

1. Imię i nazwisko: **Ilona Grabowska-Jadach**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- (1998 - 2003) studia magisterskie; praca magisterska pt.: *Synteza i zbadanie właściwości bimetalicznego kompleksu niklowo-litowego*, pod kierunkiem dr inż. Piotra Buchalskiego, obrona 11 września 2003, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

- (2003 - 2008) studia doktoranckie; praca doktorska pt.: *Opracowanie i badania miniaturowych układów analitycznych do oznaczania wybranych metabolitów w próbkach biologicznych*, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki, obrona 8 kwietnia 2008, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- maj 2008 – kwiecień 2009, samodzielny chemik, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

- maj 2009 – obecnie, adiunkt, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

***Badania in-vitro nanomateriałów pod kątem ich zastosowań
w obrazowaniu i terapii przeciwnowotworowej***

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

✉ - jako autor korespondencyjny

[H1] **Grabowska-Jadach I.** ✉, Drozd M., Biegała J., Pietrzak M., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Parzuchowski P.G., Brzózka Z., *Studies on influence of polymer modifiers for fluorescent nanocrystals' cytotoxicity*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 127 (2016) 193.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji całej pracy, przeprowadzeniu części badań biologicznych, opracowaniu i współinterpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

IF₂₀₁₆= 3,255; CI= 4

[H2] Opalski A., **Grabowska-Jadach I.** ✉, Oszwałdowski S., *Biological activity of surface modified nanocrystals*, *Current Nanoscience* 14 (2018) 307.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów mających na celu określenie aktywności biologicznej nanocząstek, współudziale w interpretacji uzyskanych wyników, korekcie tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **75%**.

IF₂₀₁₇= 1,151; CI= 0

[H3] Drozd M., Pietrzak M. ✉, Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.**, Malinowska E., *Glucose Dithiocarbamate Derivatives as Capping Ligands of Water-Soluble CdSeS/ZnS Quantum Dots*, *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects* 509 (2016) 656.

Mój udział w tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji części pracy - dotyczył wyboru nanocząstek oraz grupy ligandów do modyfikacji ich powierzchni, zaplanowaniu eksperymentów dotyczących badania cytotoksyczności nanocząstek, współinterpretacji części wyników i korekcie części tekstu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na **35%**.

IF₂₀₁₆= 2,714; CI= 4

[H4] Kalinowska D. ✉, **Grabowska-Jadach I.**, Drozd M., Pietrzak M., *Comparative studies of biological activity of cadmium-based quantum dots with different surface modifications*, *Applied Nanoscience* 8 (2018) 309.

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, interpretacji uzyskanych wyników, korekcie tekstu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

IF₂₀₁₇= 2,951; CI= 0

[H5] Kalinowska D., Drozd M., **Grabowska-Jadach I.** ✉, Pietrzak M., Dybko A., Malinowska E., Brzózka Z. *The influence of selected ω-mercaptopcarboxylate ligands on physicochemical properties and biological activity of Cd-free, zinc-copper-indium sulfide colloidal nanocrystals*, *Materials Science and Engineering C* 97 (2019) 583.

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, interpretacji uzyskanych wyników, korekcie manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

IF₂₀₁₇= 5,08; CI= 0

[H6] Skorupska S., **Grabowska-Jadach I.** ✉, *Cytotoxicity studies of quantum dots with the electroporation method*, *Bioelectrochemistry* 126 (2019) 86.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, współinterpretacji otrzymanych wyników, korekcie manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **85%**.

IF₂₀₁₇= 3,789; CI= 0

[H7] **Grabowska-Jadach I.** ✉, Haczyk M., Drozd M., Fischer A., Pietrzak M., Malinowska E., Brzózka Z., *Evaluation of biological activity of quantum dots in a microsystem*, *Electrophoresis* 37 (2016) 425.

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, współpracowaniu wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

IF₂₀₁₆= 2,744; CI= 3

[H8] **Grabowska-Jadach I.** ✉, Żuchowska A., Olesik M., Drozd M., Pietrzak M., Malinowska E., Brzózka Z., *Cytotoxicity studies of selected cadmium-based quantum dots on 2D vs. 3D cell cultures*, *New Journal of Chemistry* 42 (2018) 12787.

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu głównej części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

IF₂₀₁₇= 3,201; CI= 0

[H9] **Grabowska-Jadach I.** ✉, Kalinowska D., Drozd M., Pietrzak M., *Synthesis, characterization and application of plasmonic hollow gold nanoshells in a photothermal therapy—New particles for theranostics*, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111 (2019) 1147.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

IF₂₀₁₇= 3,457; CI= 0

[H10] Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.** ✉, Liwińska M., Drozd M., Pietrzak M., Dybko A., Brzózka Z., *Studies on effectiveness of PTT on 3D tumor model under microfluidic conditions using aptamer-modified nanoshells*, *Biosensors and Bioelectronics* 126 (2018) 214.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na wiodącym udziale w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu większości eksperymentów oraz współinterpretacji ich wyników, korekcie tekstu manuskryptu i korespondencji z edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na **55%**.

IF₂₀₁₇= 8,173; CI= 0

[H11] Szuplewska A., Kulpińska D., Dybko A., Jastrzębska A., Wojciechowski T., Rozmysłowska A., Chudy M., **Grabowska-Jadach I.**, Ziemkowska W., Brzózka Z., Olszyna A., *2D Ti₂C (MXene) as a novel highly efficient and selective agent for photothermal therapy*, Materials Science and Engineering C 98 (2019) 874.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji części pracy – związanej z aplikacją MXenów w terapii fototermicznej, wykorzystania w badaniach opracowanej procedury odmywania nanocząstek przed fotoaktywacją, doborze parametrów procedury PTT oraz współinterpretacji uzyskanych wyników.

Mój udział procentowy szacuję na **13%**.

IF₂₀₁₇= 5,08; CI= 0

Sumaryczny IF jednotematycznego cyklu publikacji wchodzącego w skład rozprawy habilitacyjnej według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania: 41,595. W 8 pracach z tego cyklu jestem autorem korespondencyjnym.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Nanomateriały stanowią bardzo liczną i zróżnicowaną grupę materiałów. Kryterium decydującym o przynależności do tej grupy jest to, by jeden z charakterystycznych wymiarów nie przekraczał 100 nm. W związku z różnym kształtem „ziarna” nanomateriału, kryterium to może odnosić się do: średnicy słupków (np. nanorurki węglowe, których średnica wynosi zwykle 2-20 nm), grubości warstwy (np. MXeny) lub średnicy ziarna (np. kropki kwantowe, których średnica wynosi zwykle kilka nanometrów). Do grupy nanomateriałów, poza powyżej wspomnianymi, należą również: dendrymery, grafen, nanocząstki metali i tlenków metali. Niewielkie rozmiary cząstek determinują właściwości fizykochemiczne nanomateriałów, które są zdecydowanie różne od właściwości ich odpowiedników w makroskali. Przykładowo, makroskopowe złoto ma kolor żółty, charakteryzuje je wysoka odporność chemiczna i temperatura topnienia wynosząca 1064°C, podczas gdy nanocząstki złota o wielkości 1 nm mają kolor rubinowy, wykazują właściwości

katalityczne, a ich temperatura topnienia to zaledwie 200°C. Jedną z cech, która jest charakterystyczna i wspólna dla nanomateriałów to wysoki stosunek powierzchni do objętości. Jest on tym większy, im mniejszy jest rozmiar nanocząstki. Parametr ten w znaczący sposób wpływa na wzrost aktywności formy nanocząsteczkowej w stosunku do formy makroskopowej, a także determinuje właściwości adsorpcyjne nanocząstek. Korzystne jest to, że ta wysoce rozwinięta powierzchnia może być modyfikowana, dzięki czemu można wpływać na chemiczną naturę nanocząstek. Poprzez dowiązanie określonych cząsteczek do powierzchni możemy uzyskać selektywność oddziaływania lub umożliwić wykorzystanie nanomateriału w roli nośnika substancji aktywnej (np. chemioterapeutyków). Wspomnieć należy również o unikalnych właściwościach optycznych, które zazwyczaj posiadają nanomateriały, np. kropki kwantowe wykazują intensywną fluorescencję, a dla niektórych nanocząstek metalicznych występuje zjawisko zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (LSPR, ang. *localised surface plasmon resonance*). To właśnie dzięki swym właściwościom fizykochemicznym nanomateriały wzbudzają takie zainteresowanie naukowców i znajdują zastosowanie w wielu obszarach, między innymi w analizie chemicznej, biologicznej i klinicznej. W ostatnim czasie nanomateriały znajdują również zastosowanie w diagnozowaniu i leczeniu chorób zakaźnych, schorzeń sercowo-naczyniowych oraz nowotworów. Prowadzone są prace, w których nanocząstki stosowane są w tomografii komputerowej (nanocząstki złota), w rezonansie magnetycznym (nanocząstki Fe_3O_4), czy też w pozytonowej emisyjnej tomografii (nanocząstki krzemionki) do wykrywania obszarów tkanek objętych chorobą (diagnostyka obrazowa nowotworów). Nanomateriały posiadające właściwości fluorescencyjne wykorzystywane są również jako znaczniki w technice cytometrii przepływowej oraz w testach Western Blot (kropki kwantowe). Z punktu widzenia ich aplikacji w leczeniu chorób nowotworowych, podejmowane są prace, w których nanocząstki (nanorurki węglowe, dendrymery, liposomy) stosowane są jako nośniki leków lub podawane w celu uzyskania wzmocnienia efektów prowadzonej terapii (grafen, fulereny). Komercyjne przykłady zastosowania nanomateriałów to wykorzystanie ich w opatrunkach przyspieszających gojenie ran (nanocząstki srebra), czy też jako biokompatybilnych powłok dla metalowych implantów medycznych (nanohydroksyapatyt).

Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. **„Badania *in-vitro* nanomateriałów pod kątem ich zastosowań w obrazowaniu i terapii przeciwnowotworowej”**, było wykorzystanie

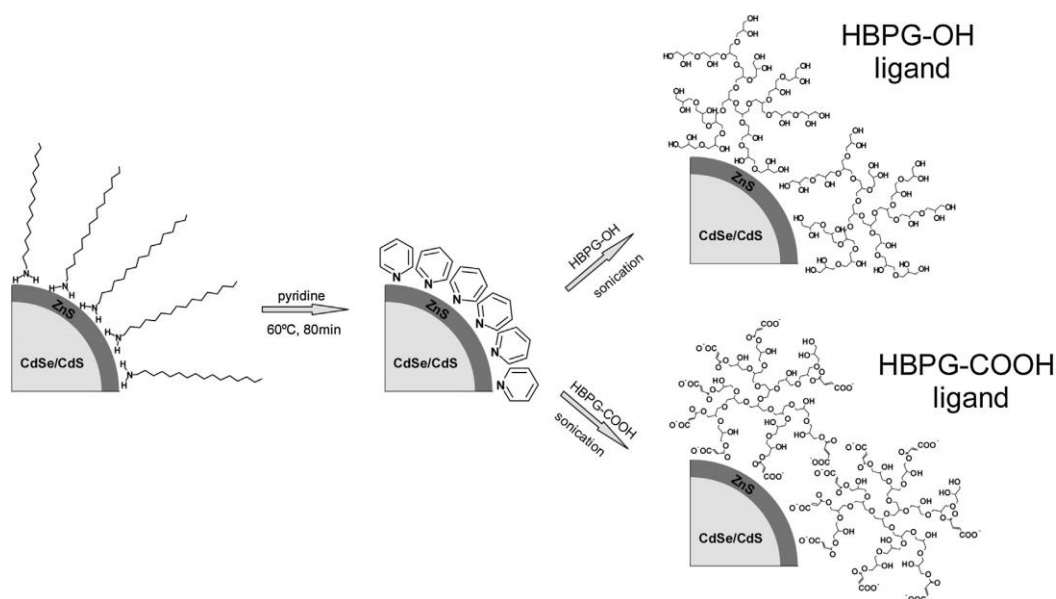
unikalnych właściwości różnorodnych nanocząstek w połączeniu z odpowiednią modyfikacją ich powierzchni, w celu odpowiedniego wpłynięcia na ich aktywność biologiczną, co w konsekwencji umożliwiłoby wykorzystanie nanomateriału w diagnostyce lub terapii nowotworów.

Pierwszym nanomateriałem, któremu poświęciłam uwagę w swoich badaniach, były kropki kwantowe. Prace te realizowane były w ramach **kierowanego przeze mnie projektu badawczego SONATA** pt.: „Badanie korelacji parametrów fizykochemicznych i aktywności biologicznej funkcjonalizowanych kropek kwantowych z wykorzystaniem metod optycznych”, finansowanego przez NCN. Badania te prowadziłam we współpracy z panią profesor Magdaleną Skompską z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Kropki kwantowe (ang. *quantum dots*, QDs) są to nieorganiczne nanokryształy półprzewodnikowe składające się z setek do tysiący atomów pierwiastków należących zazwyczaj do grup II i VI (np. InP, InAs) lub III i V (np. CdSe, CdTe) układu okresowego. Biorąc pod uwagę strukturę QDs, można je podzielić na trzy grupy: (I) zbudowane tylko z rdzenia, (II) zbudowane z rdzenia i powłoki oraz (III) zbudowane z rdzenia i kilku powłok. Powłoka powlekająca rdzeń ma zwykle wyższą energię pasma wzbronionego niż materiał rdzenia. Obecność powłoki w strukturze kropek kwantowych jest bardzo istotna, ponieważ poprawia ich właściwości optyczne. Zazwyczaj te półprzewodnikowe nanokryształy charakteryzują się średnicą od 2 do 10 nanometrów i ze względu na swoje niewielkie rozmiary nazywa się je często „sztucznymi atomami”. Rdzeń QDs nadaje im charakterystyczne właściwości optyczne, które zależą od jego składu chemicznego i średnicy. Im mniejsza jest średnica QDs (rośnie energia pasma wzbronionego) tym emitowane przez nie promieniowanie ma wyższą energię. Zatem wielkość kropek kwantowych jest kluczowym czynnikiem, który określa długość fali ich fluorescencji. Emisja fotoluminescencji tych nanocząstek może występować w szerokim zakresie długości fal (od UV do podczerwieni) i można ją „dostroić” zmieniając średnicę QDs. Na długość fali emitowanej fluorescencji wpływa również skład chemiczny zarówno rdzenia, jak i powłoki (jeśli występuje). Korzystną cechą z punktu widzenia zastosowań kropek kwantowych w obrazowaniu jest to, że charakteryzują się szerokimi pasmami absorpcji, wąskimi pikami emisji, wysokimi wydajnościami kwantowymi fotoluminescencji oraz stosunkowo dużą wartością przesunięcia Stokesa. Dzięki tym właściwościom mogą one stanowić znakomite znaczniki fluorescencyjne stosowane w bioobrazowaniu. Należy zauważyć, że powierzchnię kropek kwantowych można modyfikować za pomocą różnych ligandów. Wybór odpowiedniego ligandu jest kluczowym czynnikiem, który będzie wpływał

na stabilność i dyspersję tych nanocząstek w roztworze wodnym. Jednak obecność ligandów na powierzchni, poza determinowaniem parametrów fizycznych i chemicznych QDs, będzie decydować o charakterze ich oddziaływania z komórkami lub organizmami żywymi. Dlatego zastosowane ligandy są istotnym czynnikiem poszerzającym lub ograniczającym możliwości aplikacji nanocząstek. Muszą one być starannie wybierane zwłaszcza wtedy, gdy nanocząstki mają być wykorzystywane do celów biologicznych lub medycznych. Mając na uwadze fakt, że QDs mogą być zbudowane z różnych związków, nie możemy ich traktować jako jednorodnej grupy substancji (o jednakowych właściwościach). Ich aktywność biologiczną należy zawsze analizować w powiązaniu z parametrami takimi jak: skład, typ budowy, rodzaj ligandu czy też rozmiar.

W pierwszym etapie prowadzonych badań chciałam wykorzystać **znakomite właściwości fluorescencyjne kropek kwantowych do bioobrazowania**. Ze względu na to, że synteza QDs prowadzona jest zazwyczaj w rozpuszczalnikach organicznych (wymagana wysoka temperatura) to mają one właściwości hydrofobowe. Aby umożliwić ich wykorzystanie w zastosowaniach biologicznych niezbędna jest modyfikacja właściwości ich powierzchni. Uznałam, że ciekawym rozwiązaniem będzie pokrycie powierzchni QDs hydrofilowym polimerem. Strategia wykorzystywania biokompatybilnych materiałów polimerowych w zastosowaniach biomedycznych jest powszechnie znana i stosowana (np. w enkapsulacji leków). **Postanowiłam jednak wykorzystać do modyfikacji powierzchni kropek kwantowych niestosowany dotychczas w tym celu hiperrozgałęziony poliglicydol** (ang. *hyperbranched polyglycidol*, HBPG) (**publikacja H1 - [Grabowska-Jadach I.](#), Drozd M., Biegała J., Pietrzak M., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Parzuchowski P.G., Brzózka Z., *Studies on influence of polymer modifiers for fluorescent nanocrystals' cytotoxicity*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 127 (2016) 193**). Jest to polimer dendrytyczny, należący do hiperrozgałęzionych polieterów, otrzymywany w wyniku polimeryzacji glicydolu przebiegającej z otwarciem pierścienia. Posiada on dużą ilość asterminalnych grup hydroksylowych (hiperrozgałęziona struktura), z których część została wykorzystana do stabilizacji kropek kwantowych, a pozostałe z nich mogą być wykorzystane do dalszej (bio)funkcjonalizacji nanocząstek. W efekcie można byłoby uzyskać nanocząstki, które znalazłyby zastosowanie nie tylko w obrazowaniu komórkowym, ale również jako systemy dostarczania leków. Niska toksyczność polimeru, łatwość przygotowania i możliwość dalszej funkcyjonalizacji stanowiły główne zalety, które zachęciły mnie do wykorzystania go w celu modyfikacji powierzchni fluorescencyjnych nanokryształów.


HBPG, podobnie jak glikol polietylenowy (PEG), wykazuje wysoką hydrofilowość i jest biokompatybilny. Jednakże jego przestrzenna struktura powinna w większym stopniu zapewnić stabilizację nanocząstek (bariera steryczna) oraz dodatkowo zwiększyć ich odporność na agregację w warunkach *in vivo* w porównaniu do popularnie wykorzystywanych układów tiolowych. Oparte na tiolach monowarstwy są podatne na utlenianie i desorpcję, co może zmniejszać stabilność nanostruktur modyfikowanych z ich zastosowaniem. Liczne przykłady zastosowania QDs powlekanych PEG (liniowy analog HBPG-OH) oraz **brak doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania i cytotoksyczności QDs o powierzchni modyfikowanej HBPG-OH stanowiły dodatkowy powód do podjęcia prac w tym kierunku.** W publikacji H1 opisane zostały badania, w których oceniano aktywność biologiczną wybranych kropek kwantowych – $\text{CdSe}_x\text{S}_{1-x}/\text{ZnS}$. Powierzchnię nanokryształów poddano modyfikacji, na drodze wymiany ligandów, z wykorzystaniem hiperrozgałęzionego poliglicydu o niskiej masie cząsteczkowej (3,2 kDa) (Rys. 1).



Rys.1 Modyfikacja powierzchni $\text{CdSe}_x\text{S}_{1-x}/\text{ZnS}$ z wykorzystaniem hiperrozgałęzionych poligliceroli (HBPG-OH i HBPG-COOH) [H1]

W badaniach wykorzystano nie tylko HBPG-OH, ale również HBPH-COOH, który uzyskany został na drodze acylacji HBPG-OH prowadzonej z udziałem bezwodnika maleinowego (na podstawie analizy NMR określono, że 40% grup $-\text{OH}$ uległo modyfikacji). Zastosowano powłokę HBPG-COOH, gdyż miało to umożliwić jej dalszą funkcjonalizację (na drodze oddziaływania międzycząsteczkowego lub poprzez kowalencyjne wiązanie np. w wyniku reakcji sprzęgania z wykorzystaniem karbodiimidu). **Modyfikacja kropek**

kwantowych z wykorzystaniem obu polimerów doprowadziła do uzyskania nanocząstek charakteryzujących się dobrą dyspersją w roztworze wodnym. Scharakteryzowano właściwości optyczne obu uzyskanych rodzajów nanostruktur i stwierdzono różnicę w intensywności ich fluorescencji. Jak obliczono, wydajność kwantowa dla nanokryształów modyfikowanych HBPG-COOH wyniosła 52% wartości uzyskanej dla HBPG-OH. Przyczynę zaobserwowanej różnicy należy upatrywać w nieco odmiennej strukturze obu zastosowanych stabilizatorów - HBPG-COOH zawiera reszty kwasu maleinowego i grupy karboksylowe, a także sprzężone układy wiązań C=C i C=O, które mogą oddziaływać z QDs i wpływać na właściwości optyczne. Warto podkreślić wysoką stabilność fotoluminescencyjną QDs-HBPG (nawet po kilku tygodniach). W dalszym etapie sprawdzono cytotoksyczność uzyskanych QDs w badaniach *in vitro*. Testy te przeprowadzono na wybranej linii komórkowej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że QDs modyfikowane polimerem zawierającym grupy karboksylowe (HBPG-COOH) są bardziej toksyczne niż te modyfikowane HBPG-OH. Przyjęto, że toksyczność jest konsekwencją współistnienia dwóch czynników – składu chemicznego kropek i obecności polimeru na ich powierzchni. Okazało się, że przeprowadzona modyfikacja uniemożliwia wnikanie kropek kwantowych do wnętrza komórek na drodze endocytozy, zaobserwowano jedynie oddziaływanie z błoną komórkową (gromadzenie nanostruktur na powierzchni komórek po 24 i 48h inkubacji). W związku z tym, kropki kwantowe modyfikowane HBPG nie mogą być wykorzystane w obrazowaniu struktur wewnątrzkomórkowych.

