (l-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and



**Fig. 6.** Influence of platinum nanoparticles (PtNPs) on cisplatin (CDDP) cytotoxicity towards selected breast cancer cell lines. (A) Viability of MDA-MB-231 cells treated with 5 nm PtNPs with CDDP (0 µM – filled circles, 1 µM – empty circles, 10 µM – filled triangles, 20 µM – empty triangles). (B) Viability of MDA-MB-231 cells treated with 50 nm PtNPs with CDDP (0 µM – filled circles, 1 µM – empty circles, 10 µM – filled triangles, 20 µM – empty triangles). (C) Viability of SKBR3 cells treated with 5 nm PtNPs with CDDP (0 µM – filled circles, 1 µM – empty circles, 5 µM – filled triangles, 10 µM – empty triangles). (D) Viability of SKBR3 cells treated with 50 nm PtNPs with CDDP (0 µM – filled circles, 1 µM – empty circles, 5 µM – filled triangles, 10 µM – empty triangles). PtNPs concentration ranges: 5 nm PtNPs 0–20 µg/mL; 50 nm PtNPs 0–1 µg/mL.

confirmed that the drug-loaded nanoparticles are more cytotoxic than the pure drug against MCF-7 cell line. Other researchers demonstrated that CDDP with curcumin-coated silver nanoparticles decreases the cell viability significantly better than CDDP alone on A2780, resistant ovarian cancer cells [57].

## 5. Conclusion

To conclude, the presented results show a significant influence of PtNPs size on observed direct interactions of PtNPs with CDDP. Interestingly, despite the lack of strong evidence of nanoparticles'

aggregation in DLS and AFM results, further methods indicated structural changes between samples of PtNPs and CDDP alone and in the mixtures. Moreover, the biological tests confirmed PtNPs' influence on CDDP mutagenicity and cytotoxicity based on chosen cell lines. The latter, despite being ambiguous, provides a valuable basis for further research which should be conducted to provide conclusive evidence for the impact of PtNPs on CDDP cytotoxic activity.

## CRedit authorship contribution statement

Patrycja Beldzińska: Writing – review & editing, Writing – original

draft, Visualization, Validation, Investigation, Formal analysis. **Barbara Galikowska-Bogut**: Writing – review & editing, Investigation. **Marcin Zakrzewski**: Writing – review & editing, Investigation. **Katarzyna Bury**: Writing – review & editing, Investigation. **Marzena Jamrógiewicz**: Writing – review & editing, Investigation. **Dariusz Wyrzykowski**: Writing – review & editing, Investigation. **Grzegorz Gołuski**: Writing – review & editing, Formal analysis. **Rafał Sądej**: Writing – review & editing, Methodology. **Jacek Piosik**: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

#### Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### References

- Bray, F., Laversanne, S., Hyuna, J., Ferlay, R.L., Siegel, I., Soerjomataram, J., Ahmedin, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>, 2024.
- X. Dai, H. Cheng, Z. Bai, J. Li, Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping, *J. Cancer* 8 (2017) 3131, <https://doi.org/10.7150/JCA.18457>.
- A. Goldhirsch, J.N. Ingle, R.D. Gelber, A.S. Coates, B. Thürlimann, H.J. Senn, Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009, *Ann. Oncol.* 20 (2009) 1319–1329, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp322>.
- S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- H. Lajous, B. Lelièvre, E. Vauléon, P. Lecomte, E. Garcion, Rethinking alkylating (-like) agents for solid tumor management, *Trends Pharmacol. Sci.* 40 (2019) 342–357, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.03.003>.
- B. Szikriszt, A. Póti, E. Németh, N. Kanu, C. Swanton, D. Szüts, Cisplatin is more mutagenic than carboplatin or oxaliplatin at equitoxic concentrations, *bioRxiv* 2020 (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.08.11.245969>, 08.11.245969.
- S.A. Aldossary, Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin, *Biomedical and Pharmacology Journal* 12 (2019) 7–15, <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>.
- A. Brown, S. Kumar, P.B. Tchounwou, Cisplatin-based chemotherapy of human cancers, *J. Cancer Sci. Ther.* 11 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12031-019-00000-0>.
- D.B. Zamble, S.J. Lippard, Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 435–439, [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89095-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89095-7).
- A. Basu, S. Krishnamurthy, Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage, *J. Nucleic Acids* 2010 (2010) 16, <https://doi.org/10.4061/2010/201367>.
- T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3436–3486, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>.
- Y. Hu, Q.N. Zhu, J.L. Deng, Z.X. Li, G. Wang, Y.S. Zhu, Emerging role of long non-coding RNAs in cisplatin resistance, *Oncotargets Ther.* 11 (2018) 3185, <https://doi.org/10.2147/OTT.S158104>.
- Z. Yang, F. Guo, A.E. Albers, J. Sehouli, A.M. Kaufmann, Disulfiram modulates ROS accumulation and overcomes synergistically cisplatin resistance in breast cancer cell lines, *Biomed. Pharmacother.* 113 (2019) 108727, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108727>.
- J.O. Lee, M.J. Kang, W.S. Byun, S.A. Kim, I.H. Seo, J.A. Han, J.W. Moon, J.H. Kim, S.J. Kim, E.J. Lee, S. In Park, S.H. Park, H.S. Kim, Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51, *Breast Cancer Res.* 21 (2019) 1–18, <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1204-2/FIGURES/8>.
- Y. Wang, J. Qian, M. Yang, W. Xu, J. Wang, G. Hou, L. Ji, A. Suo, Doxorubicin/cisplatin co-loaded hyaluronic acid/chitosan-based nanoparticles for in vitro synergistic combination chemotherapy of breast cancer, *Carbohydr. Polym.* 225 (2019) 115206, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115206>.
- A. López Ruiz, E. Villaseco Arribas, K. McEnnis, Poly(lactic-co-glycolic acid) encapsulated platinum nanoparticles for cancer treatment, *Mater Adv* 3 (2022) 2858–2870, <https://doi.org/10.1039/D1MA01155C>.
- A.A. Pawar, J. Sahoo, A. Verma, A. Lodh, J. Lakkakula, A.A. Pawar, J. Sahoo, A. Verma, A. Lodh, J. Lakkakula, Usage of platinum nanoparticles for anticancer therapy over last decade: a review, *Part. Part. Syst. Char.* 38 (2021) 2100115, <https://doi.org/10.1002/PPSC.202100115>.
- J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, M.J. Yacamán, Interaction of silver nanoparticles with HIV-1, *J. Nanobiotechnol.* 3 (2005), <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-6>.
- N. Korin, M. Kanapathipillai, B.D. Matthews, M. Crescente, A. Brill, T. Mammoto, K. Ghosh, S. Jurek, S.A. Bencherif, D. Bhatta, A.U. Coskun, C.L. Feldman, D. Wagner, D.E. Ingber, Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels, *Science* 337 (2012) 738–742, <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1217815>.
- A.P. Stavropoulou, M. Theodosiou, E. Sakellis, N. Boukos, G. Papanastasiou, C. Wang, A. Tavares, C.A. Corral, D. Gournis, N. Chalmpis, O.L. Gobbo, E. K. Efthimiadou, Bimetallic gold-platinum nanoparticles as a drug delivery system coated with a new drug to target glioblastoma, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 214 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112463>.
- B. Fu, M. Dang, J. Tao, Y. Li, Y. Tang, Mesoporous platinum nanoparticle-based nanoplateforms for combined chemo-photothermal breast cancer therapy, *J. Colloid Interface Sci.* 570 (2020) 197–204, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.02.051>.
- Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small* 3 (2007) 1941–1949, <https://doi.org/10.1002/sml.200700378>.
- X. Zhang, J. Zhang, Q. Wang, S. Ghimire, L. Mei, C. Wu, Effects of particle size and surface charge on mutagenicity and chicken embryonic toxicity of new silver nanoclusters, *ACS Omega* 7 (2022) 17703–17712, <https://doi.org/10.1021/ACSNMGA.3C00688>.
- Z. Ashikbayeva, D. Tosi, D. Balmassov, E. Schena, P. Saccomandi, V. Inglezakis, Application of nanoparticles and nanomaterials in thermal ablation therapy of cancer, *Nanomaterials* 9 (2019) 1195, <https://doi.org/10.3390/NANO9091195>, 9 (2019) 1195.
- A. Borowik, R. Banasiuk, N. Derewonko, M. Rychlowski, M. Krychowiak-Masnicka, D. Wyrzykowski, M. Ziabka, A. Wozniowdka, A. Krolicka, J. Piosik, Interactions of newly synthesized platinum nanoparticles with ICR-191 and their potential application, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41092-6>, 9 (2019) 1–11.
- B. Şahin, A. Aygün, H. Gündüz, K. Şahin, E. Demir, S. Akocak, F. Şen, Cytotoxic effects of platinum nanoparticles obtained from pomegranate extract by the green synthesis method on the MCF-7 cell line, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 163 (2018) 119–124, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.042>.
- P.v. Asharani, Y. Lianwu, Z. Gong, S. Valiyaveetil, Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos, *Nanotoxicology* 5 (2011) 43–54, <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489207>.
- B. Baskaran, A. Muthukumarasamy, S. Chidambaram, A. Sugumaran, K. Ramchandran, T.R. Manimathu, Cytotoxic potentials of biologically fabricated platinum nanoparticles from *Streptomyces* sp. on MCF-7 breast cancer cells, *IET Nanobiotechnol.* 11 (2017) 241–246, <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2016.0040>.
- N.A.S. Ismail, J.X. Lee, F. Yusof, Platinum nanoparticles: the potential antioxidant in the human lung cancer cells, *Antioxidants* 11 (2022) 986, <https://doi.org/10.3390/ANTOX11050986>.
- N. Hoshiyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine* 11 (2016) 673, <https://doi.org/10.2217/NNM.16.5>.
- S. Huo, S. Jin, X. Ma, X. Xue, K. Yang, A. Kumar, P.C. Wang, J. Zhang, Z. Hu, X. J. Liang, Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry, *ACS Nano* 8 (2014) 5852–5862, <https://doi.org/10.1021/nn5008572>.
- J. Lebedová, Y.S. Hedberg, I. Odnevall Wallinder, H.L. Karlsson, Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry, *Mutagenesis* 33 (2018) 77–85, <https://doi.org/10.1093/mutage/gex027>.
- A. Wozniowdka, A. Gwizdek-Wisniewska, J. Piosik, Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines, *Bioorg. Chem.* 39 (2011) 10–17, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2010.11.001>.
- Á.I. López-Lorente, B. Mizakoff, Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy, *TRAC, Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 97–106, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.012>.
- M. Pourmadadi, A. Ghaemi, A. Shamsabadipour, M. Rajabzadeh-Khosroshahi, M. Shaghagh, A. Rahdar, S. Pandey, Nanoparticles loaded with Daunorubicin as an advanced tool for cancer therapy, *Eur. J. Med. Chem.* 258 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115547>.
- C. Yu, B. Ding, X. Zhang, X. Deng, K. Deng, Z. Cheng, B. Xing, D. Jin, P. Ma, J. Lin, Targeted iron nanoparticles with platinum(IV) prodrugs and anti-EZH2 siRNA show great synergy in combating drug resistance in vitro and in vivo, *Biomaterials* 155 (2018) 112–123, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.014>.
- E. Ortiz-Islas, M.E. Manríquez-Ramírez, A. Sosa-Muñoz, P. Almaguer, C. Arias, P. Guevara, G. Hernández-Cortez, M. Lucinda Aguirre-Cruz, Preparation and characterisation of silica-based nanoparticles for cisplatin release on cancer brain

- cells, *IET Nanobiotechnol.* 14 (2020) 191–197, <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2019.0239>.
- [38] M.H. Sultan, S.S. Moni, O.A. Madkhali, M.A. Bakkari, S. Alshahrani, S.S. Alqahtani, N.A. Alhakamy, S. Mohan, M. Ghazwani, H.A. Bukhary, Y. Almoshari, A. Salawi, M. Alshahrani, Characterization of cisplatin-loaded chitosan nanoparticles and rituximab-linked surfaces as target-specific injectable nano-formulations for combating cancer, *Sci. Rep.* 12 (2022), <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04427-W>.
- [39] S. Prylutskaya, S. Politenkova, K. Afanasieva, V. Korolovych, K. Bogutska, A. Sivolob, L. Skivka, M. Evstigneev, V. Kostjukov, Y. Prylutskyy, U. Ritter, A nanocomplex of C60 fullerene with cisplatin: design, characterization and toxicity, *Bellstein J. Nanotechnol.* 8 (2017) 1494–1501, <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.149>.
- [40] Y.J. Gu, J. Cheng, C.W.Y. Man, W.T. Wong, S.H. Cheng, Gold-doxorubicin nanocjugates for overcoming multidrug resistance, *Nanomedicine* 8 (2012) 204–211, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.005>.
- [41] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk, Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022), <https://doi.org/10.3390/IJMS23042324/S1>.
- [42] Y.I. Prylutskyy, V.I. Petrenko, O.I. Ivankov, O.A. Kyzyma, L.A. Bulavin, O.O. Litsis, M.P. Evstigneev, V.V. Cherepanov, A.G. Naumovets, U. Ritter, On the origin of C60 fullerene solubility in aqueous solution, *Langmuir* 30 (2014) 3967–3970, <https://doi.org/10.1021/LA404976K/ASSET/IMAGES/LARGE/LA-2013-04976K.0004.JPEG>.
- [43] Y.I. Prylutskyy, M.P. Evstigneev, I.S. Pashkova, D. Wyrzykowski, A. Woźniwodzka, G. Goluński, J. Piosik, V.v. Cherepanov, U. Ritter, Characterization of C60 fullerene complexation with antibiotic doxorubicin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 23164–23172, <https://doi.org/10.1039/C4CP03676A>.
- [44] Y.I. Prylutskyy, V.v. Cherepanov, M.P. Evstigneev, O.A. Kyzyma, V.I. Petrenko, V. I. Stypokin, L.A. Bulavin, N.A. Davidenko, D. Wyrzykowski, A. Woźniwodzka, J. Piosik, R. Kazmierkiewicz, U. Ritter, Structural self-organization of C60 and cisplatin in physiological solution, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 26084–26092, <https://doi.org/10.1039/C5CP02688A>.
- [45] S. Likhitar, A.K. Bajpai, Magnetically controlled release of cisplatin from superparamagnetic starch nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 300–308, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.053>.
- [46] M. Ghaferi, S. Amari, B.V. Mohrir, A. Raza, H.E. Shahmabadi, S.E. Alavi, Preparation, characterization, and evaluation of cisplatin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles with improved in vitro and in vivo anticancer activities, *Pharmaceuticals* 13 (2020), <https://doi.org/10.3390/PH13030044>.
- [47] I. Vhora, N. Khatri, J. Desai, H.P. Thakkar, Caprylate-conjugated Cisplatin for the development of novel liposomal formulation, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 845–857, <https://doi.org/10.1208/S12249-014-0106-Y>.
- [48] M. Jamrógiewicz, Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.009>.
- [49] M. Parhizkar, P.J.T. Reardon, J.C. Knowles, R.J. Browning, E. Stride, P.R. Barbara, A.H. Harker, M. Edirisinghe, Electrohydrodynamic encapsulation of cisplatin in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled drug delivery, *Nanomedicine* 12 (2016) 1919–1929, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.005>.
- [50] N. Dixit, K. Vaibhav, R.S. Pandey, U.K. Jain, O.P. Katore, A. Katyal, J. Madan, Improved cisplatin delivery in cervical cancer cells by utilizing folate-grafted non-aggregated gelatin nanoparticles, *Biomed. Pharmacother.* 69 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.016>.
- [51] S. Maenosono, T. Suzuki, S. Saita, Mutagenicity of water-soluble FePt nanoparticles in Ames test, *J. Toxicol. Sci.* 32 (2007) 575–579, <https://doi.org/10.2131/jts.32.575>.
- [52] P. Kumari, B. Ghosh, S. Biswas, Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery, *J. Drug Target.* 24 (2016) 179–191, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>.
- [53] M. Kutwin, E. Sawosz, S. Jaworski, M. Hinzmann, M. Wierzbicki, A. Hotowy, M. Grodzik, A. Winnicka, A. Chwalibog, Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme, *Arch. Med. Sci.* 13 (2017) 1322–1334, <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58925>.
- [54] V. Borse, U. Chand Banerjee, A. Kaler, M. Tech student, Microbial synthesis of platinum nanoparticles and evaluation of their anticancer activity, *International Journal of Emerging Trends in Electrical and Electronics* 11 (2015) 2320–2326, <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3132.5283>.
- [55] S.S. Rokade, K.A. Joshi, K. Mahajan, S. Patil, G. Tomar, D.S. Dubal, V.S. Parihar, R. Kirture, J.R. Bellare, S. Ghosh, Gloriosa superba mediated synthesis of platinum and palladium nanoparticles for induction of apoptosis in breast cancer, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2018 (2018), <https://doi.org/10.1155/2018/4924186>.
- [56] K. Bhatt, P. Patil, P. Jani, P. Thakkar, K. Sawant, Design and evaluation of hyaluronic acid-coated PLGA nanoparticles of raloxifene hydrochloride for treatment of breast cancer, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2022) 1–12, <https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2088784>.
- [57] T. Ramezani, M. Nabiuni, J. Baharara, K. Parivar, F. Namvar, Sensitization of resistance ovarian cancer cells to cisplatin by biogenic synthesized silver nanoparticles through p53 activation, *Iran. J. Pharm. Res. (LJPR)* 18 (2019) 222, <https://pmc/articles/PMC6487401/>. (Accessed 1 July 2022).

### **9.1.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 1**

Gdańsk, 13.06.2025

**Patrycja Beldzińska**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna,  
Jamrógiwicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gotuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

“Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?” *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przygotowaniu próbek oraz pomocy w interpretacji wyników spektrometrii w podczerwieni (FTIR i NIR) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, dla samych nanocząstek oraz mieszanin nanocząstek z lekiem, a także wykonaniu testów MTT z użyciem linii komórkowych MDA-MB-231 oraz SKBR3 oraz pomocy w analizie wyników i ich interpretacji. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

*Patrycja Beldzińska*

Gdańsk, 30.05.2025

**dr hab. Jacek Piosik, prof. UG**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Bętdzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

sprawowaniu opieki merytorycznej i metodologicznej oraz wsparciu w interpretacji wyników i dyskusji naukowej. Jednocześnie podkreślam, iż mgr Patrycja Bętdzińska pełniła wiodącą rolę w powstanie powyższego manuskryptu.



Signed by /  
Podpisano przez:

Jacek Gabriel Piosik  
Uniwersytet Gdański

Date / Data: 2025-  
06-03 09:31

Gdańsk, 16.06.2025

**prof. dr hab. Rafał Sądej**

Zakład Enzymologii i Onkologii Molekularnej  
Instytut Biotechnologii Medycznej  
i Onkologii Doświadczalnej GUMed.  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

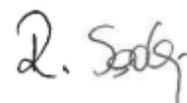
### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna,  
Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na: udostępnieniu zasobów oraz sprawowaniu nadzoru nad badaniami cytotoksyczności przeprowadzonymi z wykorzystaniem testu MTT na liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz SKBR-3.



Gdańsk, 28.05.2025

**dr hab. n. farm. Marzena Jamrógiewicz**  
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Bęldzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gołubiński Grzegorz, Sądej Rafał, Płosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/j.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

mój udział polegał na: badaniu tożsamości składników próbek oraz interpretacji występujących interakcji z nanocząstkami metodą spektroskopii w podczerwieni i bliskiej podczerwieni, a także dobraniu warunków analiz DSC próbek cisplatyny objętej pracą, wykonaniu analiz oraz interpretacji tej części wyników we współpracy z Panią mgr Patrycją Bęldzińską i najbliższym zespołem Pana prof. Jacka Płosika



Gdańsk, 28.05.2025

**dr hab. Dariusz Wyrzykowski, prof. UG**  
Pracownia Biologicznej Chemii Nieorganicznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi: 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał wyłącznie na technicznej obsłudze izotermicznego kalorymetru miareczkowego (ITC) zgodnie z parametrami podanymi przez Panią mgr Patrycję Beldzińską. Powyższej pracy nie wykorzystałem i nie zamierzam wykorzystać w postępowaniu o nadanie jakiegokolwiek stopnia naukowego lub zawodowego.

KIEROWNIK  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej

*Dariusz Wyrzykowski*  
dr hab. Dariusz Wyrzykowski  
profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk, 28.05.2025

**dr Katarzyna Bury**  
Zakład Biologii Molekularnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamróglewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gotuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

Opracowaniu i optymalizacji procedury przygotowania próbek do analizy z wykorzystaniem Mikroskopii Sił Atomowych (AFM), przeprowadzeniu obrazowania cząsteczek z wykorzystaniem techniki AFM oraz pomiarach uzyskanych danych.



Gdańsk, 02.06.2025

**dr Grzegorz Gołuński**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

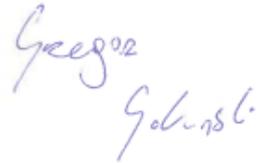
Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

wspieraniu w opracowywaniu metodologii i interpretacji wyników oraz redagowaniu manuskryptu.

Handwritten signature in blue ink, reading "Grzegorz Gołuński".

Gdańsk, 02.06.2025

**mgr Marcin Zakrzewski**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Galikowska-Bogut Barbara, Zakrzewski Marcin, Bury Katarzyna, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Gotuński Grzegorz, Sądej Rafał, Piosik Jacek.

"Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity?" *Chemico-Biological Interactions* 2025, 407: 111365. (doi. 10.1016/J.CBI.2024.111365)

mój udział polegał na:

wspierciu w analizie mutagenności testem Ames oraz redagowaniu manuskryptu.

*Marcin Zakrzewski*

## **9.2. Publikacja nr 2**



## Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity

Patrycja Bełdzińska<sup>a,b</sup>, Marcin Zakrzewski<sup>a</sup>, Inez Mruk<sup>a,\*</sup>, Marceł Bogusławski<sup>a</sup>, Natalia Derewońko<sup>b</sup>, Katarzyna Bury<sup>c</sup>, Dariusz Wyrzykowski<sup>d</sup>, Grzegorz Gołuński<sup>a</sup>, Michał Rychłowski<sup>e</sup>, Jacek Piosik<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biophysics, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>b</sup> Laboratory of Recombinant Vaccines, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>c</sup> Laboratory of Molecular Biology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>d</sup> Department of General and Inorganic Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>e</sup> Laboratory of Virus Molecular Biology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Platinum nanoparticles  
Doxorubicin  
Direct interactions  
Aggregation  
Mutagenicity  
Cytotoxicity

### ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death worldwide, with nearly 10 million fatalities yearly. Consequently, despite the search for new therapeutic approaches, the use of classical chemotherapy, remains one of the main treatment regimens. Therefore, we evaluate the use of platinum nanoparticles (PtNPs) of different sizes as potential modulators of doxorubicin (DOX) activity.

In the presented research, we utilized a wide range of methods, including Spectroscopic measurements, Isothermal Titration Calorimetry, Dynamic Light Scattering, and Atomic Force Microscopy, as well as biological assays such as the Ames mutagenicity test on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 and the alamarBlue cytotoxicity assay with Fluorescent Confocal Microscopy on non-cancerous HaCaT and cancerous MeLuSo cell lines, to investigate the interactions between PtNPs and DOX and the effect of diverse-sized nanoparticles on DOX activity.

The obtained results indicate the presence of direct interactions, particularly highlighting differences related to particles size. We confirmed that DOX affects the aggregation of nanoparticles, while the nanoparticles induce DOX fluorescence quenching. In terms of biological aspects, PtNPs reduced the mutagenicity of DOX, and increased the survival of non-cancerous HaCaT cells. Furthermore, 70 nm PtNPs significantly increased DOX effects on cancerous MeLuSo cells by negatively affecting their morphology and culture density.

To conclude, our research provided valuable insights into the interactions between PtNPs and DOX with particular emphasis on the nanoparticles' size influence highlighting nanoparticles' impact on DOX cytotoxicity providing a base for further research on the potential future modification in treatment approaches.

