



Załącznik 3A
Autoreferat

***BIOFUNKCJONALIZOWANE NANOCZĄSTKI
HYBRYDOWE W TERAPII I DIAGNOSTYCE
NOWOTWORÓW***

dr inż. Bartosz F. Grześkowiak

Centrum NanoBioMedyczne
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań 2024



Spis treści

1. Dane personalne	4
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	5
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)	6
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	6
4.2. Prace wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego.....	6
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	9
4.3.1. Wstęp.....	10
4.3.2. Nanocząstki hybrydowe w terapiach multimodalnych.....	13
4.3.2.1. Nanocząstki PDA do skojarzonej chemioterapii, terapii genowej i terapii fototermicznej.....	13
4.3.2.2. Nanocząstki PDA do celowanej, skojarzonej chemioterapii i terapii fototermicznej.....	18
4.3.2.3. Nanocząstki magnetyczne pokryte PDA do celowanej, skojarzonej chemioterapii i terapii fototermicznej.....	22
4.3.3. Nanocząstki hybrydowe do teranostyki.....	25
4.3.3.1. Porowate nanocząstki PDA modyfikowane jonami metali na potrzeby terapii i diagnostyki.....	26
4.3.3.2. Porowate nanocząstki PDA pokryte błoną komórkową do terapii i obrazowania MRI.....	28
4.3.3.3. Nanodiamenty pokryte PDA do terapii fototermicznej i obrazowania fluorescencyjnego.....	33
4.3.4. Podsumowanie.....	36
5. Istotna aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	39
5.1. Opis dorobku naukowego nie związanego z tematem habilitacji.....	39
5.2. Współpraca międzynarodowa i krajowa.....	45
5.3. Staże zagraniczne.....	47
5.4. Staże krajowe.....	47
6. Osiągnięciach dydaktyczne, organizacyjne oraz popularyzujące naukę	48
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne.....	48
6.2. Działalność popularyzująca naukę.....	50
6.3. Osiągnięcia organizacyjne.....	51
7. Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej	52
7.1. Kierowanie i udział w projektach badawczych.....	52
7.2. Zgłoszenia patentowe.....	54

7.3. Udział w konferencjach i sympozjach.....	55
7.4. Aktywność recenzencka.....	56
7.5. Nagrody.....	56
7.6. Udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych.....	57
7.7. Dane naukometryczne.....	58
4. Bibliografia.....	58

1.

Dane personalne

 Bartosz Franciszek Grześkowiak (Bartosz F. Grześkowiak)
 bartosz.grzeskowiak@amu.edu.pl

Profile naukowe

 ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1563-1262>

 Google Scholar

https://scholar.google.com/citations?hl=pl&user=DRWHudwAAAAJ&view_op=list_works&sortby=pubdate

 Scopus*

www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56270570400

 ResearchGate

www.researchgate.net/profile/Bartosz-Grzeskowiak

2.

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2014 **stopień doktora w dyscyplinie biotechnologia** (dziedzina nauk rolniczych)
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Development of vector nanodelivery system for transgenesis (Opracowanie system wprowadzania transgenów z wykorzystaniem nanotechnik)*
Promotor: prof. dr hab. Ryszard Słomski
Promotor pomocniczy: dr Anna Woźniak
- 2010 **magister inżynier biotechnologii**
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Tytuł pracy magisterskiej: *Analiza polimorfizmu genu tkankowego inhibitora metaloproteinaz TIMP-3 w tętniaku aorty brzusznej i niedrożności aortalno – biodrowej*
Promotor: dr Aleksandra Korcz

3.

Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

06.2019 – obecnie	adiunkt badawczy , Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
10.2018 – 05.2019	stażysta podoktorski w projekcie <i>Nowe, wielozadaniowe nanocząstki w skojarzonej geno- i fototerapii</i> , NCN, (2016/21/B/ST8/00477), Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
07.2015 – 09.2018	specjalista naukowo-techniczny , Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
12.2014 – 06.2015	stażysta podoktorski w projekcie <i>Rozwój kształcenia w zakresie nanotechnologii na Politechnice Poznańskiej w oparciu o współpracę z Centrum NanoBioMedycznym UAM i Università degli Studi di Trieste</i> , NCBiR, (POKL.04.01.01-00-049/13), Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
10.2014 – 11.2014	specjalista naukowo-techniczny w projekcie <i>Nanomateriały o potencjalnym zastosowaniu w biomedycynie</i> , NCBiR, (PBS1/A9/13/2012), Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska
10.2010 – 09.2014	doktorant , Międzynarodowe Projekty Doktoranckie <i>The PhD Program in Nanoscience and Nanotechnology</i> , Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska

4.

Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl siedmiu tematycznie powiązanych publikacji zatytułowany:

BIOFUNKCJONALIZOWANE NANOCZĄSTKI HYBRYDOWE W TERAPII I DIAGNOSTYCE NOWOTWORÓW

4.2. Publikacje wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego

[A1] Żebrowska Klaudia, Grabowska Małgorzata, Coy Emerson, Rolle Katarzyna, Mrówczyński Radosław*, Grześkowiak Bartosz F.*

In vitro anticancer activity of melanin-like nanoparticles for multimodal therapy of glioblastoma

(2024) Nanotechnology Reviews, 13: 20230206,

➤ Impact Factor (2023): 6.1; MNiSW: 70

(*autor ko-korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: zdefiniowanie problemu badawczego, współpracowanie koncepcji badań, nadzorowanie całości prac jako lider zespołu, zaplanowanie metodyki badań, codzienny nadzór merytoryczny nad doktorantką (pierwszy autor manuskryptu) w zakresie biofunkcjonalizacji nanocząstek i prowadzenia badań biologicznych, przeprowadzenie części badań biologicznych (analiza wiązania kwasów nukleinowych, testy cytotoksyczności nanomateriałów, testy z wykorzystaniem lasera NIR, obrazowanie z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej), opracowanie, interpretacja oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników, pisanie i edycja manuskryptu (autor korespondencyjny odpowiedzialny za całość publikacji), przygotowanie większości rycin (ryciny nr 3, 4, 5, 6, 7), odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz zapewnienie finansowania badań (badania prowadzono m.in. w ramach projektu SONATA, którego byłem kierownikiem).

[A2] Grześkowiak Bartosz F.*, Maziukiewicz Damian, Kozłowska Agata, Kertmen Ahmet, Coy Emerson, Mrówczyński Radosław*

Polyamidoamine dendrimers decorated multifunctional polydopamine nanoparticles for targeted chemo-and photothermal therapy of liver cancer model

(2021) International Journal of Molecular Sciences, 22 (2), art. no. 738, pp. 1-16.

- Impact Factor (2021): 6.208; MNiSW: 140
- Liczba cytowań: 26 (Scopus), 27 (GS), 20 (WoS)

(*autor ko-korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: zdefiniowanie problemu badawczego, współpracowanie koncepcji badań, nadzorowanie prac dotyczących biofunkcjonalizacji nanomateriałów, zaplanowanie metodyki i przeprowadzenie badań biologicznych (testy cytotoksyczności nanomateriałów, testy z wykorzystaniem lasera NIR, obrazowanie komórek z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej), opracowanie, interpretacja oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników, pisanie i edycja manuskryptu (autor korespondencyjny odpowiedzialny za całość publikacji), przygotowanie wszystkich rycin oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów.

[A3] Jędrzak Artur, Grześkowiak Bartosz F., Golba Klaudia, Coy Emerson, Synoradzki Karol, Jurga Stefan, Jesionowski Teofil, Mrówczyński Radosław*

Magnetite nanoparticles and spheres for chemo-and photothermal therapy of hepatocellular carcinoma in vitro

(2020) International Journal of Nanomedicine, 15, pp. 7923-7936.

- Impact Factor (2020): 6.4; MNiSW: 140
- Liczba cytowań: 37 (Scopus), 42 (GS), 32 (WoS)

Wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji badań biologicznych, nadzorowanie prac dotyczących biofunkcjonalizacji nanomateriałów, zaplanowanie metodyki i przeprowadzenie badań biologicznych (testy cytotoksyczności nanomateriałów, testy z wykorzystaniem lasera NIR, obrazowanie komórek z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej), opracowanie, interpretacja oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników badań biologicznych, pisanie i edycja manuskryptu, przygotowanie części rycin (ryciny nr 5, 6, S5, S6 i S7).

[A4] Bigaj-Józefowska Magdalena J., Zalewski Tomasz, Załęski Karol, Coy Emerson, Frankowski Marcin, Mrówczyński Radosław, Grześkowiak Bartosz F.*

Three musketeers of PDA-based MRI contrasting and therapy

(2024) Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 2024, 52(1), pp. 321–333,

- Impact Factor (2023): 4.5; MNiSW: 70

(* autor korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: zdefiniowanie problemu badawczego i opracowanie koncepcji badań, nadzorowanie całości prac jako lider zespołu, zaplanowanie metodyki badań, codzienny nadzór merytoryczny nad doktorantką (pierwszy autor manuskryptu) w zakresie syntezy i biofunkcjonalizacji nanocząstek, przeprowadzenie badań biologicznych (testy cytotoksyczności nanocząstek), opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników, pisanie i edycja manuskryptu (autor korespondencyjny), odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz zapewnienie finansowania badań (badania prowadzono w ramach projektu SONATA, którego byłem kierownikiem).

[A5] Bigaj-Józefowska Magdalena J., **Grześkowiak Bartosz F.***

Polymeric nanoparticles wrapped in biological membranes for targeted anticancer treatment

(2022) European Polymer Journal, 176, art. no. 111427,

- Impact Factor (2022): 6.0; MNiSW: 100
- Liczba cytowań: 15 (Scopus), 19 (GS), 15 (WoS)

(*autor korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: opracowanie koncepcji oraz sformułowanie głównych tez pracy, nowatorski sposób prezentacji i organizacji danych pozwalający na analizę tematu pod niezbadanym dotąd kątem, zebranie, analiza i interpretacja większości źródeł literaturowych, współprzygotowanie części rycin (zebranie zgód z wydawnictw na wykorzystanie rycin nr 2 – 13 w publikacji), przygotowanie tabel, pisanie i edycja manuskryptu (autor korespondencyjny), odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz zapewnienie finansowania badań (badania przeprowadzono w ramach projektu SONATA, którego byłem kierownikiem).

[A6] Bigaj-Józefowska Magdalena J., Coy Emerson, Załęski Karol, Zalewski Tomasz, Grabowska Małgorzata, Jaskot Kaja, Perrigue Patrick, Mrówczyński Radosław, **Grześkowiak Bartosz F.***

Biomimetic theranostic nanoparticles for effective anticancer therapy and MRI imaging

(2023) Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 249, 112813,

- Impact Factor (2023): 3.9; MNiSW: 140
- Liczba cytowań: 5 (Scopus), 5 (GS), 4 (WoS)

(*autor korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: zdefiniowanie problemu badawczego i opracowanie koncepcji badań, nadzorowanie całości prac jako lider zespołu, zaplanowanie metodyki badań, codzienny nadzór merytoryczny nad doktorantką (pierwszy autor manuskryptu) w zakresie syntezy i biofunkcjonalizacji nanocząstek, przeprowadzenie części badań biologicznych (testy cytotoksyczności nanomateriałów, testy z wykorzystaniem lasera NIR, obrazowanie komórek za pomocą konfokalnej

mikroskopii fluorescencyjnej), opracowanie i interpretacje uzyskanych wyników, pisanie i edycja manuskryptu (autor korespondencyjny), odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz zapewnienie finansowania badań (badania przeprowadzono w ramach projektu SONATA, którego byłem kierownikiem).

- [A7] Maziukiewicz Damian, Mrówczyński Radosław*, Jurga Stefan, **Grześkowiak Bartosz F.***
Laser synthesized nanodiamonds with hyper-branched polyglycerol and polydopamine for combined imaging and photothermal treatment
(2022) Diamond and Related Materials, 128, art. no. 109308,
➤ Impact Factor (2022): 4.1; MNiSW: 100
➤ Liczba cytowań: 6 (Scopus), 6 (GS), 6 (WoS)
(*autor ko-korespondencyjny)

Wkład w powstanie pracy: zdefiniowanie problemu badawczego, współopracowanie koncepcji badań, nadzorowanie prac dotyczących funkcjonalizacji nanomateriałów, zaplanowanie metodyki badań biologicznych, przeprowadzenie badań biologicznych (testy cytotoksyczności nanomateriałów, testy z wykorzystaniem lasera NIR, obrazowanie z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej), opracowanie, interpretacja oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników, edycja manuskryptu (autor korespondencyjny odpowiedzialny za całość publikacji), przygotowanie większości rycin (ryciny nr 2, 3, 4, 5), odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Dane naukometryczne dla publikacji wchodzących w skład cyklu:

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor): 37.208

Suma punktów MNiSW: 760

Impact Factor – współczynnik oddziaływania z roku opublikowania pracy.

MNiSW – punktacja czasopism wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z wykazem obowiązującym w okresie ukazania się pracy.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Nanobiotechnologia to interdyscyplinarny obszar badań obejmujący szeroki oraz zróżnicowany wachlarz technologii z pogranicza fizyki, chemii i biologii, który służy do projektowania, syntezy i modyfikacji materiałów w skali nanometrycznej, a także ich wykorzystania m.in. w medycynie, rolnictwie czy przemyśle spożywczym. Różne biomedyczne zastosowania nanostruktur wynikają z ich specyficznych właściwości fizykochemicznych i biologicznych, jak chociażby rozmiar, kształt, stosunek powierzchni

do objętości, ładunek powierzchniowy, stabilność w roztworach wodnych, biofunkcjonalizacja, biodostępność czy też toksyczność. Niewątpliwie nanobiotechnologia zyskuje coraz większe znaczenie w dziedzinie medycyny, przyczyniając się do poprawy skuteczności terapii poprzez inkorporację różnych biomolekuł w strukturę nanomateriałów. Biocząsteczki, takie jak małe molekuly (leki niskocząsteczkowe), węglowodany, peptydy, przeciwciała czy kwasy nukleinowe są często przyłączane do nanocząstek. Taka biofunkcjonalizacja pozwala na powstawanie unikalnych interakcji na poziomie komórkowym, w celu rozpoznania danego typu komórek, a także wywołania w nich określonego efektu. Bionanomateriały oferują wyjątkowe zalety jako nośniki, środki poprawiające detekcję oraz czynniki wzmacniające obrazowanie. **Celem naukowym moich badań było zaprojektowanie, wytworzenie, a także wykorzystanie biofunkcjonalizowanych nanocząstek hybrydowych zarówno w terapii, jak i diagnostyce nowotworów.**

Jednym z głównych problemów ograniczających skuteczność konwencjonalnych terapii, jak chemioterapia czy radioterapia, jest heterogenny charakter nowotworu, który utrudnia efektywną eliminację nieprawidłowych komórek. Dlatego też wielofunkcyjne bionanocząstki cieszą się coraz większym zainteresowaniem w onkologii, ze względu na ich zdolność do specyficznego hamowania aktywności komórek nowotworowych, przy jednoczesnym zachowaniu zdrowych komórek w stanie nienaruszonym. Są to wysoce funkcjonalne materiały, które integrują celowanie, obrazowanie i leczenie w jeden system. Obecnie liczne badania promują koncepcję łączenia dwóch, a nawet większej liczby działań opartych na nanocząstkach, co daje wzmocniony efekt terapeutyczny i diagnostyczny. W tym kontekście szczególnie istotne wydają się cztery główne problemy badawcze:

- Ocena cytotoksyczności nanocząstek (analiza zmian biochemicznych i morfologicznych w komórkach)
- Ocena komórkowego wychwytu/celowania biofunkcjonalizowanych nanocząstek (analiza interakcji komórka – nanocząstki i ich internalizacji)
- Ocena efektu terapeutycznego biofunkcjonalizowanych nanocząstek (analiza efektywności chemioterapii, fototerapii, terapii genowej)
- Ocena efektu diagnostycznego biofunkcjonalizowanych nanocząstek (obrazowanie fluorescencyjne i magnetyczne)

4.3.1. Wstęp

W ostatnich dekadach nowotwory stały się jedną z najbardziej wyniszczających chorób na świecie. Tylko w 2020 r. odnotowano 18,1 mln nowych przypadków zachorowań oraz 9,9 mln zgonów [1]. W procesie nowotworzenia dochodzi do szeregu zmian na poziomie molekularnym, które sprzyjają niekontrolowanemu podziałowi komórek, co ostatecznie może prowadzić do przerzutowania. W ciągu minionych kilkudziesięciu lat nastąpił znaczący postęp w leczeniu tej choroby, który obejmuje głównie chemioterapię, radioterapię, a także chirurgiczne usuwanie tkanki nowotworowej. Niemniej terapie te mogą wywoływać liczne niepożądane skutki uboczne, tym samym powodując uszkodzenie zdrowych tkanek, jak i niezadowolający efekt terapeutyczny. Nanotechnologia oferuje nowatorskie rozwiązania,

pozwalające sprostać tym wyzwaniom poprzez dynamiczny rozwój zaawansowanych metod leczenia, diagnostyki i monitorowania stanu zdrowia pacjenta oraz łączenie tych elementów w jeden system.

Nanomedycyna to stosunkowo nowa dziedzina nauki, która z powodzeniem stosuje nanotechnologię w celu obrazowania, diagnostyki, monitorowania, leczenia, naprawy czy regeneracji układów biologicznych [2]. Wykorzystuje ona właściwości materiału w jego skali nanometrycznej (10^{-9} m). Ze względu na bardzo małe wymiary i duży stosunek powierzchni do objętości, struktury te charakteryzują się innymi właściwościami, niż ich większe odpowiedniki. Dzięki temu wzrasta ich aktywność chemiczna, a także możliwe jest większe oddziaływanie z błoną komórkową oraz łatwiejsze przenikanie do wnętrza komórki.

Nanocząstki to na ogół struktury o wielkości w zakresie od 1 do 100 nm, w przynajmniej jednym z możliwych wymiarów przestrzennych [2]. Chociaż w teorii górną granicę dla nanocząstek stanowi 100 nm, to w praktyce nanonauka, jak i nanotechnologia zajmują się układami o rozmiarach często sięgających kilkuset nanometrów [3].

W zależności od składu nanocząstki dzieli się zwykle na trzy klasy: organiczne, węglowe i nieorganiczne [4]. Połączenie unikalnych właściwości fizycznych i chemicznych dwóch lub więcej klas nanomateriałów może doprowadzić do wytworzenia hybrydowych nanocząstek, które zapewniają doskonałą uniwersalność materiału końcowego [5]. Systemy hybrydowe pozwalają na poprawę rozpuszczalności hydrofobowych leków, zwiększenie stabilności w środowisku biologicznym, wydłużenie czasu retencji we krwi, koniugację z docelowymi ligandami, kontrolowanie zachowania uwalniania leku oraz poprawę biokompatybilności i farmakokinetyki ładunku terapeutycznego [6]. Co więcej, dzięki połączonym właściwościom materiałów hybrydowych możliwe jest jednoczesne kapsułkowanie wielu leków chemioterapeutycznych, fotouczulaczy, kwasów nukleinowych, białek i peptydów ukierunkowanych na różne szlaki metaboliczne nowotworów [7]. Dlatego też połączenie rozmaitych rodzajów materiałów rozszerza funkcjonalność systemów jednoskładnikowych.

Pojawienie się technologii wykorzystującej nanocząstki umożliwiło rozwój szerokiej gamy nowatorskich platform terapeutycznych i diagnostycznych przeznaczonych do leczenia nowotworów, w tym również dostarczania leków/kwasów nukleinowych, terapii fototermicznej, terapii fotodynamicznej, hipertermii magnetycznej, radioterapii, terapii ultradźwiękowej oraz obrazowania [8]. Ponadto połączenie diagnostyki i terapii w jeden system z wykorzystaniem nanomateriałów, zwany teranostyką, otwiera dodatkowe możliwości w walce z nowotworami.

Nanocząstki stosowane jako systemy dostarczania leków wykazują lepszy potencjał terapeutyczny, w porównaniu z konwencjonalną chemioterapią. Właściwości nanoosiłków, w tym ich rozmiary w nanoskali, wysoki stosunek powierzchni do objętości, a także modyfikacje powierzchni, mogą pozwolić im skuteczniej trafić do docelowej tkanki nowotworowej oraz uwalniać leki w stabilny, kontrolowany sposób [9]. Nanocząstki dzięki swoim unikalnym właściwościom są także obiecującymi nośnikami kwasów nukleinowych [10]. Doskonałym przykładem ich skuteczności są szczepionki mRNA przeciwko COVID-19. Nanocząstki chronią kwasy nukleinowe przed degradacją, ułatwiają ich wewnątrzkomórkowy

transport i minimalizują toksyczność terapii. Istnieje wiele klinicznie zatwierdzonych nanoosników leków/kwasów nukleinowych (m.in. Doxil, Vyxeos) do leczenia różnych typów nowotworów [11].

Nanotechnologia umożliwia zastosowanie technik zdalnego transferu ciepła do tkanek za pomocą nanocząstek stymulowanych bodźcem zewnętrznym. Terapia fototermiczna (*ang. photothermal therapy* (PTT)) to eksperymentalna metoda, która wykorzystuje połączenie nanocząstek o właściwościach fototermicznych z promieniowaniem elektromagnetycznym (najczęściej w zakresie podczerwieni) w celu wywołania podwyższonej temperatury i nieinwazyjnej eliminacji komórek nowotworowych [12]. Czynniki fototermiczne absorbują energię elektromagnetyczną w obrębie chorej tkanki oraz przekształca ją w ciepło. Indukowana lokalnie hipertermia umożliwia wysoce precyzyjne podgrzewanie tkanki nowotworowej, a tym samym minimalizuje uszkodzenia otaczających zdrowych tkanek [13]. W terapiach skojarzonych hipertermia może sprzyjać pobieraniu chemioterapeutyku przez komórki nowotworowe lub zabijać komórki z powodu podwyższonej temperatury.

Nanocząstki znajdują także coraz szersze zastosowanie jako czynniki do obrazowania komórek nowotworowych, ponieważ oferują wysoką precyzję, czułość oraz możliwość ich adaptacji do różnorodnych technik diagnostycznych, takich jak rezonans magnetyczny (*ang. magnetic resonance imaging* (MRI)), tomografia komputerowa (*ang. computed tomography* (CT)), obrazowanie optyczne, pozytronowa tomografia emisyjna (*ang. positron emission tomography* (PET)) czy ultrasonografia [14]. Dzięki swoim unikalnym właściwościom optycznym, magnetycznym czy akustycznym, nanocząstki mogą znacząco poprawić jakość diagnostyki nowotworowej, umożliwiając wcześniejsze wykrycie guzów i dokładniejsze monitorowanie postępu choroby.