W kolejnym etapie prowadzonych badań wykorzystałam inną grupę ligandów w celu modyfikacji powierzchni QDs (**publikacja H2** - Opalski A., **Grabowska-Jadach I.** , Oszwałdowski S., *Biological activity of surface modified nanocrystals*, Current Nanoscience 14 (2018) 307). Do stabilizacji nanokryształów były wykorzystywane: cysteina, kwas dihydroliponowy (DHLLA) oraz kwas 11-merkaptoundekanoowy (MUA). Dwa pierwsze spośród stosowanych ligandów to cząsteczki o niewielkich rozmiarach, które występują w organizmie ludzkim. Dobór wykorzystywanych ligandów podyktowany był obecnością w ich strukturze co najmniej dwóch grup funkcyjnych, z których jedna miała umożliwić dowiązanie do powierzchni nanocząstki, a druga mogła ulegać protonacji i deprotonacji, co korzystnie wpływałoby na stabilność nanocząstek w roztworze wodnym uzyskiwaną poprzez posiadany ładunek. Ponadto zdecydowano, że wspólną cechą ligandów będzie sposób ich dowiązania do powierzchni, zatem wszystkie musiały posiadać grupę tiolową. Po zsyntezowaniu nanokryształów, do ich powierzchni dowiązane zostały ligandy. W wyniku

przeprowadzonej modyfikacji uzyskano wodne roztwory dobrze zdyspergowanych nanocząstek stabilizowanych ujemnym ładunkiem. Analizując wyniki uzyskane techniką elektroforezy żelowej (ang. *gel electrophoresis*, GE) stwierdzono, że dla nanocząstek o tym samym rozmiarze, a różnej budowie (CdSe vs. CdSe/ZnS) ich ζ -potencjał ma podobną wartość co oznacza, że gęstość ligandu na powierzchni nie zależy istotnie od składu chemicznego i typu budowy kropek (rdzeń lub rdzeń/powłoka). Zbadano także wpływ długości ligandu na ζ -potencjał nanocząstek (CdSe-MUA vs. CdSe-cysteina). Po potwierdzeniu dobrych właściwości optycznych uzyskanych QDs, w kolejnym etapie sprawdzono, jak skład QDs i obecność różnych ligandów na ich powierzchni będzie wpływać na aktywność biologiczną nanokryształów. Badania prowadzone były dla pięciu rodzajów kropek kwantowych (CdS, CdS/ZnS, CdSe, CdSe/ZnS, CdTe), których cechą wspólną jest obecność jonów kadmu w ich rdzeniu. Dla wszystkich uzyskanych nanocząstek wyznaczono wartość stężenia IC_{50} (stężenie, przy którym żywotność komórek stanowi 50% w odniesieniu do próby kontrolnej) na podstawie badań prowadzonych na dwóch liniach komórkowych: prawidłowej i nowotworowej. Zauważono, że dla niektórych typów nanokryształów występują podobne tendencje w zmianach żywotności komórek inkubowanych z roztworem nanomateriału (np. CdSe-cysteina). Najmniej cytotoksyczne były kryształy stabilizowane cysteiną co może sugerować, że nadawanie właściwości hydrofilowych z wykorzystaniem aminokwasów czy też peptydów mogłoby przyczyniać się do wzrostu biokompatybilności nanostruktur.

W efekcie przeprowadzonych badań (**H1** i **H2**) udało się powiązać czynniki takie jak: skład, budowa, czy obecność polimerowej otoczki z cytotoksycznością QDs. Uznałam, że istotne jest również określenie wpływu sposobu wiązania ligandów z powierzchnią na właściwości nanocząstek. Biorąc pod uwagę to, że trwałość wiązania ligand-nanocząstka będzie wpływać na stabilność warstwy tworzącej otoczkę, to parametr ten powinien odgrywać istotną rolę w stabilności i cytotoksyczności QDs. Kowalencyjne wiązanie ligandu z powierzchnią nanocząstki z wykorzystaniem grup tiolowych (najczęściej wykorzystywany sposób wiązania ligandów z powierzchnią nanostruktur) jest wrażliwe na wiele czynników (chemiczne i fotochemiczne utlenianie, obecność biogennych tioli) uznałam więc, że warto sprawdzić czy możliwe jest zwiększenie stabilności monowarstwy ligandów wykorzystując w tym celu wiązanie ditiokarbaminianów (DTC) z powierzchnią nanocząstek. W związku z tym, że jednym z opisanych w literaturze sposobów na ukierunkowane dostarczanie leków do komórek nowotworowych jest ich otoczkowanie warstwą polisacharydową uznałam, że


efektywnym sposobem modyfikacji powierzchni kropek kwantowych może być wykorzystanie jako ligandów sacharydów. Zastosowania polisacharydów, a także odpowiednich analogów glukozy (tio- lub aminopochodnych) do modyfikacji nanostruktur (metalicznych, półprzewodnikowych czy też na bazie krzemionki) zostały już opisane w literaturze. Jednak **brak było doniesień na temat wykorzystania prostych pochodnych tiolu i DTC glukozy, jako stabilizatorów QDs**. Dla wybranych przeze mnie nanocząstek oraz grupy ligandów, którą wyselekcjonowałam w celu modyfikacji powierzchni nanostruktur przeprowadzone zostały badania, a ich wyniki opisano w **publikacji H3** (Drozd M., Pietrzak M., Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.**, Malinowska E., *Glucose Dithiocarbamate Derivatives as Capping Ligands of Water-Soluble CdSeS/ZnS Quantum Dots*, *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects* 509 (2016) 656). Wykorzystywane były trzy analogi glukozy do stabilizacji kropek kwantowych: 1-tio-D-glukoza (DG-SH), ditiokarbaminian D-glukozaminy (DG-DTC) i ditiokarbaminian N-metylo-d-glukaminy (NMDG-DTC). W pierwszym etapie prac zbadano i porównano właściwości samych ligandów (takie jak: stabilność w roztworach o różnym pH i zdolność do tworzenia kompleksów z dwuwartościowymi metalami) uznając, że są one istotne z punktu widzenia późniejszego zastosowania tych związków do modyfikacji powierzchni QDs ($CdSe_xS_{1-x}/ZnS$). Po przeprowadzonej funkcjonalizacji (na drodze wymiany ligandów) i uzyskaniu hydrofilowych QDs (QDs-DTC-DG, QDs-DTC-NMDG i QDs-SH-BDG) wyznaczono ich parametry fizykochemiczne (średnica hydrodynamiczna, wielkość, wydajność kwantowa fluorescencji, stabilność). W kolejnym etapie zbadano cytotoksyczność uzyskanych nanostruktur, w badaniach prowadzonych na wybranej linii komórkowej. Na ich podstawie stwierdzono, że jedynie kropki kwantowe modyfikowane NMDG-DTC nie są toksyczne w całym badanym zakresie stężeń (dla najwyższego badanego stężenia żywotność komórek w hodowli, po 24h inkubacji, wynosiła 85%). W związku z tym, że dla tych nanocząstek zaobserwowano tworzenie się agregatów w pożywce hodowlanej stwierdzono, że jest to główny czynnik wpływający na ich niższą cytotoksyczność. Natomiast DG-DTC-QDs były jednorodnie zdyspergowane w pożywce (mniejszy rozmiar w porównaniu do agregatów), co mogło wpływać na ich łatwiejsze wnikanie do komórek i determinować ich wyższą cytotoksyczność. Biorąc pod uwagę łatwość otrzymywania DTC, a także stabilność koloidalną i dobre właściwości optyczne otrzymanych hydrofilowych QDs uznano, że pochodne DTC są ciekawą alternatywą dla powszechnie stosowanych tiolowanych ligandów.


W następnym etapie prowadzonych przeze mnie prac, sprawdzony został wpływ wielkości ligandu, wielkości nanokryształu oraz głównego metalu obecnego w składzie rdzenia QDs (np. Cd vs. In) na ich aktywność biologiczną (**H4** i **H5**). W publikacji (**H4** - Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.**, Drozd M., Pietrzak M., *Comparative studies of biological activity of cadmium-based quantum dots with different surface modifications*, Applied Nanoscience 8 (2018) 309) zbadano i porównano aktywność nanocząstek CdSe/ZnS (3,7 nm) i CdSe_xS_{1-x}/ZnS (6,0 nm). Jako ligandy do uzyskania hydrofilowych QDs wykorzystano dwa homologiczne kwasy tiokarboksyłowe o różnej długości łańcucha węglowego: 3-merkaptopropionowy (MPA) i 6-merkaptiheksanowy (MHA) (C3 vs. C6). Na podstawie pomiarów, mających na celu scharakteryzowanie fizykochemicznych właściwości nanocząstek po przeprowadzonej modyfikacji, stwierdzono brak istotnego wpływu rodzaju ligandu na parametry optyczne QDs. Analiza intensywności fluorescencji kropek kwantowych doprowadziła do wniosku, że wszystkie wykazują dobre właściwości fluorescencyjne, przy czym nanocząstki stabilizowane MHA charakteryzowały się wyższą wydajnością kwantową, niż te z MPA (dla tych samych rdzeni). Fakt ten wytłumaczono lepszą pasywacją powierzchni nanokryształu przez MHA (konsekwencja większej gęstości tego ligandu na powierzchni QDs). Istotna, z punktu widzenia dalszych aplikacji, długoterminowa stabilność parametrów fizykochemicznych uzyskanych QDs (co najmniej 3 miesiące) została również potwierdzona w toku przeprowadzonych badań. Badania cytotoksyczności nanomateriału wykonano na 2 liniach komórkowych. Dla obu stwierdzono, że CdSe/ZnS-MHA są mniej toksyczne niż CdSe/ZnS modyfikowane kwasem 3-merkaptiheksanowym. Taką samą zależność zaobserwowano dla drugiego typu kropek. We wszystkich badaniach różnice w cytotoksyczności kropek modyfikowanych MHA vs. MPA były bardziej widoczne dla wyższych stężeń kropek kwantowych. Ponadto żywotność komórek była wyższa po ekspozycji na CdSe_xS_{1-x}/ZnS niż CdSe/ZnS posiadających ten sam ligand na swej powierzchni. Dla kropek kwantowych wykazujących wyższą biokompatybilność, dodatkowo przeprowadzono testy cytotoksyczności na prawidłowej linii komórkowej. Dla wszystkich badanych linii wyznaczono *parametr* IC₅₀ (Tabela 1). Na tej podstawie stwierdzono, że modyfikacja powierzchni QDs dłuższym ligandem (MHA) zmniejsza ich cytotoksyczność. Zauważono, że sama modyfikacja nanomateriału miała większy wpływ na obserwowaną cytotoksyczność, niż skład rdzenia. Pomimo tego, że mniejsze QDs mogą łatwiej przeniknąć do wnętrza komórki, to zgodnie z naszymi badaniami toksyczność QDs w większym stopniu zależy od długości łańcucha modyfikatora niż średnicy hydrodynamicznej QDs, np. mniejsze (8,6 nm) CdSe/ZnS-MHA wykazywały niższą

toksyczność niż większe (11,1 nm) CdSe_xS_{1-x}/ZnS-MPA. Wy tłumaczono to tym, że ligand o dłuższym łańcuchu zapewnia lepszą ochronę rdzenia i zmniejsza uwalnianie z niego toksycznego Cd²⁺ do środowiska hodowli komórkowej.