### 1. Introduction

According to the WHO, in 2022, there were approximately 20 million new cancer cases, and 9.7 million cancer related deaths (Global cancer burden growing, amidst mounting need for services, n.d.). Despite the ongoing search for new therapies, chemotherapy still remains a major component in the treatment of cancer, particularly in the advanced stages of malignancies (Anand et al., 2022). Unfortunately, classical

chemotherapy, despite its effectiveness, is associated with a range of side effects that significantly worsen the patient's life quality (Anand et al., 2022). Therefore, it is essential to explore strategies that enhance the efficacy of this type of treatment while minimizing adverse effects and the emergence of drug resistance (Rivankar, 2014).

Recently, nanotechnology has advanced in various fields of medicine including drug delivery, diagnostics, imaging and even direct diseases treatment (Czubacka and Czerczak, 2019; Kutwin et al., 2016; Porcel

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [patrycja.beldzinska@phdstud.ug.edu.pl](mailto:patrycja.beldzinska@phdstud.ug.edu.pl) (P. Bełdzińska), [marcin.zakrzewski@phdstud.ug.edu.pl](mailto:marcin.zakrzewski@phdstud.ug.edu.pl) (M. Zakrzewski), [inez.mruk@phdstud.ug.edu.pl](mailto:inez.mruk@phdstud.ug.edu.pl) (I. Mruk), [m.boguslawski.414@studms.ug.edu.pl](mailto:m.boguslawski.414@studms.ug.edu.pl) (M. Bogusławski), [natalia.derewonko@ug.edu.pl](mailto:natalia.derewonko@ug.edu.pl) (N. Derewońko), [katarzyna.bury@biotech.ug.edu.pl](mailto:katarzyna.bury@biotech.ug.edu.pl) (K. Bury), [dariusz.wyrzykowski@ug.edu.pl](mailto:dariusz.wyrzykowski@ug.edu.pl) (D. Wyrzykowski), [grzegorz.golunski@ug.edu.pl](mailto:grzegorz.golunski@ug.edu.pl) (G. Gołuński), [michal.rychlowski@biotech.ug.edu.pl](mailto:michal.rychlowski@biotech.ug.edu.pl) (M. Rychłowski), [jacek.piosik@ug.edu.pl](mailto:jacek.piosik@ug.edu.pl) (J. Piosik).

<sup>#</sup> Current: Laboratory of Mass Spectrometry, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107094>

Received 3 February 2025; Received in revised form 26 March 2025; Accepted 3 April 2025

Available online 3 April 2025

0928-0987/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

et al., 2010; Shi et al., 2010; Wang et al., 2017; Yezhelyev et al., 2006). In the latter, the usage of nanotechnology, including metallic nanoparticles, offers many advantages, such as the enhancement of drug bioavailability, prolonging drug half-life, targeted release at tumor sites, and the subsequent protection of healthy tissues (Liu et al., 2024; Shi et al., 2010). What is more, there are reports indicating that nanoparticles may assist in overcoming multidrug resistance, thus enhancing therapeutic outcomes (Kankala et al., 2020; Yoo et al., 2024; Zhi et al., 2023). Building on these findings we decided to evaluate the influence of the nanoparticles size on their potential applications in the field. In our research, we utilized platinum nanoparticles (PtNPs) as the agents characterized by small size, large surface, or catalytic applications (Czubačka and Czerzak, 2019; Jeyaraj et al., 2019). PtNPs arouse much interest due to their broad antibacterial, antioxidant, and anticancer properties (Jeyaraj et al., 2019). Moreover, PtNPs can induce oxidative stress which triggers the reactive oxygen species (ROS) generation and in consequence DNA damage (Faderin et al., 2025; Gurunathan et al., 2020; Shiny et al., 2016).

Doxorubicin (DOX), an anthracycline discovered in 1969 and isolated from *Streptomyces peucetius*, is widely used in therapies for various malignancies such as breast, lung, ovaries cancers but also leukemia or Hodgkin's lymphoma (Kciuk et al., 2023; Linders et al., 2024; Rivankar, 2014). The mode of DOX action is diverse and includes the formation of DOX - DNA adducts and DNA intercalation, topoisomerase trapping, and ROS generation (Gajewski et al., 2007; Kciuk et al., 2023; Mizutani et al., 2005). Unfortunately, the use of DOX is also associated with several drawbacks, among which the most significant are major side effects which primarily include cardiotoxicity but also nephrotoxicity and damage to other organs (Al-malky et al., 2019; Linders et al., 2024; Rivankar, 2014). Another issue related to doxorubicin treatment is the development of drug resistance, associated with enhanced drug efflux, alteration of topoisomerase II activity, or antioxidant defense which significantly limits the therapy's effectiveness (Al-malky et al., 2019; Cox and Weinman, 2016). Despite the undeniable disadvantages, DOX remains in use as an extremely effective drug with significant therapeutic potential (Al-malky et al., 2019; Kciuk et al., 2023; Linders et al., 2024).

Therefore, we focus on the investigation whether the interactions between PtNPs and DOX can influence the biological activity of the drug. Additionally, we concentrate closely on the potential differences arising from the sizes of nanoparticles. We employ a wide range of methods, both physicochemical and biological, with particular emphasis on comparing effects in healthy and cancerous cells. Obtained results constitute important and valuable knowledge regarding the interactions between nanoparticles and the drug, as well as the potential application of nanoparticles in cancer therapy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Doxorubicin hydrochloride (DOX) was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA, 98–102 % HPLC purity). Stock solution was prepared by dissolving DOX in distilled water and its concentration was determined spectrometrically. Platinum nanoparticles (PtNPs), in concentration 0.05 mg/mL (NanoXact) for physicochemical methods and in concentration 1 mg/mL (BioPure) for biological assays were suspended in 2 mM trisodium citrate dihydrate (5 nm, 30 nm, 50 nm) and in 4 mM trisodium citrate dihydrate (70 nm), were acquired from nanoComposix (San Diego, California, USA, 99.99 % purity). Cysteamine hydrochloride used in AFM imaging was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 strain was purchased from Xenometrics AG (Allschwil, Switzerland). Nutrient Agar, Nutrient Broth and Biological Agar media were purchased from BioMaxima S.A. (Gdansk, Poland). Histidine, biotin, and ampicillin used in Ames mutagenicity test were acquired from Sigma Aldrich Chemical Company

(St. Louis, Missouri, USA). Human keratinocyte cell line (HaCaT) and the human melanoma cell line (MelJuSo) were obtained from the Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute (Stockholm, Sweden) and the Department of Medicinal Microbiology, Leiden University Medical Center (Leiden, The Netherlands), respectively. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, and 10 % fetal bovine serum (FBS), 4 mM L-glutamine, glucose, antibiotic-antimycotic solution, HEPES, and sodium pyruvate were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

### 2.2. Spectroscopic measurements

#### 2.2.1. UV-Vis spectroscopy

All measurements were conducted at the 300 to 800 nm wavelength range, with 0.5 nm intervals, in quartz cuvettes (1 cm light path), at a temperature of  $25 \pm 0.1$  °C. The measurements were performed in trisodium citrate dihydrate, at concentrations of 2 mM for 5, 30 and 50 nm PtNPs and 4 mM for 70 nm PtNPs, using a Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Germany) spectrophotometer with a Peltier thermostat. DOX initial concentration 40.91  $\mu$ M; PtNPs concentration range 0.24 – 13.41  $\mu$ g/mL. Data is visualized in the form of a molar extinction coefficient.

#### 2.2.2. Fluorescence spectroscopy

All measurements were conducted at the 400 to 800 nm wavelength range, with an excitation wavelength of 480 nm, in quartz cuvettes at a temperature of  $25 \pm 0.1$  °C. The measurements were performed in trisodium citrate dihydrate, at concentrations of 2 mM for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs and 4 mM for 70 nm PtNPs, using a Jasco FP-8500 (Jasco, Easton, Maryland, USA) spectrofluorometer with a Peltier thermostat. DOX (initial concentration 40.01  $\mu$ M) was titrated with PtNPs in the concentration range 0.24 – 10.62  $\mu$ g/mL or trisodium citrate dihydrate to investigate the dilution effect.

### 2.3. Isothermal titration calorimetry (ITC)

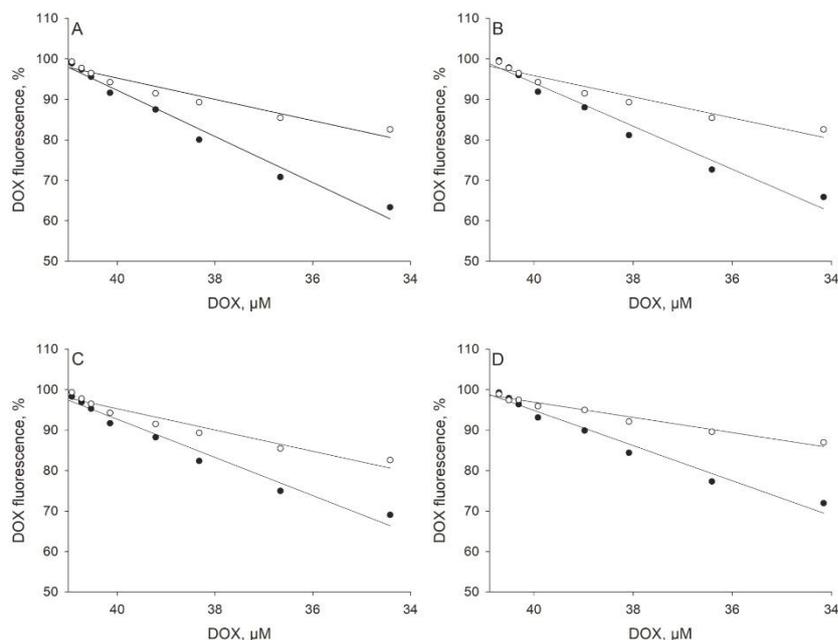
The ITC measurements were performed in 2 mM (for 5 nm, 30 nm, 50 nm PtNPs) and 4 mM (for 70 nm PtNPs) trisodium citrate dihydrate solution at 25 °C using AutoITC isothermal titration calorimeter (MicroCal Inc. GE Healthcare, Northampton, USA). The volumes of the sample and reference cells were 1.4491 mL. The experiment consisted of multiple injections of 10.02  $\mu$ L (15 injections, 2  $\mu$ L for the first injection only) of DOX solution (concentration range 2.48 – 29.87  $\mu$ M) into the sample cell containing PtNPs (initial concentration 0.05 mg/mL). Background titrations were performed by injecting DOX into trisodium citrate dihydrate solution and trisodium citrate dihydrate solution into PtNPs. The results of the background titrations were subtracted from each experimental result to account for the heat of dilution. Each injection lasted 20 s. To reach a homogenous mixing in the sample cell, the stirrer speed was kept constant at 300 rpm.

### 2.4. Dynamic light scattering (DLS)

The examination of the hydrodynamic diameters for PtNPs alone and PtNPs with DOX (PtNPs initial concentration 2.38  $\mu$ g/mL; DOX concentration 40.91  $\mu$ M) were performed on Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, UK) by measuring the intensity of the scattered light. Measurements were conducted in polystyrene cuvettes at 25 °C with a He-Ne laser (633 nm, 4 mW), at a 173° scattering angle in trisodium citrate dihydrate, 2 mM for 5 nm, 30 nm, and 50 nm PtNPs and 4 mM for 70 nm PtNPs.

### 2.5. Atomic force microscopy (AFM)

Atomic force microscopy visualization of the PtNPs nanoparticles and PtNPs-DOX mixtures was performed at 23 °C in air, in PeakForce



**Fig. 1.** Fluorescence of doxorubicin (DOX) titrated with platinum nanoparticles (PtNPs), measured at 593 nm. (A) DOX titrated with 5 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.998$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.969$ ). (B) DOX titrated with 30 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.997$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.969$ ). (C) DOX titrated with 50 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.994$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.968$ ). (D) DOX titrated with 70 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.996$ ) and 4 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.980$ ). DOX initial concentration 40.91  $\mu\text{M}$ , PtNPs concentration range 0.24 – 10.62  $\mu\text{g/mL}$ . Results are reported as the percentage of the control fluorescence (DOX alone, 40.91  $\mu\text{M}$ ).

Tapping mode, using BioScope Resolve AFM (Bruker, Bremen, Germany). PtNPs-DOX mixtures were obtained via the reaction of 0.05 mg/mL PtNPs with 81.9  $\mu\text{M}$  DOX at room temperature. Subsequently, 100 mM cysteamine was deposited onto a freshly cleaned mica surface for 5 min and afterwards the solution was aspirated. Then samples were added on mica and incubated for 5 min at room temperature, followed by washing with deionized water and drying with streams of nitrogen gas prior to AFM imaging. The ScanAsyst-Fluid+ probe (Bruker) was used for PtNPs and PtNPs-DOX mixtures imaging (resonant frequency  $f_0 = 150$  kHz; spring constant  $k = 0.7$  N/m). Images were registered at  $512 \times 512$  pixels with a PeakForce Tapping frequency of 1 kHz and amplitude of 150 nm. A height sensor signal was used to display the image using NanoScope Analysis v1.9.

## 2.6. Ames mutagenicity test

The Ames mutagenicity test was performed with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98, in accordance with the procedure described by Wozniowiczka et al. (Wozniowiczka et al., 2011). A mixture containing 100  $\mu\text{L}$  of the overnight bacteria culture, 50  $\mu\text{L}$  of 3 % NaCl, and 100  $\mu\text{L}$  of the tested solution (or sterile distilled water as a negative control) was incubated for 4 h in darkness at 37  $^\circ\text{C}$  and 220 rpm. Afterwards, the mixture was centrifuged at 11,840 g, the bacterial pellet was washed with 0.75 % NaCl, and resuspended in 300  $\mu\text{L}$  of 0.75 % NaCl solution containing 0.1  $\mu\text{M}$  histidine and 0.1  $\mu\text{M}$  biotin. The bacterial suspension was spread on a glucose minimal agar plate and incubated at 37  $^\circ\text{C}$  in darkness. After 48 h incubation, the number of

revertant colonies was calculated. All experiments were performed in triplicate. The optimal concentration of DOX (100 ng/plate) was selected after testing DOX mutagenic activity in a broad concentration range.

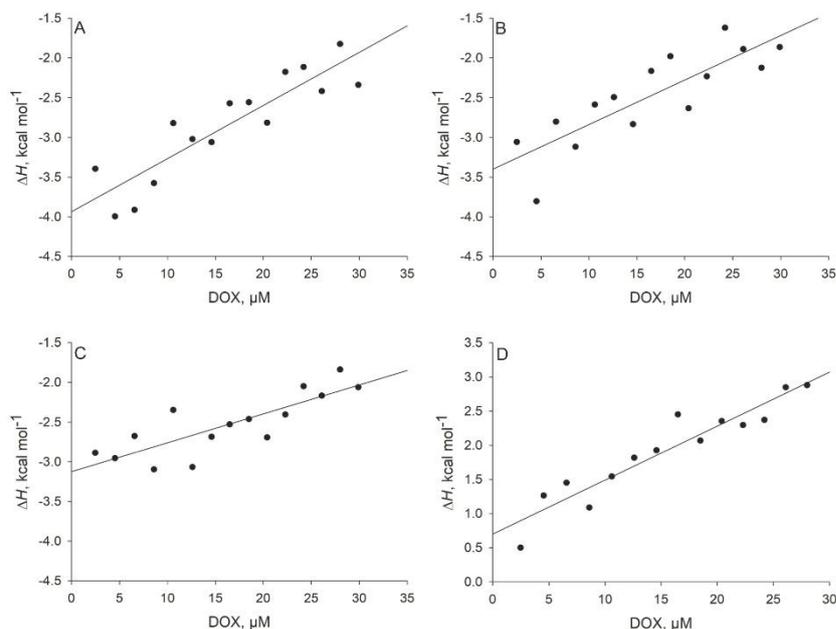
## 2.7. Cytotoxicity and imaging

### 2.7.1. Cell culture

The HaCaT cell line was cultivated in DMEM containing 4500 mg/L glucose, supplemented with 10 % fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  amphotericin B. The MelJuSo cell line was cultured in RPMI 1640 Medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  amphotericin B. Both cell lines were maintained in a humidified atmosphere containing 5 %  $\text{CO}_2$  at 37  $^\circ\text{C}$ .

### 2.7.2. Cytotoxicity assay

HaCaT and MelJuSo cells were seeded on a 96-well plate ( $\sim 2 \times 10^4$ /well) and incubated in humidified atmosphere containing 5 %  $\text{CO}_2$  at 37  $^\circ\text{C}$ , overnight. Next, cells were washed three times in media devoid of FBS. Then, PtNPs or PtNPs with DOX in different dilutions were added to cell cultures (90  $\mu\text{L}$ /well) in three replicates and incubated for 24 h. After 20 h of incubation, 10  $\mu\text{L}$  of alamarBlue (BioRad) was added to cells on each well and incubated for the next 4 h, in humidified atmosphere containing 5 %  $\text{CO}_2$ , at 37  $^\circ\text{C}$ . The absorbance was measured at 570 nm and 600 nm. Percentage of the alamarBlue reduction was



**Fig. 2.** Platinum nanoparticles (PtNPs) – doxorubicin (DOX) interactions determined by enthalpy change ( $\Delta H$ ) values. (A)  $\Delta H$  of 5 nm PtNPs-DOX interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $-3.935 \pm 0.17$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected doxorubicin. (B)  $\Delta H$  of 30 nm PtNPs-DOX interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $-3.399 \pm 0.18$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected doxorubicin. (C)  $\Delta H$  of 50 nm PtNPs-DOX interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $-3.124 \pm 0.13$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected doxorubicin. (D)  $\Delta H$  of 70 nm PtNPs-DOX interactions, calculated by the linear regression of experimental points tending to zero, is equal to  $0.877 \pm 0.21$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected doxorubicin. DOX concentration range: 2.48 – 29.87  $\mu$ M.

calculated as a difference between treated and control cells, according to the protocol provided by the manufacturer.

### 2.7.3. Fluorescent confocal microscopy

HaCaT as well as MeJUSo cells were seeded on cover slips inserted to 12-well plates ( $\sim 10^5$ /well) and grown overnight. Afterwards, cells were washed three times with DMEM or RPMI medium devoid of FBS. Then, cells were incubated for 24 h with DOX (20  $\mu$ M), 70 nm PtNPs, or the mixture of DOX and PtNPs diluted in the FBS-free medium at 37 °C, in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. Doxorubicin intracellular localization and intensity of fluorescence was analyzed in confocal microscopy using Leica SP8X confocal laser scanning microscope system (Leica, Wetzlar, Germany), at Ex/Em = 488/549–604 nm. The morphology of cells treated with PtNPs, or PtNPs with DOX were analyzed in a bright field using the same microscope system.

### 2.8. Statistical analysis

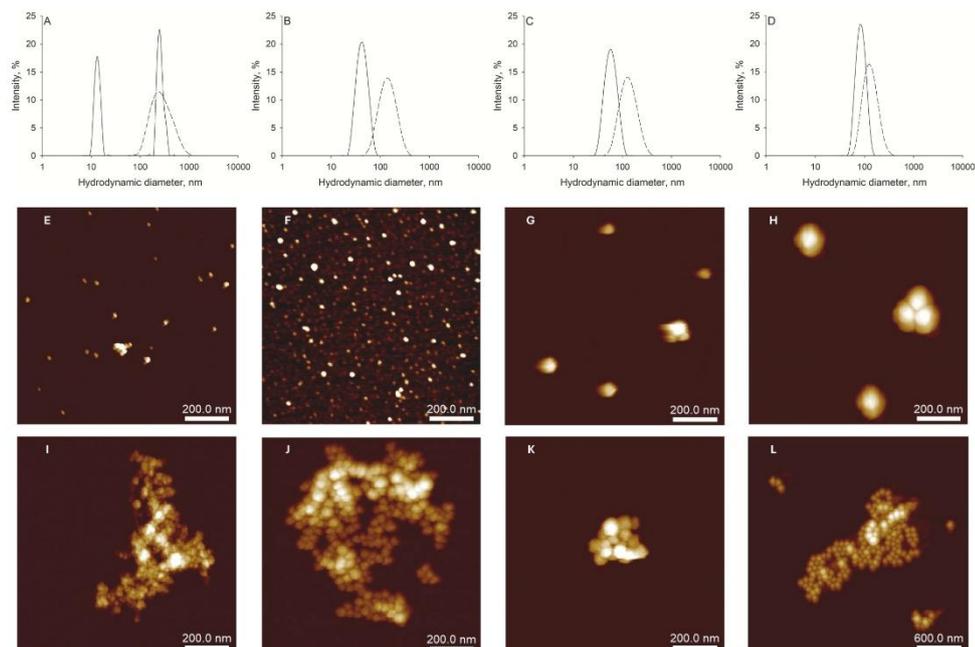
Statistical analysis was conducted using Statistica 14.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, California, USA) software. For the Ames mutagenicity test, one-way variance analysis (ANOVA) followed by the post-hoc RIR Tukey's test was applied. For the cytotoxicity assay U-Mann Whitney test was used. The significance level for all the analyses was established at  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Interactions identification

Firstly, we investigated the fluorescence of doxorubicin (DOX) titrated with increasing concentrations of platinum nanoparticles (PtNPs) in four sizes. Obtained data allowed us to both reveal the possible interactions between PtNPs and DOX and assess the influence of the nanoparticles' size on the potential aggregates formation. The PtNPs addition decreased DOX fluorescence (registered at 593 nm) to 63 % for 5 nm PtNPs, 66 % for 30 nm PtNPs, 69 % for 50 nm PtNPs, and 72 % for 70 nm PtNPs (Fig. 1). Moreover, to avoid the error caused by DOX dilution, we performed control measurements with 2 mM sodium citrate (controls for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs) and 4 mM sodium citrate (control for 70 nm PtNPs) where we observed that the dilution effects were substantially smaller (83 % with 2 mM sodium citrate and 87 % with 4 mM sodium citrate) than the effects caused by nanoparticles addition (Fig. 1) (the recorded fluorescence spectra - Supplementary material, Figure S1). On this basis, further supported and verified quantitatively by spectrophotometric analysis (see Supplementary material, Figure S2), we can confirm the presence of DOX - PtNPs interactions as well as differences in these interactions attributed to changes in PtNPs size.

In the next step, we decided to investigate the thermal effects of the observed interactions using Isothermal Titration Calorimetry analysis. The enthalpy change ( $\Delta H$ ) values obtained for PtNPs-DOX interactions were equal to  $-3.935 \pm 0.17$  ( $\pm$  SE) kcal/mol for 5 nm PtNPs,  $-3.399 \pm$



**Fig. 3.** Aggregation analysis of platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes with doxorubicin (DOX). (A) Hydrodynamic diameters of 5 nm PtNPs (solid line) and 5 nm PtNPs – DOX mixtures (dashed line). (B) Hydrodynamic diameters of 30 nm PtNPs (solid line) and 30 nm PtNPs – DOX mixtures (dashed line). (C) Hydrodynamic diameters of 50 nm PtNPs (solid line) and 50 nm PtNPs – DOX mixtures (dashed line). (D) Hydrodynamic diameters of 70 nm PtNPs (solid line) and 70 nm PtNPs – DOX mixtures (dashed line). DOX concentration 40.91  $\mu\text{M}$ ; PtNPs initial concentration 2.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Results are reported as the average hydrodynamic diameter. (E) AFM image of 5 nm PtNPs alone. (F) AFM image of 30 nm PtNPs alone. (G) AFM image of 50 nm PtNPs alone. (H) AFM image of 70 nm PtNPs alone. (I) AFM image of 5 nm PtNPs with DOX. (J) AFM image of 30 nm PtNPs with DOX. (K) AFM image of 50 nm PtNPs with DOX. (L) AFM image of 70 nm PtNPs with DOX. DOX concentration 81.9  $\mu\text{M}$ , PtNPs concentration 0.05  $\text{mg}/\text{mL}$ .