Medyczne zastosowanie nanocząstek stoi jednak przed wieloma wyzwaniami, takimi jak chociażby potrzeba ich lepszej charakteryzacji, a także możliwe problemy z toksycznością, niestabilnością w układzie krążenia i nieodpowiednim ukierunkowaniu na tkanki docelowe [15]. Naukowcy wciąż uczą się w jaki sposób właściwości nanocząstek (np. ładunek, skład, rozmiar, kształt, oddziaływania powierzchniowe, złożona architektura) wpływają na systemy biologiczne. Większość z nich jest rozpoznawana i eliminowana przez układ odpornościowy jako substancja obca. Przegląd literatury dotyczącej nośników leków na bazie nanocząstek wskazuje, że jedynie 0,7% (mediana) podanej dożylnie dawki nanocząstek trafia bezpośrednio do guza [16].

W związku z widocznymi ograniczeniami, które mogą wpływać na efektywność i bezpieczeństwo zastosowania nanotechnologii w badaniach klinicznych, moim wkładem w postęp w tym obszarze było **opracowanie nowych platform opartych na biofunkcjonalizowanych nanocząstkach hybrydowych do efektywnej terapii i diagnostyki nowotworów, z możliwością precyzyjnego rozpoznawania komórek rakowych.** Zaproponowane przeze mnie biofunkcjonalizacje nanocząstek polegały na modyfikowaniu ich powierzchni lekami niskocząsteczkowymi, kwasami nukleinowymi, elementami błon komórkowych czy też biopolimerami, w taki sposób, aby mogły one specyficznie oddziaływać z innymi strukturami biologicznymi. Proces ten miał na celu nadanie

nanocząstkom unikalnych właściwości, które umożliwiają selektywne i ukierunkowane działanie w środowisku biologicznym, co jest szczególnie istotne w biotechnologii medycznej.

4.3.2. Nanocząstki hybrydowe w terapiach multimodalnych

Złożoność i heterogeniczność nowotworów znacząco obniżają potencjał terapeutyczny stosowanych obecnie klasycznych metod leczenia. Dlatego też obecny trend w badaniach klinicznych stopniowo przesuwają nacisk z monoterapii na terapię skojarzoną, w celu zwiększenia jej skuteczności. Co więcej, terapia łączona oparta o synergiczne działanie poszczególnych monoterapii może skutkować efektami superaddytywnymi, silniejszymi niż jakakolwiek pojedyncza terapia lub ich teoretyczne kombinacje. W tym rozdziale przedstawiam badania dotyczące łączonych terapii, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania wielofunkcyjnych bionanomateriałów na bazie polidopaminy (*ang. polydopamine (PDA)*).

Polidopamina to inspirowany naturalnym pigmentem (melaniną) biopolimer, który powstaje w wyniku polimeryzacji dopaminy [17]. Wytwarzają go m.in. małże, aby przyłączyć się do różnych powierzchni, w tym do kamieni czy drewna. PDA znalazła szerokie zastosowanie w obszarze nanomedycyny i nanobiotechnologii [18, 19]. Pomyślnie wykorzystanie polidopaminy do tworzenia innowacyjnych materiałów można przypisać zestawowi jej unikalnych cech, takich jak silne właściwości adhezyjne, niski koszt przygotowania, szerokie spektrum protokołów funkcjonalizacji powierzchni PDA, zdolność do kompleksowania prawie wszystkich metali przejściowych i radioizotopów, łatwość manipulacji rozmiarem, jak i kształtem, stabilność w różnych środowiskach biologicznych, biokompatybilność oraz silne właściwości fototermiczne [20]. Główną przewagą PDA nad innymi czynnikami fototermicznymi w warunkach naświetlania z zakresu bliskiej podczerwieni (808 nm) jest wyższy współczynnik absorpcji ($7,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), wydajność konwersji fototermicznej na poziomie około 40% oraz wysoka fotostabilność [21]. W związku z tym, szczególnie w ostatniej dekadzie, polidopaminę uznano za obiecujące źródło wielofunkcyjnych nanomateriałów hybrydowych do terapii nowotworów.

4.3.2.1. Nanocząstki PDA do skojarzonej chemioterapii, terapii genowej i terapii fototermicznej

W artykule **A1** wykazałem, że nanonośniki oparte na nanocząstkach polidopaminy są obiecującą platformą dostarczania leków/kwasów nukleinowych, które mogą znaleźć zastosowanie w skojarzonym leczeniu przeciwnowotworowym glejaka wielopostaciowego (*ang. glioblastoma multiforme (GBM)*). GBM to najczęściej występujący pierwotny nowotwór mózgu, o wysokim stopniu złośliwości i bardzo złym rokowaniu [22]. Z uwagi na niską skuteczność obecnie stosowanych metod leczenia GBM oraz niski wskaźnik przeżycia pacjentów, konieczne jest opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Prezentowana platforma, poza efektywnym wiązaniem i dostarczaniem leku chemioterapeutycznego oraz terapeutycznego RNA, może być wykorzystana jako wydajny czynnik fototermiczny. Dzięki temu taki nośnik jest odpowiedni do łączonej foto-, geno- i chemioterapii.

W pierwszym etapie zsyntetyzowano sferyczne nanocząstki PDA i skutecznie sfunkcjonalizowano je za pomocą dendrymerów poliamidoaminowych (*ang. polyamidoamine* (PAMAM)) generacji 3.0 (DD3.0). Dendrymery PAMAM to klasa polimerów złożonych z powtarzalnie rozgałęzionych podjednostek reszt amidowych i aminowych [23]. To doskonały przykład uniwersalnego typu nanoosiłnika, który można inkorporować lekami (poprzez przyłączenie leków i związków bioaktywnych do reszt lub poprzez uwięzienie ich w strukturze dendrymeru). Ogólny kationowy charakter i funkcjonalność dendrymerów PAMAM sprawiają, że można je z powodzeniem zastosować do dostarczania kwasów nukleinowych. W celu opracowania wielofunkcyjnego nośnika wybrano dobrze scharakteryzowane nanocząstki PDA o średnicy około 90 nm (*ryc. 1A*). Pomiary potencjału zeta potwierdziły skuteczność funkcjonalizacji nanocząstek PDA za pomocą dendrymerów PAMAM, co spowodowało zwiększenie ładunku powierzchniowego z -30 mV do +44 mV.

Następnie oceniałem wpływ funkcjonalizowanych nanocząstek PDA@DD3.0 na żywotność komórek glejaka (linia komórkowa U-118 MG) oraz fibroblastów płucnych (linia komórkowa MRC-5) w zakresie stężeń od 1,125 do 9 $\mu\text{g/ml}$ za pomocą testu proliferacji komórek WST-1 oraz wieloparametrowej analizy obrazów (*ang. high content analysis* (HCA)) opartej na mikroskopowej obserwacji fluorescencyjnie wybarwionych żywych i martwych komórek. Do pomiaru żywotności komórek powszechnie stosuje się test kolorymetryczny WST-1. Opiera się on na redukcji soli tetrazolowej (WST-1) do rozpuszczalnego formazanu przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną w dzielących się komórkach. Następnie oznacza się ilościowo formazan za pomocą pomiaru absorbancji, przy czym ilość utworzonego barwnika jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Wyniki testu WST-1 wykazały niewielki spadek żywotności obu typów komórek przy najwyższym stężeniu nanocząstek PDA@DD3.0 (9 $\mu\text{g/ml}$) (*ryc. 1B*).

Test integralności błony komórkowej (żywe/martwe) posłużył mi do rozróżnienia żywych i martwych komórek na podstawie stanu ich błony komórkowej. Żywe komórki są wybarwiane na zielono ze względu na aktywność esteraz, które przekształcają niefluorescencyjną acetoksymetylokalceinę (kalceina-AM) swobodnie przenikającą przez błony komórkowe. Rezultatem wzbudzenia jest silny, zielony sygnał fluorescencji. Martwe komórki są znakowane barwnikiem (homodimer-2 etydyny (EthD-2)), który przedostaje się tylko do tych, z uszkodzonymi błonami i wiąże się z jądrem komórkowym, emitując czerwony sygnał fluorescencyjny. Następnie za pomocą wieloparametrowej analizy obrazu (HCA) określa się liczbę żywych i martwych komórek, a także liczbę wszystkich komórek w populacji. HCA to precyzyjna technika oparta na obrazowaniu, która łączy zautomatyzowaną mikroskopię z zaawansowanymi algorytmami analizy obrazu, w celu ilościowej oceny procesów komórkowych z dużą wydajnością. W omawianej technice komórki lub próbki biologiczne są zazwyczaj hodowane i poddawane działaniu różnych czynników, takich jak leki czy nanocząstki. Fluorescencyjnie znakowane sondy lub barwniki selektywnie barwią określone składniki komórkowe, umożliwiając wizualizację interesujących struktur komórkowych, jak i celów molekularnych. Proces obrazowania obejmuje zbieranie dużej ilości zdjęć komórek lub obszarów zainteresowania przy użyciu mikroskopu o wysokiej

rozdzielczości. Zdjęcia są następnie poddawane zaawansowanej analizie obrazu w celu wyodrębnienia z nich danych ilościowych. Wyniki uzyskane przy użyciu techniki HCA nie wykazały znaczących zmian w żywotności komórek U-118 MG i MRC-5 po inkubacji z nanocząstkami PDA@DD3.0. Na zdjęciach widoczne są głównie zielone sygnały fluorescencji pochodzący od żywych komórek i tylko kilka czerwonych sygnałów fluorescencji od martwych komórek. Nanocząstki PDA@DD3.0 można uznać za nietoksyczne, ponieważ w badanym zakresie stężeń nie wpłynęły negatywnie zarówno na komórki prawidłowe, jak i nowotworowe.

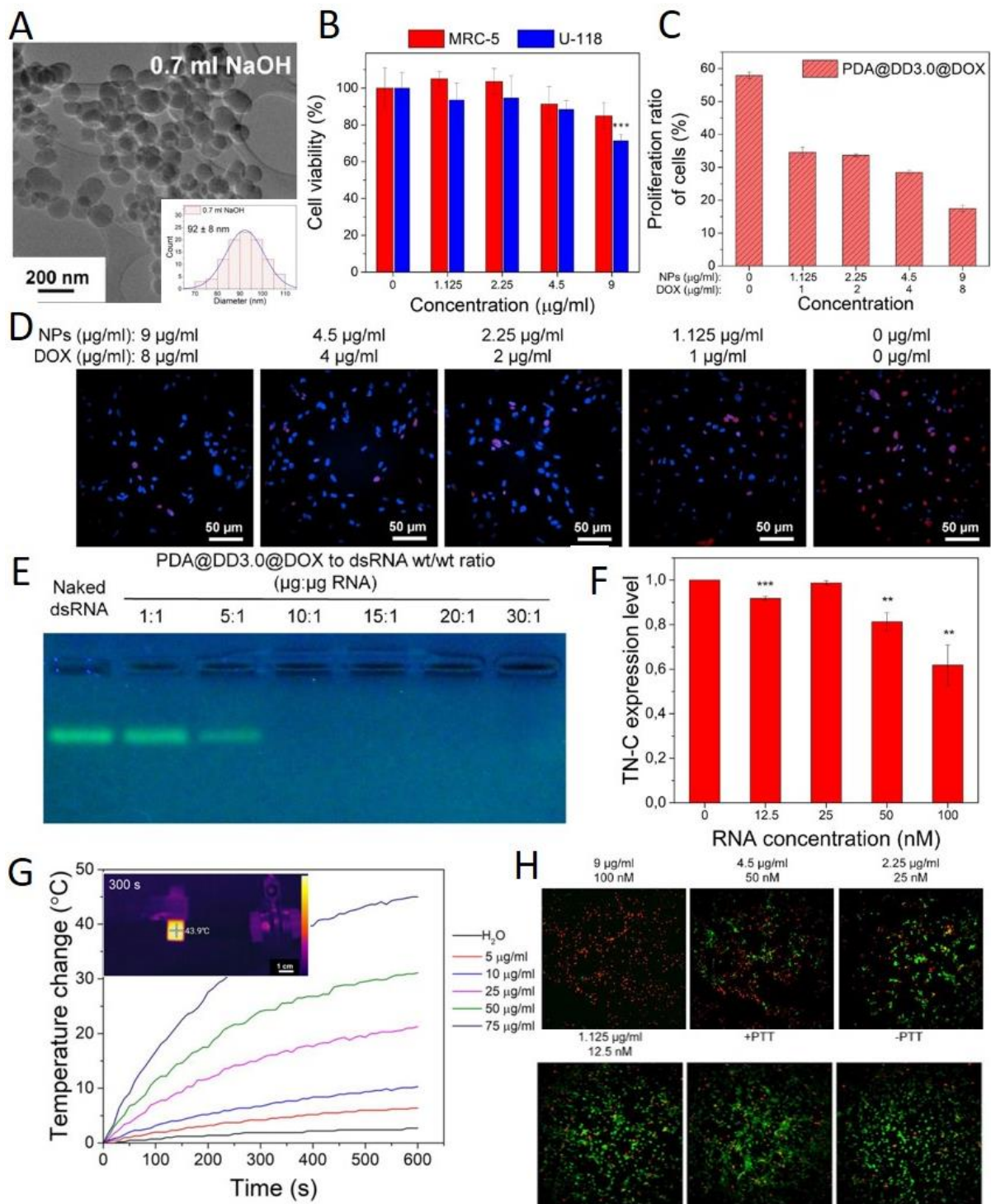
Aby ocenić efektywność chemioterapii GBM nanocząstki inkorporowano doksorubicyną (DOX). To powszechnie znany, modelowy lek niskocząsteczkowy z grupy antracyklin, który charakteryzuje się skutecznym działaniem przeciw wielu nowotworom złośliwym. DOX wiąże się z DNA komórek nowotworowych i blokuje działanie enzymu topoizomerazy II, który bierze udział w procesie replikacji. Nanocząstki pomagają zoptymalizować działanie doksorubicyny, zwiększając jej skuteczność, jednocześnie zmniejszając ryzyko poważnych działań niepożądanych. DOX załadowano na nanocząstkach PDA@DD3.0 z wysoką wydajnością (99%). Zgodnie z analizą spektrofotometryczną UV-Vis, DOX uwalniała się z nanonośników w sposób zależny od pH. Największe uwalnianie zaobserwowano w kwaśnym pH (4,5), które stymulowało środowisko komórek nowotworowych, natomiast niskie przy pH obojętnym (7,2). Zjawisko to można przypisać protonowaniu grup aminowych w kwaśnym pH, co powoduje uwolnienie leku z przestrzeni w strukturze dendrymerów.

Skuteczność dostarczania leku z wykorzystaniem badanych nanonośników do komórek glejaka określono za pomocą testu proliferacji komórek Click-iT EdU. W tej analizie zmodyfikowany analog tymidyny 5-etyniło-2'-deoksyurydyna (EdU) wbudowuje się w nowo syntetyzowaną nić DNA proliferujących komórek. Natomiast DOX, która hamuje proliferację komórek, uniemożliwia inkorporację EdU podczas procesu replikacji. Następnie za pomocą metody HCA oznacza się ilościowo replikujące komórki wyznakowane barwnikiem EdU oraz wszystkie komórki w populacji wyznakowane barwnikiem Hoechst 33342 (*ryc. 1D*). Traktowanie komórek glejaka nanocząstkami PDA@DD3.0@DOX było bardzo skuteczne, nawet przy ich najniższym stężeniu. Współczynnik proliferacji komórek U-118 MG bez nanocząstek załadowanych DOX wyniósł prawie 60% po 24-godzinnej inkubacji z odczynnikiem EdU (*ryc. 1C*). Zmniejszenie ilości proliferujących komórek, indukowane przez nanocząstki PDA@DD3.0@DOX, zaobserwowano w całym zakresie stężeń. Ponadto interpretacja badań wychwytu komórkowego doksorubicyny, którą przeprowadziłem przy użyciu konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, potwierdziła skuteczną internalizację nanocząstek PDA@DD3.0@DOX po 4 godzinach inkubacji. Obrazy mikroskopowe pozwoliły pośrednio udowodnić, że badane nanocząstki są w stanie zapewnić efektywną chemioterapię poprzez interkalację dostarczonej DOX w strukturę DNA, hamując jednocześnie proliferację komórek.

Pozytywne rezultaty zastosowania nanocząstek PDA@DD3.0 w terapii genowej potwierdzono poprzez obniżenie poziomu ekspresji białka tenascyny-C (TN-C) w komórkach

U-118 MG. Glejaki złośliwe wykazują nadekspresję szeregu markerów powierzchniowych, które można wykorzystać jako cele terapeutyczne [24]. Jednym z takich celów może być glikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej – TN-C, która bierze udział m.in. w adhezji, inwazji, migracji i proliferacji komórek nowotworowych [25]. Swoiste wobec sekwencji mRNA hamowanie ekspresji białka TN-C poprzez interferencję RNA (RNAi) jest obiecującą metodą terapii przeciwko glejakowi. Jednakże wydajne dostarczanie nagiego, dwuniciowego RNA (*ang. double stranded RNA* (dsRNA)) komplementarnego do sekwencji mRNA białka TN-C (ATN-RNA) jest problematyczne, ze względu na jego szybką degradację przez nukleazy oraz słaby wychwyty wewnętrzkomórkowy [26]. Wiązanie ATN-RNA z nanocząstkami PDA@DD3.0 poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowaną powierzchnią dendrymerów PAMAM a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w dsRNA, potwierdziłem za pomocą elektroforezy żelowej (*ryc. 1E*). Przy stosunku 30:1 (stosunek wagowo/wagowy nanocząstek PDA@DD3.0 do dsRNA) nie zaobserwowano sygnału z niezwiązanego dsRNA, co wskazuje, że kwas nukleinowy został w pełni przyłączony do badanego nanonośnika. Obecność DOX w dendrymerach dodatkowo poprawiała wiązanie dsRNA z nośnikiem. Analiza qRT-PCR wykazała, że badane nanocząstki były w stanie dostarczyć dsRNA, a także obniżyć poziom ekspresji białka TN-C w komórkach U-118 MG w stężeniach wyższych niż 50 nM dsRNA (*ryc. 1F*). Poziom ekspresji białka TN-C spadł z 80% przy zastosowaniu 50 nM dsRNA, do 70% dla komórek traktowanych 100 nM dsRNA. Nie zaobserwowano zauważalnej zmiany w ekspresji TN-C w przypadku zastosowania samych nanocząstek bez dsRNA.

Terapia fototermiczna może być obiecującą strategią leczenia GBM, ponieważ umożliwia zniszczenie guza za pomocą ciepła. Otrzymane nanocząstki PDA@DD3.0 charakteryzowały się wysokimi właściwościami fototermicznymi. Zaobserwowano zależną od stężenia zmianę temperatury przygotowanych roztworów nanocząstek podczas naświetlania światłem lasera o długości fali 808 nm i mocy 3 W (co odpowiada gęstości mocy 9 W/cm²) (*ryc. 1G*). Dla najwyższego badanego stężenia (100 µg/ml) temperatura roztworu nanocząstek PDA@DD3.0 wzrosła o prawie 50 °C pod wpływem promieniowania NIR. Wzrost temperatury naświetlanych nanocząstek potwierdziły także obrazy z kamery termowizyjnej. Materiał ten jest również wysoce stabilny w czasie, czego dowiodły pomiary fotostabilności w pięciu cyklach naświetlania. Końcowym etapem badań było określenie aktywności nanocząstek z przyłączonym dsRNA (PDA@DD3.0@ATN-RNA) w terapii fototermicznej komórek glejaka przy użyciu testu integralności błony komórkowej (żywe/martwe). Po 4-godzinnej inkubacji z analizowanymi nanocząstkami, komórki U-118 MG naświetlano następnie przez 5 minut laserem o długości fali 808 nm i mocy 3 W (co odpowiada gęstości mocy 9 W/cm²). Doświadczenie przeprowadziłem w komorze środowiskowej, utrzymując temperaturę 37 °C. Żywotność komórek oceniono po kolejnych 24 godzinach. Aby przeprowadzić testy integralności błony komórkowej (żywe/martwe), komórki najpierw wybarwiono odpowiednimi barwnikami, a następnie wizualizowano w mikroskopie fluorescencyjnym lub analizowano za pomocą cytometrii przepływowej.



Rycina 1. Wybrane wyniki zastosowania nanoosińnika PDA@DD3.0 w terapii glejaka wielopostaciowego: zdjęcia z mikroskopii TEM (A), ocena żywotności komórek za pomocą testu WST-1 (C), ocena efektu chemioterapeutycznego w komórkach za pomocą testu proliferacji EdU (D, E), analiza wiązania RNA za pomocą elektroforezy agarozowej (F), analiza ekspresji genów za pomocą qRT-PCR (G), analiza właściwości fototermicznych (H), ocena żywotności komórek po naświetlaniu laserem NIR za pomocą testu integralności błony komórkowej (I).

Test Count&Viability wykonywany za pomocą analizatora komórek Muse (cytometr mikrokapilarny) umożliwia rozróżnienie żywych i martwych komórek w populacji na podstawie przepuszczalności błony komórkowej dla dwóch barwników wiążących DNA. Jeden barwnik

wiąże się do DNA komórek z uszkodzoną błoną, natomiast drugi, przenikający przez błonę barwi jądra wszystkich komórek w populacji. Analiza uzyskanych danych wykazała, że nie było różnicy w żywotności komórek naświetlanych laserem w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zgodnie z oczekiwaniami, po wspomnianym naświetlaniu komórek inkubowanych z nanocząstkami w dwóch najwyższych stężeniach, odnotowano znaczny spadek ich żywotności. Potwierdziło to wysoką skuteczność terapii fototermicznej, która przy najwyższym stężeniu zmniejszyła liczbę żywych komórek do 20%. Efekt ten zaobserwowano też na zdjęciach z mikroskopu fluorescencyjnego (*ryc. 1H*). Komórki wybarwione kalceiną oraz EthD-2 wykazywały czerwony sygnał fluorescencji przy najwyższym stężeniu nanocząstek (9 µg/ml). Była to oznaka uszkodzenia błony komórkowej podczas naświetlania, ponieważ EthD-2 jest barwnikiem nieprzepuszczalnym dla komórek żywych. Przy niższych stężeniach nanocząstek naświetlanych laserem wykazano wyraźny wzrost stosunku komórek żywych do martwych.