Tabela 1 Wartości IC₅₀ dla badanych linii po 24h inkubacji z QDs [μ M Cd²⁺] [H4].

	K562	A549	MRC-5
CdSe _x S _{1-x} /ZnS-MPA	84 ± 3	91 ± 3	54 ± 2
CdSe/ZnS-MPA	58 ± 2	67 ± 3	
CdSe _x S _{1-x} /ZnS-MHA	53 ± 2	56 ± 2	30 ± 2
CdSe/ZnS-MHA	32 ± 1	23 ± 2	

W kolejnym etapie prac zbadana została aktywność biologiczna nanocząstek ZnCuInS/ZnS (publikacja **H5** - Kalinowska D., Drozd M., **Grabowska-Jadach I.** , Pietrzak M., Dybko A., Malinowska E., Brzózka Z. *The influence of selected mercaptocarboxylate ligands on physicochemical properties and biological activity of Cd-free, zinc-copper-indium sulfide colloidal nanocrystals*, Materials Science and Engineering C 97 (2019) 583). Testy przeprowadzone zostały na 3 liniach komórkowych. Oceniono w nich żywotność komórek, powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) i typ śmierci, jakiemu ulegają komórki na skutek inkubacji z nanomateriałem. Pośrednio określono również ilość nanomateriału, który wniknął do komórek. Dla obu ligandów (MPA i MHA) nie zauważono istotnych różnic, które pozwoliłyby powiązać cytotoxyczność QDs z ich obecnością na powierzchni. Podczas badania właściwości kropek kwantowych zawierających w swym składzie kadm, założono że może on stanowić jedną z głównych przyczyn ich toksyczności. W związku z tym, stężenie badanych QDs wyrażano poprzez stężenie Cd²⁺ (stężenie głównego składnika rdzenia). Analogicznie wyrażano stężenie dla ZnCuInS/ZnS – poprzez stężenie In³⁺. Dzięki temu możliwe było porównanie uzyskanych wyników dla obu typów kropek kwantowych (**H4 i H5**). W ten sposób dostrzeżono kolejną zależność - kropki kwantowe nieposiadające w swym rdzeniu kadmu (ZnCuInS/ZnS) stabilizowane takimi samymi ligandami (MPA i MHA) są mniej toksyczne niż CdSe/ZnS i CdSeS/ZnS. Stwierdzono, że skład rdzenia w większym stopniu wpływa na cytotoxyczność, niż średnica hydrodynamiczna (ZnCuInS/ZnS-MHA 6,8 nm, CdSe/ZnS-MHA 8,6 nm, CdSeS/ZnS-MHA 13,5 nm).

Postanowiłam również sprawdzić, w jakim stopniu środowisko, w którym znajdują się nanocząstki będzie wpływać na ich stabilność chemiczną. W tym celu porównano cytotoksyczność QDs, wówczas gdy znajdowały się w medium hodowlanym lub zostały wprowadzone do wnętrza komórek (inny skład i pH) (publikacja **H6** - Skorupska S., **Grabowska-Jadach I.** , *Cytotoxicity studies of quantum dots with the electroporation method*, *Bioelectrochemistry* 126 (2019) 86). Aktywne dostarczenie QDs do komórek realizowano z wykorzystaniem elektroporacji (EP). Elektroporacja jest to metoda, w której na skutek impulsu elektrycznego dochodzi do tymczasowej destabilizacji błony komórkowej. W efekcie tego, w podwójnej warstwie lipidowej tworzą się hydrofilowe pory (o wielkości 1-10 nm), co umożliwia migrację różnych cząsteczek obecnych w środowisku zewnątrzkomórkowym do wnętrza komórki. Pory te nie są stabilne i po krótkim czasie zanikają (trwa to zwykle kilkadziesiąt sekund do kilku minut). Badania cytotoksyczności nanocząstek CdTe-COOH prowadzono na 3 różnych liniach komórkowych. Zauważono, że środowisko zewnątrz- bądź wewnątrzkomórkowe wpływa na cytotoksyczność określoną dla danej linii komórkowej, jednakże zmiany te są większe, gdy nanocząstki znajdują się wewnątrz komórek. Ponadto zauważono, że wielkość powierzchni właściwej QDs w większym stopniu determinuje cytotoksyczność, niż środowisko, w jakim się one znajdują. W związku z tym, że w prowadzonych dotychczas przeze mnie badaniach warunki panujące w hodowli komórkowej, znacznie odbiegają od tych, które są w żywym organizmie uznałam, że może to wpływać nie tylko na funkcjonowanie komórek, ale także na oddziaływanie na nie nanomateriału. W tej sytuacji zależało mi na tym, aby w lepszym stopniu odzwierciedlić sytuację panującą *in vivo*. Postanowiłam wykorzystać w swoich badaniach **mikroprzepływowe systemy typu lab-on-a-chip**. Umożliwiają one **precyzyjną kontrolę parametrów mikrośrodowiska komórkowego, a także pozwalają pokonać ograniczenia tradycyjnych metod hodowli komórek**. W systemach mikroprzepływowych zapewniony jest transport niezbędnych substancji (tlen i składniki odżywcze) w odpowiednich stężeniach. Ponadto, przepływ medium (pożywki hodowlanej) generuje naprężenia ścinające, których obecność wpływa na funkcjonowanie komórek i może zasadniczo zmienić kinetykę dyfuzji i oddziaływanie nanomateriału z błoną komórkową. Poprzez wykorzystanie systemu mikrokanalów możliwe jest uzyskanie gradientów stężeń badanych związków, co znacznie przybliży warunki występujące w żywych organizmach. W systemach takich kanały/komory do hodowli komórkowej charakteryzuje wysoki stosunek powierzchni do objętości (ang. *surface area to volume*, SAV), co odzwierciedla warunki *in vivo* (dyfuzja gazów, transport substancji odżywczych). Innym ważnym parametrem odróżniającym hodowle komórkowe

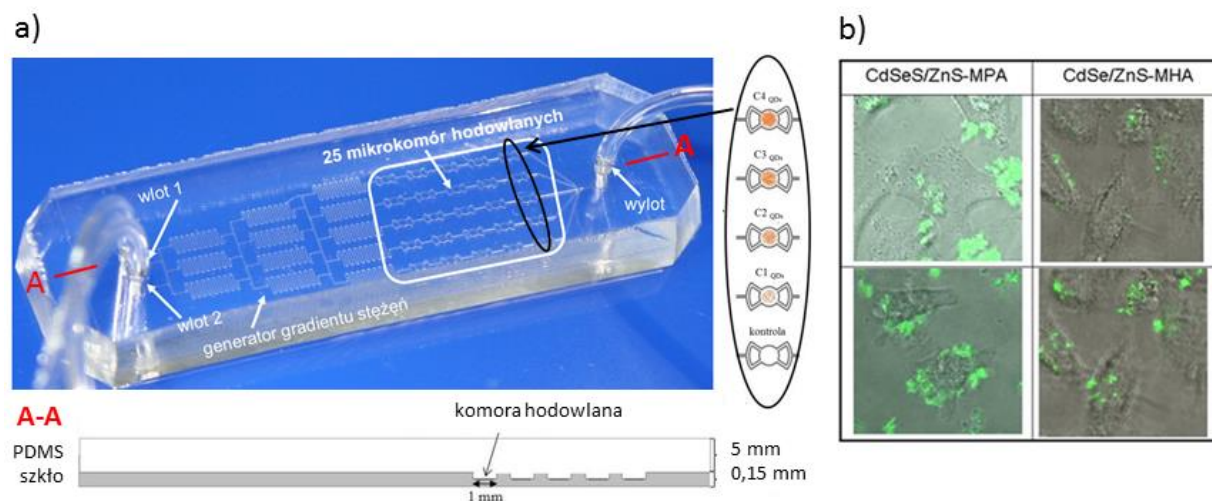
prorowadzone w makroskali od tych uzyskiwanych w mikrosystemach jest efektywna objętość hodowli – ECV (ang. *effective culture volume*). Parametr ten opisuje zdolność komórek do kontrolowania ich mikrośrodowiska podczas hodowli. ECV w makroskali jest znacznie mniejsza niż w butelce hodowlanej czy płytce 96-dołkowej (Rys. 2). Konsekwencją wszystkich wspomnianych cech mikrosystemów jest to, że możemy obserwować w nich zjawiska, które nie występują w makroskali.



Rys. 2 Porównanie warunków w badaniach *in vivo* i *in vitro* z parametrami hodowli komórkowej prowadzonej w mikrosystemie.

Badania cytotoksyczności QDs, które zostały wykonane przeze mnie z wykorzystaniem mikrosystemu (Rys.3a) opisano w publikacji **H7 (Grabowska-Jadach I., Haczyk M., Drozd M., Fischer A., Pietrzak M., Malinowska E., Brzózka Z., *Evaluation of biological activity of quantum dots in a microsystem*, Electrophoresis 37 (2016) 425).** Mikroprzepływowy system wytworzono z dwóch biokompatybilnych i przezroczystych materiałów (szkła i polimeru), które zostały ze sobą trwale połączone z wykorzystaniem plazmy tlenowej. W większości mikrosystemów stosowane są płytki szklane o grubości 1 mm i większej. Uniemożliwia to wykorzystanie do obserwacji komórek mikroskopu konfokalnego, który zapewnia wysoki kontrast i rozdzielczość, pozwala na obrazowanie 3D oraz obserwację struktur organelli komórkowych. W związku z tym, dotychczas stosowaną płytkę szklaną zastąpiłam szkiełkiem nakrywkowym o grubości 0,15 mm (Rys. 3a). W ten prosty sposób zapewniona została odpowiednia odległość obiektywu do monowarstwy

komórek (uzyskano odpowiednią głębokość ostrości). W mikrosystemie, dzięki wprowadzeniu modyfikacji w jego budowie, możliwe było nie tylko **zbadanie i porównanie cytotoksyczności wybranej grupy kropek kwantowych, ale także określenie miejsca akumulacji nanocząstek** z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Rys. 3b).