**Table 1**

Hydrodynamic diameters and polydispersity indices (PDI) for platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes and PtNPs – doxorubicin (DOX) mixtures. DOX concentration 40.91  $\mu\text{M}$ , PtNPs initial concentration 2.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

	PtNPs		PtNPs + DOX	
	Average diameter, nm	Average PDI	Average diameter, nm	Average PDI
5 nm PtNPs	12.9	0.70	341.6	0.20
30 nm PtNPs	262.7	0.06	129.2	0.12
50 nm PtNPs	36.4	0.06	119.6	0.12
70 nm PtNPs	49.0	0.02	120.0	0.09

0.18 ( $\pm$  SE) kcal/mol for 30 nm PtNPs,  $-3.124 \pm 0.13$  ( $\pm$  SE) kcal/mol for 50 nm PtNPs, and  $0.877 \pm 0.21$  ( $\pm$  SE) kcal/mol for 70 nm PtNPs (Fig. 2) (the recorded thermograms - Supplementary material, Figure S3).

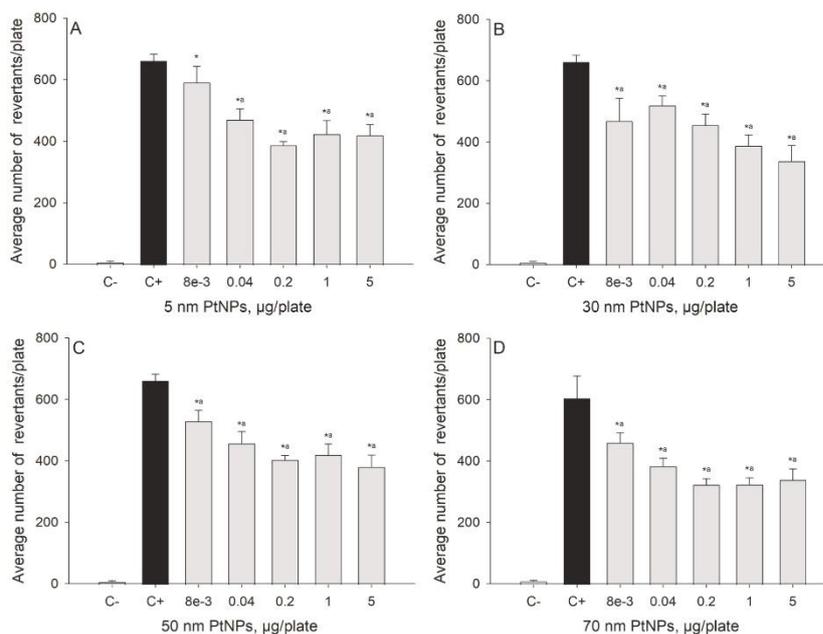
### 3.2. Aggregation analysis

To determine the possible nanoparticles' aggregation pattern before

and after the addition of DOX, Dynamic Light Scattering analysis was performed. It is important to note that 5 nm PtNPs alone showed two different peaks - 12.9 nm and 262.7 nm with polydispersity index (PDI) equal to 0.70 (Fig. 3A, Table 1). However, the addition of DOX changed the hydrodynamic diameter to 341.6 nm and PDI to 0.20 (Fig. 3A, Table 1). The increase in the diameter after adding DOX was observed for all the remaining PtNPs' sizes (Fig. 3). Analogously, Atomic Force Microscopy images confirmed the occurrence of aggregation of all the PtNPs' dimensions with DOX. The average nanoparticles' population size was  $13.4 \pm 4.7$  for 5 nm PtNPs,  $29.3 \pm 4.7$  for 30 nm PtNPs,  $57.4 \pm 10.3$  for 50 nm PtNPs and  $136.8 \pm 9.9$  for 70 nm PtNPs (Fig. 3). The addition of DOX to PtNPs samples influenced the nanoparticles' aggregation independently of the nanoparticles' size. The observed aggregates average sizes were  $619.0 \pm 69.2$  for 5 nm PtNPs,  $884.2 \pm 322$  for 30 nm PtNPs,  $295.2 \pm 37.0$  for 50 nm PtNPs, and  $1240 \pm 440.8$  for 70 nm PtNPs (Fig. 3).

### 3.3. Mutagenic activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98

Subsequently, we conducted Ames mutagenicity tests on *Salmonella enterica* to investigate the possible nanoparticles' influence on DOX mutagenicity. The addition of PtNPs, in all tested sizes, resulted in a significant decrease in the number of revertant colonies compared with the positive control with DOX, with the effect being dependent on the



**Fig. 4.** Platinum nanoparticles (PtNPs) influence doxorubicin (DOX) mutagenic activity towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98. (A) Mutagenicity of DOX and 5 nm PtNPs – DOX mixtures. (B) Mutagenicity of DOX and 30 nm PtNPs – DOX mixtures. (C) Mutagenicity of DOX and 50 nm PtNPs – DOX mixtures. (D) Mutagenicity of DOX and 70 nm PtNPs – DOX mixtures. C- negative control (sterile, distilled water; white color), C+ positive control (DOX 100 ng/plate; black color), PtNPs - DOX mixtures (PtNPs concentration range: 0.008 - 5 µg/plate, DOX 100 ng/plate; grey color). Results are reported as the average number of revertants ± SD. \* significant difference from the negative control ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ); # significant difference from the positive control ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

increasing PtNPs concentrations (Fig. 4). What is important, PtNPs alone, in all the analyzed concentrations (0.008 – 5 µg/plate) revealed no mutagenic activity in the tested bacteria strain (data not shown).

### 3.4. Cytotoxic effects in non-cancerous and cancerous cell lines

Finally, we analyzed PtNPs and their effects on DOX activity in the eucaryotic model. First, we examined the cytotoxicity of all PtNPs sizes in non-cancerous HaCaT and cancerous MelJuSo cell cultures. As we could observe, in HaCaT cells 5 nm and 30 nm PtNPs slightly increased the cell viability, while 50 nm and 70 nm PtNPs did not alter the cell growth (Fig. 5). In MelJuSo cell culture, only 5 nm PtNPs (Fig. 5A) minimally reduced the cell survival from 103 % to 92 %. However, in all the tested nanoparticles' sizes a significant difference between the tested cell lines was observed. Interestingly, the effects of 70 nm PtNPs differed significantly from other sizes of PtNPs. Namely, in the case of the largest PtNPs, the survivability of the HaCaT cell line was higher than the MelJuSo cell line in all tested concentrations. In the case of 30 and 50 nm PtNPs, the effects were opposite, while the influence of 5 nm PtNPs varied depending on the concentration.

In the next step, we wanted to compare the effect of PtNPs – DOX interactions with the effect of DOX alone. In the non-cancerous HaCaT cell line, we observed that the % of alamarBlue reduction was increasing from 46 % for DOX alone to 55 % for 5 nm PtNPs, 58 % for 30 nm PtNPs, 57 % for 50 nm PtNPs, and 61 % for 70 nm PtNPs in the highest PtNPs concentrations (Fig. 6). In the cancerous MelJuSo cell line in the case of the smaller 5 nm and 30 nm PtNPs, % of the reduction was similar to the

control with DOX, but for larger nanoparticles it decreased from 84 % to 76 % and 58 % for 50 nm and 70 nm PtNPs, respectively (Fig. 6).

### 3.5. Cell morphology and doxorubicin accumulation in HaCaT and MelJuSo cell cultures

Based on cytotoxicity assay results we decided to investigate the cell morphology using Fluorescent Confocal Microscopy using 70 nm PtNPs, which brought the most promising effects. Different concentrations of 70 nm PtNPs to both HaCaT and MelJuSo cell cultures did not affect cell morphology in comparison to untreated control. The dark spots visible in 0.2 - 5 µg/well 70 nm PtNPs were aggregates formed by nanoparticles. When PtNPs were administered with DOX we observed a dramatic change in the morphology of MelJuSo cells and density of the culture. In cells treated with DOX + PtNPs at nanoparticles' concentrations of 1 µg/well, or 5 µg/well most of the cells were circular with approximately 1/3 of them showing visible signs of membrane blebbing. The intensity and cytoplasmic localization of DOX were the same for cells treated with DOX alone and in the mixture with PtNPs. On the contrary to MelJuSo, increasing the concentration of PtNPs mixed with DOX had a positive impact on both morphology and density of HaCaT cell culture in comparison to cells treated with DOX alone. Namely, the density of the cells treated with PtNPs-DOX mixture increased and the morphology of the cells in the sample remained physiological. Moreover, there were no signs of DOX induced apoptosis or necrosis, which were present in the sample treated with DOX alone. Moreover, the addition of DOX mixed with PtNPs in nanoparticles' concentration 5 µg/well resulted in

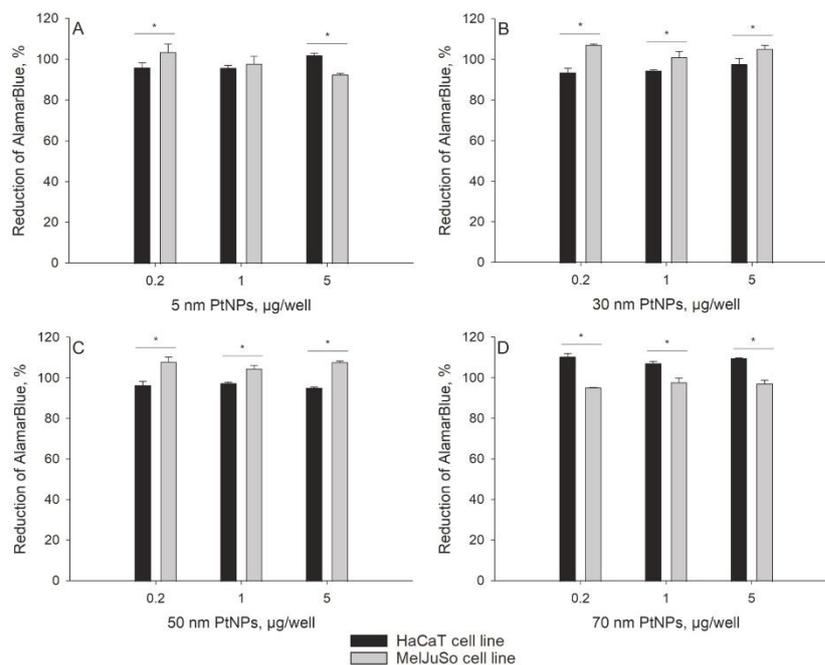


Fig. 5. Cytotoxic activity of platinum nanoparticles (PtNPs) in HaCaT and MeJuSo cell lines. (A) Cytotoxicity of 5 nm PtNPs. (B) Cytotoxicity 30 nm PtNPs. (C) Cytotoxicity of 50 nm PtNPs. (D) Cytotoxicity of 70 nm PtNPs. PtNPs concentration range: 0.2 - 5 µg/well, HaCaT cell line (black color), MeJuSo cell line (grey color). Results are reported as the percentage of AlamarBlue reduction in regard to untreated cells (negative control, 100 %) ± standard deviation.\* significant difference between both tested cell lines ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

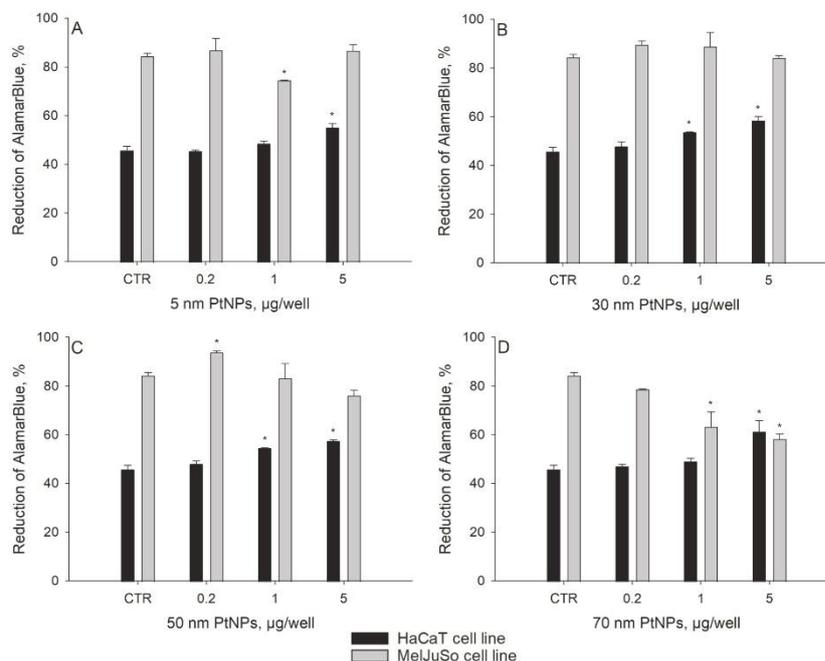
fluorescence quenching (Fig. 7).

#### 4. Discussion

Despite the undeniable development in cancer therapies, chemotherapy still remains one of the primary treatment method. However, despite its effectiveness, it is associated with numerous serious side effects, and treatment is often limited by drug resistance. In light of this, the search for new treatment solutions is crucial. The utilization of nanomaterials, such as metallic nanoparticles, may offer significant benefits. In the presented research, we characterized the direct interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and anticancer antibiotic doxorubicin (DOX) with a special focus on the differences arising from nanoparticles' sizes. Moreover, we emphasize the influence of PtNPs on DOX biological activity in both procaryotic and eukaryotic models.

In the first step, we focused on the interactions between nanoparticles and DOX. In fluorescence spectroscopy analysis, we observed fluorescence quenching with all the tested nanoparticles' sizes dependent on PtNPs concentration. The phenomenon of fluorescence quenching has been described for many metallic nanoparticles involves energy transfer as responsible for the process (Ghosh and Chattopadhyay, 2015; Pustovit and Shahbazyan, 2012). The effect of DOX fluorescence quenching was also observed by Nigam et al. (Nigam et al., 2011) for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles. Furthermore, in our previous research PtNPs decrease ICR-191 fluorescence (Borowik et al., 2019a). What is important, we observed differences due to nanoparticles' sizes -

the smaller PtNPs size, the more the DOX fluorescence decreased. Interestingly, in the case of silver nanoparticles with DOX, the differences arising from nanoparticles' size were negligible (Goluński et al., 2024). After the primary, qualitative confirmation of PtNPs - DOX interactions, we performed Isothermal Titration Calorimetry (ITC) analysis. The enthalpy change values ranged from approximately -3 to nearly -4 kcal/mol for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs, while for 70 nm PtNPs it was 0.88 kcal/mol. Considering ITC high sensitivity, such difference may arise from a different concentration of sodium citrate for the largest nanoparticles. Nevertheless, the thermodynamic analysis indicates the presence of direct interactions between nanoparticles and DOX. Literature reports present varying results, enthalpy change values around -3 kcal/mol have been recorded for silver nanoparticles with ICR-191 (Borowik et al., 2019b), while values oscillating around zero have been observed for fullerene C60 with doxorubicin (Prylutskyy et al., 2014). In the next steps, we performed Dynamic Light Scattering (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) to characterize the possible nanoparticles aggregation triggered by DOX. In all the tested sizes, the increase in hydrodynamic diameter was noticeable. It is worth noting that the suspension of 5 nm PtNPs alone is polydisperse (polydispersity index PDI 0.70), making it more challenging to draw conclusions based on them. However, for nanoparticles alone, we observed two peaks around 13 nm and 263 nm while after DOX addition the diameter changed to 342 nm and the PDI to 0.20, indicating aggregation combined with homogeneity increase caused by the addition of the drug. The reduction of PDI after DOX addition to 5 nm nanoparticles was also observed in our previous research with silver nanoparticles (Goluński



**Fig. 6.** Cytotoxic activity of platinum nanoparticles (PtNPs) with doxorubicin (DOX) in HaCaT and MeJuSo cell lines. (A) Cytotoxicity of DOX and 5 nm PtNPs – DOX mixtures. (B) Cytotoxicity of DOX and 30 nm PtNPs – DOX mixtures. (C) Cytotoxicity of DOX and 50 nm PtNPs – DOX mixtures. (D) Cytotoxicity of DOX and 70 nm PtNPs – DOX mixtures. CTR - control (DOX 20 µM), PtNPs - DOX mixtures (PtNPs concentration range: 0.2 - 5 µg/well, DOX 20 µM constantly), HaCaT cell line (black color), MeJuSo cell line (grey color). Results are reported as the mean percentage difference between treated cells and untreated control (negative control, 100 %) ± standard deviation. \* significant difference from the control with DOX for the given cell line ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

et al., 2024). Furthermore, for the other nanoparticles' sizes, from 30 to 70 nm, we observed that the smaller the nanoparticles, the greater the difference in diameter. AFM imaging results confirmed the aggregates formation triggered by DOX addition for all analyzed nanoparticles' sizes. However, the obtained aggregates were significantly larger than those observed using DLS. It is worth noting that the scale for 70 nm PtNPs with DOX (Fig. 3L) differs due to the greater size of the formed aggregate in comparison to the others. Importantly, the differences in specific values obtained in DLS and AFM analyses may arise from the conditions of both experiments: measurements in liquid and analysis of the dry sample. However, the results of both methods confirmed the aggregates formation, indicating the presence of interactions. Similar patterns were noted for silver nanoparticles with DOX (Gołuski et al., 2024) or PtNPs with ICR-191 (Borowik et al., 2019a).

All employed methods confirmed the presence of interactions, therefore, in the next stage, we decided to use a prokaryotic model *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 to investigate the effect of nanoparticles on DOX mutagenic activity. The results confirmed that PtNPs in all four tested sizes decrease the mutagenicity of DOX. Moreover, in all tested PtNPs concentrations the number of revertants was always lower than the positive control. According to the literature, a similar effect of PtNPs on ICR-191 (Borowik et al., 2019a) and cisplatin (Beldzińska et al., 2025) mutagenicity was observed. Importantly, PtNPs alone were non-mutagenic in the entire concentration range. Results of our physicochemical research indicate DOX-PtNPs aggregation induced by the addition of the drug. Observed dependency may have significant

influence on the DOX mutagenic activity. DOX molecules may be sequestered in the complexes with nanoparticles, which, in consequence, may reduce the DOX concentration in the free, mutagenic form. Similar phenomenon was observed for DOX and pentoxifylline where corresponding mechanism was proposed (Gołuski et al., 2016). In the next step, we decided to test the effect of nanoparticles on DOX activity in the eukaryotic model. To compare the impact of PtNPs on DOX cytotoxicity against healthy and cancerous cells, we have selected HaCaT - immortalized human keratinocytes, and MeJuSo - human melanoma cell lines. The results for nanoparticles alone indicated that 5 nm PtNPs have a slight effect on increasing cell viability (from 96 % to 102 %) in non-cancerous HaCaT cells and on decreasing cell viability (from 103 % to 92 %) in cancerous MeJuSo cell line. Moreover, 30 nm PtNPs also minimally supported the cell growth from 94 % to 98 % in the HaCaT cell line. In the remaining cases, PtNPs did not change the cells viability in both cell cultures. Furthermore, it is worth noting that the impact of the largest 70 nm PtNPs was distinct from the other nanoparticles' sizes, as the survival rate of non-cancerous cells was higher than that of cancerous cells in all the tested concentrations. For 30 nm and 50 nm PtNPs, the trend was reversed, particularly with the smallest 5 nm PNP where the effect was concentration-dependent. Similarly, Akhtar et al. showed that platinum-coated gold nanoparticles (Pt-Au NPs) indicated a higher quantity of nanoparticles was taken up by cancerous MCF-7 cells at half of the concentration needed to achieve the same toxicity level in non-cancerous HUVE cells (Akhtar et al., 2023). In the case of nanoparticles' influence on DOX cytotoxicity, it's worth noting that, in the

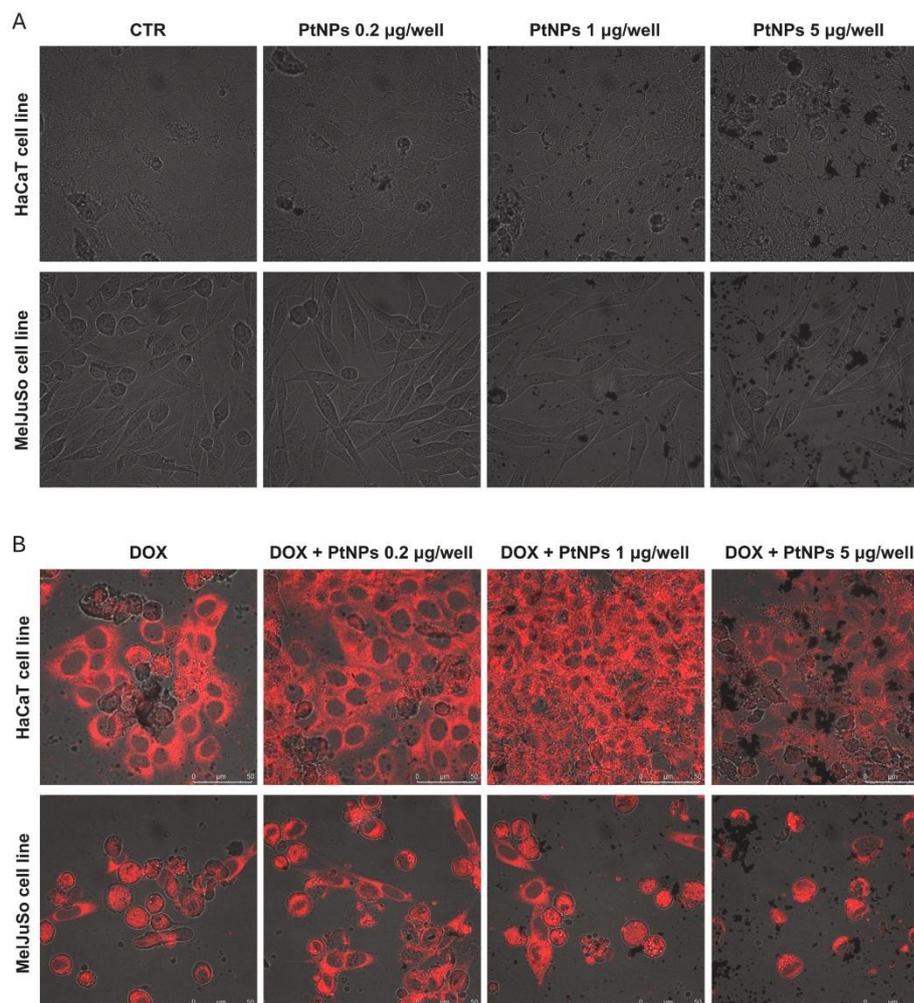


Fig. 7. Confocal microscopy images of 70 nm platinum nanoparticles (PtNPs) with doxorubicin (DOX) in HaCaT and MeJuSo cell lines. (A) Impact of 70 nm PtNPs on cell morphology. (B) Impact of 70 nm PtNPs on doxorubicin cytotoxic effects. DOX concentration 20 µM, PtNPs concentration range 0.2 – 5 µg/well.

non-cancerous HaCaT cell line the cell viability reduction by DOX is decreased by PtNPs in all sizes, and in cancerous MeJuSo cell line the viability reduction by DOX is stable for smaller 5 nm and 30 nm PtNPs, but it is enhanced for larger 50 nm and, especially, 70 nm PtNPs. The previous data published by Augustin et al. (Augustin et al., 2016) also showed a higher toxicity level for DOX conjugated with iron-oxide nanoparticles against the HT29 colon cancer cell line. Interestingly, these nanoparticles alone were non-cytotoxic, similar to PtNPs. Furthermore, our previous research revealed the additive cytotoxic effect of silver nanoparticles with DOX in the SKBR3 breast cancer cell line, with no significant influence of nanoparticles in MDA-MB-231

breast cancer cells (Gotuński et al., 2024). Based on the cytotoxicity results, we decided to perform microscopic imaging of the cell cultures for the most promising 70 nm PtNPs. Importantly, in the HaCaT cell line, increasing concentrations of 70 nm PtNPs mixed with DOX improved both the morphology and density of the cell culture compared to the control (DOX alone). Additionally, PtNPs in 5 µg/well concentration led to the DOX fluorescence quenching. In the MeJuSo cell line, we noted a significant change in the cell's morphology – the cells were rounded and a part of them showed signs of membrane blebbing, which may suggest apoptosis. Moreover, the density of the cell culture decreased in comparison to the control. The fluorescence intensity and localization within

the cytoplasm remained consistent. These findings are in conformity with research on the modulatory effects of pentoxifylline (PTX) on DOX, where PTX also significantly reduced DOX fluorescence in HaCaT cells (Gołusiński et al., 2016). Moreover, in other research, cells preincubation with PtNPs reduced ICR-191 fluorescence signal in non-cancerous cells, while it was maintained in the cancerous ones (Borowik et al., 2019a). All the results obtained by Fluorescent Confocal Microscopy were coherent with cytotoxicity assay, which showed the increase of metabolic activity of HaCaT cells observed with increasing concentration of PtNPs aggregating with DOX. At the same time, the metabolism of cancerous MeJuSo cells was dropping gradually with the increased concentration of PtNPs.