4.3.2.2. Nanocząstki PDA do celowanej, skojarzonej chemioterapii i terapii fototermicznej

Nanobiotechnologia to niezwykle szybko rozwijający się obszar badań, który może przyczynić się do opracowania nowych, obiecujących strategii terapeutycznych do leczenia nowotworu wątroby (*ang. hepatocellular carcinoma (HCC)*). Według WHO choroba ta zajmuje szóste miejsce na świecie pod względem zachorowalności, a śmiertelność z jej powodu niestety nadal jest bardzo wysoka. W pracy **A2** wykazałem, że nanocząstki PDA o właściwościach fototermicznych można z powodzeniem stosować w skojarzonej chemio- i fototerapii HCC. Aby poszerzyć swoją pracę badawczą skupiłem się także na ocenie modyfikacji nanocząstek wprowadzanych w celu wykazania ich użyteczności w terapii celowanej. Ukierunkowane dostarczanie nanocząstek do komórek nowotworowych wątroby za pośrednictwem receptorów, które ulegają nadekspresji na ich powierzchni może być alternatywną metodą bezpiecznego i selektywnego dostarczania leków przeciwnowotworowych w terapii HCC.

W badaniach tych kuliste nanocząstki PDA skutecznie sfunkcjonalizowano dendrymerami PAMAM generacji 3.0 (G3.0), a następnie dodatkowo zmodyfikowano ich powierzchnię glikolem polietylenowym (PEG) oraz kwasem foliowym (FA). Dendrymery PAMAM można łatwo poddawać modyfikacji poprzez przyłączenie ligandów specyficznie rozpoznających receptory ulegające nadekspresji na komórkach nowotworowych. Z kolei PEG jest najpowszechniej stosowanym polimerem służącym do osłaniania nanocząstek, zapobiegając ich agregacji oraz wydłużając czas retencji we krwi [27]. Rdzeń nanocząstek PDA miał kształt sferyczny o średnim rozmiarze około 90 nm (*ryc. 2A*). Skuteczną funkcjonalizację powierzchni nanocząstek potwierdzono za pomocą pomiarów potencjału zeta oraz spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (*ang. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)*). Średnica nanonośników wynosiła około 150 nm.

Nanocząstki PDA charakteryzowały się właściwościami pozwalającymi na ich zastosowanie, jako skuteczne, aktywowane światłem narzędzie w terapii fototermicznej.

Dla tych nanocząstek wykazano zależny od stężenia i czasu, wzrost temperatury po naświetlaniu laserem o długości fali 808 nm oraz gęstości mocy 2 W/cm^2 (ryc. 2B). Temperaturę roztworu nanocząstek o najwyższym stężeniu ($200 \mu\text{g/ml}$) podwyższono o $33 \text{ }^\circ\text{C}$. W kolejnych pięciu cyklach naświetlania nie zaobserwowano spadku generowanej temperatury, co świadczy o wysokiej fotostabilności analizowanego nanomateriału.

Toksyczność nanocząstek zależy może od ich wielu parametrów fizykochemicznych. Ponieważ wielkość, kształt i skład chemiczny nanocząstek były stałe, zaplanowane badania pozwoliły mi ocenić cytotoksyczność nanocząstek na każdym etapie procesu ich funkcjonalizacji. W tym celu przeprowadzono kolorymetryczny test WST-1 oraz analizę HCA opartą na fluorescencyjnym barwieniu żywych i martwych komórek z wykorzystaniem prawidłowych komórek nabłonka wątroby (linia komórkowa THLE-2) inkubowanych z nanocząstkami w zakresie stężeń od $1,25$ do $40 \mu\text{g/ml}$. Pomiar aktywności metabolicznej komórek wykazał toksyczność nanomateriału zależną od stężenia. Z kolei w analizie HCA stosunek komórek żywych do martwych po inkubacji z testowanymi nanocząstkami był podobny do tego, w komórkach kontrolnych. Stwierdziłem również, że komórki pozostały żywe, ale ich aktywność proliferacyjna została zahamowana wraz ze wzrostem stężenia cząstek. Przy wyższych stężeniach rodzaj funkcjonalizacji nanocząstek wpływał na żywotność komórek. Dowiodłem, że modyfikacja powierzchni nanocząstek PDA dendrymerami PAMAM zmniejsza żywotność komórek. Może to wynikać z ich dodatniego ładunku, który w konsekwencji prowadzi do zwiększonej interakcji z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi. Funkcjonalizacja nanocząstek PDA pokrytych dendrymerami za pomocą PEG i FA dodatkowo obniżyła aktywność metaboliczną komórek, a także zmniejszyła liczbę żywych komórek przy najwyższym stężeniu nanocząstek w porównaniu do czystych cząstek oraz nanocząstek PDA modyfikowanych PAMAM.

Kolejnym etapem była analiza wpływu terapii fototermicznej z wykorzystaniem nanocząstek PDA@DG3@PEG@FA na komórki raka wątrobowokomórkowego linii HepG2. W tym celu przeprowadzono test proliferacji komórek WST-1, test integralności błony komórkowej (żywe/martwe), test na obecność reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species* (ROS)) oraz test na obecność komórek apoptotycznych. Wyniki moich badań wykazały doskonałą skuteczność analizowanych nanomateriałów w terapii fototermicznej. Komórki HepG2 zachowywały wysoką żywotność w przypadku braku naświetlania laserem. Natomiast zaobserwowałem znacznie mniejszą żywotność komórek traktowanych wyższym stężeniem nanocząstek, po naświetlaniu laserem o długości fali 808 nm (2 W/cm^2) przez 5 minut (ryc. 2C). Nanocząstki spowodowały całkowitą eliminację komórek dla stężenia $10 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$ i $40 \mu\text{g/ml}$ w grupie traktowanej laserem (+PTT) po 48 godzinach inkubacji. Znakowanie komórek kalceiną-AM i EthD-2 w połączeniu z obrazowaniem za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego potwierdziło wpływ naświetlania laserem na komórki nowotworowe inkubowane z nanocząstkami PDA@DG3@PEG@FA (ryc. 2D). Uwidoczniono to uszkodzenie błony komórkowej podczas naświetlania, ponieważ EthD-2 jest barwnikiem, który może barwić jedynie martwe komórki. Co ważne, nie zaobserwowano zmniejszenia

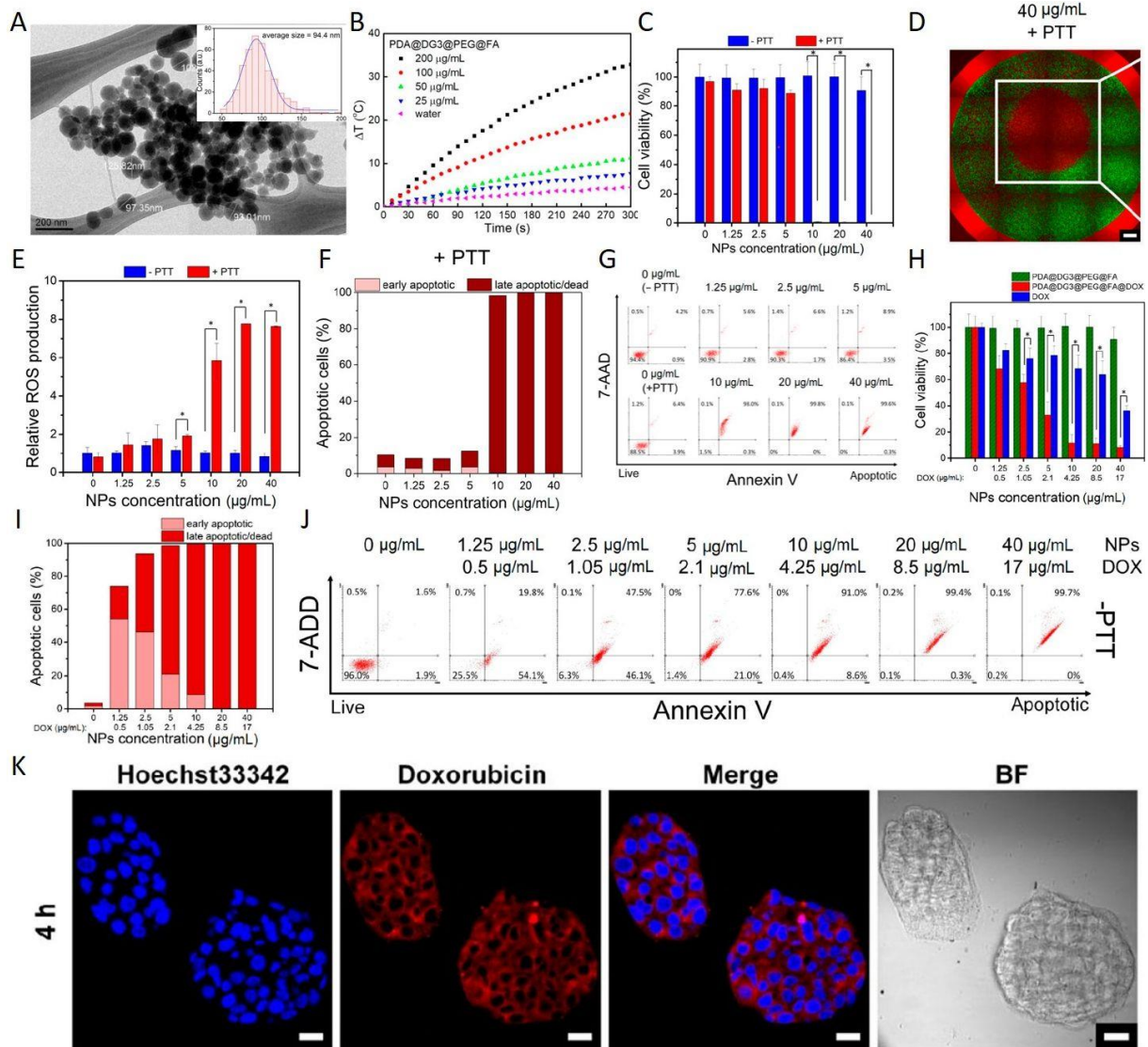
żywołności komórek w grupach kontrolnych (bez naświetlania (-PTT) i z naświetlaniem (+PTT) laserem).

Zgłębiając temat mechanizmu śmierci komórek wywołanej naświetlaniem laserem, skupiłem się na analizie powstawania ROS oraz analizie profilu komórek apoptotycznych za pomocą cytometrii przepływowej. Badanie stresu oksydacyjnego można wykorzystać do określenia poziomu produkcji ROS m.in. $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} i H_2O_2 , które prowadzą do peroksydacji tłuszczów, białek i kwasów nukleinowych [28], a w konsekwencji do zakłócenia szlaków sygnałowych, aktywacji kaskad enzymatycznych, indukcji apoptozy, a także alternatywnych dróg śmierci komórki. Test ten polega na dodaniu dihydroetydyny, odczynnika przepuszczalnego dla błony komórkowej, który w kontakcie z anionami ponadtlenkowymi ulega utlenieniu i tworzy produkt fluorescencyjny interkalujący, do DNA. Poziom ROS mierzono w komórkach HepG2 inkubowanych przez 4 godziny z badanymi nanocząstkami PDA bezpośrednio po naświetlaniu, a także 24 lub 48 godzin po traktowaniu laserem NIR. Pozwoliło mi to wyróżnić dwie populacje komórek: prawidłowe (ROS-) oraz te, które podlegają stresowi oksydacyjnemu (ROS+). Znaczący wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu ROS zaobserwowano bezpośrednio po naświetleniu komórek wiązką lasera dla stężeń nanocząstek powyżej 5 $\mu\text{g/ml}$ (ryc. 2E). Ponadto podwyższony poziom ROS utrzymywał się przez 24 i 48 godzin po naświetlaniu laserem NIR. Badania wykazały, że nanocząstki naświetlane laserem NIR indukowały cytotoksyczność wywołaną stresem oksydacyjnym. Z kolei traktowanie komórek tylko wiązką lasera nie powodowało wytwarzania ROS. Same nanocząstki również nie zwiększały wewnątrzkomórkowego poziomu ROS.

Produkcja ROS jest kluczowym czynnikiem biorącym udział w procesie apoptozy. Ze względu na wieloetapowy charakter tego zjawiska, istotne jest jego wykrycie w jak najwcześniejszej fazie. W zaplanowanym przeze mnie teście wykorzystano fakt, że na wczesnym etapie apoptozy fosfatydyloseryna ulega translokacji przez błonę komórkową, gdzie może zostać związana przez znakowaną fluorescencyjnie aneksynę V. Jodek propidyny, marker martwych komórek, jest wskaźnikiem integralności strukturalnej błony komórkowej. Jednoczesne użycie tych odczynników pozwoliło mi wyróżnić cztery populacje komórek: komórki we wczesnym stadium apoptozy (1), komórki późno apoptotyczne/martwe (2), komórki nieapoptotyczne (3) i komórki martwe (4). Nie zaobserwowałem istotnego wzrostu liczby komórek apoptotycznych po inkubacji z analizowanymi nanocząstkami w badanym zakresie stężeń. Jednakże 24 godziny po naświetleniu laserem NIR populacja komórek apoptotycznych/martwych osiągnęła poziom 100% dla wyższych stężeń nanocząstek (10-40 $\mu\text{g/ml}$) (Ryc. 2F i G). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że mechanizmem odpowiedzialnym za śmierć komórek HepG2 wywołaną terapią fototermiczną była apoptoza, ponieważ wzrost temperatury po naświetlaniu nanocząstek nie przekraczał 50 °C.

W celu zbadania efektu chemioterapeutycznego nanocząstek PDA załadowanych lekiem przeciwnowotworowym DOX przeprowadzono test WST-1 oraz test wykrywania apoptozy. Zaobserwowałem zależny od stężenia spadek żywotności komórek HepG2 inkubowanych z nanocząstkami PDA@DG3@DOX. Po 48 godzinach ekspozycji odsetek komórek wczesno apoptotycznych powiększał się, wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek

w grupie traktowanej PDA@DG3@DOX. Natomiast odsetek komórek późno apoptotycznych/martwych wzrósł dla stężenia 40 µg/ml.



Rycina 2. Wybrane wyniki zastosowania nanoosńnika PDA@DG3@PEG@FA w terapii raka wątrobowokomórkowego: zdjęcia z mikroskopii TEM (A), analiza właściwości fototermicznych (B), ocena żywotności komórek po naświetlaniu laserem NIR za pomocą testu WST-1 (C) oraz testu integralności błony komórkowej (D), analiza stresu oksydacyjnego (E) oraz testu na obecność apoptozy (F) w komórkach po naświetlaniu laserem NIR za pomocą cytometrii przepływowej, ocena efektu chemioterapeutycznego w komórkach za pomocą testu WST-1 (G) oraz testu na obecność apoptozy (H), zdjęcia z konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (I).

W kolejnym etapie sprawdziłem właściwości celujące badanych nanocząstek. Receptor folianowy (*ang. folate receptor (FR)*) ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów, w tym na komórkach nowotworu wątroby [29]. Dlatego też może być wykorzystywany jako wysoce rokujący cel w terapii nowotworowej. Nanocząstki biofunkcjonalizowane kwasem foliowym i załadowane lekiem znacząco obniżyły żywotność komórek w porównaniu z wolną doksorubicyną (ryc. 2H). Dla najwyższych stężeń nanocząstek (10-40 µg/ml) przeżywalność komórek spadła poniżej 20%. Stwierdziłem, że proces apoptozy był indukowany już przy

niskim stężeniu nanocząstek (1,25 µg/ml). Z kolei poziom komórek wczesno apoptotycznych był znacznie niższy, niż poziom komórek późno apoptotycznych przy wyższych stężeniach (*ryc. 2I i J*). Dane te sugerują, że nanocząstki PDA@DG3@PEG@FA mogą skutecznie dostarczać lek poprzez aktywne celowanie w receptory kwasu foliowego na powierzchni komórek. W przypadku nanocząstek biofunkcjonalizowanych FA, za śmierć komórek odpowiadał proces apoptozy, a efekt terapeutyczny można było uzyskać już przy bardzo niskich stężeniach leku (0.5 µg/ml). Ponadto interpretacja badań wychwytu komórkowego, którą przeprowadziłem przy użyciu konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, potwierdziła skuteczną internalizację analizowanych biofunkcjonalizowanych nanocząstek po 4 godzinach inkubacji (*ryc. 2K*).

Aby sprawdzić aktywność nanocząstek PDA@DG3@PEG@FA w skojarzonej chemio- i fototerapii komórek nowotworu wątroby, komórki HepG2 naświetlano laserem NIR po 4 godzinach inkubacji z nanocząstkami z lekiem. Testy żywotności wykonano po kolejnych 48 godzinach. Wyniki badań wykazały spadek przeżywalności komórek po naświetlaniu laserem, wynikający z efektu fototermicznego, w zakresie stężeń 5-40 µg/ml. Spadek przeżycia komórek w zakresie stężeń od 1,25 do 5 µg/ml był z kolei związany ze stosowaniem nanocząstek załadowanych lekiem. Zwiększony odsetek późno apoptotycznych komórek w zakresie stężeń od 1,25 do 5 µg/ml, w porównaniu z komórkami nienaświetlanymi (-PTT), może wynikać ze zwiększonego uwalniania leku z nanocząstek, przy niższych stężeniach w wyniku naświetlania laserem NIR.

4.3.2.3. Nanocząstki magnetyczne pokryte PDA do celowanej, skojarzonej chemioterapii i terapii fototermicznej

Nanocząstki magnetyczne i sfery magnetyczne pokryte biopolimerem polidopaminą to kolejny rodzaj nanomateriałów wykorzystujących dendrymery PAMAM oraz ukierunkowane dostarczanie, które zastosowałem w swoich badaniach jako wielofunkcyjną platformę do eliminacji komórek nowotworowych (**A3**). Tak modyfikowane materiały mogą służyć jako skuteczne nośniki leków do łączonej chemio- i fototerapii raka wątrobowokomórkowego.

Mniejsze nanocząstki magnetyczne typu rdzeń/powłoka zsyntetyzowano w drodze współstrącania, natomiast większe sfery magnetyczne (nanocząstki magnetyczne osadzone w matrycy polimerowej) otrzymano w wyniku reakcji solwotermicznej. Następnie polidopaminę osadzono na nanomateriałach poprzez polimeryzację oksydacyjną chlorowodoru dopaminy. Dendrymery PAMAM i kwas foliowy przyłączono do powierzchni PDA w sposób opisany w publikacji **A2**, z tą różnicą, że w omawianym przypadku zastosowano dendrymery generacji 5.0. Oba rodzaje nanomateriałów poddano szczegółowej charakteryzacji za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (*ang. transmission electron microscopy* (TEM)) (*ryc. 3A*), spektroskopii FT-IR, analizy termogravimetrycznej (*ang. thermogravimetric analysis* (TGA)), a także pomiarów potencjału zeta i właściwości magnetycznych.

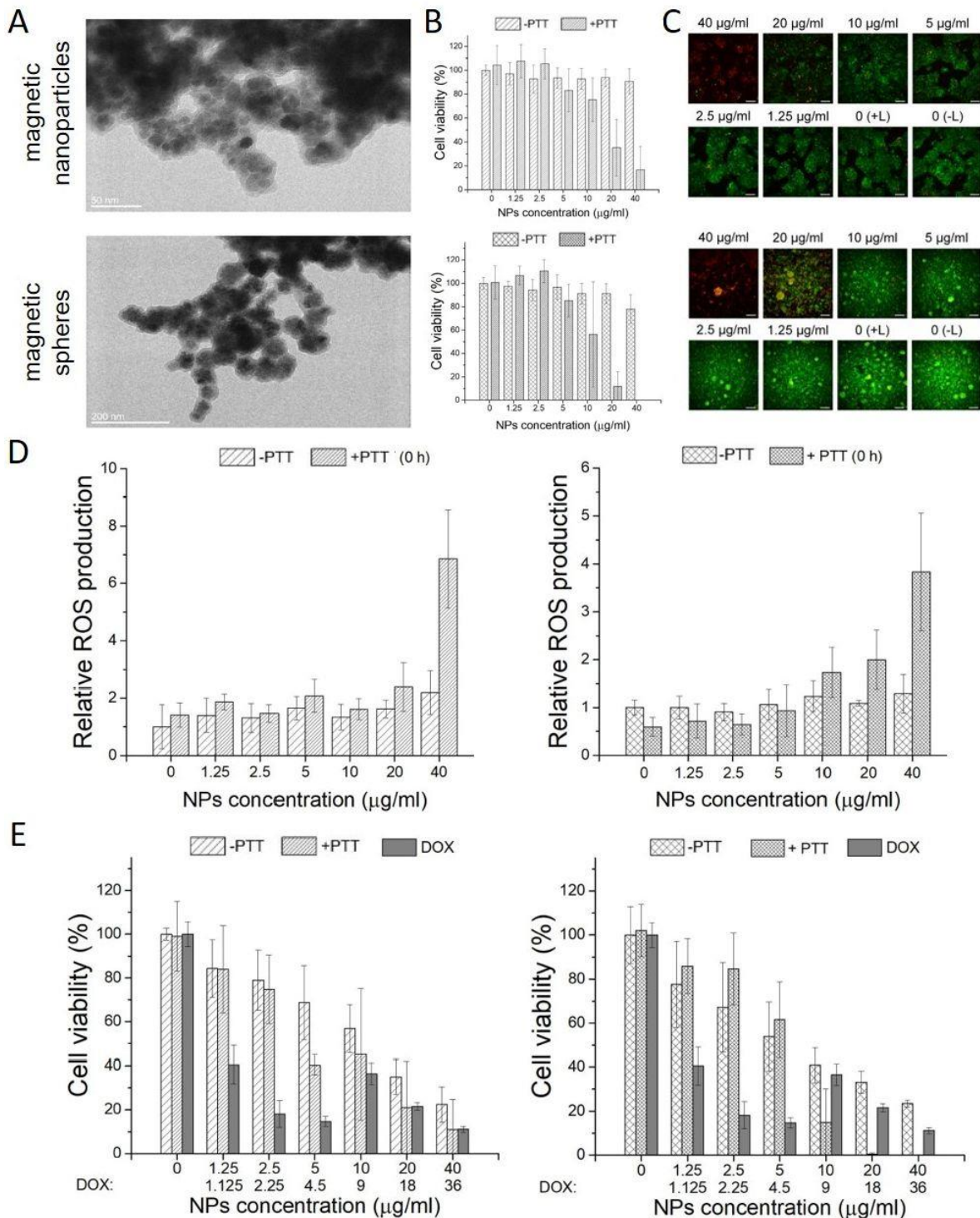
Nanocząstki miały wielkość w zakresie od 8 do 14 nm, natomiast sfery od 80 do 120 nm. Zaobserwowano, że sfery magnetyczne wykazywały silniejsze właściwości fototermiczne po naświetleniu wiązką lasera NIR o mocy 2 W/cm², niż nanocząstki

magnetyczne o mniejszych rozmiarach. Ponadto ich odpowiedź fototermiczną można wzmocnić poprzez obecność powłoki PDA. Zmiana temperatury roztworu nanomateriałów o stężeniu 100 µg/ml wyniosła odpowiednio 16 °C dla nanocząstek i 19 °C dla sfer naświetlanych laserem o mocy 2 W/cm². W obu typach materiałów wzrost temperatury zarejestrowany dla stężenia 25 µg/ml był wyższy, niż w przypadku materiałów magnetycznych nie pokrytych polidopaminą.