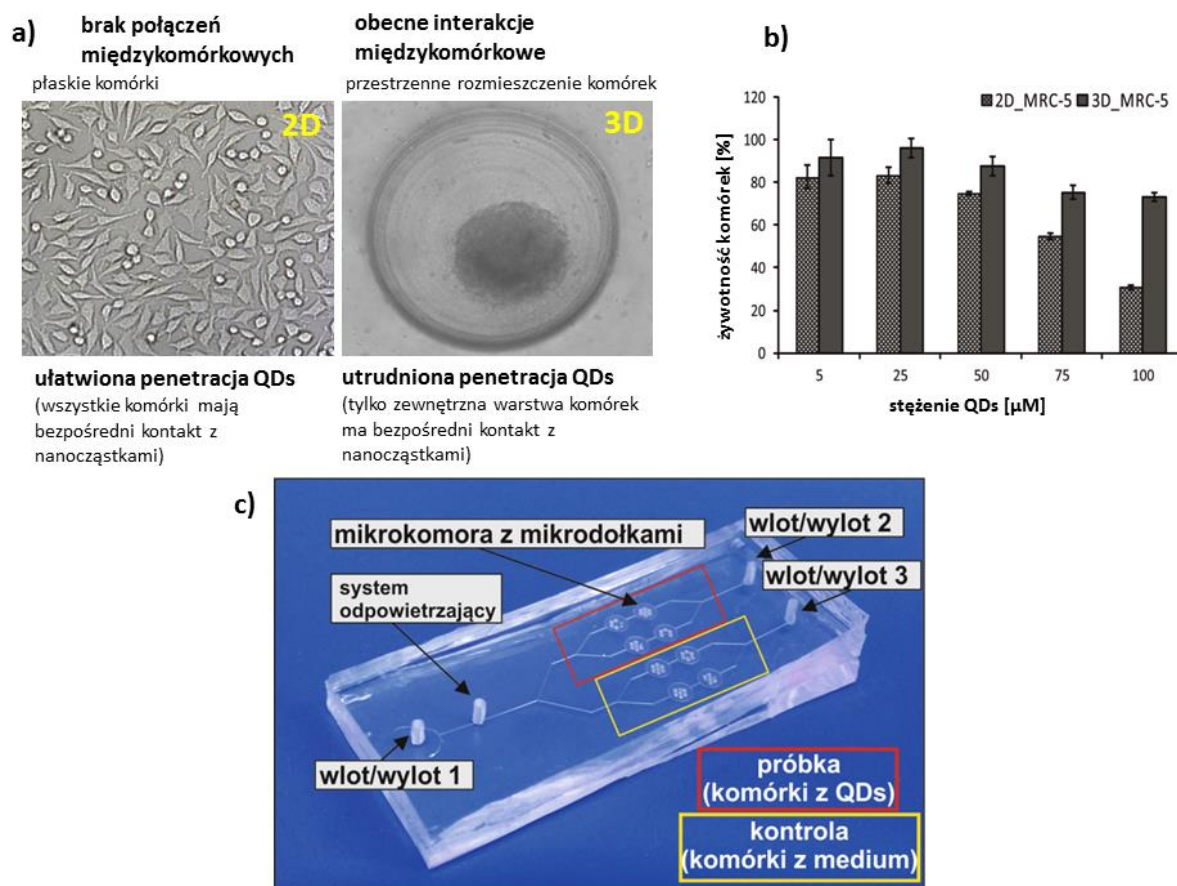


Rys. 3 a) Zdjęcie mikrosystemu, w którym prowadzono badania cytotoksyczności kropek kwantowych, b) zdjęcia mikroskopowe wykonane podczas badania wnikania kropek kwantowych do komórek [H7].

Zastosowanie mikrosystemu umożliwiło obserwację zmian morfologii pojedynczych komórek w czasie rzeczywistym. **Warto podkreślić, że w literaturze brak jest przykładów tego typu urządzeń mikroprzepływowych stosowanych w ocenie cytotoksyczności QDs.** Wprawdzie są przykłady mikroprzepływych cytometrów, ale wówczas pomiary prowadzone są dla zawiesiny komórkowej, co wymaga jej przygotowania (odklejenie komórek adherentnych). Mając na uwadze to, że większość komórek w żywym organizmie stanowią komórki adherentne, badania prowadzone w przedstawionym mikrosystemie stanowią wygodniejsze rozwiązanie.

W związku z tym, że moje badania związane z oceną aktywności biologicznej kropek kwantowych ograniczały się do bardzo prostego modelu, jaki stanowi hodowla komórkowa w postaci monowarstwy, chciałam zbadać ich cytotoksyczność na bardziej złożonym modelu. Postanowiłam przeprowadzić te **badania na wielokomórkowych sferoidach, wykorzystując w tym celu systemy lab-on-a-chip.** Wielokomórkowe sferoidy stanowią jeden z trójwymiarowych modeli hodowli komórkowej, które są stosowane w badaniach *in vitro*. Są to sferyczne, samoorganizujące się agregaty komórek powstające w warunkach, w których komórki mają ograniczoną możliwość adhezji do podłoża (dominują interakcje

komórka-komórka) (Rys. 4a). **Charakteryzują się one morfologią naśladującą budowę tkankową z dobrze rozwiniętymi interakcjami między komórkami oraz komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową.** Poza tym, w strukturach tych, transport cząsteczek jest zbliżony do tego, który ma miejsce w warunkach *in vivo*. Jest to szczególnie istotne w kontekście badań prowadzonych dla nanomateriałów – uwzględnia to bowiem kinetykę przenikania nanocząstek (wpływ ich wielkości i ładunku na penetrację tkanki). Badania z wykorzystaniem mikrosystemu, na trójwymiarowej hodowli przeprowadzono dla hydrofilowych kropek kwantowych o różnych ładunkach powierzchniowych: CdTe modyfikowanych kwasem o-merkaptokarboksylowym i CdSeS/ZnS modyfikowanych glukozaminą (GA). Testy cytotoksyczności prowadzone były na sferoidach komórek prawidłowych i nowotworowych. W badaniach wykazano, że CdSe_xS_{1-x}/ZnS-GA są bardziej toksyczne niż CdTe-MPA, co wytłumaczono obecnością na ich powierzchni nienaładowanego ligandu o biomimetycznym charakterze. Uzyskane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi dla standardowego, dwuwymiarowego modelu - monowarstwy komórek (Rys. 4b). Stwierdzono, że cytotoksyczność tych samych kropek kwantowych zależy od modelu hodowli komórkowej, na którym przeprowadzono testy - jest ona znacznie wyższa, gdy eksperymenty prowadzono na modelu 2D.



Rys. 4 Porównanie hodowli 2D i 3D: a) zdjęcia mikroskopowe, b) wyniki cytotoksyczności uzyskane dla kropek kwantowych CdTe-MPA; c) zdjęcie mikrosystemu, w którym prowadzono badania na sferoidach [na podstawie H8].


W oparciu o uzyskane wyniki powstała publikacja H8 (Grabowska-Jadach I., Żuchowska A., Olesik M., Drozd M., Pietrzak M., Malinowska E., Brzózka Z., *Cytotoxicity studies of selected cadmium-based quantum dots on 2D vs. 3D cell cultures*, New Journal of Chemistry 42 (2018) 12787), **będąca pierwszą pracą opisującą testy cytotoksyczności kropek kwantowych, które prowadzone były w mikrosystemie przepływowym na hodowli 3D.** Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono niższą cytotoksyczność QDs w badaniach na wielokomórkowych sferoidach. Wytłumaczono to ograniczonym oddziaływaniem nanomateriału na komórki, które znajdują się we wnętrzu struktury sferoidu. **Pozwala to przypuszczać, że uzyskiwane w standardowych testach cytotoksyczności (monowarstwa komórek) wyniki (IC_{50}) mogą być zawyżone.** Dokonanie ich weryfikacji na bardziej złożonym modelu, może przyczynić się do poszerzenia zastosowań biomedycznych nie tylko QDs, ale także innych nanomateriałów.

W dalszym etapie mojej pracy, poszukując innych zastosowań dla nanocząstek uznałam, że warto wykorzystać je nie tylko w obrazowaniu nowotworów, ale także w ich terapii. Ze względu na dużą powierzchnię właściwą, nanocząstki mogą być wykorzystywane jako nośniki małych molekuł (na przykład o aktywności farmakologicznej). Ligandy mogą być umieszczane na ich powierzchni (poprzez adsorpcję lub kowalencyjne dowiązanie do grup powierzchniowych) albo zamykane we wnętrzu (np. poprzez enkapsulację). Może to być wykorzystane nie tylko w celu **ukierunkowanego dostarczenia substancji aktywnej**, ale także wpływać na **wzrost wydajności transportu i stanowić ochronę przed zewnątrz- i wewnątrzkomórkową degradacją**. Postanowiłam wykorzystać kropki kwantowe jako nośniki leku, co w połączeniu z ich fluorescencyjnymi właściwościami, umożliwiłoby śledzenie ich dystrybucji w tkance. W badaniach tych, jako ligand do modyfikacji powierzchni nanocząstek wybrałam 6-tioguaninę (6-TG), która stanowiła modelowy związek o aktywności cytostatycznej. Jest ona antymetabolitem puryny, lekiem przeciwnowotworowym stosowanym w chemioterapii nowotworów (takich jak ostra białaczka szpikowa czy ostra białaczka limfoblastyczna). Ta sulfhydrylowa pochodna guaniny, wewnątrz komórki przekształcana jest do aktywnych metabolitów, które hamują syntezę puryn. W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia syntezy DNA i ostatecznie do śmierci komórki na drodze apoptozy. Dowiązanie 6-tioguaniny do nośnika miało umożliwić wzrost wydajności jej transportu do komórek, ale również zwiększyć jej stabilność. Obecny w strukturze tiopuryny atom siarki wykazuje wysokie powinowactwo do ugrupowań sulfhydrylowych biogennych tioli i białek osocza, co może zmniejszać skuteczność terapii. Problem ten może być rozwiązany poprzez zablokowanie grupy sulfidowej, które następuje na etapie dowiązania cząsteczki leku do powierzchni nanostruktury. Koniugacja 6-TG z nanonośnikiem nie tylko poprawiłaby farmakokinetykę leku, ale także wpłynęłaby korzystnie na zwiększenie stężenia jego postaci bioaktywnej w organizmie. Zaletą płynącą z transportowania leku przez nanonośnik jest również jego ochrona przed przedwczesną degradacją lizosomalną oraz możliwość zmniejszenia skutków ubocznych, dzięki ochronie przez zbyt szybką reakcją w środowisku biologicznym. Ponadto nanotransportery charakteryzują się wydłużonym czasem cyrkulacji w układzie krwionośnym. Wprowadzenie leku w postaci koniugatu z nośnikiem ma również wpływ na jego wychwytywanie i transport do wnętrza komórki. Lek przenoszony za pomocą nanonośników wychwytywany jest przez komórki, a następnie wnika do ich wnętrza głównie na drodze endocytozy. W przeciwieństwie do tradycyjnej terapii (podanie leku w wolnej postaci) koniugacja leku z nośnikiem zapobiega jego szybkiemu „wypompowaniu” będącego efektem działania

transbłonowej pompy lekowej - działanie glikoproteiny P polega na usuwaniu z komórek do środowiska zewnątrzkomórkowego substancji hydrofobowych (np. ksenobiotyków). W przypadku zastosowania koniugatu metal-lek w pierwszym etapie jest on otaczany przez błonę komórkową, a następnie transportowany w okolice pęcherzyków endosomalnych, gdzie następuje uwalnianie cząsteczek leku. Dzięki temu, że nie następuje to w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej i jej pomp zależnych od ATP, pozwala to uzyskać lepszy efekt oddziaływania chemioterapeutyku z docelową komórką. **Przeprowadziłam badania, w których potwierdziłam wyższą cytotoksyczność leku dowiązanego do nanonośnika, w porównaniu do jego wolnej postaci, a ponadto potwierdziłam możliwość śledzenia wnikania nanokoniugatów do komórek poprzez wykorzystanie fluorescencyjnych właściwości nanokryształów** (manuskrypt wysłany do Applied Nanoscience, w recenzji od 18.03.2019 – **Grabowska-Jadach I.** ✉, Drozd M., Kulpińska D., Komendacka K., Pietrzak M., *Modification of fluorescent nanocrystals with 6-thioguanine – monitoring of drug delivery*).