## 5. Conclusions

To sum up, our research provided new insights into the platinum nanoparticles (PtNPs) impact on doxorubicin (DOX) activity, with special attention to the differences arising from nanoparticles' sizes. The physicochemical methods revealed that DOX triggers PtNPs aggregation, and, in turn, PtNPs influence DOX fluorescence. Importantly, the intensity of both these effects is dependent on the PtNPs' size. Furthermore, the change in the enthalpy values, registered using the ITC method, demonstrated direct interactions between these agents. Moreover, the biological assays showed that PtNPs in all the tested sizes decreased DOX mutagenicity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98. Additionally, most of the nanoparticles' sizes are neutral for both non-cancerous HaCaT and cancerous MeJuSo cell lines. However, nanoparticles combined with DOX significantly increase the HaCaT cells viability in the highest nanoparticles' concentrations in comparison to the control with DOX alone. Moreover, 70 nm PtNPs with DOX significantly reduced MeJuSo cells viability, whereas the others nanoparticles' sizes effect remained negligible. The cell imaging showed that, whereas 70 nm nanoparticles had a positive effect on the non-cancerous cell culture, and triggered DOX fluorescence quenching in the highest tested concentration, in cancerous cells a dramatic change in morphology and density was observed. All these data suggest the significance of the nanoparticles' size on their interactions with other biological agents. What is more, promising results obtained for 70 nm PtNPs designate them as valuable candidates for further research on potential chemotherapy modulation.

## Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## CRediT authorship contribution statement

**Patrycja Beldzińska:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Investigation, Formal analysis. **Marcin Zakrzewski:** Writing – review & editing, Investigation. **Inez Mruk:** Writing – review & editing, Investigation. **Marceli Bogusławski:** Writing – review & editing, Investigation. **Natalia Derewońko:** Writing – review & editing, Investigation. **Katarzyna Bury:** Writing – review & editing, Investigation. **Dariusz Wyrzykowski:** Writing – review & editing, Investigation. **Grzegorz Gołusiński:** Writing – review & editing, Formal analysis. **Michał Rychtowski:** Writing – review & editing, Investigation. **Jacek Piosik:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejps.2025.107094.

## Data availability

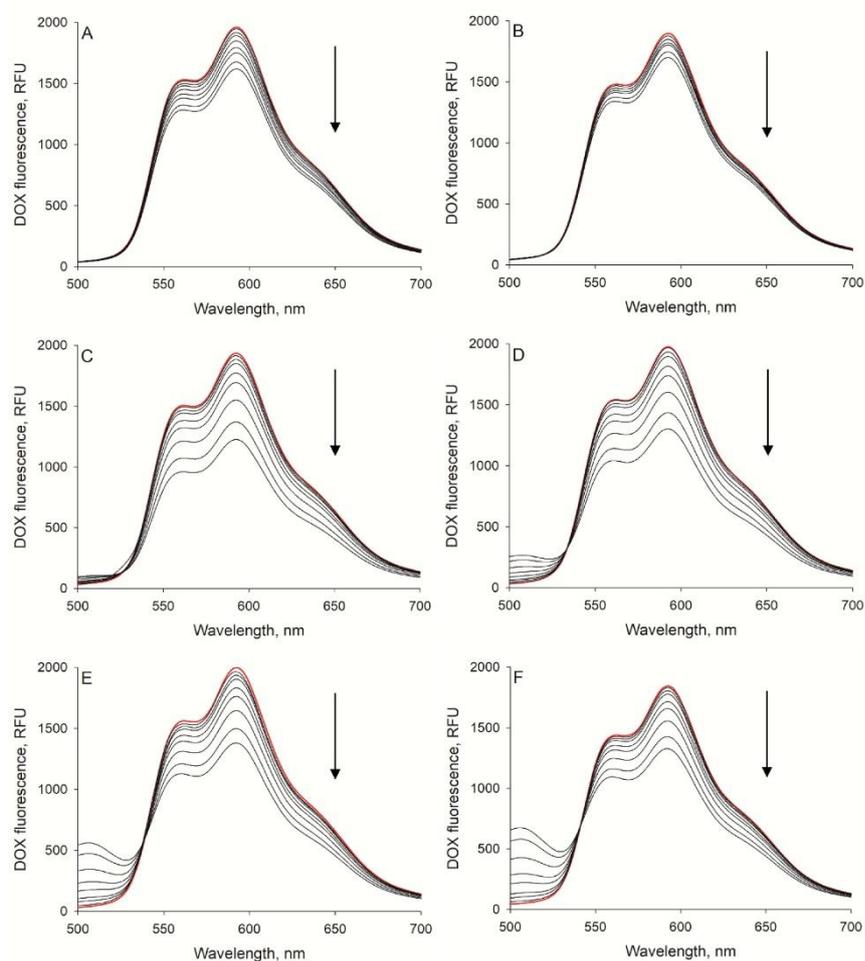
Data will be made available on request.

## References

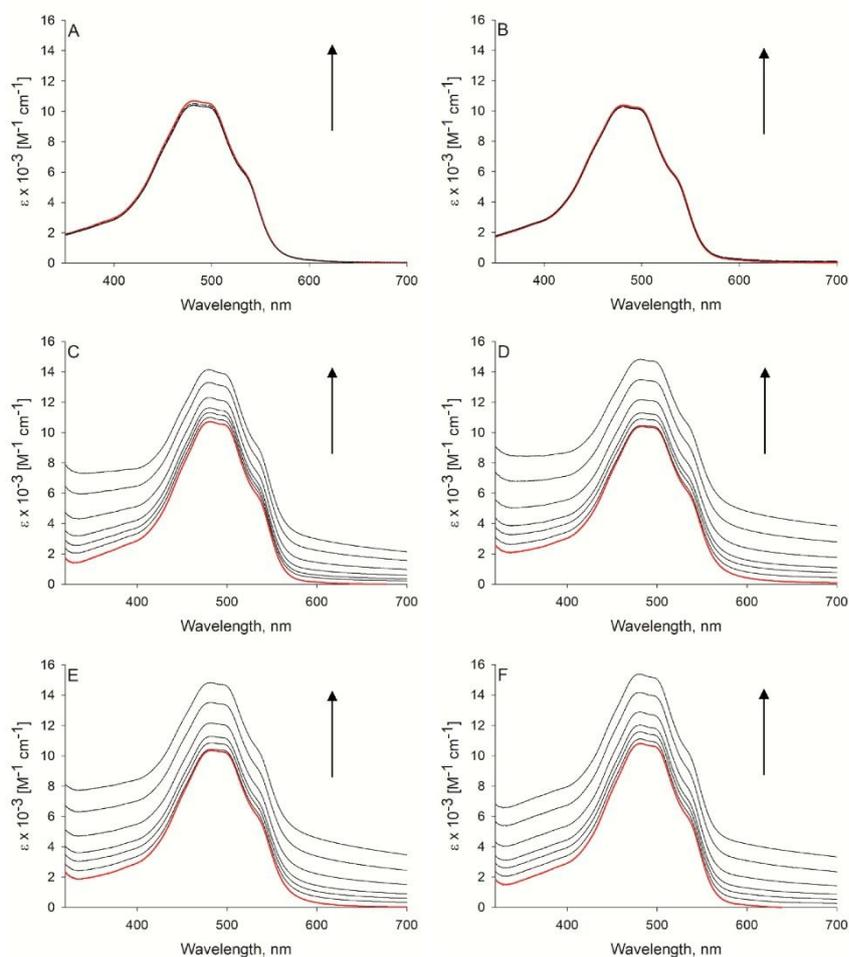
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Alhadlaq, H., 2023. A selective toxicity of Pt-coated Au nanoparticles in cancerous MCF-7 cells over non-cancerous HUVE cells. *J. King. Saud. Univ. Sci.* 35, 102583. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102583>.
- Al-malky, H.S., Al Harthi, S.E., Osman, A.M.M., 2019. Major obstacles to doxorubicin therapy: cardiotoxicity and drug resistance. <https://doi.org/10.1177/1078155219877931>.
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A.K.S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D.K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimala, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J.K., Dewanjies, S., Vallamkonda, J., Pérez de la, Lastra, 2022. Cancer chemotherapy and beyond: current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* 10, 1367. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>.
- Augustin, E., Czubek, B., Nowicka, A.M., Kowalczyk, A., Strojek, Z., Mazerska, Z., 2016. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* 33, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.009>.
- Beldzińska, P., Galikowska-Bogut, B., Zakrzewski, M., Bury, K., Jamrogiewicz, M., Wyrzykowski, D., Gołusiński, G., Sądaj, R., Piosik, J., 2025. Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity? *Chem. Biol. Interact.* 407, 111365. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2024.111365>.
- Borowik, A., Banasiuk, R., Derewońko, N., Rychtowski, M., Krychowiak-Masnicka, M., Wyrzykowski, D., Ziabka, M., Woźniowska, A., Krolicka, A., Piosik, J., 2019. Interactions of newly synthesized platinum nanoparticles with ICR-191 and their potential application. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41092-6>, 1 9.
- Borowik, A., Butowska, K., Konkel, K., Banasiuk, R., Derewońko, N., Wyrzykowski, D., Davydenko, M., Cherepanov, V., Stypokin, V., Prylutskyy, Y., Pohl, P., Krolicka, A., Piosik, J., 2019b. The impact of surface functionalization on the biophysical properties of silver nanoparticles. *Nanomaterials* 9, 973. <https://doi.org/10.3390/NANO9070973>, 2019Page 973 9.
- Cox, J., Weinman, S., 2016. Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepat. Oncol.* 3, 57–59. <https://doi.org/10.2217/HOP.15.41>.
- Czubačka, E., Czerzak, S., 2019. Are platinum nanoparticles safe to human health? *Medycyna pracy. Workers' Health Saf.* 70, 487–495. <https://doi.org/10.13075/MP.5893.00847>.
- Faderin, E., Iorkula, T.H., Aworinde, O.R., Awoyemi, R.F., Awoyemi, C.T., Acheampong, E., Chukwu, J.U., Agyemang, P., Onaiwu, G.E., Ifijen, I.H., 2025. Platinum nanoparticles in cancer therapy: chemotherapeutic enhancement and ROS generation. *Med. Oncol.* 42, 1–54. <https://doi.org/10.1007/S12032-024-02598-W>, 20252 42.
- Gajewski, E., Gaur, S., Akman, S.A., Matsumoto, I., van Balgooy, J.N.A., Doroshov, J.H., 2007. Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1947–1956. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.03.022>.
- Ghosh, D., Chattopadhyay, N., 2015. Gold and silver nanoparticles based superquenching of fluorescence: a review. *J. Lumin.* 160, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.12.018>.
- Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [WWW Document], n. d. URL <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services> (accessed 1.6.25).
- Gołusiński, G., Borowik, A., Derewońko, N., Kawiak, A., Rychtowski, M., Woźniowska, A., Piosik, J., 2016. Pentoxifylline as a modulator of anticancer drug doxorubicin. Part II: reduction of doxorubicin DNA binding and alleviation of its biological effects. *Biochimie* 123, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.003>.
- Gołusiński, G., Konkel, K., Galikowska Bogut, B., Beldzińska, P., Bury, K., Zakrzewski, M., Butowska, K., Sądaj, R., Piosik, J., 2024. Influence of silver nanoparticles' size on their direct interactions with doxorubicin and its biological effects. *Sci. Rep.* 14, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69724-6>, 20241 14.
- Gurunathan, S., Jeyaraj, M., Kang, M.H., Kim, J.H., 2020. Anticancer properties of platinum nanoparticles and retinoic acid: combination therapy for the treatment of human neuroblastoma cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6792. <https://doi.org/10.3390/IJMS21186792>, 2020Page 6792 21.
- Jeyaraj, M., Gurunathan, S., Qasim, M., Kang, M.H., Kim, J.H., 2019. A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles. *Nanomaterials* 9, 1719. <https://doi.org/10.3390/NANO9121719>, 2019Page 1719 9.
- Kankala, R.K., Liu, C.G., Yang, D.Y., Wang, S.B., Chen, A.Z., 2020. Ultrasmall platinum nanoparticles enable deep tumor penetration and synergistic therapeutic abilities through free radical species-assisted catalysis to combat cancer multidrug resistance. *Chem. Eng. J.* 383, 123138. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123138>.
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kolat, D., Katuzińska-Kolat, Z., Celik, I., Kontek, R., 2023. Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells* 12, 659. <https://doi.org/10.3390/CELLS12040659>, 2023Page 659 12.

- Kutwin, M., Sawosz, E., Jaworski, S., Hinzmann, M., Wierzbicki, M., Hotowy, A., Grodzik, M., Winnicka, A., Chwalibog, A., 2016. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. *Arch. Med. Sci.* 13, 1322. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2016.58925>.
- Linders, A.N., Dias, I.B., López Fernández, T., Tocchetti, C.G., Bomer, N., Van der Meer, P., 2024. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *NPJ. Aging* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00135-7>, 20241 10.
- Liu, B., Zhou, H., Tan, L., Siu, K.T.H., Guan, X.Y., 2024. Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies. *Signal. Transduct. Target. Ther.* 9, 1–44. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7>, 20241 9.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., Kawanishi, S., 2005. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76, 1439–1453. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.040>.
- Nigam, S., Barick, K.C., Bahadur, D., 2011. Development of citrate-stabilized Fe3O4 nanoparticles: conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* 323, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.09.009>.
- Porcel, E., Liehn, S., Remita, H., Usami, N., Kobayashi, K., Furusawa, Y., Sech, C.L., Lacombe, S., 2010. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology.* 21, 085103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/8/085103>.
- Prylutskyy, Y.I., Evstigneev, M.P., Pashkova, I.S., Wyrzykowski, D., Wozniwodzka, A., Gotuński, G., Piosik, J., Cherepanov, V.V., Ritter, U., 2014. Characterization of C60 fullerene complexation with antibiotic doxorubicin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 23164–23172. <https://doi.org/10.1039/C4CP03367A>.
- Pustovit, V.N., Shahbazyan, T.V., 2012. Fluorescence quenching near small metal nanoparticles. *J. Chem. Phys.* 136. <https://doi.org/10.1063/1.4721388>.
- Rivankar, S., 2014. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* 10, 853–858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>.
- Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C., Langer, R., 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett.* 10, 3223. <https://doi.org/10.1021/NL102184C>.
- Shiny, P.J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2016. DNA damage and mitochondria-mediated apoptosis of A549 lung carcinoma cells induced by biosynthesised silver and platinum nanoparticles. *RSC. Adv.* 6, 27775–27787. <https://doi.org/10.1039/C5RA27185A>.
- Wang, Z., Chen, L., Huang, C., Huang, Y., Jia, N., 2017. Albumin-mediated platinum nanocrystals for in vivo enhanced computed tomography imaging. *J. Mater. Chem. B* 5, 3498–3510. <https://doi.org/10.1039/C7TB00561f>.
- Wozniwodzka, A., Gwizdek-Wisniewska, A., Piosik, J., 2011. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines. *Bioorg. Chem.* 39, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2010.11.001>.
- Yezhelyev, M.V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajji, A., Nie, S., O'Regan, R.M., 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol.* 7, 657–667. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70793-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70793-8).
- Yoo, H., Kim, Y., Kim, J., Cho, H., Kim, K., 2024. Overcoming cancer drug resistance with nanoparticle strategies for key protein inhibition. *Molecules.* 29, 3994. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29173994>.
- Zhi, S., Zhang, X., Zhang, J., Wang, X.Y., Bi, S., 2023. Functional nucleic acids-engineered bio-barcode nanoplatfoms for targeted synergistic therapy of multidrug-resistant cancer. *ACS. Nano* 17, 13533–13544. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.3C02009/ASSET/IMAGES/LARGE/NN3C02009.0005.JPEG>.

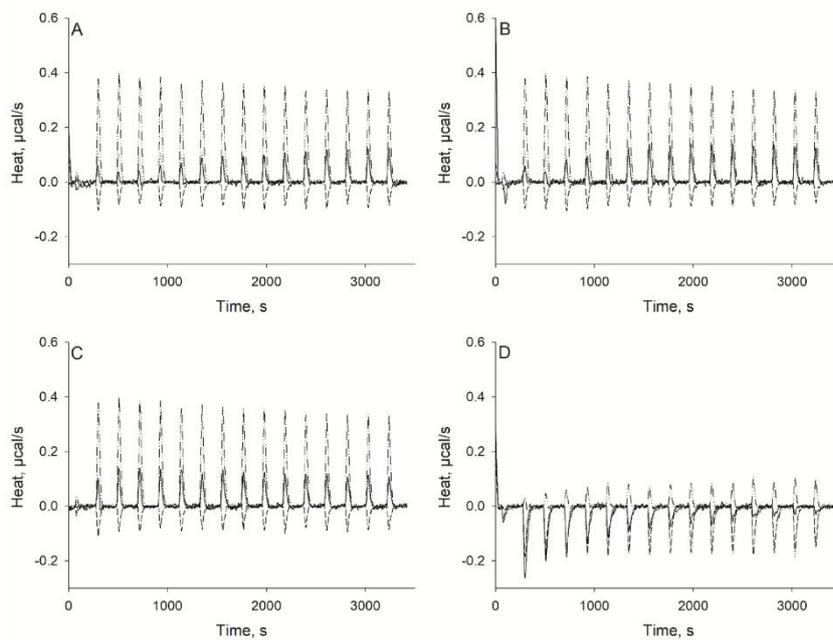
## Supplementary materials



**Fig. S1. Fluorescence spectra of platinum nanoparticles (PtNPs) – doxorubicin (DOX) interactions.** (A) DOX titration with increasing concentration of 2 mM sodium citrate – control for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs. (B) DOX titration with increasing concentration of 4 mM sodium citrate – control for 70 nm PtNPs. (C) DOX titration with increasing concentration of 5 nm PtNPs. (D) DOX titration with increasing concentration of 30 nm PtNPs. (E) DOX titration with increasing concentration of 50 nm PtNPs. (F) DOX titration with increasing concentration of 70 nm PtNPs. The arrow indicates DOX dilution. DOX initial concentration 40.91 μM (red line); PtNPs concentration range 0.24 – 10.62 μg/mL.



**Fig. S2. Spectrophotometric analysis of platinum nanoparticles (PtNPs) – doxorubicin (DOX) interactions.** (A) DOX titration with increasing concentration of 2 mM sodium citrate – control for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs. (B) DOX titration with increasing concentration of 4 mM sodium citrate – control for 70 nm PtNPs. (C) DOX titration with increasing concentration of 5 nm PtNPs. (D) DOX titration with increasing concentration of 30 nm PtNPs. (E) DOX titration with increasing concentration of 50 nm PtNPs. (F) DOX titration with increasing concentration of 70 nm PtNPs. The arrow indicates DOX dilution. DOX initial concentration 40.91  $\mu\text{M}$  (red line); PtNPs concentration range 0.24 – 13.41  $\mu\text{g/mL}$ .



**Fig. S3. Thermal effects of platinum nanoparticles (PtNPs) – doxorubicin (DOX) interactions.** Thermograms presenting microcalorimetric titrations of PtNPs with DOX (solid line), sodium citrate solution with DOX (dash-dotted line), water with PtNPs (dashed line), and water with sodium citrate solution (dotted line), shown as heat released in time, for (A) 5 nm PtNPs, (B) 30 nm PtNPs, (C) 50 nm PtNPs, (D) 70 nm PtNPs.

### **9.2.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 2**

Gdańsk, 13.06.2025

**Patrycja Beldzińska**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogustawski Marcei, Derewońko Natalia, Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gotuński Grzegorz, Rychłowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników spektrometrii fluorescencyjnej oraz UV-Vis, przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, przygotowaniu próbek i interpretacji wyników testów cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórkowych MeUuSo i HaCaT, a także przygotowaniu próbek i pomocy w interpretacji obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

*Patrycja Beldzińska*

Gdańsk, 30.05.2025

**dr hab. Jacek Piosik, prof. UG**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogusławski Marceli, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołński Grzegorz, Rychłowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

sprawowaniu opieki merytorycznej i metodologicznej oraz wsparciu w interpretacji wyników i dyskusji naukowej. Jednocześnie podkreślam, iż mgr Patrycja Betdzińska pełniła wiodącą rolę w powstanie powyższego manuskryptu.



Signed by /  
Podpisano przez:

Jacek Gabriel Piosik  
Uniwersytet Gdański

Date / Data: 2025-  
06-03 09:30

Gdańsk, 28.05.2025

**dr Natalia Derewońko**

Zakład Szczepionek Rekombinowanych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

#### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

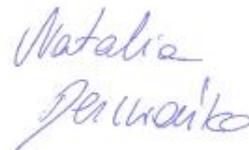
Oświadczam, że w pracy:

**Bętdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogustawski Marcei, Derewońko Natalia, Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołński Grzegorz, Rychłowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

przeprowadzeniu testów cytotoksyczności nanocząstek platyny z doxorubicyną na liniach komórkowych HaCaT i MeUuSo.



Gdańsk, 28.05.2025

**dr hab. Dariusz Wyrzykowski, prof. UG**  
Pracownia Biologicznej Chemii Nieorganicznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

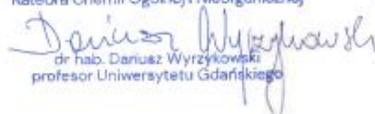
Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogusławski Marceli, Derewońko Natalia, Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Rychłowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał wyłącznie na technicznej obsłudze izotermicznego kalorymetru miareczkowego (ITC) zgodnie z parametrami podanymi przez Panią mgr Patrycję Beldzińską. Powyższej pracy nie wykorzystałem i nie zamierzam wykorzystać w postępowaniu o nadanie jakiegokolwiek stopnia naukowego lub zawodowego.

KIEROWNIK  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej

  
dr hab. Dariusz Wyrzykowski  
profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk, 28.05.2025

**dr Katarzyna Bury**  
Zakład Biologii Molekularnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogustawski Marceł, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołubiński Grzegorz, Rychtowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

Opracowaniu i optymalizacji procedury przygotowania próbek do analizy z wykorzystaniem Mikroskopii Sił Atomowych (AFM), przeprowadzeniu obrazowania cząsteczek z wykorzystaniem techniki AFM oraz pomiarach uzyskanych danych.



Gdańsk, 13.06.2025

**dr Michał Rychtowski**  
Zakład Szczepionek Rekombinowanych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Bęldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogustawski Marceli, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Rychtowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

mój udział polegał na pomocy w zaprojektowaniu doświadczeń z użyciem mikroskopu konfokalnego i wykonaniu obrazowania.



Gdańsk, 02.06.2025

**dr Grzegorz Gołuński**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

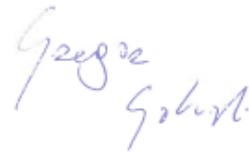
Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogusławski Marcei, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Rychtowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

wspierciu w opracowywaniu metodologii i interpretacji wyników oraz redagowaniu manuskryptu.



Gdańsk, 13.06.2025

**mgr Inez Mruk**  
Laboratorium spektrometrii mas  
Zespół Laboratoriów Specjalistycznych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Bętdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogusławski Marcei, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gotuński Grzegorz, Rychtowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

przygotowaniu wstępnych pomiarów spektrofotometrycznych.



Gdańsk, 02.06.2025

**mgr Marcin Zakrzewski**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Bętdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Mruk Inez, Bogustawski Marceł, Derewońko Natalia,  
Bury Katarzyna, Wyrzykowski Dariusz, Gołuński Grzegorz, Rychtowski Michał, Piosik Jacek.

„Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025, 3:107094 (doi:10.1016/j.ejps.2025.107094)

mój udział polegał na:

wspieraniu w analizie mutagenności testem Ames oraz redagowaniu manuskryptu.