Cytotoksyczność zsyntetyzowanych nanomateriałów oceniałem na prawidłowych komórkach nabłonka wątroby (THLE-2) za pomocą testu WST-1 oraz testu integralności błony komórkowej (żywe/martwe). Wyniki wykazały zależną od stężenia toksyczność w obu wariantach nanomateriałów, mierzoną na podstawie aktywności metabolicznej komórek w zakresie stężeń od 1,25 do 40 µg/ml. Natomiast w teście fluorescencyjnym, stosunek komórek żywych do martwych po inkubacji z analizowanymi materiałami był podobny, jak w komórkach kontrolnych. Zaobserwowałem, że komórki pozostały żywe, jednakże ich aktywność proliferacyjna była hamowana wraz ze wzrostem stężenia cząstek. Większą żywotność komórek uzyskano w przypadku nanocząstek magnetycznych pokrytych wyłącznie PDA. Jest to zgodne z doniesieniami wskazującymi, że tego typu nanomateriały charakteryzują się mniejszą toksycznością [30]. Przyłączenie dendrymerów PAMAM zmniejszyło żywotność komórek, co jest spowodowane dodatnim ładunkiem cząstek oraz zwiększoną interakcją z ujemnie naładowanymi membranami. Dalsza funkcjonalizacja materiałów z wykorzystaniem PEG poprawiła ich biokompatybilność. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłem, że efekt cytotoksyczny zależy od rodzaju funkcjonalizacji cząstek.

Niska toksyczność w połączeniu z wysokimi właściwościami fototermicznymi dowiodły, że nanocząstki te mogą znaleźć zastosowanie w skutecznej fototerapii komórek raka wątroby. Żywotność komórek HepG2 po inkubacji z nanomateriałami, a także po naświetlaniu laserem o mocy 2 W/cm² oceniałem za pomocą testu WST-1, testu integralności błony komórkowej (żywe/martwe) oraz oznaczenia poziomu ROS. Dla stężeń 20 µg/ml i 40 µg/ml cytotoksyczność nanocząstek magnetycznych wzrosła odpowiednio o ponad 60% i 80% w grupie traktowanej laserem (+PTT) (*ryc. 3B*). Barwienie komórek kalceiną-AM i EthD-2 w połączeniu z obrazowaniem za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wykazało obecność czerwonego sygnału fluorescencji przy najwyższym stężeniu (40 µg/ml) (*ryc. 3C*). Była to oznaka uszkodzenia błony komórkowej podczas naświetlania. Przy niższych stężeniach zaobserwowano wyraźny wzrost stosunku ilości komórek żywych do martwych. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS mierzony bezpośrednio po naświetlaniu nieznacznie zwiększył się, wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek, osiągając najwyższą wartość dla stężenia 40 µg/ml (*ryc. 3D*). W przypadku sfer magnetycznych efekt ten był jeszcze bardziej wyraźny, ponieważ w grupie traktowanej laserem (+PTT) zaobserwowano uszkodzenie wszystkich komórek przy 40 µg/ml i prawie 90% spadek żywotności komórek przy 20 µg/ml. Dane te były zgodne z wynikami testu integralności błony komórkowej (żywe/martwe), w którym przy najwyższych stężeniach zarejestrowano wiele martwych komórek. Należy zauważyć, że poziom ROS wzrastał przy niższym stężeniu cząstek (10 µg/ml) inkubowanych z komórkami HepG2 naświetlanymi laserem NIR. Same cząstki, jak również ekspozycja

komórek na wiązkę lasera nie zwiększały wewnątrzkomórkowego poziomu ROS. Dane te sugerują, że stres oksydacyjny bierze udział w procesie cytotoksycznym indukowanym przez badane nanomateriały naświetlone laserem NIR.



Rycina 3. Wybrane wyniki zastosowania nanoosiłników $NPs@PDA@DD5@PEG-FA$ oraz $sMAG@PDA@DD5@PEG-FA$ w terapii raka wątrobowokomórkowego: zdjęcia z mikroskopii TEM (A), ocena żywotności komórek po naświetlaniu laserem NIR za pomocą testu WST-1 (B), testu integralności błony komórkowej (C) oraz testu wykrywania stresu oksydacyjnego (D), ocena efektu chemioterapeutycznego w komórkach za pomocą testu WST-1 (E).

Załadunek dokсорubicyny na funkcjonalizowanych nanomateriałach dodatkowo umożliwił wykorzystanie opracowanych nośników w skojarzonej chemio- i fototerapii raka wątroby. Skumulowane uwalnianie leku po 120 godzinach wyniosło odpowiednio 19,5% dla nanocząstek magnetycznych i 14,5% dla sfer magnetycznych. Wyniki wskazały na przedłużone uwalnianie DOX, co jest pożądaną cechą w chemioterapii. Ponadto zaobserwowano, że proces ten był zależny od pH. Aby ocenić efekt chemioterapeutyczny nośników, komórki linii HepG2 inkubowane z nanomateriałami poddano analizie przy użyciu testu WST-1. W przypadku obu materiałów wykazano zależne od stężenia zmniejszenie żywotności komórek, potwierdzając jednocześnie uwalnianie leku z nośników (ryc. 3E). Jednakże sfery magnetyczne działały na komórki silniej niż mniejsze nanocząstki. Efekt ten można przypisać większemu rozmiarowi cząstek, a w konsekwencji zwiększonemu załadunkowi oraz innemu sposobowi dystrybucji leku. Naświetlanie komórek laserem NIR spowodowało znaczny spadek żywotności komórek inkubowanych z nanocząstkami magnetycznymi w zakresie stężeń od 2,5 do 40 $\mu\text{g/ml}$, w porównaniu z chemioterapią. Potencjał terapeutyczny naświetlanego materiału wzrósł czterokrotnie, w porównaniu z nienaświetlanymi nanocząstkami. Podobny efekt stwierdzono w przypadku sfer magnetycznych. Żywotność komórek spadła do poziomu 70%, 20% i blisko 0%, gdy inkubowano je z tym materiałem w stężeniach odpowiednio 5, 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.3. Nanocząstki hybrydowe do teranostyki

Teranostyka integruje terapię i diagnostykę w jeden spójny system, zapewniając precyzyjne leczenie dopasowane do potrzeb konkretnego pacjenta. Zastosowanie rozwiązań teranostycznych cieszy się ogromnym zainteresowaniem i zostało uznane za potencjalny przełom w pokonywaniu wyzwań konwencjonalnej terapii onkologicznej. U pacjentów chorych na raka mamy do czynienia z połączeniem środków obrazujących z lekami chemioterapeutycznymi lub terapeutycznymi kwasami nukleinowymi oraz innymi terapiami przeciwnowotworowymi. Czynniki obrazujące są najczęściej stosowane do przewidywania odpowiedzi pacjenta i monitorowania skuteczności leczenia w czasie. Można je również wykorzystywać do antycypowania skutków ubocznych u niektórych chorych, dostarczając dane o potencjalnych miejscach akumulacji w zdrowej tkance. Nanocząstki charakteryzują się wyjątkowymi właściwościami fizykochemicznymi (rozmiar w skali nanometrycznej, unikalne właściwości magnetyczne i optyczne), a także przedłużoną retencją we krwi, aktywnym lub pasywnym celowaniem w nowotwór czy zwiększonym wychwytem komórkowym. Dlatego też z powodzeniem można je wykorzystać jako środki teranostyczne. Niewątpliwie, wraz z rozwojem nanotechnologii teranostyka stała się rzeczywistością i obecnie znajduje się w fazie wdrażania wiedzy naukowej „od stołu laboratoryjnego do łóżka chorego” (*ang. bench-to bedside*). W tym rozdziale przedstawiam wyniki moich badań, które mogą posłużyć do opracowania nowatorskich platform nanoteranostycznych w leczeniu chorób nowotworowych.

4.3.3.1. Porowate nanocząstki PDA modyfikowane jonami metali na potrzeby terapii i diagnostyki

Artykuł **A4** prezentuje wyniki badań dotyczących systemów teranostycznych opartych na mezoporowatych nanocząstkach polidopaminy (MPDA). Opisałem w nim możliwość modyfikacji tych nanostruktur różnymi związkami kompleksowymi metali, w celu uzyskania właściwości kontrastujących. Chociaż takie modyfikacje zostały już wcześniej pokazane, nanocząstki MPDA wzbogacone jonami żelaza (Fe), manganu (Mn) lub gadolinu (Gd) zostały po raz pierwszy otrzymane dzięki syntezie jednoetapowej (*ang. one-pot synthesis*). Synteza ta ułatwia jednoczesne tworzenie nanocząstek oraz włączanie jonów metali w obręb jednego naczynia reakcyjnego, co zapewnia ich jednorodną dystrybucję w całej strukturze nanomateriałów. Oprócz możliwości diagnostycznych, otrzymane nanoformulacje wykazywały silne właściwości fototermiczne. Co więcej, porowata struktura nanocząstek umożliwiła skuteczną inkorporację leków przeciwnowotworowych. Dlatego też środki teranostyczne takie jak nanocząstki MPDA zawierające jony metali (Fe, Gd lub Mn) mają szansę zrewolucjonizować terapię nowotworów, zapewniając diagnostykę w czasie rzeczywistym, a także możliwość opracowania spersonalizowanych schematów leczenia.

Otrzymane nanocząstki charakteryzowały się kulistym kształtem (*ryc. 4A*). Obecność metali w nanocząstkach potwierdzono za pomocą analizy spektrometrii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (*ang. energy dispersive spectroscopy (EDS)*) (*ryc. 4B*), która wykazała ich równomierny rozkład w całej strukturze, a nie tylko na powierzchni. Wszystkie badane materiały posiadały widoczne pory (rozmiar ok. 10–20 nm), które zwiększają zdolność nanoosników do załadunku leków, w porównaniu z materiałami nieporowatymi. Nanocząstki modyfikowane Fe (MPDAFe) miały najmniejszą średnicę hydrodynamiczną. Jej wartość była na poziomie ok. 210 nm. Z kolei te zawierające Mn (MPDAMn) osiągnęły blisko 250 nm. Największe (290nm) spośród trzech układów okazały się nanocząstki modyfikowane Gd (MPDAGd). Z drugiej strony, nanocząstki z Mn wykazywały najniższy potencjał zeta (–26 mV), podczas gdy te z Fe i Gd posiadały wartości potencjału zeta bliskie 0 mV.

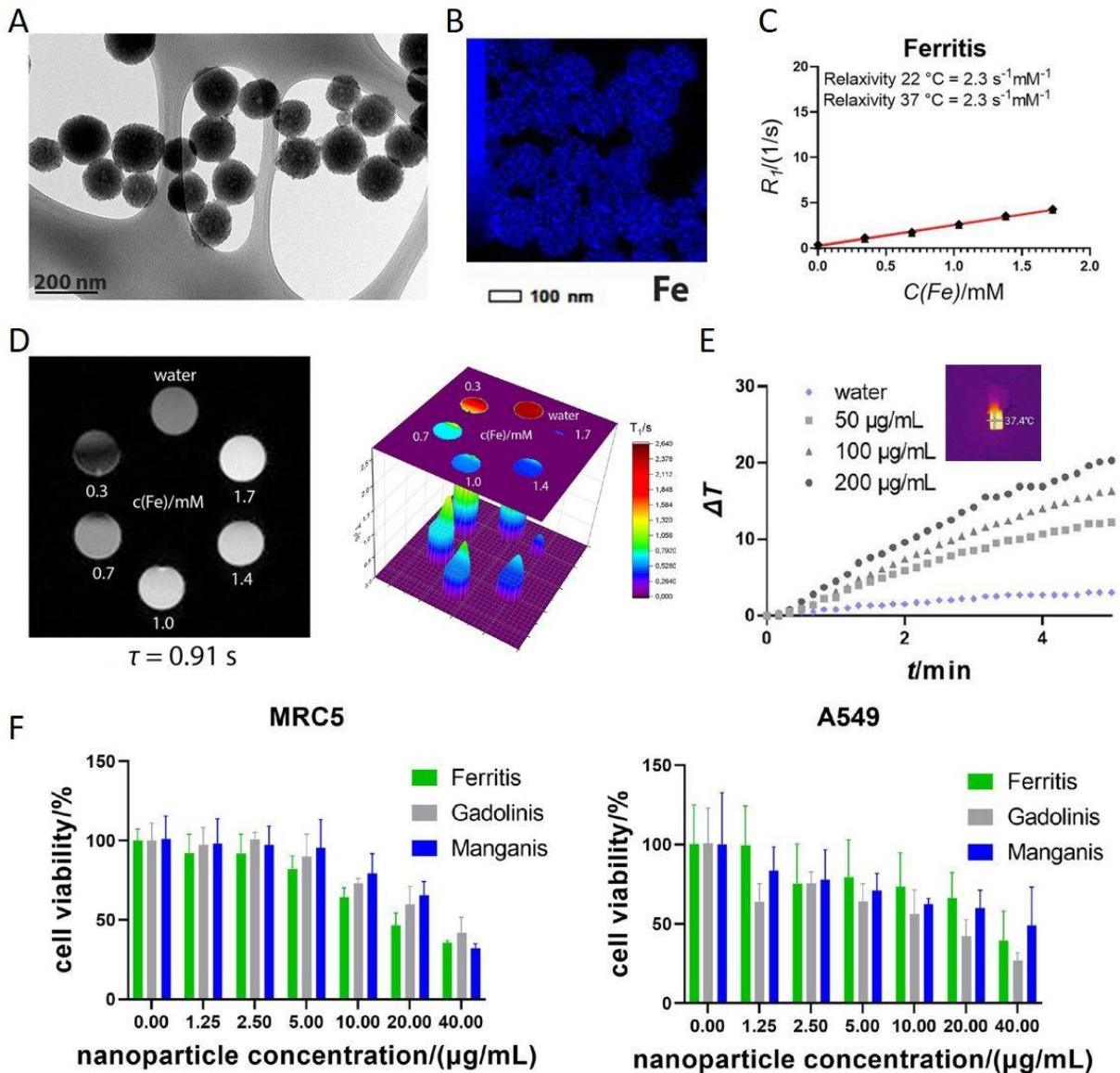
Włączenie składników metalicznych do syntezy nanocząstek miało na celu wykorzystanie ich paramagnetycznej natury, a w konsekwencji podniesienie ich wydajności jako środków kontrastujących w obrazowaniu MRI. Uzyskane wyniki potwierdziły te właściwości we wszystkich trzech wariantach nanomateriałów. Krzywe podatności magnetycznej zgodne z prawem Curie oraz krzywe namagnesowania wykazały typowy profil obserwowany w tego rodzaju materiałach. Co więcej, ocena porównawcza z niemodyfikowaną polidopaminą dowiodła, że charakterystyczne sygnatury magnetyczne są rezultatem wprowadzenia jonów metali.

Relaksacyjność jest kluczowym parametrem oceny skuteczności nanocząstek jako środków kontrastujących w obrazowaniu MRI. Wartości relaksacyjności oparte na pomiarach szybkości relaksacji podłużnej w polu o indukcji 0,4 T wyniosły $2,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, $4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ i $19 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ odpowiednio dla nanocząstek modyfikowanych Fe (*ryc. 4C*), Gd i Mn. Eksperymenty obrazowania MRI dodatkowo potwierdziły duży potencjał kontrastujący badanych nanomateriałów, zarówno na obrazach ważonych T_1 (*ryc. 4D*), jak i T_2 . Nanocząstki

modyfikowane Fe i Gd wykazywały wartości relaksacyjności, które są konkurencyjne, a nawet przewyższają standardowo stosowane środki kontrastujące, takie jak Teslascan, Magnevist lub Prohance [31]. Z kolei nanocząstki modyfikowane Mn miały znacznie wyższe wartości relaksacyjności, niż powszechnie stosowane formułacje komercyjne. Dlatego też z powodzeniem mogą konkurować ze środkami kontrastującymi na bazie nanocząstek takimi jak znakowane Gd nanocząstki tlenku żelaza. Wyniki uzyskane w kierowanej przeze mnie grupie badawczej sugerują możliwość wykorzystania nanomateriałów z Fe, Gd i Mn w obrazowaniu MRI, a zarazem przyczyniają się do rozwoju technologii obrazowania diagnostycznego.

W kolejnym etapie badań oceniono właściwości fototermiczne otrzymanych platform teranostycznych opartych na nanocząstkach polidopaminy modyfikowanej jonami Fe, Gd lub Mn. Uzyskane wyniki pokazały zależny od stężenia wzrost temperatury dla wszystkich trzech typów nanomateriałów (*ryc. 4E*). Warto zaznaczyć, że zarejestrowane zmiany temperatury przekraczały 20 °C. Świadczy to o znacznej wydajności fototermicznej wszystkich badanych nanoformułacji. Rezultat ten potwierdza potencjał nanosystemów do zastosowania ich w terapii fototermicznej. Zaobserwowany wzrost temperatury naświetlanych nanocząstek stwarza szansę na precyzyjną i kontrolowaną indukcję hipertermii w docelowych tkankach. Co więcej, uniwersalność nanonośników PDA otwiera możliwość łączenia fototerapii z innymi metodami terapeutycznymi, takimi jak np. chemioterapia.

Ocenę cytotoksyczności nanocząstek modyfikowanych Fe, Gd i Mn przeprowadziłem na nienowotworowych komórkach linii MRC-5 (ludzkich fibroblastach) oraz na nowotworowych komórkach A549 (komórki ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc) za pomocą testu WST-1 z 48-godzinnym okresem inkubacji (*ryc. 4F*). Zakres testowanych stężeń dla każdego typu nanocząstek wynosił od 1,25 do 40 µg/ml. W przypadku komórek MRC-5, nanocząstki z Fe, Gd i Mn wykazywały brak znaczącej toksyczności do stężenia 10 µg/ml. Jednak przy najwyższym testowanym stężeniu (40 µg/ml), żywotność komórek została zredukowana do około 30%. Wyniki te wskazują na zależny od stężenia wpływ na żywotność komórek. Jednocześnie zwracają uwagę na stosunkowo korzystny profil bezpieczeństwa przy niższych stężeniach. Co ciekawe, w przypadku komórek A549 uzyskano podobny efekt dla nanocząstek modyfikowanych Fe i Mn. Z kolei nanocząstki z Gd wyraźniej wpływały na spadek żywotności komórek, w porównaniu z dwoma innymi typami nanomateriałów. Przeprowadzone badania okazały się niezbędne do oceny profilu bezpieczeństwa modyfikowanych nanocząstek PDA jako potencjalnych platform teranostycznych. Zaobserwowana zależna od stężenia odpowiedź w komórkach MRC-5 i A549 pozwala na takie dobranie zakresu dawkowania nanocząstek, które minimalizuje efekty cytotoksyczne, przy jednoczesnej maksymalizacji skuteczności terapeutycznej. Przedstawione analizy biokompatybilności wnoszą cenne spostrzeżenia dotyczące potencjalnej przydatności nanocząstek PDA modyfikowanych Fe, Gd i Mn jako bezpiecznych i skutecznych platform do zintegrowanego leczenia i obrazowania komórek nowotworowych.



Rycina 4. Wybrane wyniki zastosowania nanocząstek MPDAFe jako platformy do terapii i diagnostyki: zdjęcia z mikroskopii TEM (A), analiza EDS (B), analiza relaksacyjności (C), analiza własności kontrastujących T_1 (D), ocena właściwości fototermicznych (E), ocena żywotności komórek inkubowanych z nanocząstkami MPDA modyfikowanymi jonami Fe, Gd i Mn za pomocą testu WST-1 (F).

4.3.3.2. Porowate nanocząstki PDA pokryte błoną komórkową do terapii i obrazowania MRI

Połączenie precyzyjnego celowania w komórki nowotworowe, kontrolowanego uwalniania leku oraz monitorowania efektu terapeutycznego w czasie rzeczywistym oferuje niespotykane dotąd możliwości spersonalizowanych i skutecznych metod leczenia. Nanocząstki gromadzą się preferencyjnie w miejscu guza poprzez pasywne i aktywne mechanizmy celowania. Zgodnie z głównym paradygmatem nanomedycyny, tkanka nowotworowa koncentruje nanocząstki w szybszym tempie, niż inne tkanki. Wynika to z nieszczelności układu naczyniowego, a także dysfunkcji układu limfatycznego, które uniemożliwiają odprowadzanie nanocząstek z nowotworu. Proces ten, nazywany efektem

wzmocnionej przepuszczalności i retencji (*ang. enhanced permeabilization and retention (EPR)*) [32], odpowiada tylko za 3–25% akumulacji nanocząstek w nowotworze [33]. Dalszy rozwój technologii syntezy nanocząstek umożliwił wprowadzenie na ich powierzchnię aktywnie ukierunkowanych ligandów, które specyficznym wiąże się z receptorami komórek nowotworowych w celu poprawy dostarczania [32]. Modyfikacja powierzchni nanocząstek za pomocą (poli)sacharydów, peptydów, aptamerów, przeciwciał monoklonalnych i małych cząsteczek [34], które wiążą się z receptorami ulegającymi nadekspresji na komórkach nowotworowych, może zwiększyć wychwyty komórkowy poprzez proces endocytozy. Taki sposób celowania, z wykorzystaniem ligandu oddziałującego z receptorami kwasu foliowego na powierzchni komórek raka wątroby, został przedstawiony przez mnie w publikacjach **A2** i **A3**.