Kolejnym podejściem do zastosowania nanomateriałów w terapii nowotworów, było wykorzystanie ich zdolności do oddawania energii, uzyskanej podczas naświetlania promieniowaniem elektromagnetycznym, w postaci ciepła. Taką właściwość posiadają między innymi nanocząstki złota, które to wykazują zjawisko zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych. Postanowiłam wykorzystać je jako czynniki fototermiczne w terapii fototermicznej (ang. *photothermal therapy*, PTT) (badania opisane w publikacjach **H9** i **H10**). Jest to stosunkowo niedawno opracowana metoda miejscowego leczenia nowotworów. Podstawą tej metody jest wykorzystanie zjawiska hipertermii, na skutek krótkotrwałego (trwającego zaledwie kilka minut) wzrostu temperatury tkanki (41-46°C), w efekcie którego dochodzi do śmierci komórek. Dzięki temu, że naświetlanie prowadzone jest w ściśle określonym obszarze, temperatura wzrasta lokalnie i uzyskiwany efekt ogranicza się do tkanki nowotworowej (ograniczenie skutków ubocznych). Istotnym elementem tej metody terapii nowotworów jest zastosowanie odpowiedniego czynnika fototermicznego. W badaniach opisywanych w literaturze, w terapii fototermicznej wykorzystywane są głównie nanocząstki złota w kształcie prętów (ang. *nanorods*). W związku z istotnymi wadami tych nanocząstek, wśród których należy wymienić obecność trudnych do usunięcia surfaktantów w roztworze nanocząstek po ich syntezie (np. bromek cetylotrimetyloamoniowy, CTAB), postanowiłam wykorzystać nanocząstki złota o innym kształcie. Uznałam, że najkorzystniejsze będzie wykorzystanie w tym celu nanopowłok złota

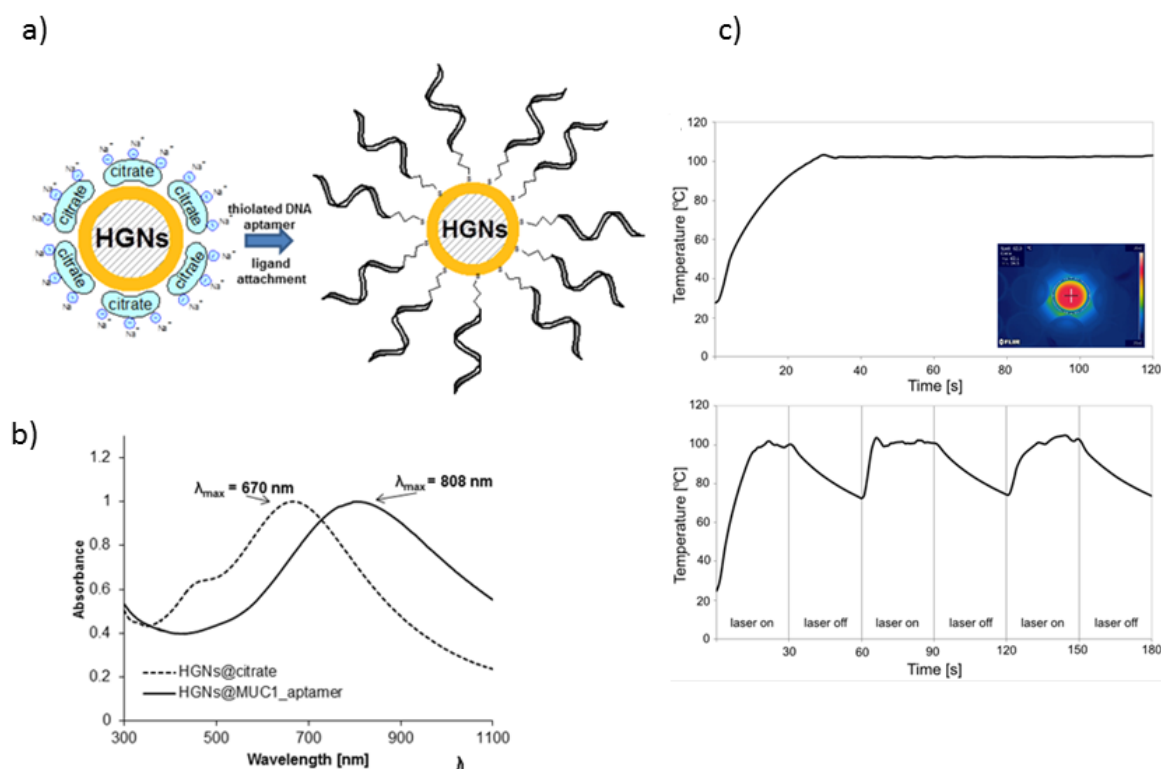
(ang. *hollow gold nanoshells*, HGN). Wybór takiego kształtu podyktowany był kilkoma powodami. Po pierwsze, synteza tego rodzaju nanocząstek nie musi być prowadzona w obecności surfaktantów, które są cytotoksyczne, a zatem stanowią czynnik ograniczający możliwość bezpiecznego ich wykorzystania w warunkach *in vivo*. Dzięki temu, że nanopowłoki są puste w środku, do ich syntezy wykorzystuje się mniejsze ilości złota, co w konsekwencji ogranicza ilość metalu wprowadzanego do organizmu podczas stosowanej terapii. Kolejną zaletą nanopowłok jest wysoka wydajność konwersji fototermicznej, a także możliwość dostosowania długości fali A_{max} nie tylko poprzez zmianę wielkości nanocząstek, ale również na skutek zmiany stosunku średnicy rdzenia do średnicy zewnętrznej powłoki (zwiększenie grubości powłoki przy stałej średnicy zewnętrznej nanocząstki powoduje przesunięcie pików LSPR w kierunku krótszych długości fal). Dąży się do tego aby A_{max} występowało w obszarze bliskiej podczerwieni, gdyż promieniowanie o tej długości fali może penetrować tkankę nawet na głębokość kilku cm. Wynika to z faktu, że przy tej długości fali występuje tzw. okno optyczne tkanek (700 - 1100 nm). Tak więc, w przypadku nanopowłok złota możemy modyfikować ich właściwości fototermiczne kontrolując grubość powłoki, bez wpływania na rozmiar uzyskiwanych nanocząstek (wielkość nanocząstek jest istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność ich wnikania). Mniejsze nanocząstki złota są w stanie lepiej penetrować i zatrzymywać się przez dłuższy czas w tkankach nowotworu niż cząstki o większych rozmiarach. Ten efekt nazywa się zwiększoną przepuszczalnością i efektem retencji (EPR). EPR jest bezpośrednim wynikiem rozmiaru cząstek, który jest również związany ze specyficznymi cechami układu dostarczania krwi w tkance nowotworowej. Ze względu na to, że uzyskanie specyficznej biodystrybucji nanocząstek w tkance, może być osiągnięte poprzez odpowiednią modyfikację ich powierzchni, postanowiłam wykorzystać **aptamery, jako ligandy do modyfikacji powierzchni nanopowłok złota**. Ich obecność miała wpłynąć na selektywne oddziaływanie modyfikowanych nanopowłok z komórkami nowotworowymi. Wybrane zostały dwa aptamery RNA: MUC1 – skierowany przeciwko mucynie i AS1411 skierowany przeciwko nukleolinie. Należą one do grupy aptamerów, które są wykorzystywane w różnych aplikacjach medycznych. Ich wspólną cechą jest ukierunkowanie na białka, których nadekspresja obserwowana jest w komórkach nowotworowych i są zlokalizowane na błonie cytoplazmatycznej tych komórek. Nukleolina jest to wielofunkcyjna fosfoproteina występująca w jąderkach, cytoplazmie i błonie komórkowej, która posiada zdolność przemieszczania się pomiędzy tymi przedziałami komórkowymi. Nukleolinie przypisuje się udział w wielu procesach fizjologicznych, a także patologicznych. Wykazano, że

nadekspresja tego białka obserwowana jest w komórkach nowotworowych (np. rak sutka). W związku z tym, postanowiłam wykorzystać wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania aptamerów do nukleoliny, w celu ukierunkowania oddziaływania nanocząstek z komórkami nowotworowymi. Na podstawie danych literaturowych wybrana została odpowiednia sekwencja aptameru, która wykazuje specyficzność wiązania z nukleoliną. W celu umożliwienia dowiązania aptameru do powierzchni złota, do końca 3' aptameru dołączona była grupa tiolowa (AS1411 (5'-TTG GTG GTG GTG GTT GTG GTG GTG GTG G-(CH₂)₆-SH-3')). Część wykonanych badań związaną z aplikacją uzyskanych nanokoniugatów w PTT, którą przeprowadzono na dwóch wybranych liniach komórkowych skóry (prawidłowej HaCaT i nowotworowej A375) opisano w publikacji **H9 (Grabowska-Jadach I. , Kalinowska D., Drozd M., Pietrzak M., *Synthesis, characterization and application of plasmonic hollow gold nanoshells in a photothermal therapy—New particles for theranostics*, Biomedicine & Pharmacotherapy 111 (2019) 1147).** W celu sprawdzenia, czy obserwowane jest ukierunkowane oddziaływanie aptameru z komórkami nowotworowymi, przeprowadzono badania z aptamerem wyznakowanym izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Niewpływająca na powinowactwo aptameru do białka koniugacja z barwnikiem fluorescencyjnym umożliwiła stwierdzenie (na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji komórek w hodowli komórkowej przed i po inkubacji), że jego **akumulacja w komórkach nowotworowych jest o ok. 2,67 razy większa w porównaniu do komórek prawidłowych**. W kolejnym etapie przeprowadzono badania, których celem było określenie właściwości fizykochemicznych nanopowłok po dowiązaniu do ich powierzchni aptameru AS1411. Charakteryzację tę oparto o pomiary widm absorpcji, obrazowanie TEM i analizę DLS. Na ich podstawie potwierdzono dowiązanie ligandu do powierzchni, określono średnicę hydrodynamiczną i potencjał zeta uzyskanych nanocząstek. Ponadto przeprowadzono doświadczenie oceniające zdolność bioreceptorów przyłączonych do powierzchni HGN do selektywnego wiązania z docelową molekułą. W tym celu wykorzystano technikę rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *surface plasmon resonance*, SPR) do zbadania oddziaływania nanokoniugatu z komplementarną sekwencją DNA unieruchomioną na przetworniku SPR. Dla tego modelowego układu potwierdzono silne plazmonowe sprzężenie pasma LSPR nanocząstek (wysoka wartość odpowiedzi SPR) zaimmobilizowanych do powierzchni przetwornika, które to zdecydowanie przewyższało wartość uzyskaną dla wolnej postaci aptameru. Natomiast, aby sprawdzić wpływ niespecyficznych interakcji w oddziaływaniu z docelowym białkiem, przeprowadzono analogiczne badania dla koniugatu nanocząstka-aptamer (o losowej sekwencji i zbliżonej