*Marcin Zakrzewski*

### **9.3. Publikacja nr 3 (manuskrypt)**

**Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity**

Patrycja Bętdzińska<sup>1</sup>, Marcin Zakrzewski<sup>1</sup>, Katarzyna Grzyb<sup>2</sup>, Amandine Hauer<sup>2</sup>, Marzena Jamrógiewicz<sup>3</sup>, Dariusz Wyrzykowski<sup>4</sup>, Katarzyna Bury<sup>5</sup>, Grzegorz Gołuński<sup>1</sup>, Jacek Piosik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biophysics, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>3</sup>Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>4</sup>Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

<sup>5</sup>Laboratory of Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

\*corresponding author: [jacek.piosik@ug.edu.pl](mailto:jacek.piosik@ug.edu.pl)

## **Abstract**

In 2022, nearly 20 million new cancer cases were diagnosed worldwide. Despite undeniable improvement in cancer treatment, chemotherapy, a frequently used method, remains limited due to severe side effects. Hence, in this research we utilized platinum nanoparticles (PtNPs) of varying sizes to investigate their interactions with epirubicin (EPI), a commonly used anticancer drug, and assess their impact on its biological activity.

We employed various physicochemical methods, including Fluorescence and Infrared Spectroscopies, Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry, Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering with Zeta Potential measurements, to investigate the interactions and aggregation patterns of PtNPs with EPI. Moreover, the biological effect of these interactions, with a particular emphasis on the differences due to nanoparticles' sizes, was verified in Ames mutagenicity test on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 and through cytotoxicity assays on MeUuSo (cancerous) and HaCaT (non-cancerous) cell lines.

The obtained results confirmed the presence of PtNPs-EPI interactions depending on the nanoparticles' size. The physicochemical analyses revealed the formation of EPI-induced aggregates of nanoparticles, which may be of great importance in the context of the biological effects. Consequently, the biological part indicated that PtNPs decrease EPI mutagenicity and increase its cytotoxicity in cancerous cell line. In the contrary, nanoparticles exhibited a protective effect on cells and mostly increased or maintained the cells viability in non-cancerous cell line. Summing up, our research provides valuable insights into the PtNPs influence on epirubicin with special focus on the differences attributed to nanoparticles sizes.

## **Keywords**

platinum nanoparticles, epirubicin, direct interactions, aggregation, mutagenicity, cytotoxicity

## 1. Introduction

According to the International Agency for Research on Cancer, nearly 20 million new cancer cases were diagnosed globally in 2022, which are projected to increase to even 35 million by 2050 [1]. Despite undeniable improvement in treatment over the years, chemotherapy is still a widely used treatment regimen, however, the anticancer agents affect both cancer and normal cells, which causes a number of severe side effects [2,3]. Therefore, searching for therapy modifications aimed at reducing the side effects and, in consequence, improving the quality of patients' life is of utmost importance [4,5].

First anthracyclines, one of the most effective anticancer agents, were isolated in the 1960s from *Streptomyces peucetius*. This group has many analogues, but the most commonly used are doxorubicin, daunorubicin, epirubicin and idarubicin. Epirubicin (EPI) is a doxorubicin epimer, differing in the hydroxyl group in the 4' position of the daunosamine ring in the structure [6–8]. The mechanism of EPI activity is based on three main modes of action: the DNA intercalation, the inhibition of topoisomerase II activity, and the generation of reactive oxygen species (ROS) [7]. This anthracycline is used in treatment of a wide range of malignancies namely, breast, stomach, lung, or endometrium cancers and many others [7–9]. Despite the undoubted efficiency, the most severe side effect of EPI is dose-dependent cardiotoxicity [7,10]. Nevertheless, the risk of cardiological problems is significantly lower in comparison to doxorubicin, which allows for usage of higher doses and, in consequence, makes EPI a safer chemotherapeutic agent [7,11].

Nowadays, nanotechnology plays a significant role in medicine, finding its function especially in diagnosis, drug delivery, implants, radiotherapy, and bioimaging applications [12–15]. Nanoparticles (NPs), as structures between 1 nm to 100 nm in diameter, attract much attention due to their diverse properties. NPs can be classified in three main groups: inorganic (including metals), organic, and carbon-based nanoparticles [16]. Platinum nanoparticles (PtNPs), noble metal NPs, are gaining more attention, due to their features, such as large surface to volume ratio, surface functionalization, size and shape ductility, agglomeration, and electrocatalytic features [15]. Thereby, PtNPs have shown antimicrobial and

antifungal activity [15,17–20], but more importantly, they were proven to possess anticancer properties [18,20–24]. The mechanism of PtNPs action is mainly based on the ROS generation, but they can also penetrate the cell membrane and cause damage through the interaction with the intracellular components as well as the release of platinum ions [15,17]. Interestingly, some findings confirmed that PtNPs were not cytotoxic to the healthy tissues, and can be used as nanodelivery platforms for drugs, enabling more specific drug delivery to the targeted tissue, increasing the treatment effectiveness and also overcoming the drug resistance [25–31]. The size of nanoparticles and its influence on their cellular interactions are the crucial aspects that affect the biomedical applications such as drug delivery, cell imaging, or tumor targeting [32,33].

Therefore, in this research we used platinum nanoparticles (PtNPs) in four sizes to investigate their potential influence on anticancer drug epirubicin (EPI) with special focus on the differences arising from various nanoparticles' diameters. Moreover, we hypothesized that these potential interactions could influence the biological activity of EPI. To verify this theory, we conducted a comprehensive array of both physicochemical and biological methods also using human cell lines. Our results provide worthwhile background about nanoparticles' impact on the analyzed anthracycline and its possible application potential.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

Epirubicin hydrochloride (EPI) was purchased from Selleck Chemicals (Houston, Texas, USA). EPI was dissolved in distilled water and its concentration was determined by UV-Vis spectroscopy. Platinum nanoparticles (PtNPs), in concentration 0.05 mg/mL for physicochemical methods and in concentration 1 mg/mL for biological assays in 2 mM trisodium citrate dihydrate (5 nm, 30 nm, 50 nm) and in 4 mM trisodium citrate dihydrate (70 nm), were acquired from nanoComposix (San Diego, California, USA; 99.99 % purity). Cysteamine hydrochloride used in AFM imaging was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 strain was purchased from Xenometrics AG (Allschwil, Switzerland). Nutrient Agar,

Nutrient Broth and Biological Agar media were purchased from BioMaxima S.A. (Gdansk, Poland). Histidine, biotin, and ampicillin were acquired from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). Human keratinocyte cell line (HaCaT) and human melanoma cell line (MeUuSo) were obtained from the Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute (Stockholm, Sweden) and the Department of Medicinal Microbiology, Leiden University Medical Center (Leiden, The Netherlands), respectively. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, 10 % fetal bovine serum (FBS), 4mM L-glutamine, glucose, antibiotic-antimycotic solution, HEPES, and sodium pyruvate were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

## **2.2. Fluorescence spectroscopy**

Fluorescence spectroscopy measurements were conducted at the 400 to 800 nm wavelength range, with an excitation wavelength of 480 nm, in quartz cuvettes at a temperature of  $25 \pm 0.1$  °C. All measurements were performed in trisodium citrate dihydrate (2 mM for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs and 4 mM for 70 nm PtNPs) using a Jasco FP-8500 (Jasco Company, Tokyo, Japan) spectrofluorometer with a Peltier thermostat. EPI (initial concentration 21.23  $\mu$ M) was titrated with PtNPs in the concentration range 0.24 – 10.62  $\mu$ g/mL or trisodium citrate dihydrate in appropriate concentration to investigate the dilution effect.

## **2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Near Infrared Spectroscopy (NIR)**

FTIR and NIR spectra of complexes formed between EPI and PtNPs were recorded on Jasco-4700 instrument (IR: 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  NIR: 8200-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) with 32 scans, 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution (Jasco Company, Tokyo, Japan). NIR transmission technique was applied using dry salt KBr and dry samples of EPI and other components obtained by lyophilization using Freeze Dryer (Labconco, Kansas City, Missouri, USA). The materials were compressed with potassium bromide to form a disc. All spectra were recorded as a background and analysis of spectra was performed using Spectra Analysis software (Jasco Company, Tokyo, Japan).

#### **2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC), the constant pressure heat capacities**

The thermal behavior of the samples was measured and analyzed by the STAR-1 System (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) calibrated with indium, combined with the intercooler system. The samples were lyophilized on Freeze Dryer (Labconco, Kansas City, Missouri, USA). 1-5 mg of the samples were weighted into aluminum crucibles (40  $\mu$ l) and the analysis was carried out at the temperature range from 20 °C to 400 °C. Samples were heated at the heating rate of 10 °C/min and a nitrogen flow rate 60 mL/min. All tests were standardized to the sample size.

#### **2.5. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)**

The ITC measurements were performed in 2 mM (for 5 nm, 30 nm, 50 nm PtNPs) and 4 mM (for 70 nm PtNPs) trisodium citrate dihydrate solution at 25 °C using AutoITC isothermal titration calorimeter (MicroCal Inc. GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). The volumes of the sample and reference cells were 1.4491 mL. The experiment consisted of multiple injections of 10.02  $\mu$ L (15 injections, 2  $\mu$ L for the first injection only) of EPI solution (4.13 – 49.79  $\mu$ M) into the sample cell containing PtNPs (initial concentration 0.05 mg/mL). Background titrations were performed by injecting EPI into trisodium citrate dihydrate solution and trisodium citrate dihydrate solution into PtNPs. The results of the background titrations were subtracted from each experimental result to account for the heat of dilution. Each injection lasted 20 s. To reach a homogenous mixing in the sample cell, the stirrer speed was kept constant at 300 rpm.

#### **2.6. Dynamic Light Scattering (DLS)**

The hydrodynamic diameter of PtNPs alone and PtNPs with EPI was determined on Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, UK) by measuring the intensity of the scattered light. Measurements were conducted in polystyrene cuvettes at 25 °C with a He-Ne laser (633 nm, 4 mW), at a 173° scattering angle. Each measurement was performed in triplicate. EPI initial concentration 8  $\mu$ M; PtNPs initial concentration 2.38  $\mu$ g/mL).

## 2.7. Zeta Potential

Zeta potential measurements were conducted in Univette quartz cuvettes at 25 °C utilizing Litesizer DLS 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria), with the voltage of 200 V. All measurements were performed in trisodium citrate dihydrate (2 mM for 5 nm, 30 nm, and 50 nm PtNPs and 4 mM for 70 nm PtNPs). EPI concentration 104 µM; PtNPs initial concentration 0.05 mg/mL).

## 2.8. Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy visualization of the PtNPs alone and PtNPs with EPI mixtures was performed at 23 °C in air, in PeakForce Tapping mode, using BioScope Resolve AFM (Bruker, Bremen, Germany). PtNPs (0.05 mg/mL) were mixed with EPI (81.9 µM) at room temperature. Subsequently, 100 mM cysteamine was deposited onto a freshly cleaned mica surface for 5 min and afterwards the solution was aspirated. Then samples were added on mica and incubated for 5 min at room temperature, followed by washing with deionized water and drying with streams of nitrogen gas prior to AFM imaging. The ScanAsyst-Fluid+ probe (Bruker) was used for PtNPs alone and PtNPs-EPI mixtures imaging (resonant frequency  $f_0 = 150$  kHz; spring constant  $k = 0.7$  N/m). Images were registered at  $512 \times 512$  pixels with a PeakForce Tapping frequency of 1 kHz and amplitude of 150 nm. A height sensor signal was used to display the image using NanoScope Analysis v1.9.

## 2.9. Ames test

The Ames test was performed with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98, according to the procedure described by Woziwodzka et al. [34]. A mixture containing 100 µL of the overnight bacteria culture, 50 µL of 3 % NaCl, and 100 µL of the tested solution (or sterile distilled water as a negative control) was incubated for 4 h in darkness at 37 °C and 220 rpm. Afterwards, the mixture was centrifuged at 11840 g for 5 min. Then, the bacterial pellet was washed with 0.75 % NaCl and resuspended in 300 µL of 0.75 % NaCl solution containing 0.1 µM histidine and 0.1 µM biotin. The bacterial suspension was spread on a glucose minimal agar plate and incubated at 37 °C in darkness. After 48h incubation, the number of revertant colonies was calculated. All experiments were performed in triplicate. The optimal

concentration of EPI (1000 ng/plate) was selected after testing EPI mutagenic activity in a broad concentration range (data not shown).

## **2.10. Cytotoxicity**

### **2.10.1. Cell culture**

The HaCaT cell line was cultivated in DMEM containing 4500 mg/L glucose, supplemented with 10 % fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin. The MeJuSo cell line was cultured in RPMI 1640 Medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin. Both cell lines were maintained in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **2.10.2. Cytotoxicity assay**

HaCaT and MeJuSo cells were seeded on a 96-well plate (~2x10<sup>4</sup>/well) and incubated in humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>, at 37 °C, overnight. Next, cells were washed three times in media devoid of FBS. Then, EPI or PtNPs with EPI mixtures in different dilutions were added to cell cultures (90 µL/well) in three replicates and incubated for 20 h. Afterwards, 10 µL of AlamarBlue (BioRad, Hercules, California, USA) was added to cells on each well and incubated for the next 4 h, in humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>, at 37 °C. The absorbance was measured at 570 nm and 600 nm. The percentage of the AlamarBlue reduction was calculated as a difference between treated and control cells, according to the manufacturer's protocol:

$$diff(\%) = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)}$$

diff – difference between treated and control cells; O<sub>1</sub> – ε<sub>570</sub> of oxidized AlamarBlue (80586 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); O<sub>2</sub> – ε<sub>600</sub> of oxidized AlamarBlue (117216 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); A<sub>1</sub> – absorbance of the test wells at 570 nm; A<sub>2</sub> – absorbance of test wells at 600 nm; P<sub>1</sub> – absorbance of control wells at 570 nm; P<sub>2</sub> – absorbance of control wells at 600 nm.

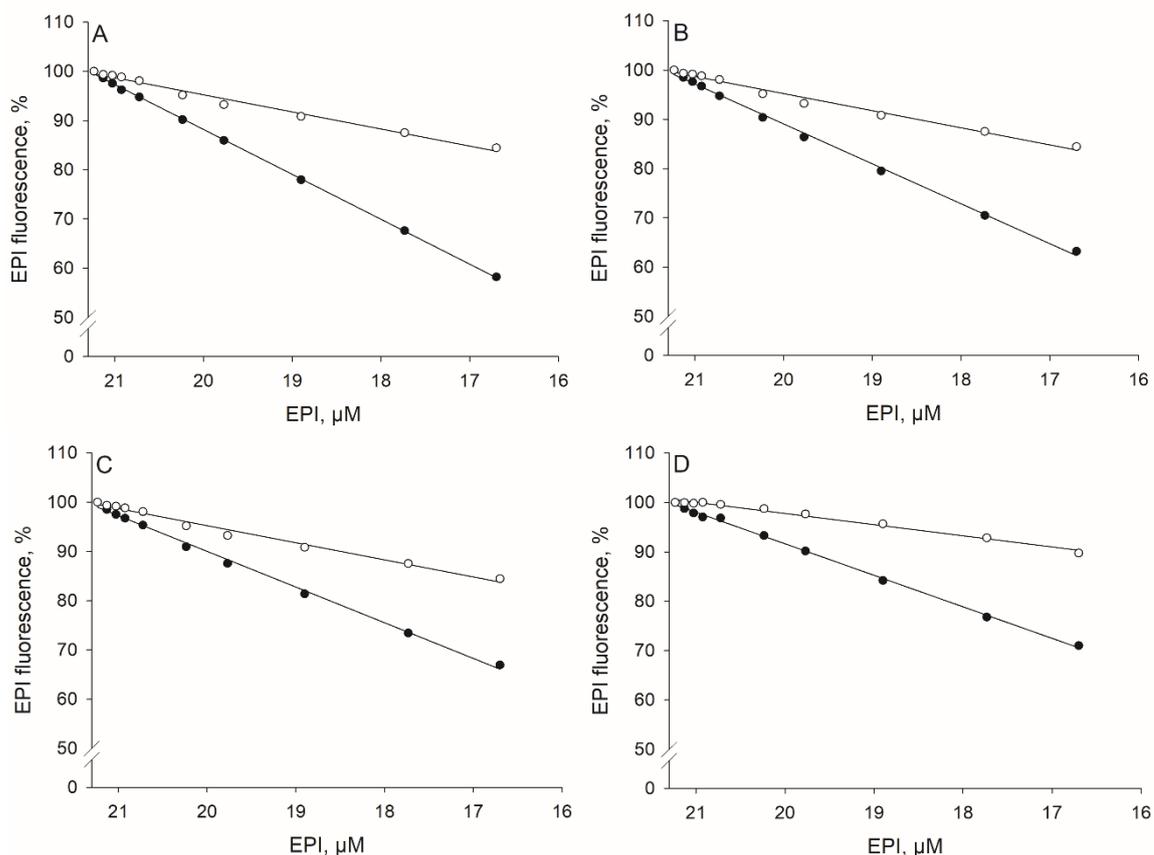
## **2.11. Statistical analysis**

Statistical analysis was conducted using Statistica 14.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, California, USA) software. For the Ames mutagenicity test and cytotoxicity assay, one-way variance analysis (ANOVA) followed by the post-hoc RIR Tukey's test was applied. The significance level for all the analyses was established at  $\alpha = 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. Direct interactions between platinum nanoparticles and epirubicin**

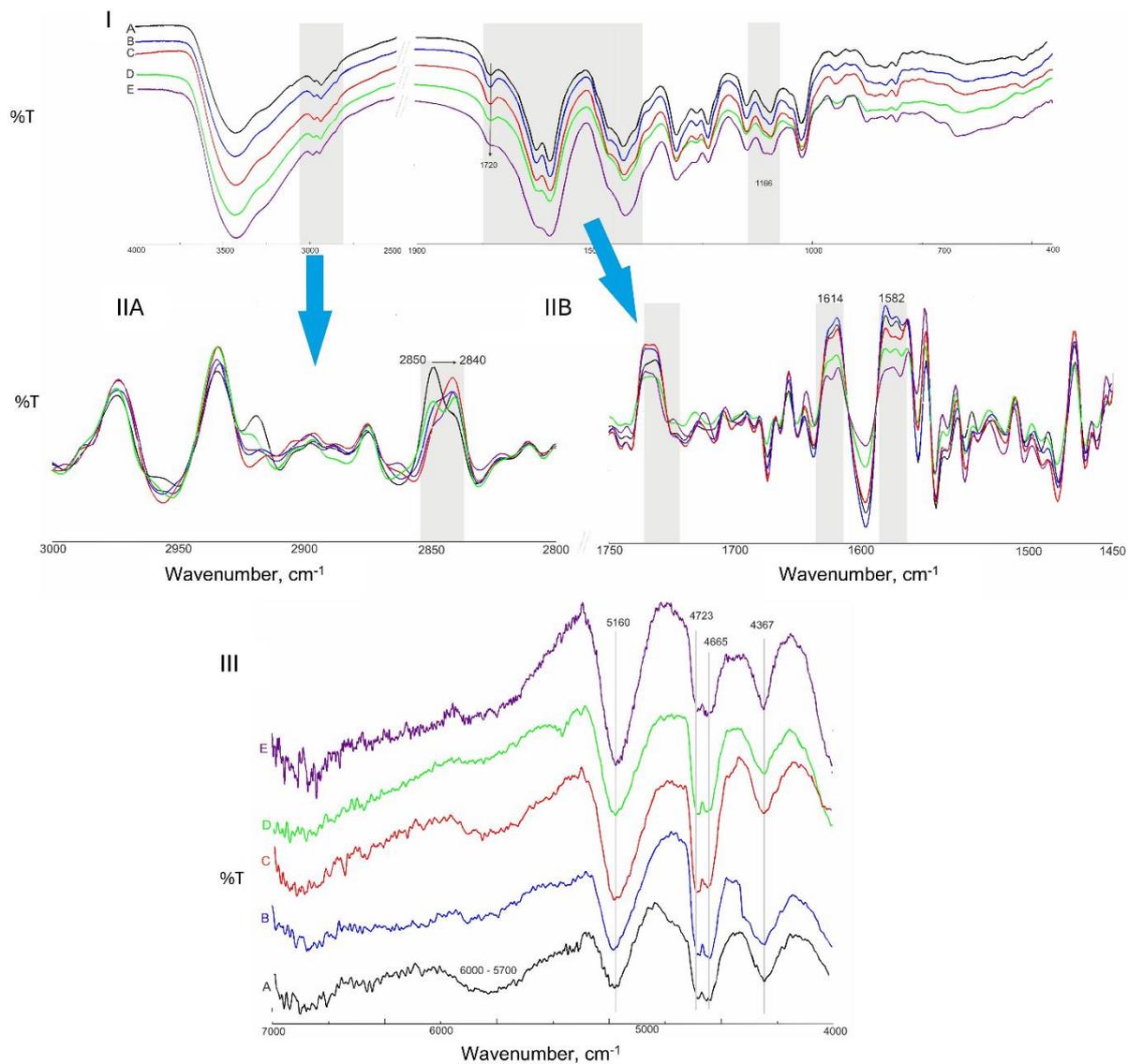
Firstly, the potential interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and epirubicin (EPI) were verified using spectroscopic analysis. The fluorescence of EPI titrated with nanoparticles was reduced to 58 %, 63 %, 67 % and 71 % for 5 nm, 30 nm, 50 nm and 70 nm PtNPs, respectively. To exclude the factor of EPI dilution, we performed control titrations where the fluorescence was reduced to 84 % and 90% for 2 mM trisodium citrate (control for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs) and 4 mM trisodium citrate (control for 70 nm PtNPs) (Figure 1), respectively. The recorded fluorescence spectra for all measurements are available in the Supplementary materials (Figure S1).



**Fig. 1. Fluorescence analysis of epirubicin (EPI) titrated with platinum nanoparticles (PtNPs).** (A) EPI with 5 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.999$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.986$ ). (B) EPI with 30 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.998$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.986$ ). (C) EPI with 50 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.998$ ) and 2 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.986$ ). (D) EPI with 70 nm PtNPs (filled circle;  $R^2 = 0.999$ ) and 4 mM sodium citrate (empty circle;  $R^2 = 0.988$ ). EPI initial concentration 21.23  $\mu\text{M}$ , PtNPs concentration range 0.24 – 10.62  $\mu\text{g/mL}$ . Results are reported as the percentage of the fluorescence of EPI alone (21.23  $\mu\text{M}$ ). The fluorescence values were registered at 592 nm.