W ostatnich latach coraz więcej badań skupia się na wykorzystaniu błon komórkowych jako elementów poprawiających bezpieczeństwo biologiczne i właściwości celujące nośników leków przeciwnowotworowych opartych na nanocząstkach. Powłoka z membrany nadaje syntetycznym nanomateriałom cechy komórek, co czyni je ciekawą platformą do różnych zastosowań biomedycznych. W tym celu nanocząstki otacza się błonami komórkowymi wyizolowanymi z komórek różnego typu, takich jak np. czerwone i białe krwinki, komórki nowotworowe, komórki macierzyste, płytki krwi czy inne. Każdy rodzaj błony, zależnie od źródła pochodzenia, wyposaża nanocząstki w dodatkowe funkcje biologiczne. Wśród nich wymienić można m.in. przedłużoną retencję we krwi, ucieczkę spod nadzoru układu odpornościowego lub celowanie w miejsce występowania komórek nowotworowych tego samego typu. W publikacji przeglądowej **A5** podsumowałem badania zmierzające do opracowania biomimetycznych nanonośników polimerowych w celu skutecznego leczenia nowotworów. Oprócz wielu przykładów różnych platform wielofunkcyjnych pokrytych błonami komórkowymi, w pracy zamieściłem też skondensowany przegląd wybranych materiałów polimerowych stosowanych w terapiach nowotworowych z uwzględnieniem podstawowych metod ich syntezy i charakteryzacji. Ponadto opisałem różne typy komórek, które mogą stanowić źródło pozyskiwania błon komórkowych, a także metody pokrywania i charakteryzowania tak otrzymanych nanonośników. Zaprezentowałem także ograniczenia i wyzwania jakim należy sprostać przy projektowaniu takich systemów. W mojej ocenie informacje zawarte w publikacji pozwoliły na usystematyzowanie wiedzy dotyczącej otrzymywania i zastosowania nanocząstek pokrytych błonami komórkowymi. Bez wątpienia można ją wykorzystać do projektowania nowych, skutecznych nanonośników do dostarczania środków terapeutycznych, a także leczenia i obrazowania nowotworów.

Technologię opłaszczania nanocząstek błonami komórkowymi wykorzystałem w badaniach przedstawionych w artykule **A6**. Charakteryzuję w nim zaprojektowany przez mnie nowatorski system dostarczania leku składający się z modyfikowanych żelazem mezoporowatych nanocząstek polidopaminy pokrytych błonami wyizolowanymi z komórek nowotworowych (MPDAFe@Mem). Badania skupiły się na kompleksowej charakterystyce fizykochemicznej, ocenie biokompatybilności oraz efektu fototermicznego, a także skuteczności chemioterapeutycznej tych nanocząstek na modelu raka wątroby. Dodatkowo

nanonośnik odznaczał się bardzo dobrymi właściwościami kontrastującymi, czego dowiodły również wyniki zaprezentowane w pracy **A4**. Uzyskane rezultaty ujawniły ogromny potencjał tych systemów dostarczania leków pokrytych błoną komórkową w zakresie spersonalizowanej terapii i diagnostyki nowotworów.

Otrzymane nanocząstki MPDAFe miały około 160 nm średnicy i widoczne pory o rozmiarach 10–20 nm (*ryc. 5A*). Obecność żelaza w całym przekroju nanocząstek potwierdzono mapowaniem pierwiastkowym metodą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (*ang. energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy*) oraz spektrometrią mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (*ang. inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)*). Załadunek lekiem modelowym DOX nanocząstek MPDAFe był wysoki i wynosił około 90%, podczas gdy efektywność enkapsulacji to około 46%. Uwalnianie leku było najskuteczniejsze dla pH 4,5 oraz w obecności glutationu (GSH), czyli w warunkach, które odwzorowują środowisko chemiczne komórek nowotworowych.

Protokół opłaszczania nanocząstek MPDAFe błonami wyizolowanymi z komórek linii HepG2 łączył dwie najczęściej stosowane techniki. W pierwszej kolejności sformowano pęcherzyki błonowe metodą ekstruzji, czyli kilkukrotne przepuszczanie próbki przez porowaty filtr. Następnie pęcherzyki zmieszano z nanocząstkami i poddano sonikacji za pomocą ultradźwięków o dużej mocy. W kolejnym etapie ponownie przepuszczono je przez filtr z porami o wielkości 800 nm. W ten sposób otrzymano nanonośnik pokryty membraną (MPDAFe@Mem). Skuteczność opłaszczania potwierdzono poprzez zwiększenie średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta analizowanych układów. W efekcie wyniki ujawniły wzrost średnicy o około 10 nm, co jest zgodne z teoretyczną grubością błony komórkowej. Ponadto wartość potencjału zeta spadła po opłaszczaniu i była bliska wartości pęcherzyków błonowych (-40 mV). Obecność białek błonowych potwierdzono za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (*ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*) (*ryc. 5C*). Wzory białkowe izolatu błonowego, pęcherzyków błonowych i nanocząstek MPDAFe pokrytych błoną wykazały wysoki stopień podobieństwa, co sugeruje pomyślną translokację białek błonowych na nanocząstki. Warstwa membrany wokół nanocząstek była również widoczna na obrazach z mikroskopii TEM (*ryc. 5B*).

Relaksacyjność potencjalnych środków kontrastujących jest istotnym parametrem przy ocenie ich skuteczności w zastosowaniach MRI. Uzyskane wartości r_1 były zbliżone do kilku klinicznie stosowanych środków kontrastujących [31]. Nanocząstki MPDAFe@Mem redukowały również czas relaksacji T_2 (*ryc. 5D*).

W kolejnym etapie zbadano właściwości fototermiczne nanocząstek MPDAFe@Mem, aby ocenić ich zdolność do przekształcania energii świetlnej w ciepło, co ma fundamentalne znaczenie w terapii fototermicznej. Otrzymane krzywe zmian temperatury oraz obrazy z kamery termowizyjnej wykazały wyraźną zależność wzrostu temperatury od stężenia nanocząstek oraz od gęstości mocy lasera NIR (*ryc. 5E*). Zmiany temperatury pozostały stabilne w czasie pięciu cykli naświetlania, co wskazuje na powtarzalną odpowiedź fototermiczną nanocząstek. Zachowanie to ma kluczowe znaczenie dla osiągnięcia skutecznej i kontrolowanej terapii fototermicznej, gdzie wymagana jest powtarzalność stosowanego

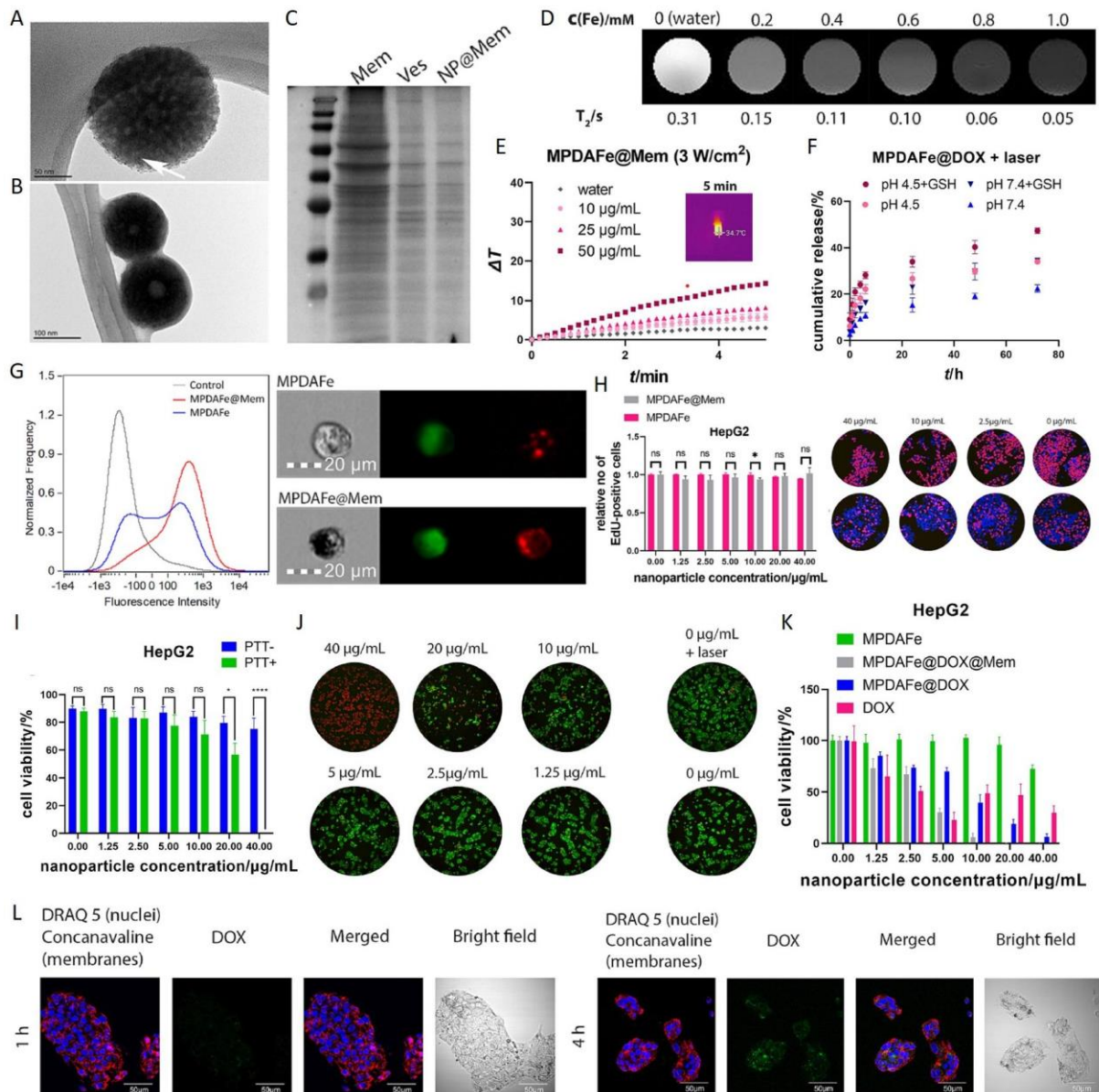
leczenia. Miejscowe podgrzewanie wywołane efektem fototermicznym nanocząstek spowodowało również uwolnienie załadowanej DOX, zapewniając kontrolowane uwalnianie leku w celowanej terapii przeciwnowotworowej (ryc. 5F).

Internalizację nanocząstek MPDAFe i MPDAFe@Mem do komórek linii nowotworowej HepG2 oceniano po 1 i 4 godzinach inkubacji za pomocą cytometrii przepływowej z funkcją obrazowania. Cytometria przepływowa z funkcją obrazowania to czuła technika badawcza, która łączy wieloparametrową analizę populacji komórek z uzyskiwaniem obrazu pojedynczych komórek w populacji. Wyniki potwierdziły, że nanocząstki MPDAFe@Mem wniknęły do komórek w większym stopniu, niż nanocząstki MPDAFe (ryc. 5G). Dowodzi to, że powłoka błonowa nanocząstek znacząco zwiększa ich internalizację do homotypowych komórek nowotworowych (komórki tego samego typu). Zwiększona internalizacja obserwowana po 1 godzinie inkubacji sugeruje szybki wychwyty nanocząstek MPDAFe@Mem przez komórki, który jest ułatwiony przez interakcje między błoną komórkową a powłoką membranową nanocząstek. Wzmocniony trend internalizacji nasilił się po 4 godzinach, wskazując zależną od czasu akumulację nanocząstek w komórkach. Zwiększona internalizacja nanocząstek do komórek nowotworowych jest kluczowym krokiem do ukierunkowanego dostarczania leków, które umożliwi jego miejscowe i specyficzne działanie terapeutyczne.

Biokompatybilność systemów dostarczania leków opartych na nanocząstkach ma kluczowe znaczenie dla ich potencjalnego zastosowania klinicznego. Cytotoksyczność nanocząstek MPDAFe i MPDAFe@Mem oceniałem zarówno na komórkach prawidłowych (linia MRC-5), jak i nowotworowych (linia HepG2) za pomocą analizy integralności błony komórkowej (żywe/martwe) oraz poziomu proliferacji komórek. Wyniki testu na integralność błony komórkowej przy użyciu wieloparametrowej analizy obrazu wykazały znikomą toksyczność nanocząstek MPDAFe dla komórek MRC-5 i prawie 100% żywotności komórek obserwowaną w zakresie testowanych stężeń nanocząstek (w zakresie od 1,25 do 40 $\mu\text{g/ml}$). W przypadku komórek linii HepG2 nieznaną toksyczność zaobserwowano przy najwyższym stężeniu (40 $\mu\text{g/ml}$) nanocząstek MPDAFe@Mem. Wyniki testu proliferacji komórek EdU wykazały, że zarówno nanocząstki MPDAFe, jak i MPDAFe@Mem nie wpływają znacząco na obniżenie tempa proliferacji komórek MRC-5 w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 5H). Rezultaty te wskazują na nietoksyczny charakter zarówno nanocząstek MPDAFe, jak i MPDAFe@Mem, w stosunku do komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Dowodzi to ich potencjału jako bezpiecznych systemów dostarczania leków.

W celu oceny skuteczności terapii fototermicznej, nanocząstki MPDAFe@Mem inkubowano z komórkami nowotworowymi linii HepG2. Do porównania wyników żywotności pomiędzy komórkami poddanymi naświetlaniu laserem NIR o mocy 3 W/cm^2 oraz bez naświetlania, zastosowałem test Count&Viability i test integralności błony komórkowej (żywe/martwe). Wyniki z cytometru przepływowego wykazały niewielki spadek żywotności komórek nienaświetlanych laserem, co sugeruje niską toksyczność nanocząstek MPDAFe@Mem (ryc. 5I). Natomiast naświetlanie komórek inkubowanych z wyższymi stężeniami nanocząstek prowadziło do ich całkowitej eliminacji. Obrazy mikroskopowe komórek HepG2 w teście żywe/martwe dodatkowo potwierdziły znaczną toksyczność

indukowaną przez nanocząstki MPDAFe@Mem traktowane laserem (ryc. 5J). Ilość żywych komórek wzrastała, wraz ze spadkiem stężenia nanocząstek. Podkreśla to zależny od stężenia charakter efektu cytotoksycznego. Wyniki sugerują, że naświetlanie laserem wzmacnia właściwości przeciwnowotworowe nanocząstek MPDAFe@Mem, co prowadzi do skutecznego obniżania żywotności badanych komórek. Wykorzystując efekt fototermiczny, omawiane nanocząstki mogą selektywnie atakować komórki nowotworowe i indukować ich śmierć.



Rycina 5. Wybrane wyniki zastosowania nanocząstek MPDAFe@Mem jako platformy do terapii i obrazowania MRI: zdjęcia z mikroskopii TEM (A,B), analiza optaszczania za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (C), obrazy T_2 -ważone (D), ocena właściwości fototermicznych (E), ocena uwalniania DOX (F), ocena internalizacji nanocząstek za pomocą cytometrii przepływowej (G), ocena żywotności komórek za pomocą testu proliferacji EdU (H), ocena żywotności komórek po naświetlaniu laserem NIR za pomocą testu Count&Viability (I) oraz testu integralności błony komórkowej (J), ocena efektu chemioterapeutycznego w komórkach za pomocą testu WST-1 (K), zdjęcia internalizacji z konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (L).

Potencjał chemioterapeutyczny opłaszczonych błonami nanocząstek inkorporowanych doksorubicyną (MPDAFe@DOX@Mem) oceniałem na komórkach nowotworowych linii HepG2 przy użyciu kilku testów. Wyniki testu WST-1 wykazały minimalny wpływ nanocząstek MPDAFe na żywotność komórek w większości testowanych stężeń (1,25–20 µg/ml) (ryc. 5K). Jednakże przy najwyższym stężeniu (40 µg/ml) zaobserwowałem umiarkowany spadek żywotności komórek, wynoszący około 20%. Z kolei nanocząstki MPDAFe@DOX@Mem wykazały silne działanie chemioterapeutyczne, powodując całkowitą eliminację komórek przy stężeniu 20 µg/ml. Nanocząstki MPDAFe@DOX wykazywały znaczną cytotoksyczność, aczkolwiek mniej wyraźną, niż nanocząstki MPDAFe@DOX@Mem z około 10% żywotnością komórek przy najwyższym stężeniu. Ponadto analiza porównawcza nanocząstek na podstawie testu EdU ujawniła spadek odsetka proliferujących komórek w obu przypadkach. Warto zauważyć, że nanocząstki MPDAFe@DOX@Mem odznaczały się wyższą cytotoksycznością w porównaniu z nanocząstkami MPDAFe@DOX i wolną DOX. Sugeruje to wysoką skuteczność terapeutyczną, którą osiągnięto dzięki synergistycznemu działaniu nanonośnika i powłoki z błony komórek nowotworowych. Dodatkowo obrazy z mikroskopii konfokalnej potwierdziły wyższą internalizację nanocząstek MPDAFe@DOX@Mem po 4 godzinach inkubacji z komórkami linii HepG2 (ryc. 5L). Intensywny wychwyt komórkowy i wewnątrzkomórkowa lokalizacja załadowanych DOX nanocząstek wskazuje na skuteczne dostarczanie leku do docelowych komórek nowotworowych. Badania dotyczące mezoprowatych nanocząstek PDA modyfikowanych jonami metali i opłaszczonych błonami komórkowymi przeprowadzono w ramach projektu SONATA 14, którego byłem kierownikiem.

4.3.3.3. Nanodiamenty pokryte PDA do terapii fototermicznej i obrazowania fluorescencyjnego

Nanodiamenty (*ang. nanodiamonds* (NDs)) dzięki swoim unikalnym właściwościom fizyko-chemicznym, a także doskonałej biokompatybilności mogą znaleźć zastosowanie zarówno w terapii, jak i diagnostyce nowotworów m.in. jako wielofunkcyjna platforma do obrazowania fluorescencyjnego oraz terapii fototermicznej. Jednym ze sposobów bioobrazowania z użyciem NDs jest wykorzystanie centrów barwnych, czyli naturalnych bądź wprowadzonych sztucznie defektów krystalicznej struktury, które zapewniają właściwości fluorescencyjne. Kluczowym etapem umożliwiającym wykorzystanie NDs w teranostyce jest również biofunkcjonalizacja ich powierzchni. Duża powierzchnia właściwa NDs oraz występowanie na niej grup funkcyjnych zawierających tlen ułatwia proces modyfikacji. Ponieważ nanodiamenty wykazują niską wydajność konwersji fototermicznej, muszą być modyfikowane odpowiednimi materiałami, jak np. PDA, aby można je było uznać za skuteczny środek fototermiczny. Biofunkcjonalizacja NDs polidopaminą pozwala dodatkowo na przyłączanie bioaktywnych cząsteczek, które mogą być efektywnie dostarczane do docelowych tkanek i komórek.

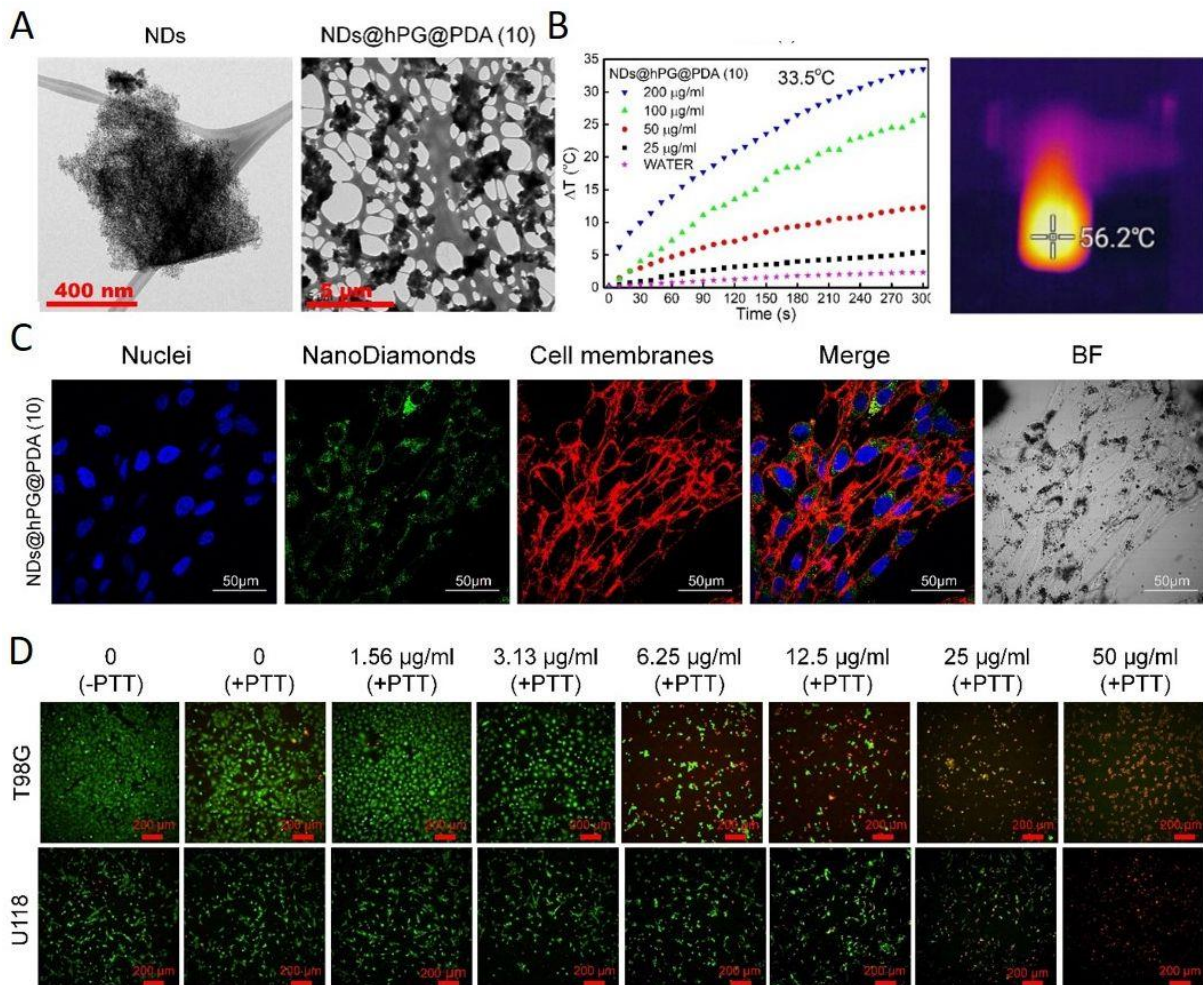
We wcześniejszych badaniach korzystałem z nanodiamentów otrzymywanych metodą kontrolowanej detonacji z grupami karboksylowymi na powierzchni, które nie dawały jednak zadowalającego sygnału fluorescencji. Wyniki zaprezentowane w publikacji **A7** dotyczą

zastosowania NDs wytworzonych w procesie ablacji laserowej jako bazy do syntezy wysoce biokompatybilnego układu bimodalnego, zarówno o właściwościach fluorescencyjnych, jak i fototermicznych. Nanodiamenty działały jako znacznik fluorescencyjny do obrazowania komórkowego, z kolei polidopaminowa otoczka zapewniała efekt fototermiczny. Wprowadzenie hiperglicerolu (hPG) na powierzchnię poprawiło stabilność NDs w wodzie, a także pomogło w ich dezagregacji. Niemodyfikowane NDs o wielkości ok. 5 nm szybko wytrącały się w postaci dużych agregatów, osiągając zwykle rozmiary powyżej 2 μm . Po funkcjonalizacji hPG, rozmiar NDs uległ zmniejszeniu, a rozkład średnicy hydrodynamicznej był znacznie węższy. Następnie przeprowadzono polimeryzację dopaminy na nanodiamentach funkcjonalizowanych hPG. Do dalszych eksperymentów wybrano próbki z najniższą (NDs@hPG@PDA (1)) i najwyższą (NDs@hPG@PDA (10)) (ryc. 6A) ilością prekursora PDA użytego w procesie powlekania. Powłoka polidopaminowa w próbce NDs@hPG@PDA (10) była blisko 4 razy grubsza, niż w próbce NDs@hPG@PDA (1) (odpowiednio 20 nm w porównaniu z 5 nm). Rozmiary cząstek w tych próbkach były porównywalne ze średnicą hydrodynamiczną, wynoszącą około 400 nm.