długości). **Uzyskane nanocząstki charakteryzowały się wysoką wydajnością konwersji fototermicznej (ponad 85%), co przewyższa znacznie wartości uzyskiwane dla nanocząstek złota o innych kształtach (dane literaturowe i badania własne).** W kolejnym etapie oceniono cytotoksyczność nanocząstek w wybranym zakresie stężeń i przeprowadzono PTT na wybranych liniach komórkowych. Opracowano specjalną procedurę odmywania nanocząstek, tak aby obserwować jedynie efekt termiczny pochodzący od nanopowłok złota, które oddziałują z komórkami (wniknęły do ich wnętrza lub dowiązały się do ich powierzchni). Warto podkreślić, że **w większości opublikowanych badań *in vitro* nie jest to uwzględniane.** W związku z tym, dokonywana w nich ocena efektywności przeprowadzonej procedury terapeutycznej nie jest wiarygodna. Poza tym wówczas nie jest możliwe sprawdzenie, w jakim stopniu ligandy znajdujące się na powierzchni nanocząstek, wpływają na selektywność ich oddziaływania z komórkami nowotworowymi. Największą różnicę w żywotności komórek prawidłowych i nowotworowych po przeprowadzonej procedurze terapeutycznej uzyskano dla stężeń z zakresu 50-75 μM , co pozwoliło ustalić, że takie stężenia nanokoniugatów mogłyby potencjalnie być stosowane w warunkach *in vivo*.

W moich badaniach związanych z aplikacją nanopowłok złota w terapii fototermicznej, w celu uzyskania efektywniejszego oddziaływania nanocząstek z komórkami nowotworowymi stosowałam również modyfikację powierzchni złota aptamerem DNA (5-GCA GTT GAT CCT TTG GAT ACC CTG G-(CH₂)₆-SH-3') skierowanym przeciwko mucynie 1 (publikacja **H10** - Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.** ✉, Liwińska M., Drozd M., Pietrzak M., Dybko A., Brzózka Z., *Studies on effectiveness of PTT on 3D tumor model under microfluidic conditions using aptamer-modified nanoshells*, Biosensors and Bioelectronics 126 (2018) 214). Mucyna 1 (MUC1) to białko, które odgrywa rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. W związku z tym, że stwierdzono jego nadmierną ekspresję, nieprawidłową lokalizację wewnątrzkomórkową i zmianę w glikozylacji w wielu typach komórek nowotworowych (np. komórkach płuc i piersi) stała się ona celem różnych strategii leczenia przeciwnowotworowego (immunoterapia, radioterapia, terapia fotodynamiczna). Jednakże **dotychczas nie prowadzono badań nad możliwością wykorzystania nanokoniugatów GNS-MUC1 jako czynników fototermicznych w PTT.** Zależało mi na tym, aby dokonać oceny efektywności procedury terapeutycznej w warunkach, które najlepiej odzwierciedlałyby sytuację panującą *in vivo*. W związku z tym, przeprowadziłam badania na trójwymiarowym modelu hodowli komórkowej - wielokomórkowych sferoidach z wykorzystaniem systemów lab-on-a-chip. **Dotychczas nie**

były wykonywane badania, w których ten rodzaj terapii prowadzono na sferoidach z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego. Takie połączenie badań na modelu wczesnego stadium guza nowotworowego (podobna morfologia, występowanie gradientów tlenu i metabolitów, interakcje komórkowe i kinetyka wzrostu komórek w sferoidach podobne do nieunaczynionego guza) w warunkach mikroprzepływowych pozwoli w większym stopniu przewidzieć odpowiedź organizmu na zastosowaną metodę leczenia. Uzyskane na drodze galwanicznej wymiany nanopowłoki złota, po dowiązaniu do ich powierzchni aptameru swoistego wobec MUC-1, zostały scharakteryzowane pod kątem właściwości fizykochemicznych i fototermicznych (Rys. 5).



Rys. 5 a) Schemat modyfikacji powierzchni nanopowłok złota, b) krzywe absorpcji przed i po modyfikacji powierzchni nanocząstek, c) zmiany temperatury roztworu nanocząstek rejestrowane po naświetleniu promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni [na podstawie H10].

W kolejnym etapie prowadzonych prac nanopowłoki złota zastosowano w PTT i oceniono efektywność przeprowadzonej z ich udziałem procedury terapeutycznej. Badania te wykonano na 4 wybranych liniach komórkowych, sprawdzono w nich wpływ jedno- i dwukrotnego naświetlania. W efekcie przeprowadzonej procedury PTT uzyskano istotne zmniejszenie się rozmiarów sferoidów komórek nowotworowych, największe zmiany (skuteczność terapii) uzyskano dla sferoidów komórek nowotworowych piersi (MCF-7).

W dalszym etapie prowadzonych badań zależało mi na sprawdzeniu, czy inne nanomateriały mogą stanowić alternatywę dla nanocząstek złota i być wykorzystywane jako czynniki fototermiczne w PTT. W związku ze współpracą z dr hab. inż. Agnieszką Jastrzębską (Zakład Materiałów Ceramicznych i Polimerowych, PW), która to zajmuje się syntezą i modyfikacją powierzchni różnych nanomateriałów, postanowiłam sprawdzić czy nanocząstki Ti_2C (nanomateriał z grupy MXenów) będą atrakcyjnym nanomateriałem z punktu widzenia aplikacji w tej metodzie leczenia nowotworów (publikacja **H11** - Szuplewska A., Kulpińska D., Dybko A., Jastrzębska A., Wojciechowski T., Rozmysłowska A., Chudy M., **Grabowska-Jadach I.**, Ziemkowska W., Brzózka Z., Olszyna A., *2D Ti_2C (MXene) as a novel highly efficient and selective agent for photothermal therapy*, Materials Science and Engineering C 98 (2019) 874). MXeny, tak jak i grafen, należą do grupy nanomateriałów dwuwymiarowych. Warto podkreślić, że w chwili gdy planowano badania opisane w publikacji (H11) niewiele było prac, w których nanocząstki z grupy MXenów byłyby wykorzystywane w PTT (było ich zaledwie 5 i dotyczyły one nanostruktur o innym składzie). Po syntezie Ti_2C powierzchnia nanomateriału została zmodyfikowana z wykorzystaniem PEG. Pokrycie powierzchni hydrofilowym polimerem, w przypadku biomedycznych aplikacji nanomateriału, ma na celu wydłużenie czasu cyrkulacji we krwi (minimalizacja opsonizacji, zmniejszenie wychwytu przez makrofagi oraz zapobieganie degradacji w układzie siateczkowo-śródbłonkowym). Parametry fizykochemiczne nanomateriału po modyfikacji – Ti_2C_PEG zostały wyznaczone przy wykorzystaniu technik takich jak: DLS, SEM, XPS, HREM. W badaniach *in vitro* prowadzonych na czterech wybranych liniach komórkowych, były to te same linie, które wcześniej stosowałam w badaniach aktywności QDs i GNS, oceniono biokompatybilność nanomateriału. Określono jego cytotoksyczność z wykorzystaniem testu MTT po 24 i 48h inkubacji. Ponadto prowadzono obserwację mikroskopową, aby sprawdzić czy obecność nanomateriału w pożywce hodowlanej wpływa na zmianę morfologii komórek. Zauważono, że dla pewnych stężeń żywotność komórek nowotworowych jest niższa niż komórek prawidłowych (wyniki analizowano dla komórek izolowanych z tego samego organu, np. MCF-10a i MCF-7). W oparciu o zdjęcia wykonane z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, stwierdzono różne powinowactwo badanego nanomateriału do komórek (MXen zlokalizowany głównie na powierzchni komórek nowotworowych). Aby zaproponować potencjalny mechanizm działania Ti_2C_PEG określono poziom wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu w zależności od czasu inkubacji i stężenia nanomateriału w hodowli komórkowej. Stwierdzono wzrost poziomu ROS (po 24h inkubacji) dla obu linii komórek

nowotworowych, jednakże dla komórek nowotworowych skóry (A375) był on 2,5 razy większy niż dla komórek nowotworowych piersi (MCF-7). Przyczynę tej różnicy wytłumaczono innym tempem procesów wewnątrzkomórkowych (czas podwojenia - parametr określający kinetykę procesów wewnątrzkomórkowych i tempo proliferacji dla A375 wynosi około 6-12 godzin, natomiast dla MCF-7 24h). Co ciekawe, nie zaobserwowano zmian poziomu ROS w komórkach prawidłowych. W kolejnym etapie prac oceniono wydajność konwersji fototermicznej nanocząstek Ti_2C_PEG (87,1%). Wartość ta jest zbliżona do tej, którą uzyskano dla nanopowłok złota. Skuteczność procedury terapii fototermicznej przy użyciu Ti_2C_PEG , z uwzględnieniem opracowanej przeze mnie procedury odmywania nanocząstek, badano po 24h inkubacji hodowli komórkowej z różnymi stężeniami nanomateriału i przeprowadzeniu naświetlaniem laserem (808 nm). Parametry procedury terapeutycznej dobrane były w oparciu o wcześniejsze moje doświadczenia uzyskane podczas stosowania nanocząstek złota w PTT. Odnotowano znaczące zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych, które przypisano synergicznemu efektowi fotodynamicznemu (stres oksydacyjny) i fototermicznemu. Uznano, że ten rodzaj terapii może być skutecznym sposobem leczenia nowotworów skóry (wyniki uzyskane dla linii nowotworowej - A375).