The FTIR analysis revealed subtle changes in the spectra of EPI upon the addition of different platinum nanoparticles (Figure 2). Firstly, the broad bands at  $3435\text{ cm}^{-1}$  that correspond to the O–H stretching vibration of water were observed in all spectra. The most significant differences between the samples were noticed at  $2850\text{ cm}^{-1}$  related to the C–H vibration of aldehydes. In the case of 50 nm and 70 nm PtNPs a notable shift of this band to  $2840\text{ cm}^{-1}$  was observed, while for 5 nm and 30

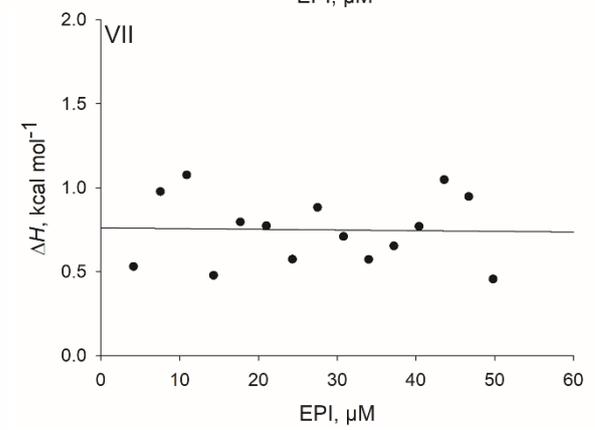
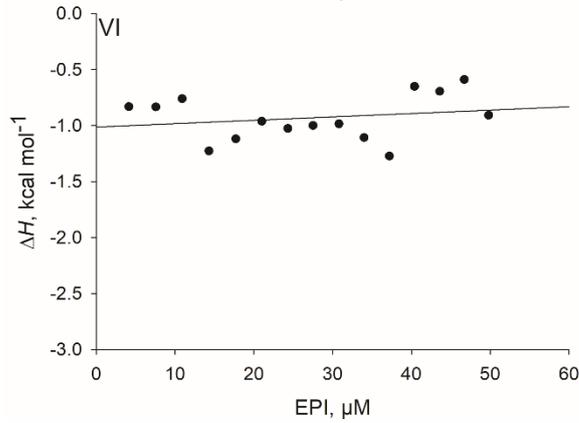
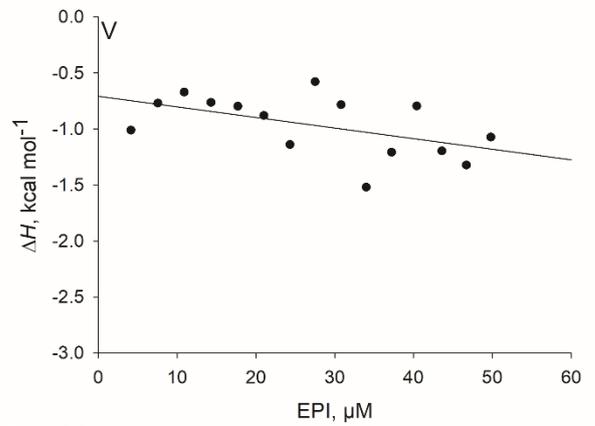
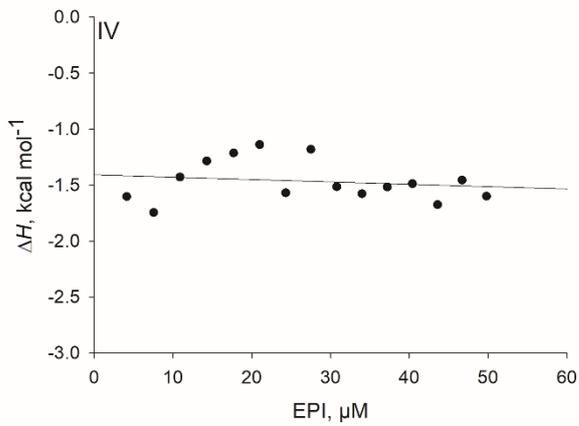
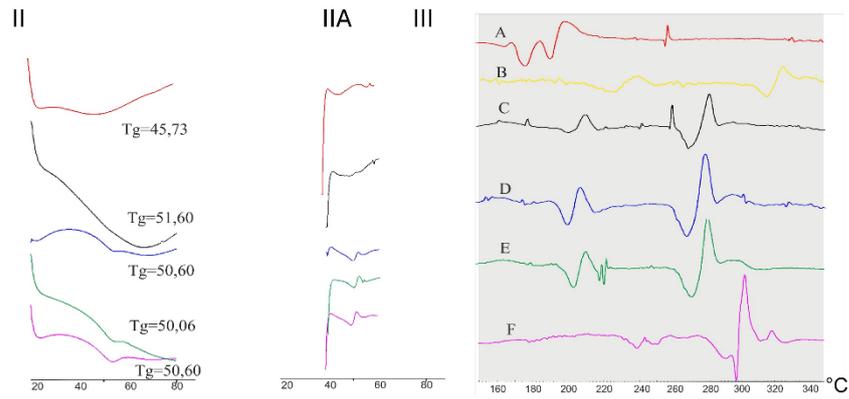
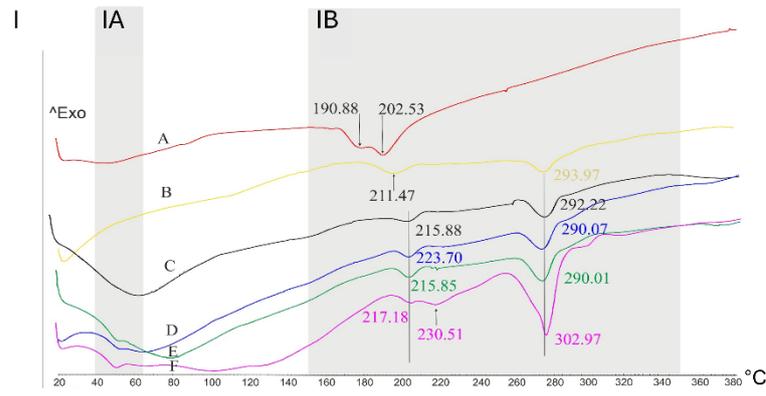
nm PtNPs doublets appeared in the derivatives spectra. Some minor differences were also visible at 1728–1720  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), and 1614  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the simultaneous contribution of C=C and C=O stretching mode, and 1582  $\text{cm}^{-1}$  (N-H). The band at 1404  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the bending vibration of C-H (methyl group) revealed no changes. Furthermore, the C-O stretching bond was shifted to 1166  $\text{cm}^{-1}$  for EPI, varying in all samples with PtNPs. Complementing the FTIR analysis, we also used NIR spectroscopy which indicates changes in hydrogen bonding. In the 6000  $\text{cm}^{-1}$  and 5700  $\text{cm}^{-1}$  range, where C-H vibrations are typically observed, a weaker, less intensive, band was noted for 50 and 70 nm PtNPs compared to the free EPI molecule. At 5160  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 2) band, corresponding to O-H stretching and H-O-H bending, combination of incorporated water molecules was recorded. Moreover, we noticed some differences in the vibrations at 4723  $\text{cm}^{-1}$  and 4665  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic for N-H/C-N/C=O amide deformations. Additionally, there were deformations in the band shapes between 4500–4200  $\text{cm}^{-1}$ , with a point at 4367  $\text{cm}^{-1}$  characteristic for C-H aromatic, CHO, CONH<sub>2</sub> vibrations. The spectra of 5 nm as well as 30 nm PtNPs with EPI were similar to the free EPI in this range, while the spectra of 50 and 70 nm PtNPs were slightly different, thinner, more intensive and similar to each other which may suggest their comparable interactions.



**Figure 2. FTIR and NIR spectra of the investigated complexes of epirubicin (EPI) and platinum nanoparticles (PtNPs).** FTIR spectra at (I) region 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  and the second derivatives in region (IIA) 3000 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  and (IIB) 1750 – 1450  $\text{cm}^{-1}$ . (III) NIR spectra in the wavenumber region 7000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . EPI with sodium citrate (A, black), EPI with 5 nm PtNPs (B, blue), EPI with 30 nm PtNPs (C, red), EPI with 50 nm PtNPs (D, green), EPI with 70 nm PtNPs (E, purple).

The thermograms shown in Figure 3, indicate that the samples of free EPI and all EPI complexes with PtNPs exhibit glass transition (Figure 3, II) near 45 °C for EPI and between 50 °C to 51 °C for complexes, respectively. The DSC curves also indicated the presence of water in nanoparticles' samples after lyophilization (Figure 3, I). The peaks at 190.88 °C and 202.53 °C corresponded to the melting process of EPI (curve

A), while for EPI complexed with PtNPs this process shifted to 215 °C for 5 nm, 30 nm, and 50 nm PtNPs and to 230.15 °C for 70 nm PtNPs. Moreover, in the sample with the largest nanoparticles, there were strong endothermic peaks near 290-302 °C, which started to decompose above 305 °C (curve F). Next, we examined the thermodynamics of PtNPs-EPI interactions using Isothermal Titration Calorimetry (ITC). The enthalpy change ( $\Delta H$ ) values for the 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs were similar, and equated to -1.41 kcal/mol, -0.71 kcal/mol and -1.01 kcal/mol, respectively. In case of 70 nm PtNPs, the  $\Delta H$  value was equal to 0.76 kcal/mol (Figure 3, IV-VI). The recorded thermograms for all measurements are available in the Supplementary materials (Figure S2).



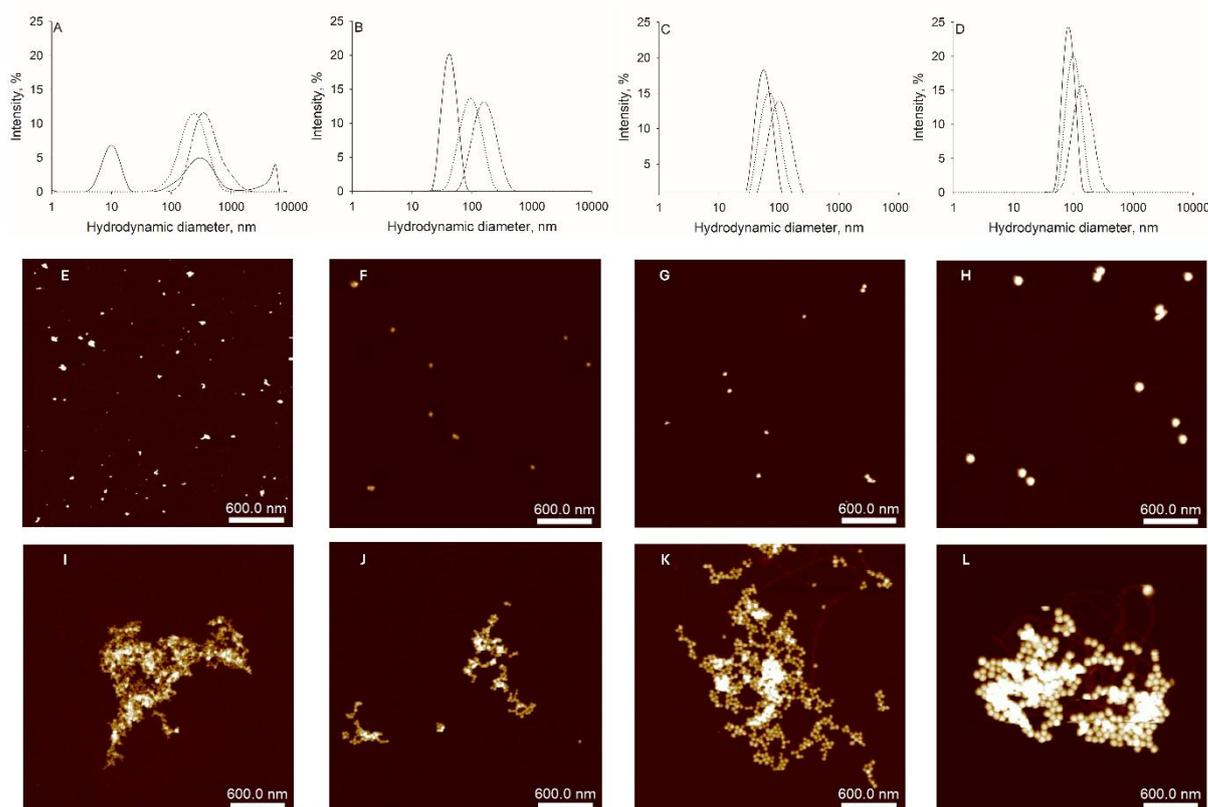
**Fig. 3. Thermal analysis of interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and epirubicin (EPI).** (I) Differential scanning calorimetry (DSC) curves. (IA) T<sub>g</sub> region, and (IB) derivatives region. (II) Curves in T<sub>g</sub> region, (IIA) 1st derivatives in T<sub>g</sub> region, and (III) 1st derivatives of curves from region IB. EPI (A, red), EPI with sodium citrate (B, yellow), EPI with 5 nm PtNPs (C, black), EPI with 30 nm PtNPs (D, blue), EPI with 50 nm PtNPs (E, green), EPI with 70 nm PtNPs (F, purple). Enthalpy change values ( $\Delta H$ ) calculated from Isothermal Titration Calorimetry (ITC) analysis. (IV)  $\Delta H$  of 5 nm PtNPs-EPI interactions  $-1.41 \pm 0.11$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected EPI. (V)  $\Delta H$  of 30 nm PtNPs-EPI interactions  $-0.71 \pm 0.13$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected EPI. (VI)  $\Delta H$  of 50 nm PtNPs-EPI interactions  $-1.01 \pm 0.12$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected EPI. (VII)  $\Delta H$  of 70 nm PtNPs-EPI interactions  $0.76 \pm 0.12$  ( $\pm$ SE) kcal/mol of injected EPI. The results were calculated by the linear regression of experimental points tending to zero. EPI concentration range: 4.13 – 49.79  $\mu$ M.

### 3.2. Platinum nanoparticles aggregation

To verify whether EPI may trigger PtNPs aggregation, we performed Dynamic Light Scattering. For 30 nm, 50 nm and 70 nm PtNPs the results were similar – the addition of EPI induced an increase in PtNPs hydrodynamic diameter (Figure 4, Table 1). Importantly, in all the measurements the polydispersity index (Pdl) was below 0.2 which indicates a homogenous sample. On the other hand, for 5 nm PtNPs alone we observed three different peaks around 10 nm, 321 nm and 4303 nm with Pdl 0.49 which can be characteristic for very small particles. However, EPI addition promoted aggregation, visible as formation of a single peak of 254 nm (8  $\mu$ M EPI) and 449 nm (40  $\mu$ M EPI), and, in consequence, the decrease of Pdl indicating increased samples homogeneity. These results are in conformity with AFM imaging where the nanoparticles formed aggregates after EPI addition. PtNPs alone were about 27 nm, 56 nm, 67 nm, and 125 nm for 5 nm, 30 nm, 50 nm and 70 nm PtNPs, respectively. The addition of EPI changed the dimensions to 1064 nm, 428 nm, 823 nm and 1194 nm (Figure 4).

**Table 1. Aggregation analysis of platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes and PtNPs – epirubicin (EPI) mixtures.** PtNPs initial concentration 2.38 µg/mL. Pdl – polydispersity index; SD – standard deviation.

		Peak mean size, nm	Peak area, % (± SD)	Pdl
<b>5 nm PtNPs</b>		10.33	39.57 ± 6.4	
	PtNPs	321.33	46.67 ± 8.8	0.49
		4303.00	12.00 ± 0.5	
	+ 8 µM EPI	253.87	100	0.25
	+ 40 µM EPI	449.47	100	0.24
<b>30 nm PtNPs</b>	PtNPs	43.46	100	0.06
	+ 8 µM EPI	101.20	100	0.16
	+ 40 µM EPI	175.93	100	0.18
<b>50 nm PtNPs</b>	PtNPs	58.54	100	0.07
	+ 8 µM EPI	75.39	100	0.14
	+ 40 µM EPI	111.63	100	0.17
<b>70 nm PtNPs</b>	PtNPs	85.25	100	0.03
	+ 8 µM EPI	104.53	100	0.11
	+ 40 µM EPI	152.03	100	0.16



**Figure 4. Aggregation of platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes with epirubicin (EPI).** Hydrodynamic diameters of PtNPs alone (solid line) or in mixtures with 8  $\mu\text{M}$  EPI (dotted line), and 40  $\mu\text{M}$  EPI (dashed line). (A) 5 nm PtNPs. (B) 30 nm PtNPs. (C) 50 nm PtNPs. (D) 70 nm PtNPs. PtNPs initial concentration 2.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Results are reported as the average hydrodynamic diameter. AFM images of PtNPs and PtNPs - EPI mixtures. (E) 5 nm PtNPs. (F) 30 nm PtNPs. (G) 50 nm PtNPs. (H) 70 nm PtNPs. (I) 5 nm PtNPs with EPI. (J) 30 nm PtNPs with EPI. (K) 50 nm PtNPs with EPI. (L) 70 nm PtNPs with EPI. EPI concentration 81.9  $\mu\text{M}$ , PtNPs concentration 0.05  $\text{mg}/\text{mL}$ .

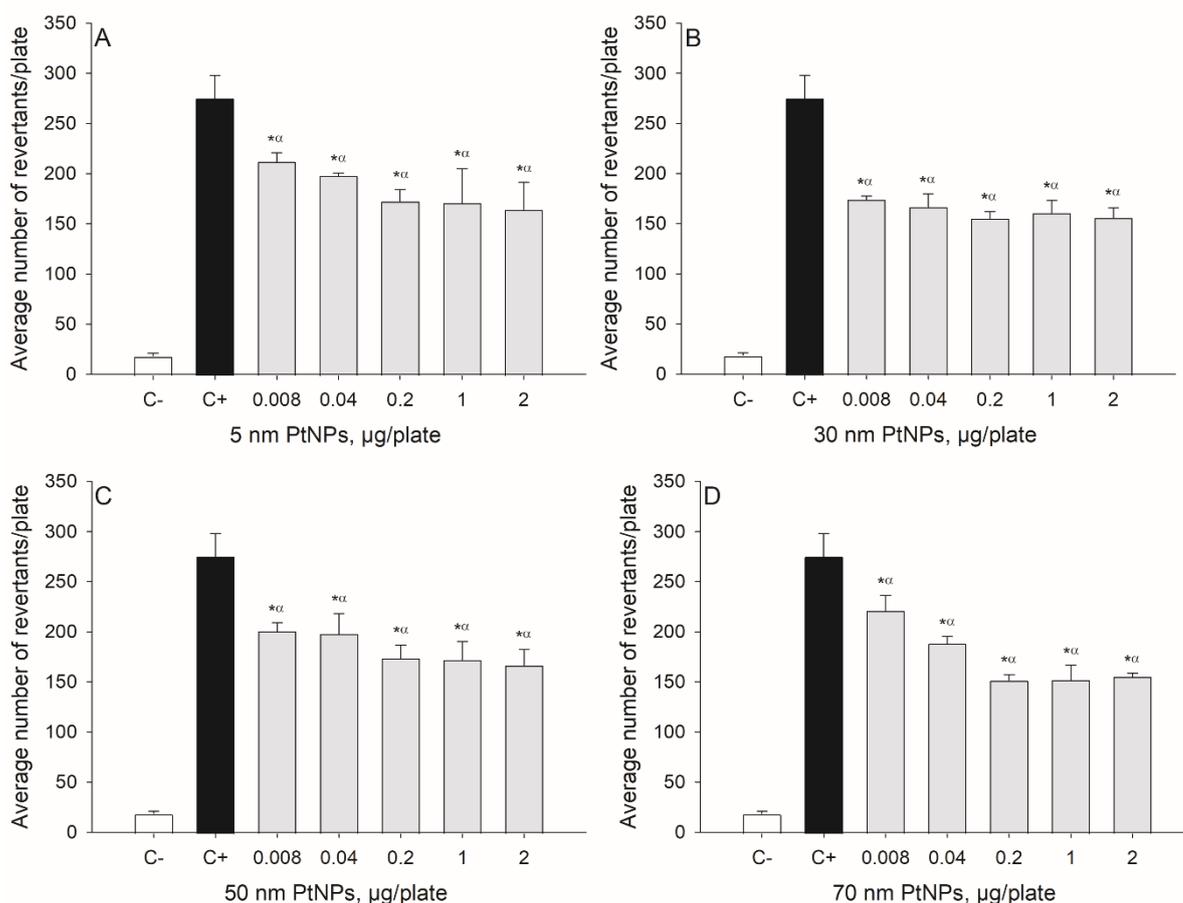
After the confirmation of aggregates formation, we decided to investigate the electrical potential for PtNPs alone and in mixture with EPI. All tested nanoparticles sizes exhibited a negative charge on their surface (Table 2). Unfortunately, according to the manufacturer, for 5 nm PtNPs the result can be inaccurate. Nevertheless, the addition of EPI, in all analyzed cases changed the zeta potential to positive values in the range from 1.6 to 4.8 mV (Table 2).

**Table 2. Zeta potential measurements of platinum nanoparticles (PtNPs) in different sizes and PtNPs – epirubicin (EPI) mixtures.** PtNPs initial concentration 0.05 mg/mL, EPI concentration 104  $\mu$ M.

	Zeta potential, mV	
	PtNPs	PtNPs + EPI
5 nm	-0.5	3.6
30 nm	-28.2	4.8
50 nm	-49.1	3.0
70 nm	-43.5	1.6

### 3.3. Platinum nanoparticles influence on EPI mutagenicity

Due to the confirmation of PtNPs – EPI interactions, in the next step we decided to investigate the nanoparticles' influence on EPI mutagenic activity in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 Ames assay. Importantly, all nanoparticles' sizes decreased EPI mutagenicity significantly. In the case of 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs, the observed influence was similar, irrespectively of the nanoparticles' concentration, while for 70 nm nanoparticles it was related to the increasing amount of PtNPs (Figure 5). Moreover, PtNPs alone have shown no mutagenic activity (see Supplementary materials, Figure S3).

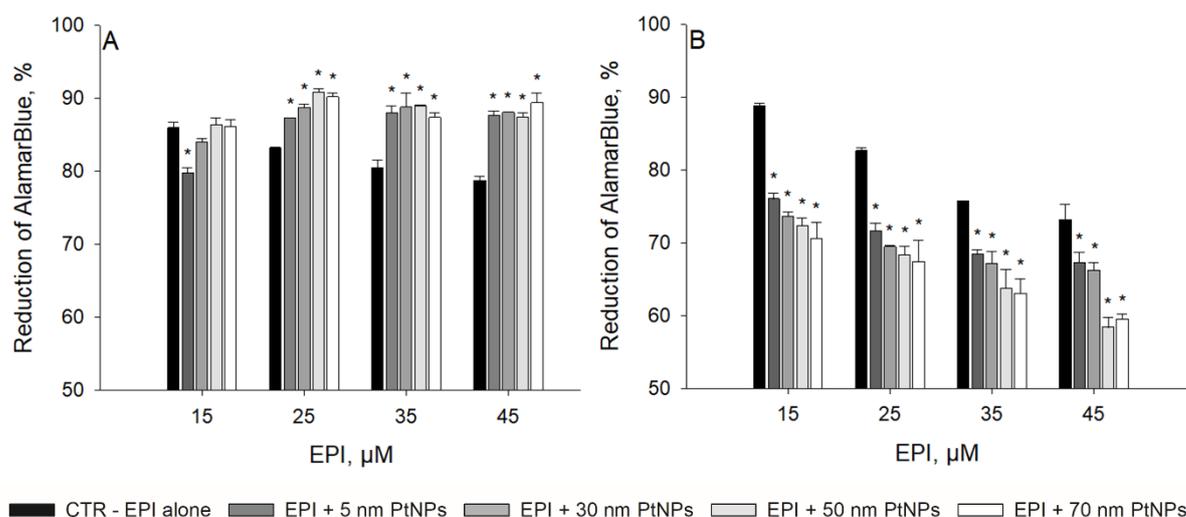


**Figure 5. Influence of platinum nanoparticles (PtNPs) on epirubicin (EPI) mutagenic activity towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98.** Mutagenicity of EPI with (A) 5 nm PtNPs, (B) 30 nm PtNPs, (C) 50 nm PtNPs, (D) 70 nm PtNPs. C- negative control (sterile water; white color), C+ positive control (EPI 1000 ng/plate; black color), PtNPs with EPI (PtNPs concentration range 0.008 – 2 µg/plate, EPI 1000 ng/plate; grey color). Results are reported as the average number of revertants ± standard deviation. \* significant difference from the negative control ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ );  $\alpha$  significant difference from the positive control ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

### 3.4. Platinum nanoparticles influence on EPI cytotoxicity

In the last step, we investigated whether PtNPs affect EPI cytotoxicity in two contrasting cell lines: non-cancerous HaCaT (human keratinocytes) and cancerous MeJuSo (human melanoma). In non-cancerous cell line, in the case of EPI concentrations ranging from 25 to 45 µM, the addition of nanoparticles of all tested

sizes significantly enhanced cell viability compared to the control with the drug alone. Interestingly, in the lowest EPI concentration, PtNPs sized from 30 nm to 70 nm did not affect the cell growth, but the 5 nm PtNPs increased drug's cytotoxicity (Figure 6A). On the other hand, in cancerous MeJuSo cell line, the addition of PtNPs to EPI resulted in a significant enhancement of cytotoxicity in all nanoparticles sizes. The AlamarBlue reduction percentage increased with the increasing size of PtNPs. The most considerable difference was observed for 50 nm and 70 nm nanoparticles at the EPI concentration 45  $\mu$ M (Figure 6B).