Dzięki obecności powłoki PDA, NDs wykazywały wzmocnione właściwości fototermiczne (ryc. 6B) i mogły być z powodzeniem zastosowane w fototerapii. Zgodnie z oczekiwaniami zmiana temperatury była widoczna w sposób zależny od stężenia nanomateriałów i wzrastała wraz z upływem czasu naświetlania laserem NIR. Próbka NDs@hPG@PDA z grubszą otoczką PDA dawała lepsze wyniki jako czynnik fototermiczny, ponieważ przy stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ temperatura roztworu wzrosła powyżej 10 $^{\circ}\text{C}$, po naświetleniu laserem o mocy 6 W/cm^2 . Taka temperatura jest wystarczająca, aby wywołać efekt terapeutyczny w komórkach nowotworowych. Zwiększone właściwości fototermiczne związane ze wzrostem grubości PDA były zgodne z wartościami wydajności konwersji fototermicznej nanodiamentów NDs@hPG@PDA (1) i NDs@hPG@PDA (10), obliczoną odpowiednio na blisko 14% i 30%. Dodatkowo analiza fotostabilności próbek wykazała, że można je stosować w co najmniej 5 cyklach naświetlania laserem. Wzrost temperatury roztworów NDs pod wpływem naświetlania laserem NIR potwierdzono także za pomocą kamery termowizyjnej.

Mimo obserwacji, iż PDA przyczynia się do tłumienia emisji fluorescencji, znaczniki NDs@hPG@PDA zachowały swoje właściwości i można było je łatwo śledzić za pomocą obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Możliwość uzyskania silnego sygnału sprawia, że nanocząstki te mogą odgrywać kluczową rolę w diagnozowaniu chorób nowotworowych. Aby potwierdzić właściwości optyczne NDs modyfikowanych PDA, przeprowadziłem eksperymenty wychwytu komórkowego na komórkach glejaka wielopostaciowego (linia U-118 MG) przy użyciu skaningowej mikroskopii konfokalnej (ryc. 6C). Nanocząstki NDs@hPG@PDA wnikały do komórek z wysoką wydajnością, rozprzestrzeniając się następnie po cytoplazmie, bez wnikania do jądra komórkowego. Ciemniejsze obszary pokazane na obrazach uzyskanych w świetle przechodzącym odpowiadały klastrom nanodiamentów pokrytych PDA, których sygnał był słabszy na obrazach

fluorescencyjnych. Jednakże sygnał fluorescencji NDs był na tyle silny, że pozwalał na śledzenie otrzymanych nanomateriałów wewnątrz komórek.



Rycina 6. Wybrane wyniki zastosowania nanodiamentów NDs@hPG@PDA (10) jako platformy do terapii fototermicznej i obrazowania fluorescencyjnego komórek glejaka wielopostaciowego: zdjęcia z mikroskopii TEM (A), ocena właściwości fototermicznych (B), zdjęcia internalizacji z konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (C), ocena żywotności komórek za pomocą testu integralności błony komórkowej (D).

Do oceny żywotności komórek wyselekcjonowałem próbkę wykazującą najlepsze właściwości fototermiczne i odpowiednie właściwości fluorescencyjne. Wpływ nanodiamentów NDs@hPG@PDA na integralność błony komórkowej fibroblastów MRC-5 oraz komórek glejaka wielopostaciowego (U-118 MG i T98G) oceniłem za pomocą testu Count&Viability z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zaobserwowałem wysoką biokompatybilność NDs, z niewielkim, niekorzystnym wpływem na analizowane komórki. NDs pokryte PDA wykazały zależny od stężenia spadek żywotności fibroblastów, jak również komórek glejaka (T98G), podczas gdy żywotność komórek U-118 MG nie uległa zmniejszeniu. Komórki glejaka inkubowane z NDs@hPG@PDA naświetlano następnie laserem NIR o mocy 6 W/cm². W efekcie zaobserwowano ich wysoką śmiertelność, związaną z generowaniem wysokiej temperatury. W przypadku komórek T98G, inkubacja w stężeniu

12,5 $\mu\text{g/ml}$ z NDs i naświetlanie laserem skutkowało znacznym spadkiem żywotności. Podobny rezultat był widoczny dla komórek U-118 MG w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie barwienia żywych i martwych komórek wizualizowałem uszkodzenie błony komórkowej wywołane naświetlaniem lasera (ryc. 6D). Ilość martwych komórek w znacznej mierze była zależna od stężenia NDs w dołku płytki hodowlanej. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego potwierdziły wyniki uzyskane metodą cytometrii przepływowej, tj. wykazały, że nawet niskie stężenia próbki NDs@hPG@PDA (12,5 $\mu\text{g/ml}$) mogą być skuteczne w terapii fototermicznej glejaka wielopostaciowego.

4.3.4. Podsumowanie

Nanocząstki cieszą się szerokim zainteresowaniem jako inteligentne narzędzie w terapii przeciwnowotworowej. W efekcie nanobiotechnologia jako nauka może zrewolucjonizować współczesną medycynę, szczególnie na etapie wczesnej diagnozy i leczenia nowotworów. Najnowsza generacja bionanomateriałów pozwala łączyć tradycyjne terapie z tymi eksperymentalnymi, jak np. terapia fototermiczna, fotodynamiczna, celowane dostarczanie leków/kwasów nukleinowych czy magnetyczna hipertermia. Przyczynia się to do osiągnięcia synergistycznego efektu leczenia. Zastosowanie bionanocząstek pozwala także na zwiększenie czułości detekcji, jak również umożliwia szybkie wykrywanie i bardziej precyzyjną diagnostykę komórek nowotworowych.

Nanocząstki to niezwykle obiecujące środki teranostyczne, jednakże ich słaba dostępność biologiczna, niestabilność w układzie krążenia oraz niedostateczna biodystrybucja w tkankach i toksyczność stanowią pewne ograniczenia ich praktycznego zastosowania. Zaprezentowane przeze mnie biofunkcjonalizacje nanocząstek umożliwiają celowane dostarczanie środków terapeutycznych oraz zwiększenie efektywności terapii. Dzięki selektywnemu kierowaniu nanocząstek do komórek nowotworowych, ogranicza się toksyczność systemową i negatywne skutki uboczne takie jak uszkodzenia zdrowych tkanek. Biofunkcjonalizacja zwiększa stabilność nanocząstek w środowisku biologicznym, co chroni przenoszone substancje (leki, kwasy nukleinowe) przed degradacją, jak również umożliwia kontrolowane i aktywne ich uwalnianie w odpowiedzi na specyficzne warunki w mikrośrodowisku guza. **Opisane prace pokazują mój znaczący wkład w rozwój biotechnologii medycznej, który polega na opracowaniu zaawansowanych nanocząstek o ulepszonych właściwościach biologicznych.** Tego typu modyfikacje w połączeniu z takimi nanomateriałami nie były wcześniej wykorzystywane w terapii i diagnostyce danych nowotworów. Dzięki tym badaniom otwierają się nowe możliwości tworzenia innowacyjnych produktów i rozwiązań biotechnologicznych, które mogą wydłużyć i poprawić jakość życia pacjentów onkologicznych. Dowiodłem, że sferyczne nanocząstki PDA (**A1** i **A2**) oraz nanomateriały magnetyczne pokryte PDA (**A3**) mogą być z powodzeniem stosowane w skojarzonej, celowanej terapii różnych typów nowotworów. Z kolei wielozadaniowe platformy teranostyczne na bazie porowatych nanocząstek PDA modyfikowanych jonami metali (**A4**), jak również opłaszczanych błonami komórkowymi (**A6**) czy nanodiamenty z otoczką z PDA (**A7**) można wykorzystać do zintegrowanego leczenia i obrazowania komórek

nowotworowych. W celu dalszego potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa opracowanych nanonośników, kolejny etap moich badań będzie obejmował badania na modelach zwierzęcych.

Terapie oparte na wielozadaniowych bionanocząstkach charakteryzują się wysoką skutecznością leczenia, możliwością personalizacji, a jednocześnie znacznie ograniczają występowanie ewentualnych skutków ubocznych. Wszystko to czyni je idealnym materiałem do budowy zaawansowanych platform teranostycznych. **Rezultaty moich doświadczeń mają ogromne znaczenie w dalszych badaniach nad tego typu bionanomateriałami, a zarazem rzucają nowe światło na ich charakterystykę, funkcjonalizację i wykorzystanie w zaawansowanej terapii przeciwnowotworowej.** To krok w kierunku potencjalnego zastosowania w praktyce klinicznej. Terapia dostosowana do potrzeb konkretnego pacjenta, z użyciem nanocząstek opłaszczonych błonami komórkowymi wyizolowanymi z komórek chorego, pozwala na „maskowanie” nanocząstek, co może umożliwiać im swobodne krążenie w organizmie bez wykrycia przez układ odpornościowy. Dzięki swoim unikalnym właściwościom zaprojektowane układy mogą również znaleźć zastosowanie podczas eliminacji komórek nowotworowych pod kontrolą obrazowania. Takie połączenie może zmniejszyć ryzyko przerzutów, a także pozytywnie wpłynąć na określenie bezpiecznych marginesów chirurgicznych. Daje to nadzieję na możliwość skutecznego, a przede wszystkim spersonalizowanego leczenia nowotworów.

Do najważniejszych osiągnięć w omawianym obszarze tematycznym zaliczam:

1. Opracowanie nanonośnika na bazie nanocząstek polidopaminy modyfikowanych dendrymerami PAMAM o niskiej toksyczności, efektywnym załadunku i kontrolowanym uwalnianiu doksorubicyny, silnym wiązaniu dwuniciowego ATN-RNA oraz wysokich właściwościach fototermicznych do skutecznej chemio-, geno- i fototerapii glejaka wielopostaciowego. Potwierdzenie efektu terapeutycznego nanocząstek PDA uzyskałem poprzez zmniejszenie tempa proliferacji komórek glejaka, spadek ich żywotność po naświetlaniu laserem NIR oraz zmniejszenie ekspresji białka TN-C.
2. Opracowanie nanonośnika na bazie hybrydowych nanocząstek (nanocząstki polidopaminy, nanomateriały magnetyczne pokryte polidopaminą) modyfikowanych dendrymerami PAMAM o niskiej toksyczności, efektywnym załadunku i kontrolowanym uwalnianiu doksorubicyny oraz wysokich właściwościach fototermicznych do łączonej chemio- i fototerapii nowotworu wątroby. Efekt celowania w komórki nowotworu wątroby uzyskałem poprzez zastosowanie kwasu foliowego na powierzchni nanocząstek modyfikowanych dendrymerami PAMAM. Udowodniłem, że biofunkcjonalizacja kwasem foliowym znacząco wpłynęła na poprawę efektu chemioterapeutycznego badanych nanomateriałów. Wykazałem, że generowanie reaktywnych form tlenu podczas naświetlania laserem NIR było głównym mechanizmem prowadzącym do apoptozy komórek nowotworu wątroby. Potwierdziłem, że terapia łączona oparta o synergiczne

działanie poszczególnych monoterapii skutkowało efektami silniejszymi niż oddzielnie stosowane metody.

3. Opracowanie platformy teranostycznej na bazie porowatych nanocząstek polidopaminy modyfikowanych jonami metali (Fe, Gd, Mn) o niskiej toksyczności, wysokich właściwościach fototermicznych oraz o wysokim potencjale kontrastującym w obrazowaniu MRI, przewyższającym standardowo stosowane środki kontrastujące. Wykazałem efektywny załadunek dokсорubicyny na nanocząstkach polidopaminy modyfikowanych jonami żelaza (MPDAFe) oraz jej uwalnianie pod wpływem bodźców zewnętrznych (pH, GSH, laser).
4. Uzyskanie efektu celowania w komórki nowotworu wątroby poprzez opracowanie procedury opłaszczania porowatych nanocząstek polidopaminy modyfikowanych jonami żelaza (MPDAFe) błoną komórkową wyizolowaną z komórek tego samego typu. Potwierdziłem, że internalizacja nanocząstek MPDAFe do komórek homotypowych była wzmocniona dzięki powlekanii ich powierzchni błoną komórkową. Wykazałem zdolność tych nanocząstek do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych w wyniku zastosowania terapii fototermicznej i chemioterapii.
5. Opracowanie platformy teranostycznej na bazie nanodiamentów pokrytych polidopaminą o niskiej toksyczności, silnych właściwościach fluorescencyjnych i wysokich właściwościach fototermicznych do obrazowania i fototerapii nowotworu mózgu. Wykazałem możliwość obrazowania fluorescencyjnego nanodiamentów pokrytych polidopaminą internalizowanych przez komórki glejaka wielopostaciowego oraz potwierdziłem ich efekt terapeutyczny poprzez spadek żywotność komórek po naświetlaniu laserem NIR.

5.

Istotna aktywność naukowa realizowana w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

5.1. Opis dorobku naukowego nie związanego z tematem habilitacji

Biomedyczne zastosowanie nanomateriałów

Moje zainteresowania badawcze skupiają się wokół wykorzystania różnych typów nanomateriałów w biomedycynie. Obecnie zajmuję się badaniem cytotoksyczności nanocząstek konwertujących energię w górę (*ang. up-converting nanoparticles* (UCNPs)) domieszkowanych jonami lantanowców (Ln^{3+}). Materiały te mogą przekształcać fotony o niskiej energii z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR), w fotony o wyższej energii w procesie absorpcji dwufotonowej. Materiały konwertujące energię w górę mogą mieć różne zastosowania, takie jak np. wyświetlacze, ogniwa słoneczne, czujniki, lasery, biosensory, nośniki leków itp. Szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie nanocząstek konwertujących energię w górę jako biomarkerów. Jest to możliwe dzięki ich wzbudzeniu w tzw. oknach optycznych (pierwsze (NIR-I, 750-900 nm), drugie, (NIR-II, 1100-1350 nm) oraz trzecie (NIR-III, 1500-1700 nm)). Stosując wzbudzenie w przedstawionych zakresach, możliwa jest głęboka penetracja tkanek, przy zmniejszonym rozpraszaniu fotonów i minimalnej autofluorescencji. Dzięki tej właściwości, szkodliwe skutki zastosowania promieniowania podczerwonego dla zdrowych komórek są mniejsze, niż w porównaniu do wzbudzenia UV. W publikacjach **B1**, **B6**, **B8** i **B11** odpowiadałem za ocenę toksyczności nanocząstek konwertujących energię w górę. Co więcej, właściwości fluorescencyjne tych układów zostały przeze mnie wykorzystane do ich obrazowania w komórkach i większych organizmach, takich jak rozwielitka wielka (*Daphnia magna*).

Prowadzę również badania w zakresie oceny toksyczności takich nanomateriałów jak nanocząstki złota, nanocząstki krzemionki, nanocząstki magnetyczne i nanocząstki tlenku cynku, które znajdują coraz szersze zastosowanie w bionanotechnologii. Do moich kompetencji należy także obrazowanie penetracji nanocząstek oraz ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii skaningowej. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacjach **B3**, **B4**, **B5**, **B7**, **B9**, **B10**, **B12**, **B13**, **B15**, **B16**, **B18**, **B19**, **B20**, **B22** i **B24**.

Badanie modyfikowanych powierzchni i powłok w zakresie ich aktywności biologicznej to kolejny obszar moich zainteresowań naukowych. W ostatnim czasie dużą uwagę naukowców, zwłaszcza w obszarze medycyny regeneracyjnej i dostarczaniu leków, budzi technika elektroprzędzenia i jej modyfikacje. Publikacja **B14** skupia się na analizie profilu uwalniania, a także cytotoksyczności materiałów elektroprzędzonych z hydrofobowych i hydrofilowych polimerów biodegradowalnych z inkorporowanym, słabo rozpuszczalnym cilostazolem. Aby uzyskać lepszy wgląd w ich potencjalne zastosowanie w chorobach układu

sercowo-naczyniowego, dokonałem oceny właściwości biologicznych pojedynczych włókien otrzymanych na kolektorach stacjonarnych oraz struktur 3D. Uzyskane materiały elektroprzędzone poddano analizie wpływu na przeżywalność i fizjologię komórek oraz ich geometrię rozwoju. Przedstawione w publikacji **B23** elektroprzędzone maty zawierające antybiotyki, zastosowano jako potencjalny opatrunek na rany stomatologiczne o działaniu antibakteryjnym ułatwiający wzrost fibroblastów dziąsłowych. Cienkie warstwy ZnO znalazły zastosowanie w szerokiej gamie urządzeń, takich jak tranzystory, diody elektroluminescencyjne, czujniki czy biosensory. Z badań przedstawionych w publikacji **B17** wynika, że powłoka ZnS nie wpływała negatywnie na właściwości antibakteryjne warstw ZnO, a nawet nieznacznie je zwiększała. Z kolei Artykuł **B21** miał na celu zbadanie wpływu domieszkowania powłok Ti-Si-N jonami Cu, na właściwości fizyczne i biologiczne, do potencjalnych zastosowań biomedycznych. Natomiast w publikacji **B2** cementy kostne, które są przeznaczone do stabilizacji skomplikowanych złamań, a także wypełniania ubytków kostnych zostały zmodyfikowane eugenolem, w celu poprawy ich właściwości bakteriobójczych. We wspomnianych powyżej publikacjach odpowiadałem za wykonanie testów antibakteryjnych, testów adhezji komórek eukariotycznych do podłoża, badania wzrostu komórek na podłożach za pomocą testów żywotności oraz obrazowania za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

- [B1] Przybylska D., Jurga N., Ekner-Grzyb A., Stopikowska N., **Grzeńkowiak B.**, Runowski M., Grzyb T.
Optical Temperature Sensing and Bioimaging of Aquatic Invertebrates With Nd³⁺-Sensitized Core@Shell Nanoparticles
(2024) Advanced Optical Materials
➤ Impact Factor (2023): 8.0; MNiSW: 140
- [B2] Przesławski G., Szcześniak K., **Grzeńkowiak B.**, Mazzaglia A., Jarzębski M., Niewczas A., Kuczyński P., Zarębska-Mróż A., Marcinkowska A.
Modification of methacrylate bone cement with eugenol – A new material with antibacterial properties
(2024) Reviews on Advanced Materials Science, 63(1), 20230171,
➤ Impact Factor (2023): 3.6; MNiSW: 100
- [B3] Henschke A., Mielcarek A., **Grzeńkowiak B.**, Perrigue P.M., Jaskot K., Coy E., Moya S.E.
Cellular senescence and nanoparticle-based therapies: Current developments and perspectives
(2024) Nanotechnology Reviews, 13(1), 20230211,
➤ Impact Factor (2023): 6.1; MNiSW: 70

- [B4] Witkowska M., Mrówczyński R., **Grzeńkowiak B.**, Miechowicz I., Florek E.,
Oxidative Stress in Xenograft Mouse Model Exposed to Dendrimers Decorated Polydopamine Nanoparticles and Targeted Chemo- and Photothermal Therapy
(2024) *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16565,
➤ Impact Factor (2023): 4.9; MNiSW: 140
- [B5] Perrigue P.M., Henschke A., **Grzeńkowiak B.F.**, Przysiecka Ł., Jaskot K., Mielcarek A., Coy E., Moya S.E.
Cellular uptake and retention studies of silica nanoparticles utilizing senescent fibroblasts
(2023) *Scientific Reports*, 13 (1), art. no. 475,
➤ Impact Factor (2023): 3.8; MNiSW: 140
- [B6] Ekner-Grzyb A., Jurga N., Venâncio C., Grzyb T., **Grzeńkowiak B.F.**, Lopes, I.
Ecotoxicity of non- and PEG-modified lanthanide-doped nanoparticles in aquatic organisms
(2023) *Aquatic Toxicology*, 259, art. no. 106548,
➤ Impact Factor (2023): 4.1; MNiSW: 140
➤ Liczba cytowań: 4 (Scopus), 2 (WoS), 6 (GS)
- [B7] Aguilar-Ferrer D., Vasileiadis T., Iatsunskiy I., Ziółek M., Żebrowska K., Ivashchenko O., Błaszkiwicz P., **Grzeńkowiak B.**, Pazos R., Moya S., Bechelany M., Coy, E.
Understanding the Photothermal and Photocatalytic Mechanism of Polydopamine Coated Gold Nanorods
(2023) *Advanced Functional Materials*,
➤ Impact Factor (2023): 18.5; MNiSW: 200
➤ Liczba cytowań: 21 (Scopus), 22 (WoS), 23 (GS)
- [B8] Jurga N., Przybylska D., Kamiński P., Tymiński A., **Grzeńkowiak B.F.**, Grzyb T.
Influence of the synthesis route on the spectroscopic, cytotoxic, and temperature-sensing properties of oleate-capped and ligand-free core/shell nanoparticles
(2022) *Journal of Colloid and Interface Science*, 606, pp. 1421-1434.
➤ Impact Factor (2022): 9.9; MNiSW: 100
➤ Liczba cytowań: 24 (Scopus), 24 (WoS), 30 (GS)
- [B9] Mrówczyński R., **Grzeńkowiak B.F.**
Biomimetic catechol-based nanomaterials for combined anticancer therapies
(2021) *Nanoengineering of Biomaterials: Drug Delivery & Biomedical Applications*, 2-2, pp. 145-180.
➤ Impact Factor: -; MNiSW: 20
➤ Liczba cytowań: 2 (Scopus), 4 (WoS), 4 (GS)