Podsumowanie

Prowadzone przeze mnie prace miały na celu wykorzystanie unikalnych właściwości różnorodnych nanocząstek w połączeniu z możliwością modyfikacji ich wysoce rozwiniętej powierzchni, które umożliwiałyby wykorzystanie nanomateriału w bioobrazowaniu lub terapii nowotworów. W prowadzonych badaniach wykazałam zależności pomiędzy parametrami fizykochemicznymi nanocząstek, a ich oddziaływaniem na organizmy żywe. W ramach przeprowadzonych prac:

- **opracowano metodyki modyfikacji powierzchni kropek kwantowych typu rdzeń-powłoka** na drodze przeniesienia międzyfazowego **z wykorzystaniem szeregu nowych, hydrofilowych ligandów**. Zaproponowane związki, które **nie były dotychczas stosowane** jako stabilizatory powierzchni kropek kwantowych (m.in. pochodne hiperrozgałęzionego poliglicydolu oraz tiolowe i ditiokarbaminianowe analogi glukozy), pozwoliły na **otrzymanie stabilnych koloidalnie nanostruktur** o właściwościach biomimetycznych. Uzyskanie wodnych roztworów fluorescencyjnych QDs umożliwia ich zastosowanie w obrazowaniu

komórkowym (w badaniach potwierdzono stabilność otrzymanych nanocząstek w roztworach pożywek hodowlanych);

- zbadano wpływ wybranych parametrów fizykochemicznych kropek kwantowych (skład rdzenia i jego rozmiar, obecność otoczki lub jej brak, wielkość ligandu) na cytotoksyczność nanocząstek, a także wyznaczono parametr IC_{50} . **Uzyskano w rezultacie zależności, które umożliwiają zaprojektowanie i otrzymanie nietoksycznych nanocząstek przeznaczonych do obrazowania biologicznego;**

- **określono aktywność biologiczną nanocząstek i porównano ją w badaniach przeprowadzonych na dwóch modelach komórkowych** (monowarstwa komórek - 2D i wielokomórkowe sferoidy - 3D). Do tej pory niewiele jest doniesień literaturowych na temat badań, w których cytotoksyczność kropek kwantowych określano z wykorzystaniem trójwymiarowych hodowli komórkowych (te które są, dotyczą jedynie badań w makroskali). Badania przeprowadzone przeze mnie na wielokomórkowych sferoidach (jest to jedyna publikacja, w której oceniono cytotoksyczność QDs na sferoidach z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego) **umożliwiły stwierdzenie, że wyniki uzyskiwane na modelach 2D są przeszacowane** (wyznaczana cytotoksyczność jest większa niż ta, którą otrzymuje się w doświadczeniach prowadzonych na hodowlach komórkowych 3D);

- zmodyfikowano konstrukcję mikrosystemu lab-on-a-chip dzięki czemu **opracowano narzędzie, które umożliwia prowadzenie obserwacji mikroskopowej charakteryzującej się wysokim kontrastem i rozdzielczością** (mikrosystem kompatybilny z mikroskopem konfokalnym). Wykorzystanie mikrosystemu umożliwiło dokonanie oceny **morfologii komórek i akumulacji w nich kropek kwantowych oraz równoczesne zbadanie cytotoksyczności nanomateriału**. W literaturze naukowej brak jest informacji na temat tego typu urządzenia stosowanego w badaniach właściwości nanomateriałów;

- wykorzystano metodę elektroporacji, w celu wspomaganego dostarczania nanomateriału do komórek, dzięki czemu **zbadano wpływ środowiska wewnątrzkomórkowego na cytotoksyczność kropek kwantowych** (stabilność nanomateriału). Jest to jedyna praca, w której zbadano i porównano wpływ środowiska wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego na aktywność biologiczną wybranych nanocząstek;

- przeprowadzono badania, w których **wykorzystano nanomateriał w roli nośnika leku**, dzięki czemu **uzyskano wzrost wydajności jego transportu i dodatkowo zabezpieczono**

lek przed degradacją, a wykorzystanie fluorescencyjnych właściwości nośnika (kropek kwantowych) umożliwiło **śledzenie wnikania otrzymanych nanokoniugatów do komórek**;

- opracowano **nowe czynniki fototermiczne** – nanopowłoki złota o powierzchni modyfikowanej aptamerami (swoistymi wobec MUC-1 i nukleoliny) **charakteryzującymi się wysokim stopniem konwersji energii termicznej (powyżej 85%) i zwiększonym stopniem akumulacji w komórkach nowotworowych (jest to jedyne doniesienie literaturowe na temat zastosowania nanopowłok złota modyfikowanych wybranymi aptamerami w terapii fototermicznej)**;

- **przeprowadzono i określono skuteczność procedury terapeutycznej (terapia fototermiczna) z wykorzystaniem różnych nanomateriałów (GNS-MUC1, GNS-AS1411, Ti₂C-PEG)**. W badaniach tych **opracowano i stosowano procedurę odmywania nanocząstek**, co umożliwiło obserwowanie rzeczywistego efektu termicznego, który pochodzi od nanocząstek oddziałujących z komórkami. Warto podkreślić, że **w większości opublikowanych badań *in vitro* nie jest to uwzględniane**. Badania zostały również przeprowadzone na wielkomórkowych sferoidach (model wczesnego stadium nieunaczynionego guza nowotworowego) z wykorzystaniem mikrosystemu. **W literaturze naukowej nie ma informacji na temat prac, w których ten rodzaj terapii badano na sferoidach z wykorzystaniem mikrosystemu przepływowego (jest to jedyna taka praca, poświęcona ocenie skuteczności procedury PTT, którą prowadzono w mikrosystemie przepływowym)**.

Obecne i przyszłe prace badawcze

Obecnie, swoją uwagę koncentruję przede wszystkim na badaniu i zastosowaniu wspomaganego transportu substancji aktywnych farmakologicznie do komórek. W ramach tych prac opracowywany jest mikrosystem do prowadzenia elektroporacji sferoidów (brak doniesień literaturowych na temat takiego urządzenia). Będzie on wykorzystywany przy poszukiwaniu nowych substancji o aktywności przeciwnowotworowej, które mogłyby być wykorzystywane w elektrochemioterapii. W oparciu o wyniki badań przeprowadzonych na trójwymiarowym modelu możliwe będzie nie tylko wyselekcjonowanie związków, które wykazują aktywność cytostatyczną (potencjalne leki), ale również opracowanie procedur terapeutycznych prowadzonych przy ich użyciu. Prowadzę również badania mające na celu opracowanie wielofunkcyjnych koniugatów nanocząstek tlenku żelaza powlekanych warstwą

złota z modyfikowaną powierzchnią. Takie nanocząstki pełniłyby zarówno funkcję diagnostyczną, jak i terapeutyczną ze względu na posiadane właściwości magnetyczne i zdolność konwersji fototermicznej. Nanokoniugaty zbudowane z tlenku żelaza i złota umożliwiłyby lokalizację w ciele pacjenta obszaru objętego procesem chorobowym oraz podjęcie leczenia dzięki równoczesnemu dostarczeniu w to miejsce czynnika fototermicznego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza badaniami przedstawionymi w jednotematycznym cyklu publikacji, moje zainteresowania naukowe dotyczyły między innymi opracowywania i wykorzystywania mikrosystemów, jako narzędzi do prowadzenia analizy chemicznej i biochemicznej. Była to naturalna kontynuacja badań, które stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej. W pracach tych wykorzystywałam swoje doświadczenie i wiedzę zdobytą **w zakresie projektowania systemów lab-on-a-chip, wytwarzania mikrostruktur w różnych materiałach oraz stosowania optycznych i elektrochemicznych metod detekcji**. W tym okresie brałam również udział w przygotowywaniu dwóch artykułów przeglądowych (*"Potentiometric studies and various applications of solid state electrodes based on silicon and epoxy glass structures – an overview"*, *"Miniaturized tools and devices for bioanalytical applications: an overview"*) oraz byłam współautorką 5 rozdziałów w monografiach i skryptach. W związku z korzyściami płynącymi z **zastosowania mikrosystemów w badaniach *in vitro***, moja uwaga skupiła się również na możliwości ich wykorzystania, w celu uzyskiwania różnych modeli hodowli komórkowej oraz w badaniu wpływu wzajemnych interakcji komórkowych na proliferację komórek i efektywność terapii przeciwnowotworowej. W tym czasie brałam udział w kilku szkoleniach, m. in. z zakresu hodowli komórkowej, wykorzystania techniki cytometrii przepływowej w analizie parametrów pojedynczych komórek oraz stosowania obrazowania mikroskopowego w badaniach *in vitro*.

W obszarze moich naukowych zainteresowań znajdowały się także nanomateriały. Mając świadomość tego, że ich zastosowanie w bioanalizie wymaga poznania ich właściwości i określenia, w jakim stopniu są one skorelowane z oddziaływaniem na organizmy żywe, zaplanowałam badania, które miały umożliwić zdobycie tej wiedzy. Przygotowany przeze mnie projekt uzyskał finansowanie NCN a część prac, które były prowadzone podczas jego realizacji opisałam w punkcie 4 autoreferatu.

Jako współwykonawca, biorę również udział w badaniach, w których do charakteryzacji nanomateriałów wykorzystywane są sprzężone techniki analityczne. Te prace realizowane są w Katedrze Chemii Analitycznej PW ramach projektu OPUS: *"Metodyki analityczne do badania specjacji wewnątrzkomórkowej metalonanomateriałów terapeutyczno-diagnostycznych: opracowanie, optymalizacja i zastosowanie in-vitro"* we współpracy z grupą profesora Andrei Timerbaeva z Moskwy (Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry). Dotychczasowe wyniki przeprowadzonych badań opisane zostały w dwóch manuskryptach (Kruszewska J., Kur A., Kalinowska D., **Grabowska-Jadach I.**, Matczuk M., Keppler B.K., Timerbaev A., Jarosz M., *"An improved protocol for in-vitro assessment of the cellular uptake of metal-based nanoparticles"*, Kruszewska J., Matczuk M., Skorupska S., **Grabowska-Jadach I.**, Pérez Hernández E., Timerbaev A., Jarosz M., *"Characterization of quantum dots in cancer cytosol using ICP-MS-based combined techniques"*) obecnie znajdujących się w recenzji.

W ostatnim czasie, swoje zainteresowania badawcze skupiam także na możliwości **wykorzystania wspomaganego transportu leków, w celu poprawy efektywności chemioterapii**. Taką formę terapii nazywa się elektrochemioterapią a dzięki wykorzystaniu w niej metody elektroporacji uzyskuje się zwiększenie efektywności dostarczania cytostatyków do komórek nowotworowych. Taka terapia pozwoliłaby ograniczyć efekty uboczne działania cytostatyków i mogłaby być stosowana wówczas, gdy stanowią one wyraźne przeciwwskazanie do podjęcia konwencjonalnego leczenia chorego. Wstępne prace dotyczące tej tematyki zawarłam w dwóch artykułach, które są obecnie w recenzji (Skorupska S., **Grabowska-Jadach I.** ✉, *"Studies on effectiveness of chemotherapy supported by calcium ions and electroporation"*, Skorupska S., **Grabowska-Jadach I.** ✉, *"Enhanced drug delivery with application of electroporation method – studies on 3D tumor model"*).

Ilona Grabowska-Jadach