**Figure 6. Influence of platinum nanoparticles (PtNPs) on epirubicin (EPI) cytotoxicity.** (A) HaCaT cell line (non-cancerous). (B) MeJuSo cell line (cancerous). EPI alone – black, EPI with 5 nm PtNPs – dark grey, EPI with 30 nm PtNPs – grey, EPI with 50 nm PtNPs – light grey, EPI with 70 nm PtNPs – white. PtNPs concentration 5  $\mu$ g/well. Results are reported as the percentage of AlamarBlue reduction regarding untreated cells (negative control, 100%)  $\pm$  standard deviation. \* significant difference from the control with EPI for the given EPI concentration ( $p < \alpha$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In the presented research, a broad spectrum of both physicochemical and biological methods was used to analyze the interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and epirubicin (EPI), and the nanoparticles' influence on the mutagenicity and cytotoxicity of the drug. Importantly, we focused on the differences resulting from various PtNPs sizes from 5 nm to 70 nm.

In the first part of the research, we used fluorescence spectroscopy to characterize the possible interactions between PtNPs and EPI. For all the tested nanoparticles' sizes, we observed fluorescence quenching, described as a process that decreases the fluorescence intensity of a substance [35]. The EPI fluorescence decreased in a PtNPs size-dependent manner, where the smallest 5 nm PtNPs caused the greatest fluorescence reduction. The process of fluorescent quenching near nanoparticles results from the energy transfer to the metal when a molecule is close to the metal surface [36], which suggests the interaction between EPI and PtNPs. Similar effect of platinum nanoparticles was observed for PtNPs with doxorubicin (DOX) [37] and aromatic mutagen ICR-191 [25]. In the literature, the quenching effect was also observed for other metal nanoparticles such as silver or gold [38–40]. In the next research phase, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis, as a valuable method for nanoparticles characterization [41], was utilized. The results revealed differences between the spectra of EPI alone and in mixtures with nanoparticles in all analyzed sizes. The existing bands were similar indicating the successful aggregation of EPI with PtNPs. The most notable changes related to alkane stretching were observed for the larger nanoparticles, namely 50 nm and 70 nm, which points to EPI-PtNPs interactions. In case of the smaller, 5 nm and 30 nm, PtNPs the signals were more complicated, as evidenced by doublets visible at the 2850-2840  $\text{cm}^{-1}$  band, which can suggest minor interactions of mixed strength. Moreover, some slight changes caused by EPI-PtNPs interactions related to carbon-carbon double bonds, carbonyl groups, and nitrogen-hydrogen bonds, were noted in all samples. However, the bending of CH<sub>2</sub> groups revealed no changes, indicating that this part of the molecule is not significantly affected by the PtNPs. Knowing that EPI contains hydroxy and amine groups, we also used Near Infrared Spectroscopy (NIR) to detect changes in hydrogen bonding. The spectra did not show significant interactions between nanoparticles and epirubicin, however, they revealed some slight changes in the vibrations. For 50 nm and 70 nm PtNPs, second overtones of C-H vibrations band were weaker than the one observed for EPI alone. Moreover, there were some vibrations differences related to amide groups, and other band shapes deformations particularly noticeable for the 50 nm and 70 nm PtNPs. This may be attributed to similar and stronger interactions for larger nanoparticles, while

the smaller ones induced slighter or no interactions. Subsequently, Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to investigate the thermal properties of epirubicin with PtNPs providing insights into the state of a drug in its complexes. Firstly, in comparison to free EPI, the temperature of the glass transition increased with the nanoparticles addition. The temperature of the EPI melting process was higher after the nanoparticles addition, especially in case of 70 nm PtNPs. The endothermic peaks around 300 °C and the decomposition that occurred in the sample with 70 nm PtNPs could suggest physical mixtures rather than chemical bonds. Nevertheless, the thermal analysis indicated stronger and more stable interactions in the complexes with the largest nanoparticles. In the next step, we employed Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to measure the heat released or absorbed during the PtNPs-EPI interactions. The obtained enthalpy change ( $\Delta H$ ) values for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs indicated an exothermic reaction with the  $\Delta H$  ranging from -1.4 to -0.7 kcal/mol. On the other hand, a value of 0.8 kcal/mol was obtained for the largest nanoparticles, but this could be attributed to a different concentration of the buffer solution. Analogously, the exothermic reaction for the smaller nanoparticles, and the endothermic reaction for the largest were observed in our previous research assessing DOX interactions with PtNPs [37]. Previous results confirmed the presence of the interactions, therefore, in the next phase we decided to perform the aggregation analysis using Dynamic Light Scattering (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) imaging. The measured hydrodynamic diameters confirmed the aggregates formation depending on the EPI concentration, where higher concentration led to the formation of larger aggregates. However, the smallest nanoparticles (5 nm) suspension was polydisperse as evidenced by three peaks around 10 nm, 320 nm and 4303 nm. What is important, the addition of EPI decreased the polydispersity index from 0.49 for 5 nm PtNPs alone to around 0.25 for nanoparticles with the drug and caused the formation of one peak instead of three. The dissimilarity between the AFM imaging and DLS results may be attributed to the difference in the experimental conditions, dry sample on mica surface and liquid sample, respectively. Nevertheless, both experiments confirmed the aggregates formation after the addition of epirubicin, which is crucial in terms of the biological applications. The results for platinum nanoparticles combined with other

agents differ, as some studies reported the presence of aggregation, e.g. PtNPs with DOX [37], or ICR-191 [25], whereas in case of PtNPs with cisplatin [42] this effect was not observed. To complete the aggregation analysis, we used the Zeta potential measurement to assess the stability of the samples. Importantly, the absolute values between  $\pm 30$  to  $\pm 60$  mV indicate physical stability, while the values around 0-5 mV points to strong agglomeration [43]. In this research, the values for 30 nm, 50 nm and 70 nm were approximately -28 to -49 mV, while the EPI addition changed the values to 1.6 - 4.8 mV, which indicated the aggregates formation. Analogously to the DLS results, the zeta potential value for 5 nm PtNPs, amounting to -0.5 mV, suggests that nanoparticles of this size are not homogenous. However, the zeta potential of PtNPs with EPI also shifted to a positive value, suggesting a change in the surface charge properties.

Since the physicochemical methods confirmed the presence of interactions between PtNPs and EPI, we decided to use both prokaryotic and eukaryotic models to investigate whether these interactions could affect the epirubicin biological activity. First, we employed *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98 to perform the Ames mutagenicity assay. In accordance with literature reports [25,44], platinum nanoparticles alone revealed no mutagenic activity in the tested strain (see Supplementary materials, Figure S3). Moreover, for PtNPs with EPI mixtures in all the tested cases, the number of revertants decreased significantly with the nanoparticles addition in comparison to the positive control with EPI alone. In the case of 70 nm PtNPs, the change in the number of revertants per plate was concentration-dependent, while for the rest of nanoparticles sizes it was similar, irrespective of their concentration. As the previous results confirmed, aggregation between PtNPs and EPI occurs, which may be a critical factor in the mutagenicity decrease, due to the limited availability of epirubicin. The described phenomenon was also observed in our previous research with DOX but the effect was more dependent on the increasing nanoparticles concentration [37]. Also, a similar PtNPs influence was revealed for the biological activity of ICR-191 [25] in *S. enterica* TA98 and cisplatin [42] in *S. enterica* TA102. Due to the undeniable effect of platinum nanoparticles on EPI mutagenicity, in the next step we performed cytotoxicity

analysis. Consequently, we used two cell lines: MeUuSo (melanoma cell line) and HaCaT (human keratinocyte cell line) to compare the effect in cancerous and non-cancerous cells. The effects of nanoparticles alone were described in our previous research [45], where PtNPs did not change the cells viability or slightly promoted the growth in non-cancerous cell line compared to the cancerous one, dependently on the nanoparticles' size. Other research on platinum nanoparticles confirmed the opposite effects in cancer versus normal cell lines [46,47]. Importantly, this effect has also been widely described in the context of using platinum nanoparticles as drug delivery platforms [15,26,29,30]. In this research, in non-cancerous HaCaT cell line, the effect of all nanoparticles sizes with most of the epirubicin concentrations (25 – 45  $\mu$ M) was similar; nanoparticles significantly promoted the cell growth in comparison to the EPI alone. However, at the lowest EPI concentration, 5 nm PtNPs decreased the cell viability, but other sizes did not significantly affect the cytotoxicity. The lowest EPI concentration has the smallest capability of inducing aggregation with PtNPs, therefore the cumulative effect of drug and 5 nm PtNPs alone could account for a significant decrease in cell viability. Nevertheless, considering all the results in non-cancerous cell line, PtNPs mostly promoted the cell growth, which can be interpreted as a protective effect of nanoparticles in the healthy tissue. An analogous effect was observed for epirubicin loaded iron oxide nanoparticles, where the complex demonstrated reduced cytotoxicity in the control cells while maintaining the efficiency in cancerous cell line [48]. Moreover, in MeUuSo cancerous cell line, the addition of PtNPs in all the tested sizes enhanced the EPI cytotoxicity and in consequence the cell viability reduction was higher than for EPI alone. Also, the observed effect was size-dependent, with larger nanoparticles inducing a greater decrease in cell viability. The contrasting cytotoxic effects of nanoparticles observed between non-cancerous and cancerous cell lines may be attributed to differences in the cellular metabolism and membrane characteristics of the healthy and cancer cells, as well as variations in nanoparticle uptake or oxidative stress response [49]. Furthermore, Literature reports indicate that usage of unmodified or functionalized platinum nanoparticles as delivery platforms for anthracyclines improve the therapeutic effectiveness and may even overcome the drug resistance [28,50,51].

## Conclusions

In summary, our research consisted of investigating potential interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and epirubicin (EPI), that might impact its biological effects, with particular emphasis on the differences due to nanoparticles size. The results of spectroscopic and calorimetric analyses revealed direct interactions between nanoparticles and EPI, with slight differences depending on the nanoparticles size. Additionally, DLS with Zeta potential measurements and AFM analysis demonstrated that epirubicin promotes nanoparticles aggregation. The biological part revealed that PtNPs reduce the mutagenicity of EPI towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98. Moreover, in the cancerous MeJuSo cell line, PtNPs in all the tested sizes enhanced the epirubicin cytotoxic effect. However, in the non-cancerous HaCaT cell line, nanoparticles, particularly the larger sizes, either promoted the cell growth or had no significant effect. All results provided valuable insights into the possible application of platinum nanoparticles to potentially improve anthracycline-based chemotherapy.

## CRedit author statement

**Patrycja Beldzińska:** Formal Analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing—original draft. **Marcin Zakrzewski:** Investigation, Writing—review & editing. **Katarzyna Grzyb:** Investigation, Resources, Writing—review & editing. **Amandine Hauer:** Investigation, Writing—review & editing. **Marzena Jamrógiewicz:** Investigation, Resources, Writing—review & editing. **Dariusz Wyrzykowski:** Investigation, Resources, Writing—review & editing. **Katarzyna Bury:** Investigation, Writing—review & editing. **Grzegorz Gołuński:** Formal analysis, Writing—review & editing. **Jacek Piosik:** Conceptualization, Formal Analysis, Methodology, Resources, Supervision, Writing—review & editing.

## Acknowledgements

We would like to thank Natalia Derewońko for experimental support.

## **Funding sources**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **Declaration of competing interests**

The authors declare no conflict of interest.

## **Research Data Availability Statement**

Data will be available upon request.

## **References**

1. Bray Bsc F, Laversanne | Mathieu, Hyuna |, Phd S, Ferlay J, Siegel Mph RL, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74: 229–263. doi:10.3322/CAAC.21834
2. Mohammad AA, Alam A, Farooq U, Singh R, Dubey VP, Kumar S, et al. Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review *Open Acc J of Toxicol Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review.* Article in *Open Access Journal of Toxicology.* 2018;2. doi:10.19080/OAJT.2018.02.555600
3. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J, et al. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2021 71:3. 2021;71: 507–526. doi:10.1007/S00262-021-03013-3
4. van den Boogaard WMC, Komninos DSJ, Vermeij WP. Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 627. 2022;14: 627. doi:10.3390/CANCERS14030627
5. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* 2023;10: 1367–1401. doi:10.1016/J.GENDIS.2022.02.007

6. Bonadonna G, Gianni L, Santoro A, Bonfante V, Bidoli P, Casali P, et al. Drugs ten years later: Epirubicin. *Annals of Oncology*. 1993;4: 359–369. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.ANONC.A058514
7. Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*. 2012;21: 142–149. doi:10.1016/J.BREAST.2011.12.012
8. Cortés-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol*. 2007;7: 56–60. doi:10.1007/S12012-007-0015-3
9. Edwardson DW, Narendrula R, Chewchuk S, Mispel-Beyer K, Mapletoft JPJ, Parissenti AM. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab*. 2015;16: 412–426. doi:10.2174/1389200216888150915112039
10. Li W, Zhang Y, Wei Y, Ling G, Zhang Y, Li Y, et al. New insights into mitochondrial quality control in anthracycline-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, therapeutic targets, and natural products. *Int J Biol Sci*. 2025;21: 507. doi:10.7150/IJBS.103810
11. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 2010;10: 1–14. doi:10.1186/1471-2407-10-337
12. Ramos AP, Cruz MAE, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical Reviews* 2017 9:2. 2017;9: 79–89. doi:10.1007/S12551-016-0246-2
13. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*. 2023;7: 70–77. doi:10.1016/J.GLOHJ.2023.02.008
14. Daneshvar F, Salehi F, Karimi M, Vais RD, Mosleh-Shirazi MA, Sattarahmady N. Combined X-ray radiotherapy and laser photothermal therapy of melanoma cancer cells using dual-sensitization of platinum nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2020;203: 111737. doi:10.1016/J.JPHOTOBIO.2019.111737

15. Jeyaraj M, Gurunathan S, Qasim M, Kang MH, Kim JH. A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials* 2019, Vol 9, Page 1719. 2019;9: 1719. doi:10.3390/NANO9121719
16. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology* 2022 20:1. 2022;20: 1–29. doi:10.1186/S12951-022-01477-8
17. Mandal AK. Platinum nanoparticles as delivery system in combating various diseases. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2024;14: 101-115. doi:10.22270/JDDT.V14I7.6644
18. Gholami-Shabani M, Sotoodehnejadnematalahi F, Shams-Ghahfarokhi M, Eslamifar A, Razzaghi-Abyaneh M. Platinum Nanoparticles as Potent Anticancer and Antimicrobial Agent: Green Synthesis, Physical Characterization, and In-Vitro Biological Activity. *J Clust Sci*. 2023;34: 501–516. doi:10.1007/S10876-022-02225-6
19. Rajendran S, Prabha SS, Rathish RJ, Singh G, Al-Hashem A. Antibacterial activity of platinum nanoparticles. *Nanotoxicity: Prevention and Antibacterial Applications of Nanomaterials*. 2020; 275–281. doi:10.1016/B978-0-12-819943-5.00012-9
20. Safdar M, Ozaslan M, Khailany RA, Latif S, Junejo Y, Saeed M, et al. Synthesis, Characterization and Applications of a Novel Platinum-Based Nanoparticles: Catalytic, Antibacterial and Cytotoxic Studies. *J Inorg Organomet Polym Mater*. 2020;30: 2430–2439. doi:10.1007/S10904-019-01387-7
21. Mohammadi H, Abedi A, Akbarzadeh A, Mokhtari MJ, Shahmabadi HE, Mehrabi MR, et al. Evaluation of synthesized platinum nanoparticles on the MCF-7 and HepG-2 cancer cell lines. *International Nano Letters* 2013 3:1. 2013;3: 1–5. doi:10.1186/2228-5326-3-28
22. Baskaran B, Muthukumarasamy A, Chidambaram S, Sugumaran A, Ramachandran K, Manimuthu TR. Cytotoxic potentials of biologically fabricated

platinum nanoparticles from *Streptomyces* sp. on MCF-7 breast cancer cells. *IET Nanobiotechnol.* 2016;11: 241. doi:10.1049/IET-NBT.2016.0040

23. Ghosh S. Novel Anticancer Platinum and Palladium Nanoparticles from *Barleria prionitis*. *Global Journal of Nanomedicine.* 2017;2. doi:10.19080/GJN.2017.02.555600

24. Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, et al. Assessment of the proliferation status of glioblastoma cell and tumour tissue after nanoplatinum treatment. *PLoS One.* 2017;12: e0178277. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0178277

25. Borowik A, Banasiuk R, Derewonko N, Rychlowski M, Krychowiak-Masnicka M, Wyrzykowski D, et al. Interactions of newly synthesized platinum nanoparticles with ICR-191 and their potential application. *Scientific Reports* 2019 9:1. 2019;9: 1–11. doi:10.1038/s41598-019-41092-6

26. Pawar AA, Sahoo J, Verma A, Lodh A, Lakkakula J. Usage of Platinum Nanoparticles for Anticancer Therapy over Last Decade: A Review. *Particle & Particle Systems Characterization.* 2021;38: 2100115. doi:10.1002/PPSC.202100115

27. Fu B, Dang M, Tao J, Li Y, Tang Y. Mesoporous platinum nanoparticle-based nanoplatforms for combined chemo-photothermal breast cancer therapy. *J Colloid Interface Sci.* 2020;570: 197–204. doi:10.1016/J.JCIS.2020.02.051

28. Mukherjee S, Kotcherlakota R, Haque S, Bhattacharya D, Kumar JM, Chakravarty S, et al. Improved delivery of doxorubicin using rationally designed PEGylated platinum nanoparticles for the treatment of melanoma. *Materials Science and Engineering: C.* 2020;108: 110375. doi:10.1016/J.MSEC.2019.110375

29. Chandrakala V, Aruna V, Angajala G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials* 2021 5:6. 2022;5: 1593–1615. doi:10.1007/S42247-021-00335-

X

30. Abed A, Derakhshan M, Karimi M, Shirazinia M, Mahjoubin-Tehran M, Homayonfal M, et al. Platinum Nanoparticles in Biomedicine: Preparation, Anti-Cancer Activity, and Drug Delivery Vehicles. *Front Pharmacol.* 2022;13: 797804. doi:10.3389/FPHAR.2022.797804/XML/NLM
31. Xie P, Wang Y, Wei D, Zhang L, Zhang B, Xiao H, et al. Nanoparticle-based drug delivery systems with platinum drugs for overcoming cancer drug resistance. *J Mater Chem B.* 2021;9: 5173–5194. doi:10.1039/D1TB00753J
32. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The Effect of Nanoparticle Size on In Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomedicine.* 2016;11: 673–692. doi:10.2217/NNM.16.5
33. Dolai J, Mandal K, Jana NR. Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Appl Nano Mater.* 2021;4: 6471–6496. doi:10.1021/ACSANM.1C00987
34. Woziwodzka A, Gwizdek-Wiśniewska A, Piosik J. Caffeine, pentoxifylline and theophylline form stacking complexes with IQ-type heterocyclic aromatic amines. *Bioorg Chem.* 2011;39: 10–17. doi:10.1016/J.BIOORG.2010.11.001
35. Callis PR. Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach. *J Mol Struct.* 2014;1077: 14–21. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2014.04.050
36. Pustovit VN, Shahbazyan T V. Fluorescence quenching near small metal nanoparticles. *Journal of Chemical Physics.* 2012;136. doi:10.1063/1.4721388/71949
37. Bętdzińska P, Zakrzewski M, Mruk I, Bogustawski M, Derewońko N, Bury K, et al. Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2025;209: 107094. doi:10.1016/J.EJPS.2025.107094
38. Zhu J, Li J jun, Wang A qing, Chen Y, Zhao J wu. Fluorescence Quenching of Alpha-Fetoprotein by Gold Nanoparticles: Effect of Dielectric Shell on Non-

Radiative Decay. *Nanoscale Res Lett.* 2010;5: 1496. doi:10.1007/S11671-010-9668-0

39. Aboalhassan AA, El-Daly SA, Ebeid EZM, Sakr MAS. Plasmonic Surface of Metallic Gold and Silver Nanoparticles Induced Fluorescence Quenching of Meso-Terakis (4-Sulfonatophenyl) Porphyrin (TPPS) and Theoretical–Experimental Comparable. *J Fluoresc.* 2022;32: 2257. doi:10.1007/S10895-022-03022-0

40. Farokhcheh A, Alizadeh N. Effect of silver nanoparticles concentration on the metal enhancement and quenching of ciprofloxacin fluorescence intensity. *Journal of the Iranian Chemical Society.* 2013;10: 799–805. doi:10.1007/S13738-012-0215-Z

41. López-Lorente Ál, Mizaikoff B. Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2016;84: 97–106. doi:10.1016/J.TRAC.2016.01.012

42. Bętdzińska P, Galikowska-Bogut B, Zakrzewski M, Bury K, Jamrógięwicz M, Wyrzykowski D, et al. Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity? *Chem Biol Interact.* 2025;407: 111365. doi:10.1016/J.CBI.2024.111365

43. Mahbulul IM. Stability and Dispersion Characterization of Nanofluid. *Preparation, Characterization, Properties and Application of Nanofluid.* 2019; 47–112. doi:10.1016/B978-0-12-813245-6.00003-4

44. Maenosono S, Suzuki T, Saita S. Mutagenicity of water-soluble FePt nanoparticles in ames test. *Journal of Toxicological Sciences.* 2007;32: 575–579. doi:10.2131/JTS.32.575,

45. Bętdzińska P, Zakrzewski M, Mruk I, Boguśławski M, Derewońko N, Bury K, et al. Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2025;209: 107094. doi:10.1016/J.EJPS.2025.107094

46. Bendale Y, Bendale V, Paul S. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through

induction of apoptosis. *Integr Med Res.* 2017;6: 141–148. doi:10.1016/j.imr.2017.01.006

47. W FA, Jose J, E I A. Assessing anticancer properties of PEGylated platinum nanoparticles on human breast cancer cell lines using in-vitro assays. *Biomed Phys Eng Express.* 2024;10: 065019. doi:10.1088/2057-1976/AD795D

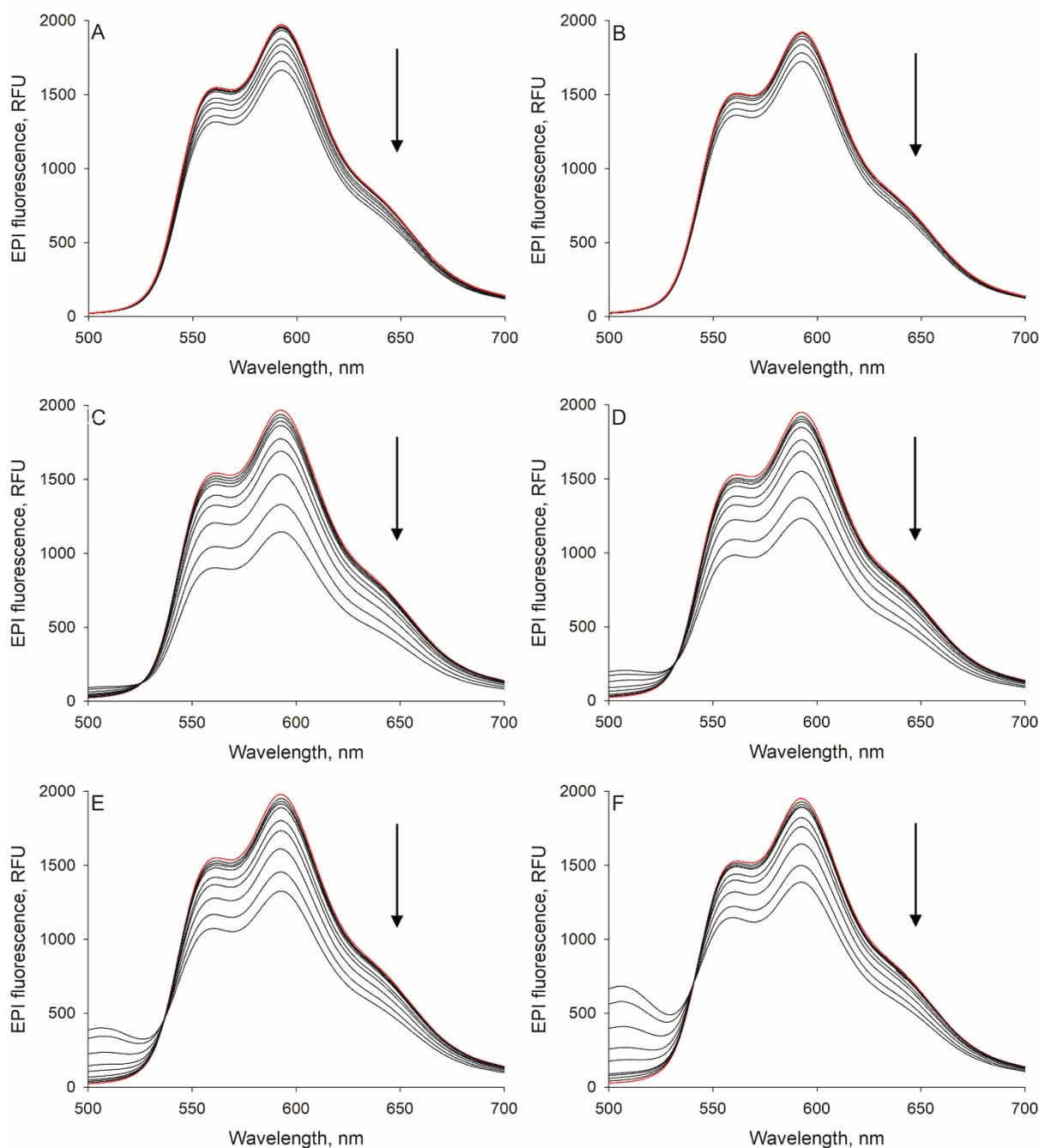
48. Jalalian SH, Taghdisi SM, Hamedani NS, Kalat SAM, Lavaee P, ZandKarimi M, et al. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013;50: 191–197. doi:10.1016/j.ejps.2013.06.015