- [B10] Grabowska M., **Grześkowiak B.F.**, Rolle K., Mrówczyński R.
Magnetic Nanoparticles as a Carrier of dsRNA for Gene Therapy
(2021) *Methods in Molecular Biology*, 2211, pp. 69-81.
➤ Impact Factor: -; MNiSW: 70
➤ Liczba cytowań: 5 (Scopus), 5 (WoS), 7 (GS)
- [B11] Przybylska D., Ekner-Grzyb A., **Grześkowiak B.F.**, Grzyb T.
Upconverting SrF₂ nanoparticles doped with Yb³⁺/Ho³⁺, Yb³⁺/Er³⁺ and Yb³⁺/Tm³⁺ ions – optimisation of synthesis method, structural, spectroscopic and cytotoxicity studies
(2019) *Scientific Reports*, 9 (1), art. no. 8669,
➤ Impact Factor (2019): 3.998; MNiSW: 140
➤ Liczba cytowań: 34 (Scopus), 37 (WoS), 49 (GS)
- [B12] Grabowska M., **Grześkowiak B. F.**, Szutkowski K., Wawrzyniak D., Głodowicz P., Barciszewski J., Jurga S., Rolle K., Mrówczyński R.
Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme
(2019) *PLoS ONE*, 14 (3), art. no. e0213852,
➤ ImpactFactor (2019): 2.74; MNiSW: 100
➤ Liczba cytowań: 33 (Scopus), 29 (WoS), 37 (GS)
- [B13] Maziukiewicz D., **Grześkowiak B.F.**, Coy E., Jurga S., Mrówczyński R.
NDs@PDA@ICG conjugates for photothermal therapy of glioblastoma multiforme
(2019) *Biomimetics*, 2019, 4(1), 3,
➤ Impact Factor (2019): - MNiSW: 20
➤ Liczba cytowań: 55 (Scopus), 53 (WoS), 65 (GS)
- [B14] Rychter M., Milanowski B., **Grześkowiak B.F.**, Jarek M., Kempieński M., Coy E.L., Borysiak S., Baranowska-Korczyk A., Lulek J.
Cilostazol-loaded electrospun three-dimensional systems for potential cardiovascular application: Effect of fibers hydrophilization on drug release, and cytocompatibility
(2019) *Journal of Colloid and Interface Science*, 536, pp. 310-327.
➤ Impact Factor (2019): 7.489; MNiSW: 100
➤ Liczba cytowań: 24 (Scopus), 22 (WoS), 26 (GS)
- [B15] Jędrzak A., **Grześkowiak B.F.**, Coy E., Wojnarowicz J., Szutkowski K., Jurga S., Jesionowski T., Mrówczyński R.
Dendrimer based theranostic nanostructures for combined chemo- and photothermal therapy of liver cancer cells in vitro
(2019) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, pp. 698-708.
➤ Impact Factor (2019): 4.389; MNiSW: 100
➤ Liczba cytowań: 75 (Scopus), 57 (WoS), 89 (GS)

- [B16] Mrówczyński R., Jędrzak A., Szutkowski K., **Grzeškowiak B.F.**, Coy E., Markiewicz R., Jesionowski T., Jurga S.
Cyclodextrin-based magnetic nanoparticles for cancer therapy
(2018) *Nanomaterials*, 8 (3), art. no. 170,
➤ Impact Factor (2018): 4.034; MNiSW: 35
➤ Liczba cytowań: 56 (Scopus), 47 (WoS), 69 (GS)
- [B17] Baranowska-Korczyk A., Kościński M., Coy E.L., **Grzeškowiak B.F.**, Jasiurkowska-Delaporte M., Peplińska B., Jurga S.
ZnS coating for enhanced environmental stability and improved properties of ZnO thin films
(2018) *RSC Advances*, 8 (43), pp. 24411-24421.
➤ Impact Factor (2018): 3.049; MNiSW: 35
➤ Liczba cytowań: 34 (Scopus), 29 (WoS), 28 (GS)
- [B18] Woźniak A., **Grzeškowiak B.F.**, Babayevska N., Zalewski T., Drobna M., Woźniak-Budych M., Wiweger M., Słomski R., Jurga S.
ZnO@Gd2O3 core/shell nanoparticles for biomedical applications: Physicochemical, in vitro and in vivo characterization
(2017) *Materials Science and Engineering C*, 80, pp. 603-615.
➤ Impact Factor (2017): 5.080; MNiSW: 30
➤ Liczba cytowań: 17 (Scopus), 13 (WoS), 22 (GS)
- [B19] Woźniak A., Walawender M., Tempka D., Coy E., Załęski K., **Grzeškowiak B.F.**, Mrówczyński R.
In vitro genotoxicity and cytotoxicity of polydopamine-coated magnetic nanostructures
(2017) *Toxicology in Vitro*, 44, pp. 256-265.
➤ Impact Factor (2017): 3.105; MNiSW: 30
➤ Liczba cytowań: 19 (Scopus), 17 (WoS), 23 (GS)
- [B20] Woźniak A., Malankowska A., Nowaczyk G., **Grzeškowiak B.F.**, Tuśnio K., Słomski R., Zaleska-Medynska A., Jurga S.
Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications
(2017) *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28 (6), art. no. 92,
➤ Impact Factor (2017): 2.448; MNiSW: 30
➤ Liczba cytowań: 173 (Scopus), 151 (WoS), 218 (GS)

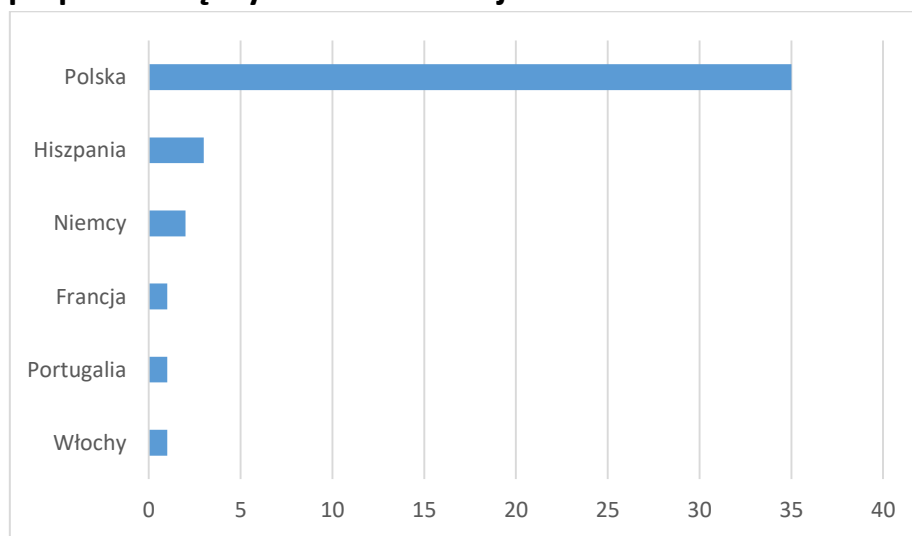
- [B21] Shpylenko A., Pshyk A.V., **Grześkowiak B.**, Medjanik K., Peplinska B., Oyoshi K., Pogrebnyak A., Jurga S., Coy E.
Effect of ion implantation on the physical and mechanical properties of Ti-Si-N multifunctional coatings for biomedical applications
 (2016) *Materials and Design*, 110, pp. 821-829.
 ➤ Impact Factor (2016): 4.364; MNiSW: 35
 ➤ Liczba cytowań: 71 (Scopus), 69 (WoS), 83 (GS)
- [B22] Woźniak A., Noculak A., Gapiński J., Kociolek D., Boś-Liedke A., Zalewski T., **Grześkowiak B.F.**, Kołodziejczak A., Jurga S., Banski M., Misiewicz J., Podhorodecki A.
Cytotoxicity and imaging studies of β -NaGdF₄:Yb³⁺+Er³⁺@PEG-Mo nanorods
 (2016) *RSC Advances*, 6 (98), pp. 95633-95643.
 ➤ Impact Factor (2016): 3.108; MNiSW: 30
 ➤ Liczba cytowań: 10 (Scopus), 6 (WoS), 13 (GS)
- [B23] Baranowska-Korczyk A., Warowicka A., Jasiurkowska-Delaporte M., **Grześkowiak B.**, Jarek M., Maciejewska B.M., Jurga-Stopa J., Jurga S.
Antimicrobial electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for gingival fibroblast growth
 (2016) *RSC Advances*, 6 (24), pp. 19647-19656.
 ➤ Impact Factor (2016): 3.108; MNiSW: 30
 ➤ Liczba cytowań: 66 (Scopus), 60 (WoS), 72 (GS)
- [B24] Sokół B., Woźniak A., Jankowski R., Jurga S., Wąsik N., Shahid H., **Grześkowiak B.**
HMGB1 Level in Cerebrospinal Fluid as a Marker of Treatment Outcome in Patients with Acute Hydrocephalus Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage
 (2015) *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 24 (8), pp. 1897-1904.
 ➤ Impact Factor (2015): 1.599; MNiSW: 20
 ➤ Liczba cytowań: 36 (Scopus), 34 (WoS), 50 (GS)

Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora

W ramach realizacji pracy doktorskiej prowadziłem badania nad otrzymywaniem genetycznie modyfikowanych komórek z zastosowaniem nanocząstek magnetycznych na potrzeby transgenezy. Proces transgenezy umożliwia uzyskanie genetycznie modyfikowanych zwierząt, które mogą być wykorzystywane m.in. jako bioreaktory do produkcji rekombinowanych białek, modele chorób człowieka, źródło organów w ksenotransplantacji, jak również takich, które posiadają lepsze cechy użytkowe. Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie technologii wprowadzania plazmidowego DNA do komórek fibroblastów myszy i świni za pomocą nanocząstek magnetycznych oraz zewnętrznego pola magnetycznego, czyli metodą magnetofekcji. Genetycznie modyfikowane fibroblasty można wykorzystać jako komórki donorowe w klonowaniu somatycznym. Wynikiem tych badań były dwie publikacje (**C1** i **C2**) oraz dwie kolejne (**C3** i **C4**) dotyczące transgenezy.

- [C1] **Grzeškowiak B.F.**, Sánchez-Antequera Y., Hammerschmid E., Döblinger M., Eberbeck D., Woźniak A., Słomski R., Plank C., Mykhaylyk O.
Nanomagnetic activation as a way to control the efficacy of nucleic acid delivery
(2015) *Pharmaceutical Research*, 32 (1), pp. 103-121.
➤ Impact Factor (2015): 3.260; MNiSW: 40
➤ Liczba cytowań: 21 (Scopus), 19 (WoS), 33 (GS)
- [C2] **Grzeškowiak B.F.***, Hryhorowicz M., Tuśnio K., Grzeszkowiak M., Załęski K., Lipiński D., Zeyland J., Mykhaylyk O., Słomski R., Jurga S., Woźniak A.
Generation of Transgenic Porcine Fibroblast Cell Lines Using Nanomagnetic Gene Delivery Vectors
(2016) *Molecular Biotechnology*, 58 (5), pp. 351-361.
➤ Impact Factor (2016): 1.634; MNiSW: 20
➤ Liczba cytowań: 2 (Scopus), 2 (WoS), 5 (GS)
- [C3] Hryhorowicz M., **Grzeškowiak B.**, Mazurkiewicz N., Śledziński P., Lipiński D., Słomski R.
Improved Delivery of CRISPR/Cas9 System Using Magnetic Nanoparticles into Porcine Fibroblast
(2019) *Molecular Biotechnology*, 61 (3), pp. 173-180.
➤ Impact Factor (2019): 2.022; MNiSW: 70
➤ Liczba cytowań: 47 (Scopus), 45 (WoS), 45 (GS)
- [C4] **Grzeškowiak B.F.***, Tusnio K., Wozniak A., Szalata M., Lipinski D., Jurga S., Słomski R.
Transgenic plant detection using an AuNPs based SPR biosensor
(2019) *Biosensors*, 9 (4), art. no. 116,
➤ Impact Factor (2019): 3.240; MNiSW: 70
➤ Liczba cytowań: 7 (Scopus), 7 (WoS), 9 (GS)

5.2. Współpraca międzynarodowa i krajowa



Współpraca wg kraju (WoS)

Współpraca międzynarodowa:

- Prof. Sergio Moya (CiC BioMaGUNE – San Sebastian – Hiszpania) – współpraca w ramach projektu **NCN OPUS 17** „Badania losu zaawansowanych nośników polimerowych *in vitro* i formowania się korony białkowej na ich powierzchni” (2019/33/B/ST5/01495).

Rezultat – publikacje B3, B5, B7

- Prof. Christian Plank (Institute of Molecular Immunology and Experimental Oncology, Uniwersytet Techniczny w Monachium – Niemcy) – współpraca podczas studiów doktoranckich dotycząca zastosowania nanocząstek magnetycznych jako nośników kwasów nukleinowych.

Rezultat – publikacja C1 i C2

- Dr Erika Porcel (Univiersite Paris-Saclay – Paryż – Francja) – współpraca dotycząca zastosowania nanocząstek up-konwertujących w radioterapii.

Współpraca krajowa:

- Prof. dr hab. Ewa Florek (Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu) – współpraca w ramach projektu **NCN SONATA 14** *Zastosowanie biomimetycznych pokryć w zaawansowanej terapii raka wątroby* (2018/31/D/ST8/02434) dotycząca eksperymentów na zwierzętach.

Rezultat – publikacja B4 oraz manuskrypt w recenzji:

- M. Szukalska, B. F. Grześkowiak, M. Bigaj-Józefowska, M. Witkowska, E. Cicha, P. Sujka-Kordowska, I. Miechowicz, M. Nowicki, R. Mrówczyński, E. Florek, *Biomarkers of oxidative stress in the organs of mice treated with mesoporous polydopamine nanoparticles modified with iron and coated with cancer cell membrane*, International Journal of Nanomedicine

- Prof. ICHB PAN dr hab. Katarzyna Rolle (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN) – współpraca w ramach projektu **NCN OPUS 11** *Nowe, wielozadaniowe nanocząstki w skojarzonej geno- i fototerapii* (2016/21/B/ST8/00477) dotycząca zastosowania terapii interferencji RNA w leczeniu glejaka wielopostaciowego.

Rezultat – publikacja A1, B10, B12

- Prof. UAM dr hab. Radosław Mrówczyński (Wydział Chemii, UAM) – współpraca dotycząca syntezy polimerowych nanocząstek polidopaminy w ramach projektów **NCBiR LIDER** oraz **NCN SONATA 14, OPUS11 i OPUS16**

Rezultat – publikacje A1, A2, A3, A4, A6, A7, B4, B9, B10, B12, B13, B15, B16, B19

- Prof. UAM dr hab. Tomasz Grzyb (Wydział Chemii, UAM) – współpraca dotycząca syntezy nanocząstek up-konwertujących.

Rezultat – publikacje B1, B6, B8, B11

- Dr inż. Magdalena Hryhorowicz (Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) – współpraca dotycząca zastosowania nanocząstek magnetycznych jako nośników kwasów nukleinowych w transgenezie.

Rezultat – publikacje C2, C3 oraz manuskrypt w przygotowaniu:

- M. Hryhorowicz, B. Grześkowiak, D. Lipiński, P. Olejnik, J. Zeyland, *Magnetic nanoparticles as a tool to increase the efficiency of CRISPR/Cas9 delivery in RNA format into porcine primary fibroblasts*

5.3. Staże zagraniczne

W roku akademickim 2007/2008 dzięki programowi ERASMUS odbyłem **roczne studia na kierunku biotechnologia na University of Natural Resources and Applied Sciences (Wiedeń, Austria)**. Pobyt na austriackim uniwersytecie pozwolił mi na zdobycie wiedzy i praktycznych umiejętności z zakresu najnowszych technik biotechnologicznych. Dodatkowo, studia w zagranicznym ośrodku wpłynęły na udoskonalenie moich umiejętności językowych oraz zaowocowały nawiązaniem kontaktów ze studentami z innych krajów.

W toku kariery zawodowej odbyłem **4 staże w zagranicznych ośrodkach naukowych**.

W 2009 roku uczestniczyłem w **2-miesięcznym stażu na University of Natural Resources and Applied Sciences (Wiedeń, Austria) w grupie prof. Florian Rükera**. Brałem aktywny udział w badaniach związanych z klonowaniem i ekspresją zmodyfikowanych fragmentów Fab przeciwciał IgG, a także ich oczyszczaniem i wstępną charakterystyką biochemiczną.

W 2012 roku odbyłem **12-miesięczny staż na Technical University of Munich, Klinikum rechts der Isar, Institute of Experimental Oncology and Therapy Research (Monachium, Niemcy) w grupie prof. Christiana Planka**. W trakcie stażu, w ramach studiów doktoranckich, zajmowałem się badaniami nad zastosowaniem magnetofekcji do wprowadzania konstrukcji genowych do komórek fibroblastów. Dodatkowo w roku 2013 wzięłem udział w **1-miesięcznym stażu** w tej samej grupie badawczej. Wymiernym efektem tego stażu są publikacje **C1 i C2**.

W 2015 roku w ramach stażu podoktorskiego przebywałem na **1-miesięcznym stażu w Elettra Sincrotrone (Triest, Włochy) w grupie dr Loredany Casalis**. Przedmiotem moich badań była synteza nanocząstek złota pokrytych jednoniciowymi DNA oraz ich zastosowanie do monitorowania reakcji enzymatycznych.

5.4. Staże krajowe

W swoim dorobku posiadam **6-miesięczne praktyki laboratoryjne (2009 r.) w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w grupie prof. Marka Świtońskiego**. W ramach praktyk doskonalenia zawodowego zapoznałem się z szeregiem technik z zakresu badań cytogenetycznych i molekularnych, takich

jak: prowadzenie hodowli limfocytów i fibroblastów *in vitro*, przygotowanie preparatów cytogenetycznych, barwienia prążkowe chromosomów, izolacja DNA genomowego i plazmidowego, prowadzenie hodowli bakteryjnych, znakowanie DNA, barwienie immunofluorescencyjne oraz technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

W roku 2009 odbyłem również **1-miesięczny staż w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w grupie dra hab. Michała Sikorskiego**. Podczas tej praktyki zapoznałem się z najważniejszymi metodami inżynierii białek obejmującymi ich produkcję w systemie bakteryjnym, techniki oczyszczania oraz analizę czystości frakcji białkowych.

6.

Osiągnięciach dydaktyczne, organizacyjne oraz popularyzujące naukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

W trakcie mojej kariery zawodowej pracowałem na stanowisku naukowo-badawczym, co sprawiło, że nie miałem obowiązku prowadzenia zajęć dydaktycznych ze studentami. Uważam jednak, że przekazywanie wiedzy młodym ludziom oraz wspieranie ich w rozwoju osobistym jest istotnym elementem pracy naukowca. Przygotowanie zajęć to także świetna okazja do uporządkowania własnej wiedzy. Pomimo braku obowiązku dydaktycznego udało mi się zgromadzić dorobek w tym zakresie obejmujący szeroki wachlarz aktywności, od prowadzenia zajęć w ujętych w programie studiów doktoranckich oraz studiów podyplomowych, poprzez kierowanie pracami studentów w ramach praktyk indywidualnych, po promotorstwo prac licencjackich, magisterskich i doktorskich.

