

**Uniwersytet Łódzki**  
**Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**  
**Katedra Biofizyki Medycznej, Instytut Biofizyki**  
**ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź**

---

**dr Marzena Szwed**

Autoreferat

*Załącznik 3a*

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Nanoterapeutyki w leczeniu raka piersi człowieka**  
**- mechanizmy toksyczności nanomateriałów oraz**  
**ocena aktywności enkapsulowanych leków**

Łódź, wrzesień 2023

---

<b>Spis treści</b>		<b>Str.</b>
1.	Imię i Nazwisko	2
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	2
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.	2
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.).	2
5.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	40
5. 1.	Opis działań prowadzonych w ramach stażu po-doktorskiego odbytego w Oslo Radium Hospital	40
5. 2.	Współpraca naukowa z innymi jednostkami badawczymi	41
5. 3.	Omówienie działań naukowych prowadzonych w jednostce macierzystej, poza badaniami, których tematyka została włączona w osiągnięcie naukowe	42
6.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	55
7.	Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia wnioskodawcy, dotyczące jego kariery zawodowej	61

**1. Imię i Nazwisko**

Marzena Szwed

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- 2007 – magister biologii w dyscyplinie biofizyka

Praca wykonana w Katedrze Termobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego na temat: „Oddziaływanie akklarubicyny z komórkami nowotworowymi linii A549” pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Józwiak

- 2012 – doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka

Praca wykonana w Katedrze Termobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego na temat: „Oddziaływanie koniugatu doksorubicyny z transferyną na wybrane linie komórkowe białaczki człowieka” pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Józwiak

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych**

- **2007 - 2012** doktorantka, Stacjonarne Studium Doktoranckie Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
- **2008 - 2012** asystent w Katedrze Termobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
- **2012 - 2015** adiunkt w Katedrze Termobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
- **2015 - 2016** adiunkt w Katedrze Biofizyki Medycznej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (zmiana nazwy jednostki)
- **2016 – 2019** pracownik naukowy/stypendysta w Instytucie Badań nad rakiem przy uniwersyteckim szpitalu w Oslo, Norwegia
- **Od 2019** adiunkt w Katedrze Biofizyki Medycznej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

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

**IA. tytuł osiągnięcia naukowego:****Nanoterapeutyki w leczeniu raka piersi człowieka - mechanizmy toksyczności nanomateriałów oraz ocena aktywności enkapsulowanych leków**

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji wnioskodawcy zawarte są w Załączniku 5 (oświadczenia współautorów) i 6 (Szwed - Załącznik 6 - Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe).

**IB. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

- IB-1** Szwed M, Sønstevold T, Øverbye A, Engedal N, Grallert B, Mørch Ý, Sulheim E, Iversen TG, Skotland T, Sandvig, Torgersen ML. **Small variations in nanoparticle structure dictate differential cellular stress responses and mode of cell death.** *Nanotoxicology*, 2019, 13(6):761-782, doi: 10.1080/17435390.2019.1576238. \*IF<sub>2019</sub> =4.925, #MNiSW<sub>2019</sub>= 140 pkt, \*IF<sub>2020</sub> = 5.913, ##MEiN<sub>2021</sub>= 140 pkt, cyt. = 20

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: I. współudziale w doświadczeniach dotyczących: 1) oznaczenia przeżywalności komórek nowotworowych po działaniu badanych nanocząstek z grupy PACA na podstawie pomiarów wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, 2) oceny tempa całkowitej syntezy białka w komórkach, 3) pomiaru markerów stresu oksydacyjnego (indukcja ROS, spadek wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, peroksydacja lipidów błonowych), 4) immunoblottingu, 5) transfekcji i wyciszania genów z zastosowaniem antysensownego siRNA, 6) wizualizacji zmian morfologii komórek za pomocą mikroskopu świetlnego, 7) analizy procesu ferroptozy indukowanej przez nanocząstki POCA 8) oceny akumulacji nanocząstek POCA w komórkach; II. współtworzeniu koncepcji pracy, III opracowaniu, interpretacji i dyskusji wyników, wykonaniu analizy statystycznej, IV. współprzygotowaniu rycin zamieszczonych w pracy V. uczestniczeniu w pisaniu artykułu.*

- IB-2** Szwed M, Torgersen ML, Kumari RV, Yadava SK, Pust S, Iversen TG, Skotland T, Giri J, Sandvig K. **Biological response, and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules.** *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1):5. doi: 10.1186/s12951-019-0567-y.