49. Awashra M, Młynarz P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an in vitro metabolomic perspective. *Nanoscale Adv.* 2023;5: 2674–2723. doi:10.1039/D2NA00534D

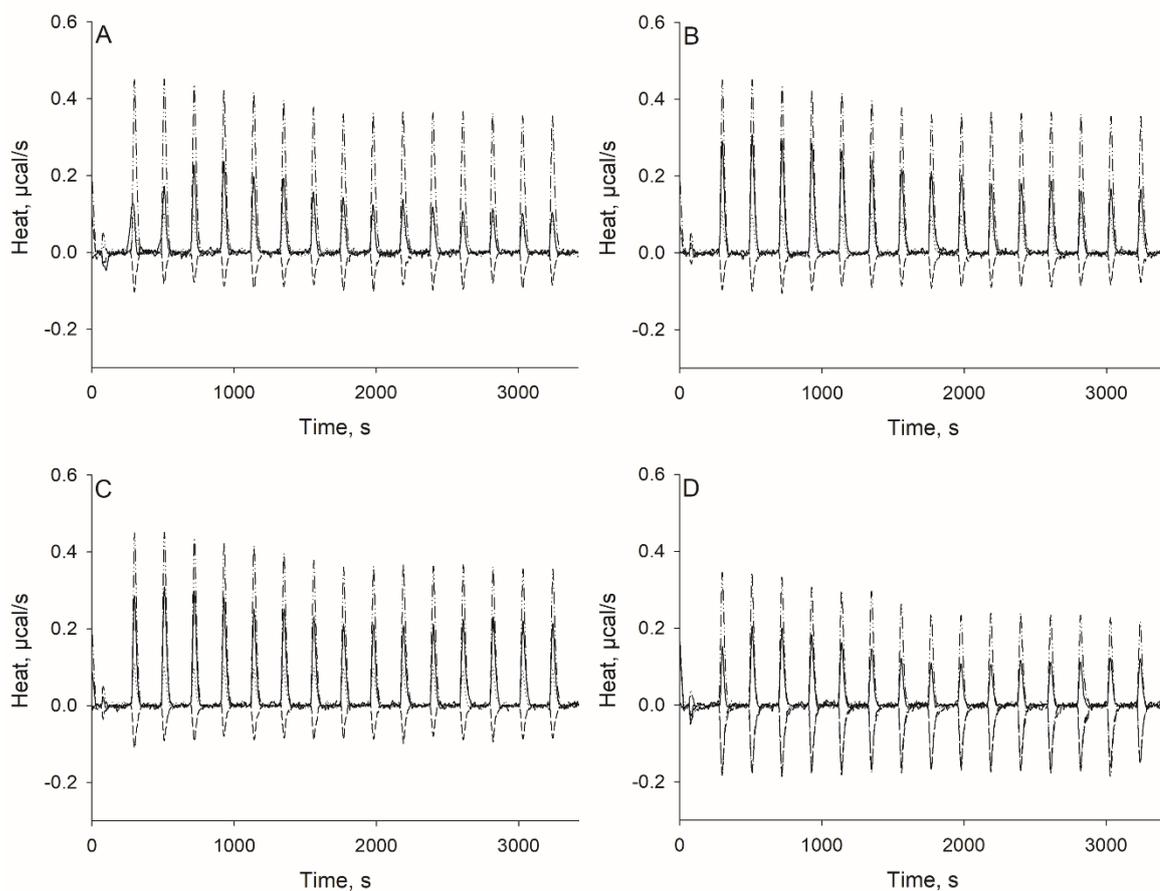
50. Fu B, Dang M, Tao J, Li Y, Tang Y. Mesoporous platinum nanoparticle-based nanoplatforms for combined chemo-photothermal breast cancer therapy. *J Colloid Interface Sci.* 2020;570: 197–204. doi:10.1016/J.JCIS.2020.02.051

51. Kalindemirtaş FD, Cilasun GE, Kariper A. Enhanced therapeutic efficacy of platinum-doxorubicin nanoparticles on colon and breast cancer cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2025; 1–17. doi:10.1007/S00210-025-04080-4

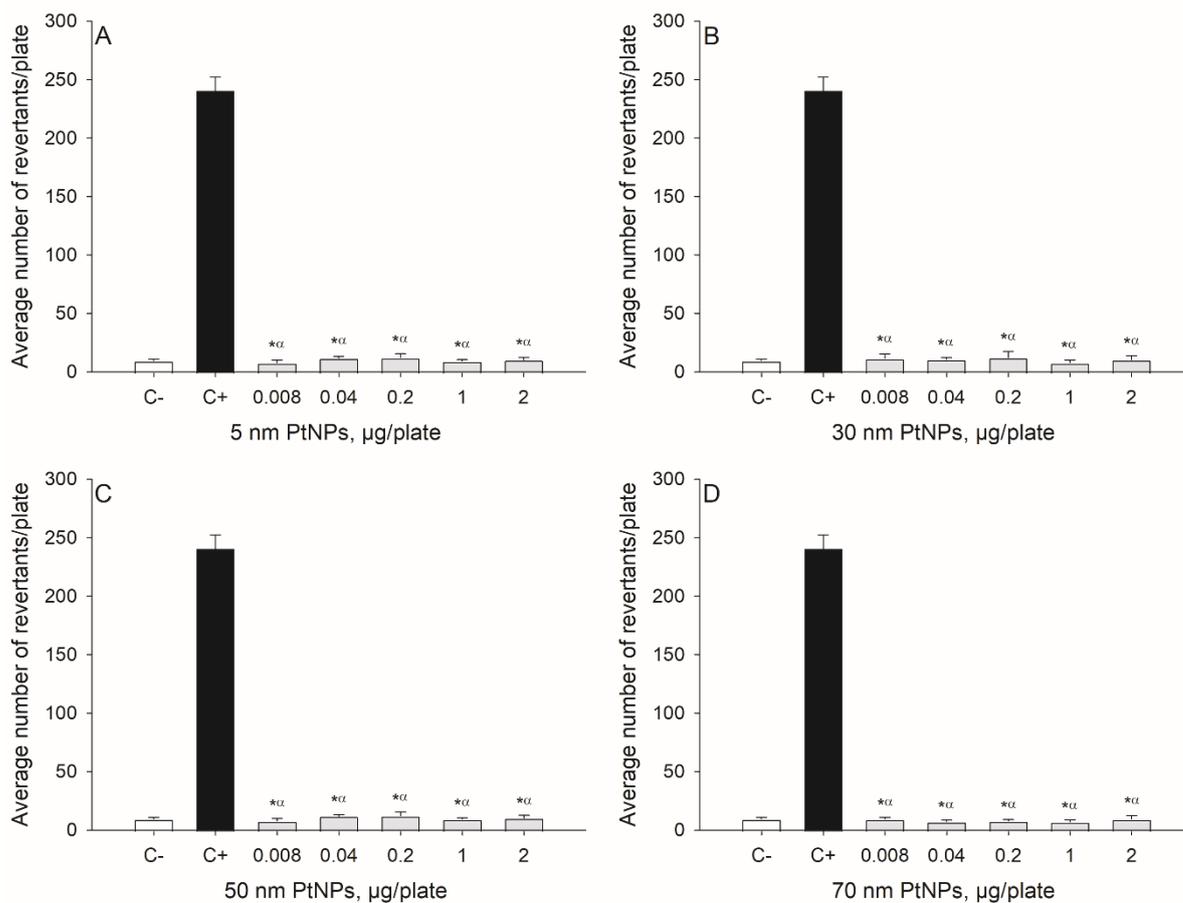
## Supplementary materials



**Figure S1. Fluorescence spectra of epirubicin (EPI) titrated with platinum nanoparticles (PtNPs).** (A) EPI with 2 mM sodium citrate – control for 5 nm, 30 nm and 50 nm PtNPs. (B) EPI with 4 mM sodium citrate – control for 70 nm PtNPs. (C) EPI with 5 nm PtNPs. (D) EPI with 30 nm PtNPs. (E) EPI with 50 nm PtNPs. (F) EPI with 70 nm PtNPs. The arrow indicates EPI dilution. EPI initial concentration 21.23  $\mu\text{M}$  (red line); PtNPs concentration range 0.24 – 10.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Fig. S2. Thermal effects of interactions between platinum nanoparticles (PtNPs) and epirubicin (EPI).** Thermograms presenting microcalorimetric titrations of PtNPs with EPI (solid line), sodium citrate solution with EPI (dash-dotted line), water with PtNPs (dashed line), and water with sodium citrate solution (dotted line) for (A) 5 nm PtNPs, (B) 30 nm PtNPs, (C) 50 nm PtNPs, (D) 70 nm PtNPs, shown as heat released in time.



**Fig. S3. Mutagenic activity of platinum nanoparticles (PtNPs) towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA98.** (A) 5 nm PtNPs. (B) 30 nm PtNPs. (C) 50 nm PtNPs. (D) 70 nm PtNPs. C- negative control (sterile water; white color), C+ positive control (EPI 1000 ng/plate; black color), PtNPs (0.008 – 2 µg/plate; grey color). Results are reported as the average number of revertants  $\pm$  standard deviation. \* significant difference from the positive control ( $p < 0.05$ ); <sup>a</sup> no significant difference from the negative control ( $p > 0.05$ ).

### **9.3.1. Oświadczenia współautorów do publikacji nr 3**

**Patrycja Beldzińska**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiwicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gołufski Grzegorz, Piosik Jacek.

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

zaprojektowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu pomiarów i opracowaniu wyników spektrometrii fluorescencyjnej, przygotowaniu próbek, opracowaniu surowych danych oraz analizie danych z użyciem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC), przygotowaniu próbek oraz pomocy w interpretacji wyników spektrometrii w podczerwieni (FTIR i NIR) oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), przeprowadzeniu pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS), przygotowaniu próbek oraz interpretacji obrazowania przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM), przygotowaniu próbek i interpretacji wyników pomiarów potencjału zeta, wykonaniu, analizie i interpretacji wyników testów mutagenności Ames, z wykorzystaniem bakterii *Salmonella enterica*, przygotowaniu próbek, opracowaniu danych oraz interpretacji wyników testów cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórkowych MeUuSo i HaCaT. Ponadto, przygotowałam ryciny, opracowałam manuskrypt oraz wykonałam korekty po poprawkach współautorów.

*Patrycja Beldzińska*

Gdańsk, 30.05.2025

**dr hab. Jacek Piosik, prof. UG**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gołuński Grzegorz, Piosik Jacek.

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

sprawowaniu opieki merytorycznej i metodologicznej oraz wsparciu w interpretacji wyników i dyskusji naukowej. Jednocześnie podkreślam, iż mgr Patrycja Beldzińska pełniła wiodącą rolę w powstanie powyższego manuskryptu.



Signed by /  
Podpisano przez:

Jacek Gabriel Piosik  
Uniwersytet Gdański

Date / Data: 2025-  
06-03 09:32

Gdańsk, 28.05.2025

**dr Katarzyna Grzyb**  
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gotuński Grzegorz, Piosik Jacek.

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

- przeprowadzeniu doświadczenia mającego na celu zbadanie cytotoksyczności nanocząstek platyny z epirubicyną na liniach komórkowych HaCaT i MeUuSo.

*Katarzyna Grzyb*

Gdańsk, 28.05.2025

**dr hab. n. farm. Marzena Jamrógiewicz**  
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gotuński Grzegorz, Piosik Jacek.**

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na: badaniu tożsamości składników próbek oraz interpretacji występujących interakcji z nanocząstkami metodą spektroskopii w podczerwieni i bliskiej podczerwieni, a także dobraniu warunków analiz DSC próbek epirubicyny objętej pracą, wykonaniu analiz oraz interpretacji tej części wyników we współpracy z Panią mgr Patrycją Betdzińską i najbliższym zespołem Pana prof. Jacka Piosika



Gdańsk, 28.05.2025

**dr hab. Dariusz Wyrzykowski, prof. UG**  
Pracownia Biologicznej Chemii Nieorganicznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiwicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gołuński Grzegorz, Piosik Jacek.**

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał wyłącznie na technicznej obsłudze izotermicznego kalorymetru miareczkowego (ITC) zgodnie z parametrami podanymi przez Panią mgr Patrycję Beldzińską. Powyższej pracy nie wykorzystałem i nie zamierzam wykorzystać w postępowaniu o nadanie jakiegokolwiek stopnia naukowego lub zawodowego.

KIEROWNIK  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej  
  
dr hab. Dariusz Wyrzykowski  
profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk, 28.05.2025

**dr Katarzyna Bury**  
Zakład Biologii Molekularnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Beldzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógiwicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gołuński Grzegorz, Płosik Jacek.

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

Opracowaniu i optymalizacji procedury przygotowania próbek do analizy z wykorzystaniem Mikroskopii Sił Atomowych (AFM), przeprowadzeniu obrazowania cząsteczek z wykorzystaniem techniki AFM oraz pomiarach uzyskanych danych.



Gdańsk, 02.06.2025

**dr Grzegorz Gołuński**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja**, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógliewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gołuński Grzegorz, Piosik Jacek.

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

wsparciu w opracowywaniu metodologii i interpretacji wyników oraz redagowaniu manuskryptu.

Grzegorz Gołuński

Gdańsk, 02.06.2025

**mgr Marcin Zakrzewski**  
Pracownia Biofizyki  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

**Betdzińska Patrycja, Zakrzewski Marcin, Grzyb Katarzyna, Hauer Amandine, Jamrógliewicz Marzena, Wyrzykowski Dariusz, Bury Katarzyna, Gotuński Grzegorz, Piosik Jacek.**

„Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity”

mój udział polegał na:

wsparciu w analizie mutagenności testem Ames oraz redagowaniu manuskryptu.

*Marcin Zakrzewski*

## 10. Dorobek naukowy

### 10.1. Publikacje wchodzące w skład przewodu doktorskiego

- I. **Bętdzińska, P.**, Galikowska-Bogut, B., Zakrzewski, M., Bury, K., Jamrógiewicz, M., Wyrzykowski, D., Gołuński, G., Sądej, R., Piosik, J., 2025. Platinum as both a drug and its modulator – Do platinum nanoparticles influence cisplatin activity? *Chemico-Biological Interactions*, 407, 111365. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2024.111365>. IF<sub>2023</sub> 4.7, MNiSW<sub>2024</sub> 100
- II. **Bętdzińska, P.**, Zakrzewski, M., Mruk, I., Bogustawski, M., Derewońko, N., Bury K., Wyrzykowski, D., Gołuński, G., Rychłowski, M., Piosik, J. 2025. Size dependent impact of platinum nanoparticles on doxorubicin activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 209: 107094. doi:10.1016/J.EJPS.2025.107094. IF<sub>2023</sub> 4.3, MNiSW<sub>2024</sub> 100

+ gotowy manuskrypt

- III. **Bętdzińska, P.**, Zakrzewski, M., Grzyb, K., Hauer, A., Jamrógiewicz, M., Wyrzykowski, D., Bury, K., Gołuński, G., Piosik, J. 2025. Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity.

### 10.2. Publikacje niewchodzące w skład przewodu doktorskiego

- I. Prylutsky, Y.\*, **Bętdzińska, P.\***, Derewońko, N., Halenova, T., Raksha, N., Zakrzewski, M., Gołuński, G., Prylutska, S., Ritter, U., Savchuk, O., Piosik, J. 2025. Biosafety and Blood Compatibility of Graphene Oxide Particles in In Vitro Experiments. *Materials* 2025, Vol. 18, Page 2128, 18(9), 2128. <https://doi.org/10.3390/MA18092128> \*equal contribution
- II. Gołuński, G., Konkel, K., Galikowska Bogut, B., **Bętdzińska, P.**, Bury, K., Zakrzewski, M., Butowska, K., Sądej, R., Piosik, J., 2024. Influence of silver nanoparticles' size on their direct interactions with doxorubicin and its biological effects. *Scientific Reports* 2024 14:1 14, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69724-6>

- III. Jamrógiewicz, M., Bray, A., Gołuński, G., **Betdzińska, P.**, Zakrzewski, M. 2024. Photodegradation of indomethacin and naproxen contained within commercial products for skin – RAP. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 246, 116201. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2024.116201>
- IV. Zgórzynska, E., Krawczyk, K., **Betdzińska, P.**, Walczewska, A. 2021. Molecular basis of proteinopathies: Etiopathology of dementia and motor disorders. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 75, 456–473. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.9513>

### 10.3. Doniesienia konferencyjne własne

- I. Poster – „How do platinum nanoparticles affect the biological activity of doxorubicin?” **Patrycja Betdzińska**, Marcin Zakrzewski, Inez Mruk, Natalia Derewońko, Katarzyna Bury, Grzegorz Gołuński, Michał Rychłowski, Jacek Piosik. 19th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF2025). 23-26.06.2025
- II. Poster – „Platinum nanoparticles as cisplatin modulators – direct interactions and biological effects” – **Patrycja Betdzińska**, Kamila Butowska, Grzegorz Gołuński, Marcin Zakrzewski, Barbara Galikowska-Bogut, Rafał Sądej, Augustyn Moliński, Jacek Piosik. 5th Congress of Polish Biosciences BIO2023 – “Different faces of biosciences”. 13-16.09.2023
- III. Poster – „Platinum nanoparticles with cisplatin – direct interactions and mutagenicity modulation” – **Patrycja Betdzińska**, Kamila Butowska, Grzegorz Gołuński, Marzena Jamrógiewicz, Augustyn Moliński, Jacek Piosik. 18th Congress of the Polish Biophysical Society. 06-09.09.2022
- IV. Prezentacja ustna – “The impact of platinum nanoparticles on cisplatin and carboplatin: interactions and biological activity of the analyzed compounds” - **Patrycja Betdzińska**, Kamila Butowska, Dariusz Wyrzykowski, Jacek Piosik. National Scientific Conference Science and Young Researchers V edition. 05.06.2021

- V. Poster – “Platinum nanoparticles and cisplatin: interactions and biological activity of the analyzed substances” - **Patrycja Beldzińska**, Kamila Butowska, Dariusz Wyrzykowski, Jacek Piosik. IXth Intercollegiate Biotechnology Symposium “Symbioza”. 21-23.05.2021
- VI. Prezentacja ustna, nagrodzona – „Nanocząstki platyny - interakcje i modulacja aktywności chemioterapeutyków platynowych” - **Patrycja Beldzińska**, Kamila Butowska, Dariusz Wyrzykowski, Jacek Piosik. Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa „Diagnostyczno-biotechnologiczne Zagłębienie Nauki”. 07.05.2021
- VII. Poster – “Interactions of Platinum Nanoparticles with Cisplatin and Their Influence on the Biological Activity of the Analyzed Substance” - **Patrycja Beldzińska**, Kamila Butowska, Dariusz Wyrzykowski, Jacek Piosik. e-Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 19.12.2020
- VIII. Poster – “Interactions of platinum nanoparticles with cisplatin and carboplatin, and their influence on the biological activity of the analyzed substances” - **Patrycja Beldzińska**, Kamila Butowska, Dariusz Wyrzykowski, Jacek Piosik. I Pomorskie Sympozjum Chemiczne. 26-27.09.2020

#### **10.4. Doniesienia konferencyjne – współautorstwo**

- I. Prezentacja ustna – „Metallic nanoparticles as potential modulators of anticancer therapy” – Grzegorz Gołuński, **Patrycja Beldzińska**, Marcin Zakrzewski, Barbara Galikowska-Bogut, Natalia Derewońko, Katarzyna Bury, Marzena Jamrógiewicz, Dariusz Wyrzykowski, Rafał Sądej, Jacek Piosik. 19th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF2025). 23-26.06.2025
- II. Poster – „Platinum nanoparticles interact with idarubicin and affect its biological activity” - Marcin Zakrzewski, **Patrycja Beldzińska**, Grzegorz Gołuński, Dariusz Wyrzykowski, Katarzyna Bury, Jacek Piosik. 19th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF2025). 23-26.06.2025

- III. Prezentacja ustna – „Photodegradation of API contained within commercial products for skin” - Marzena Jamrogiewicz, Adam Bray, Grzegorz Gołuński, **Patrycja Bętdzińska**. IV Poznańska Konferencja Współczesna Analityka Farmaceutyczna i Biomedyczna w Ochronie Zdrowia. 23-24.10.2023
- IV. Prezentacja ustna – “Silver nanoparticles as doxorubicin carriers – direct interactions and modulation of biological effects” - Kinga Konkel, Barbara Galikowska-Bogut, **Patrycja Bętdzińska**, Katarzyna Bury, Marcin Zakrzewski, Kamila Butowska, Rajmund Kaźmierkiewicz, Rafał Sądej, Jacek Piosik, Grzegorz Gołuński. 5th Congress of Polish Biosciences BIO2023 – “Different faces of biosciences”. 13-16.09.2023
- V. Poster – “Platinum nanoparticles and their interactions with daunorubicin” - Marcin Zakrzewski, **Patrycja Bętdzińska**, Grzegorz Gołuński, Jacek Piosik. 5th Congress of Polish Biosciences BIO2023 – “Different faces of biosciences”. 13-16.09.2023
- VI. Poster – „Interactions of platinum nanoparticles and daunomycin – binding, release, and biological activity” - Marcin Zakrzewski, **Patrycja Bętdzińska**, Jacek Piosik, Grzegorz Gołuński. 18th Congress of the Polish Biophysical Society. 06-09.09.2022

#### **10.5. Kursy i szkolenia**

Bioinformatics and Comparative Genomics (George DiCenzo) - 06.03-10.03.2023

Szkolenie z oprogramowania Statistica (Statsoft Polska) - 24.02.2023

Mikroskopia przyszłości - Morze możliwości (KAWA.SKA) - 23-24.11.22

Systems biology - computational biology (Marco Fondi) - 08-18.11.22

Zaawansowane szkolenie z zasad działania i obsługi analizatora Malvern

NanoSight NS300 - 24.06.2021

Zarządzanie karierą - projekt ProUG - 06.11.2020

## **10.6. Inna działalność**

Aktywność dydaktyczna 2021 – 2025

- Statystyka w biotechnologii
- Zastosowanie wybranych metod analizy statystycznej w biotechnologii

Członek Rady Doktorantów Międzyuczelnianej Szkoły Doktorskiej Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – 2023 - 2025

Członek Polskiego Towarzystwa Biofizycznego (PTBF) - 2021 – obecnie

- w tym Sekretarz Oddziału Gdańskiego PTBF - 2022 – 2025
- Prowadzenie seminarium PTBF pt. „Nanocząstki platyny jako potencjalne modulatory aktywności wybranych leków przeciwnowotworowych” - 21.03.2023

Członek Koła Naukowego BIO-MED – 2019 - 2022