Opieka naukowa nad studentami i doktorantami w charakterze promotora, promotora pomocniczego i opiekuna naukowego

Doktoranci, nad którymi pełniłem opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego

- Magdalena J. Bigaj – Józefowska (2019 – 2024, obrona pracy doktorskiej 12.02.2024), promotor: prof. UAM dr hab. Radosław Mrówczyński (Wydział Chemii), praca realizowana w ramach projektu NCN SONATA 14
- Klaudia Żebrowska (2019 – 2023, obrona pracy doktorskiej 09.05.2023), promotor: prof. UAM dr hab. Emerson Coy (Centrum NanoBioMedyczne UAM), praca realizowana w ramach projektu PO WER "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" (03.02.00-00-I032/16)

- Konrada Kuczyński (2019 – 2023, obrona pracy doktorskiej 08.02.2023), promotor: prof. ICHB PAN dr hab. Katarzyna Rolle (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN), praca realizowana w ramach projektu PO WER "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" (03.02.00-00-I032/16)

Doktoranci, nad którymi pełniłem opiekę naukową w ramach wykonywania prac doktorskich

- Damian Maziukiewicz (2018 – 2022), praca realizowana w ramach projektu NCN OPUS 11
- Agata Henschke (2020 - 2024), praca realizowana w ramach projektu NCN OPUS 17

Studenci, nad którymi pełniłem opiekę naukową w charakterze promotora

- Marcin Ryczek (magister biotechnologii, obrona pracy magisterskiej 12.06.2018, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)
- Zofia Borowska (licencjat z biotechnologii, obrona pracy licencjackiej 12.07.2021, Wydział Biologii UAM)

Studenci, nad którymi pełniłem opiekę naukową w ramach wykonywanych prac magisterskich

- Agata Kozłowska (magister biotechnologii, 2019, Wydział Biologii UAM, promotor: prof. UAM dr hab. Radosław Mrówczyński)
- Weronika Szczepańska (magister biotechnologii, 2022, Wydział Biologii UAM, promotor: prof. UAM dr hab. Radosław Mrówczyński)
- Adrian Turowski (magister biotechnologii, 2024, Wydział Biologii UAM, promotor: prof. UAM dr. hab. Emerson Coy)
- Alicja Anioła (magister biotechnologii, 2024, Wydział Biologii UAM, promotor: prof. UAM dr. hab. Emerson Coy)

Studenci, nad którymi pełniłem opiekę naukową w ramach stażu

- Wiktoria Karasiewicz (2019) – letni staż naukowy, studentka Wydziału Chemii, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu

Aktywność dydaktyczna

Wykłady

- Biochemia (5-godzinny kurs dla doktorantów w ramach programu PO WER "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" (03.02.00-00-I032/16)), 2019, Centrum NanoBioMedyczne UAM

Ćwiczenia

- Ćwiczenia laboratoryjne „System InCell Analyzer 2000” (20-godzinny kurs dla doktorantów w ramach programu PO WER "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" (03.02.00-00-I032/16)), 2019, Centrum NanoBioMedyczne UAM
- Ćwiczenia laboratoryjne „Cytometria przepływowa” (20-godzinny kurs dla doktorantów w ramach programu PO WER "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" (03.02.00-00-I032/16)), 2019, Centrum NanoBioMedyczne UAM
- Ćwiczenia laboratoryjne “Mikroskopia fluorescencyjna” i “System InCell Analyzer 2000” (20-godzinny kurs dla studentów podyplomowych w ramach projektu POKL "Zaawansowane materiały i nanotechnologia w praktyce" (POKL.04.03.00-00-152/12-00)), 2015, Centrum NanoBioMedyczne UAM

6.2. Działalność popularyzująca naukę

Wykłady popularyzujące naukę

- *Strach ma wielkie oczy - wpływ nanocząstek na organizmy żywe*, LabsExpo – Targi wyposażenia i technologii laboratoryjnych, Poznań, Polska, 27.04.2023
- *Nanotechnologia w służbie medycyny*, Ogólnopolski Dzień Inżynierii Materiałowej – Materiały inspirowane naturą, Poznań, Polska, 22.03.2024

Warsztaty popularyzujące naukę

- organizacja warsztatów dla uczniów szkół ponadpodstawowych w ramach Ogólnopolskiego Dnia Inżynierii Materiałowej – Materiały inspirowane naturą, Poznań, Polska, 22.03.2024

Aktywności w ramach drzwi otwartych w Centrum NanoBioMedycznym

- zajęcia, podczas których uczniowie lokalnych szkół podstawowych i ponadpodstawowych odwiedzają ośrodki badawcze, zapoznają się z prowadzonymi badaniami oraz przeprowadzają eksperymenty naukowe

Członkostwo w stowarzyszeniu naukowym NanoTrivium

- realizowanie zadań naukowo-badawczych w obszarze nanobiomedycznym
- organizacja wydarzeń popularyzujących naukę takich jak m.in. Noc Naukowców, Poznański Festiwal Nauki i Sztuki w Centrum NanoBioMedycznym UAM
- organizacja wydarzeń i warsztatów edukacyjno-szkoleniowych na terenie lokalnych szkół

Aktywność medialna

- artykuł prasowy na łamach Życia Uniwersyteckiego, miesięcznika wydawanego przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, dot. zespołów badawczych działających w Centrum NanoBioMedycznym UAM, 24.05.2024

6.3. Osiągnięcia organizacyjne

Aktywność organizacyjna w ramach jednostki naukowej

- Opiekun Laboratorium Biologicznego w Centrum NanoBioMedycznym UAM – do moich obowiązków należy zapewnianie sprawnego i bezpiecznego funkcjonowania laboratorium poprzez dbanie o utrzymanie sprzętu, zarządzanie zasobami laboratoryjnymi, przestrzeganie i wdrażanie procedur BHP, prowadzenie dokumentacji, zarządzanie odpadami biologicznymi oraz prowadzenie szkoleń nowych pracowników, studentów lub stażystów.
- Współtwórca oraz kierownik Zakładu Inżynierii Genetycznej (wg nomenklatury Ministerstwa Klimatu i Środowiska) w Centrum NanoBioMedycznym UAM – do moich obowiązków należy przestrzeganie przepisów MKiŚ dotyczących prowadzenia badań z wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów (GMM).
- Przygotowanie wniosku o zamknięte użycie GMM kat. II dla Zakładu Inżynierii Genetycznej w CNBM UAM, które dotyczyło prowadzenia prac z użyciem modyfikowanych szczepów bakteryjnych oraz linii komórkowych, wprowadzania kwasów nukleinowych w celu uzyskania lub wyciszenia ekspresji genów, charakteryzacji bakteryjnych systemów naprawy DNA.
- Członek Rady CNBM – organ doradczy dyrektora Centrum NanoBioMedycznego UAM (kadencja 2023-2024 oraz 2024-2028).

Organizacja konferencji

- Członek komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji NanoTech Poland w latach 2011 - 2024, Poznań, Polska,
Przewodniczący jednej z sesji w roku 2023 i 2024
Członek komisji oceniającej wystąpienia ustne młodych naukowców w sekcji „Young Research’s Forum” (2023 r. i 2024 r.)
Członek komisji oceniającej plakaty (2023 r. i 2024 r.)
- Członek komitetu organizacyjnego szkoły letniej The AMPERE Nuclear Magnetic Resonance School w latach 2011-2014, Zakopane, Polska

7.

Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Kierowanie i udział w projektach badawczych

Kierownik projektu

- *Selection of catalytic antisense oligonucleotides targeting BCL-2 protein family for acute myeloid leukemia treatment*, Wsparcie zarządzania talentami - powstrzymanie drenażu mózgow – projekt ID-UB, (038/04/NŚ/0013).
Okres trwania projektu: 30 miesięcy (03.2022 – 09.2024).
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
Budżet projektu: 50 000 PLN.
- *Zastosowanie biomimetycznych pokryć w zaawansowanej terapii raka wątroby*, Projekt SONATA 14, Narodowe Centrum Nauki, (2018/31/D/ST8/02434).
Okres trwania projektu: 60 miesięcy (06.2019 – 05.2024).
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu/Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
Budżet projektu: 1 132 600 PLN.

Wykonawca w projektach badawczych

- *Ocena potencjału terapeutycznego syntetycznego analogu miRNA-223-3p na modelu astmy ciężkiej u szczura*, Projekt SONATA 19, Narodowe Centrum Nauki, (2023/51/D/NZ4/01095/R).
Okres trwania projektu: 36 miesięcy (07.2024 – 06.2027).
Kierownik projektu: dr Wojciech Langwiński.
Kierownik po stronie UAM: dr inż. Bartosz Grześkowiak (budżet projektu: 416 020 PLN).
Miejsce: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu/Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Hybrydowe nanokompozyty na bazie nanocząstek złota jako obiecujące materiały fotoaktywne do skojarzonej terapii fototermicznej/fotodynamicznej - HyPhoto2*, Projekt SONATINA 7, Narodowe Centrum Nauki, (2023/48/C/ST4/00067).
Okres trwania projektu: 36 miesięcy (12.2023 – 11.2026).
Kierownik projektu: dr Paulina Błaszczewicz.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

- *Zrozumienie roli międzywierzchni nanostruktur polidopaminy i półprzewodnika w procesie fotokatalitycznego rozszczepiania wody*, Projekt OPUS 18, Narodowe Centrum Nauki, (2019/35/ST5/00248).
Okres trwania projektu: 48 miesięcy (07.2020 – 06.2024).
Kierownik projektu: prof. UAM, dr hab. Emerson Coy.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Opracowanie wielofunkcyjnych nanosystemów do teranostyki chorób niedokrwiennych serca (nanoHEART)*, Drugi polsko-chiński konkurs bilateralny, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (DWM/WPC2/285/2020).
Okres trwania projektu: 48 miesięcy (04.2021 – 03.2025).
Kierownik projektu: Prof. dr hab. Stefan Jurga/dr Grzegorz Nowaczyk.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Badania losu zaawansowanych nośników polimerowych in vitro i formowania się korony białkowej na ich powierzchni*, Projekt OPUS 17, Narodowe Centrum Nauki, (2019/33/B/ST5/01495).
Okres trwania projektu: 48 miesięcy (02.2020 – 01.2024).
Kierownik projektu: prof. UAM, dr hab. Emerson Coy/Dr. Sergio Moya.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Opracowanie nowoczesnych nanomateriałów dla potrójnej terapii raka wątrobowokomórkowego*, Projekt OPUS 16, Narodowe Centrum Nauki, (2018/31/B/ST8/02460).
Okres trwania projektu: 66 miesięcy (09.2019 – 03.2025).
Kierownik projektu: prof. UAM, dr hab. Radosław Mrówczyński.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Synteza i właściwości nowych, hybrydowych magnetycznych nanocząstek oraz ocena ich zastosowania jako wielozadaniowych nośników leków w łączonej terapii przeciwnowotworowej*, Projekt LIDER, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (LIDER/11/0055/L-7/15/NCBiR/2016).
Okres trwania projektu: 36 miesięcy (01.2017 – 12.2019).
Kierownik projektu: prof. UAM, dr hab. Radosław Mrówczyński.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Nowe, wielozadaniowe nanocząstki w skojarzonej geno- i fototerapii*, Projekt OPUS 11, Narodowe Centrum Nauki, (2016/21/B/ST8/00477).
Okres trwania projektu: 54 miesięcy (04.2017 – 10.2021).

Kierownik projektu: prof. dr hab. Stefan Jurga.

Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

- *Nanomateriały o potencjalnym zastosowaniu w biomedycynie (NanoMatBio)*, Projekt PBS, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (PBS1/A9/13/2012).
Okres trwania projektu: 36 miesięcy (01.2012 – 10.2015).
Kierownik projektu: prof. dr hab. Stefan Jurga.
Miejsce: Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- *Opracowywanie innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń dla celów biomedycznych (MEDPIG)*, Projekt INNOMED, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (INNOMED/I/17/NCBR/2014).
Okres trwania projektu: 48 miesięcy (2014 – 2018).
Kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard Słomski.
Miejsce: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.
- *Nanoguide - Nanoparticle-based targeting of gene and cell based therapies*, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Research Unit FOR917 (Project PL 281/3-1).
Kierownik projektu: prof. Christian Plank.
Miejsce: Uniwersytet Techniczny w Monachium.
- *Uzyskanie transgenicznych świń jako dawców tkanek i narządów do transplantacji u ludzi oraz ich biotechnologiczna, fizjologiczna i medyczna charakterystyka. Zadanie 1. Przygotowanie modyfikujących, regulujących i inaktywujących konstrukcji genowych dla potrzeb ksenotransplantacji oraz wielotransgenicznych komórek świń do klonowania somatycznego.* Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Projekt rozwojowy Nr: N R12 0036 06/2009.
Okres trwania projektu: 48 miesięcy (2009 – 2012).
Kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard Słomski.
Miejsce: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

7.2. Zgłoszenia patentowe

Jestem współautorem dwóch zgłoszeń patentowych

- Wielozadaniowe nanocząstki polidopaminy, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie w dostarczaniu leku przeciwnowotworowego do komórek rakowych zwłaszcza terapii raka wątroby.
Numer zgłoszenia: P.430512 [WIPO ST10/C PL430512]

- Modyfikowane dendrymerami PAMAM nanocząstki polidopaminy, sposób ich wytwarzania i ich zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej zwłaszcza terapii raka wątroby.

Numer zgłoszenia: P.430511 [WIPO ST10/C PL430511]

7.3. Udział w konferencjach i sympozjach

Podczas mojej kariery naukowej brałem aktywny udział w 27 konferencjach krajowych i międzynarodowych (10 przed uzyskaniem stopnia doktora, 17 po uzyskaniu stopnia doktora) w Polsce, Niemczech, Włoszech, Portugalii oraz Francji, w tym 7-krotnie w formie prelekcji oraz wielokrotnie w formie prezentacji wyników na sesjach plakatowych (szczegóły załącznik 4A, punkt II.7).

Wystąpienia ustne:

- *Nucleic acid delivery to mouse fibroblasts using nonviral vectors associated with magnetic nanoparticles*, Young scientists Meeting of the DFG (German Research Foundation), Berlin, Niemcy, 27.02.2013
- *Nanomagnetic gene delivery vectors for transgenesis*, Sharing Advances on Large Animal Models (SALAAM), Monachium, Niemcy, 16.12.2014
- *Establishment of transgenic fibroblasts using magnetic nanoparticle-based gene delivery vectors*, 5th Summer Symposium on Nanomaterials and their application to Biology and Medicine, Zakopane, Polska, 18.06.2015
- *Establishment of transgenic fibroblast cell lines using nanomagnetic gene delivery vectors*, 7th Polish Conference on Nanotechnology, Poznań, Polska, 25.06.2015
- *mRNA technology as a way to establish porcine induced pluripotent stem cells*, Final Conference of the COST Action BM 1308 Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM, Halle, Niemcy, 29.09.2017
- *Nanomaterials for biomedicine*, 7th Young Polymer Scientists Conference and Short Course (7th YPSCSC), Łódź, Polska, 28.09.2021
- *Cell membrane coated polymeric nanoparticles for targeted anticancer therapy*, NanoTechPoland 2022, Poznań, Polska, 02.06.2022

7.4. Aktywność recenzencka

Recenzent w czasopismach

Nazwa czasopisma	Ilość zrecenzowanych artykułów	Impact Factor (2023)
Acta Biomaterialia (Elsevier)	1	9.4
BioTechnologia	1	-
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (Elsevier)	3	5.4
Heliyon (Elsevier)	1	3.4
HerbaPolonica	1	-
International Journal of Molecular Sciences (MDPI)	2	4.9
International Journal of Nanomedicine (Dovepress)	3	6.6
International Journal of Pharmaceutics: X (Elsevier)	1	5.2
Journal of Drug Delivery Science and Technology (Elsevier)	1	4.5
Journal of Pharmaceutical Analysis (Elsevier)	1	6.1
Materials and Design (Elsevier)	1	7.6
Omega (ACS)	1	3.7
Pharmaceutics (MDPI)	4	4.5
Reproductive Biology and Endocrinology (Elsevier)	1	4.2
World Journal of Surgical Oncology (Elsevier)	1	2.5

Recenzent w projektach

- Wykonanie oceny projektu w ramach Poddziałania 1.3.2 *Dofinansowanie procedury patentowej dotyczącej sposobu otrzymywania roślin transgenicznych o ulepszonych cechach uprawnych*, który został zrealizowany przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Ocena wykonana dla Ośrodka Przetwarzania Informacji – Państwowego Instytutu Badawczego w ramach projektu *Badania i rozwój nowoczesnych technologii* Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007 – 2013. Data realizacji: sierpień 2015
- Wykonanie oceny zagranicznego projektu *Biosensing and specific targeting of cancer cells by innovative photothermal MoOx nanoparticle platform*, 9th Call for Bilateral Projects SAS – TUBITAK (projekt słowacko – turecki). Data realizacji: sierpień 2024

7.5. Nagrody

- Zespołowa Nagroda Rektora I stopnia za wybitne osiągnięcia naukowe w 2023 roku, dotyczące zastosowań wielofunkcyjnych nanomateriałów na bazie materiałów hybrydowych w obszarach wytwarzania energii oraz biomedycyny, Poznań 2024.
- Stypendium Rektora Uniwersytetu im. Adam Mickiewicza w Poznaniu za wybitne osiągnięcia naukowe w 2019 roku, Poznań 2020.

- Nagroda Miasta Poznania za wyróżniającą się pracę doktorską, Poznań 2015.
- Nagroda Poznańskiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk za najlepszą oryginalną pracę twórczą, której wiodącym autorem jest doktorant w obszarze nauk biologicznych i rolniczych, Poznań 2015.
- I nagroda za plakat *Magnetic field assisted nucleic acid delivery into primary fibroblasts*, konferencja NanoPL 2014, Kielce, 16.10.2014.
- II nagroda za plakat *Magnetic nanoparticles based non-viral vectors for gene therapy*, VI Kongres Współczesnej Onkologii Next Generation, Poznań, 27-29.03.2014.
- I nagroda za plakat *Nanomagnetic actuation as a method to enhance transfection efficiency of primary fibroblasts*, 3rd Summer Symposium on Nanomaterials and their application to biology and medicine, Poznań, 16-19.06.2013.

7.6. Udział w specjalistycznych szkoleniach i warsztatach naukowych

- Szkolenie organizowane przez Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (PoLLASA), 2-6.11.2015
 - dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie
 - dla osób wykonujących procedury
 - dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach
- Szkolenie *Principles of Entrepreneurship – how to start a Biotech Company in Poland* zorganizowane przez Centrum NanoBioMedyczne UAM, 2-3.02.2015
- Szkolenie *Business principles introduction* zorganizowane przez Centrum NanoBioMedyczne UAM, 26.01-06.02.2015
- Szkolenie z komunikacji naukowej (20-godzinny kurs) zorganizowany przez Katedrę Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 5-8.05.2014
- Studium nowoczesnej metodyki kształcenia realizowane w ramach projektu *Zintegrowany program wspierający rozwój Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu w zakresie nauk fizycznych: „Proinnowacyjne kształcenie, kompetentna kadra, absolwenci przyszłości”*, 2012/2013
- Szkolenie przeznaczone dla młodych naukowców *Developing entrepreneurial skills for future career: moving from science toward practice* zorganizowane przez Centrum Integracji Europejskiej UAM we współpracy z Elettra Synchrotron Light Source (Triest, Włochy), 17-22.10.2010

7.7. Dane naukometryczne

Dane naukometryczne według baz Web of Science (WoS)[™], Scopus[™] i Google Scholar (GS)[™] na dzień 15 października 2024.

	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Liczba publikacji	35	35	35
Liczba cytowań	869	973	1167
Liczba cytowań (bez samocytowań)	828	926	-
Indeks Hirscha (h)	18	18	20
Indeks i10	20	21	21

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) dla wszystkich publikacji: **154.775**
 - przed uzyskaniem stopnia doktora: **4.894**
 - po uzyskaniu stopnia doktora: **149.881**

- Suma punktów MNiSW dla wszystkich publikacji: do 2019 (**335**); od 2019 (**2480**)
 - przed uzyskaniem stopnia doktora: do 2019 (**60**)
 - po uzyskaniu stopnia doktora: do 2019 (**275**); od 2019 (**2480**)

8.

Bibliografia

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-49.
2. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. Chemical Reviews. 2016;116(5):2826-85.
3. Roco M. National nanotechnology initiative: Past, present and future/Handbook on nanoscience, engineering and technology. W. A et al. CRC, Taylor and Francis. 2007.
4. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. Journal of Nanobiotechnology. 2022;20(1):262.
5. Chen G, Qian Y, Zhang H, Ullah A, He X, Zhou Z, et al. Advances in cancer theranostics using organic-inorganic hybrid nanotechnology. Applied Materials Today. 2021;23:101003.
6. He C, Lu J, Lin W. Hybrid nanoparticles for combination therapy of cancer. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2015;219:224-36.
7. Tariq H, Bokhari SAI. Surface-functionalised hybrid nanoparticles for targeted treatment of cancer. IET nanobiotechnology. 2020;14(7):537-47.
8. Xin Y, Yin M, Zhao L, Meng F, Luo L. Recent progress on nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. Cancer biology & medicine. 2017;14(3):228-41.
9. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2015;200:138-57.

10. Mendes BB, Conniot J, Avital A, Yao D, Jiang X, Zhou X, et al. Nanodelivery of nucleic acids. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022;2(1):24.
11. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(2):101-24.
12. Jaque D, Martínez Maestro L, del Rosal B, Haro-Gonzalez P, Benayas A, Plaza JL, et al. Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*. 2014;6(16):9494-530.
13. Curley S. Thermal Cancer Ablation Therapies Using Nanoparticles. In: Bhushan B, editor. *Encyclopedia of Nanotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 2697-704.
14. Zhang Y, Li M, Gao X, Chen Y, Liu T. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):137.
15. Jabir NR, Anwar K, Firoz CK, Oves M, Kamal MA, Tabrez S. An overview on the current status of cancer nanomedicines. 2018;34(5):911-21.
16. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*. 2016;1(5):16014.
17. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science (New York, NY)*. 2007;318(5849):426-30.
18. Huang Q, Chen J, Liu M, Huang H, Zhang X, Wei Y. Polydopamine-based functional materials and their applications in energy, environmental, and catalytic fields: State-of-the-art review. *Chemical Engineering Journal*. 2020;387:124019.
19. Mrówczyński R. Polydopamine-Based Multifunctional (Nano)materials for Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10(9):7541-61.
20. Mrówczyński R, Markiewicz R, Liebscher J. Chemistry of polydopamine analogues. *Polymer International*. 2016;65(11):1288-99.
21. Jędrzak A, Grześkowiak BF, Coy E, Wojnarowicz J, Szutkowski K, Jurga S, et al. Dendrimer based theranostic nanostructures for combined chemo- and photothermal therapy of liver cancer cells in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;173:698-708.
22. Jovčevska I, Kočevar N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Molecular and clinical oncology*. 2013;1(6):935-41.
23. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl Mater Today*. 2018;12:177-90.
24. Bou Zerdan M, Atoui A, Hijazi A, Basbous L, Abou Zeidane R, Alame SM, et al. Latest updates on cellular and molecular biomarkers of gliomas. *Frontiers in oncology*. 2022;12:1030366.
25. Sun Z, Schwenzer A, Rupp T, Murdamoothoo D, Vegliante R, Lefebvre O, et al. Tenascin-C Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis through Integrin $\alpha 9 \beta 1$ -Mediated YAP Inhibition. *Cancer research*. 2018;78(4):950-61.
26. Xu L, Anchordoquy T. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011;100(1):38-52.
27. Zalba S, ten Hagen TLM, Burgui C, Garrido MJ. Stealth nanoparticles in oncology: Facing the PEG dilemma. *Journal of Controlled Release*. 2022;351:22-36.
28. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*. 2013;2013:942916.
29. Fernández M, Javaid F, Chudasama V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chemical Science*. 2018;9(4):790-810.
30. Woźniak A, Walawender M, Tempka D, Coy E, Załęski K, Grześkowiak BF, et al. In vitro genotoxicity and cytotoxicity of polydopamine-coated magnetic nanostructures. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2017;44:256-65.
31. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investigative radiology*. 2005;40(11):715-24.

32. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;66:2-25.
33. Sindhwani S, Syed AM, Ngai J, Kingston BR, Maiorino L, Rothschild J, et al. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*. 2020;19(5):566-75.
34. Li M, Zhang W, Wang B, Gao Y, Song Z, Zheng QC. Ligand-based targeted therapy: a novel strategy for hepatocellular carcinoma. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5645-69.