\*IF<sub>2020</sub> =10.43, #MNiSW<sub>2019</sub>= 140 pkt, \*IF<sub>2021</sub> = 9.429, ##MEiN<sub>2021</sub>= 140 pkt, cyt. =16

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: I. udziale w doświadczeniach dotyczących: 1) oznaczenia przeżywalności komórek traktowanych lipidowymi nanokapsułami metodą MTT, 2) oceny tempa całkowitej syntezy DNA w komórkach, 3) transfekcja i wyciszania ekspresji*

genów antysensownym siRNA, 4) pomiaru wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, 5) oceny tempa całkowitej syntezy białka w komórkach, 6) pomiaru indukcji ROS i peroksydacji lipidów, 7) oceny akumulacji lipidowych nanokapsuł w komórkach, 8) pomiarów internalizacji oraz endocytozy <sup>125</sup>I-Tf do komórki, 9) mikroskopowego i cytometrycznego oszacowania indukcji stresu lizosomalnego, 10) analizy zmian wewnątrzkomórkowego pH, 11) wizualizacji zmian morfologii komórek za pomocą mikroskopu świetlnego; II. współtworzeniu koncepcji pracy, III. opracowaniu, interpretacji i dyskusji wyników, wykonaniu analizy statystycznej, IV. przygotowaniu wszystkich rycin zamieszczonych w pracy V. uczestniczeniu w pisaniu artykułu i odpowiedziach na recenzje, współtworzeniu końcowej wersji pracy.

- IB-3** Valsalakumari R, Yadava SK, Szwed M, Pandaya AD, Mælandsmo G M, Torgersen ML, Iversen TG, Skotland T, Sandvig K, Giri J. **Mechanism of cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel loaded lipid nanocapsules in breast cancer cells.** International Journal of Pharmaceutics, 2021,15: 597, 120217, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120217.

**\*IF<sub>2020</sub> =6.510, #MEiN<sub>2021</sub>= 100 pkt, \*IF<sub>2023</sub> = 6.510, ##MEiN<sub>2021</sub>= 100 pkt, cyt. =13**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: I. udziale w doświadczeniach dotyczących: 1) oznaczenia parametrów fizykochemicznych charakteryzujących lipidowe nanokapsuły (średnica hydrodynamiczna, indeks polidispersyjności, potencjał zeta), 2) oceny przeżywalności komórek traktowanych lipidowymi nanocząstkami metodą MTT i tempa całkowitej syntezy DNA w komórkach, 3) analizy mechanizmów endocytozy zaangażowanych w transport lipidowych nanokapsuł do komórek, 4) oceny procesu apoptozy indukowanej przez lipidowe nanokapsuły z enkapsulowanym PTX; II. współtworzeniu koncepcji pracy III. opracowaniu, interpretacji i dyskusji wyników, wykonaniu analizy statystycznej, IV. współprzygotowaniu rycin zamieszczonych w pracy, V. uczestniczeniu w pisaniu artykułu i odpowiedziach na recenzje.

- IB-4** Wigner P, Zielinski K, Michlewska S, Danielska P, Marczak A, Ricci Jr E, Santos-Oliveira R, Szwed M. **Disturbance of cellular homeostasis as a molecular risk evaluation of human endothelial cells exposed to nanoparticles.** Scientific Reports, 2021, 11(1), 3849, doi: 10.1038/s41598-021-83291-0.

**\*IF<sub>2020</sub> =4.99, ##MEiN<sub>2021</sub>= 140 pkt, \*IF<sub>2023</sub> = 4.997, cyt. = 9**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: I: koordynowaniu prac badawczych części biologicznej pracy, II udziale w realizacji części eksperymentów: 1) oszacowanie odsetka komórek, które uległy apoptozie lub nekrozie po działaniu badanych nanocząstek za pomocą podwójnego barwienia mieszaniną fluorochromów Hoechst 33258/jodek propidyny, 2) analiza proapoptotycznej fragmentacji DNA metodami TUNEL i drabinki DNA, 3) obserwacje mikroskopowe zmian morfologii komórek, 4) pomiar poziomu ROS, 5) oznaczenie fosforylacji histonu H2AX, 6) oznaczenie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w apoptozę; III zaplanowaniu koncepcji pracy, IV. opracowaniu i interpretacji wyników oraz ich dyskusji, analizie statystycznej, V. głównym udziale w napisaniu i zredagowaniu pracy, odpowiedzi na recenzje. Autor korespondencyjny.

**IB-5** Szwed M, Michlewska S, Kania K, Szczęch M, Marczak A, Szczepanowicz K, **New SDS- based polyelectrolyte multicore nanocarriers for paclitaxel delivery – synthesis, characterization, and activity against breast cancer cells**. Cells, 2023, (12, 2052 doi: doi.org/10.3390/cells12162052).

**\*IF<sub>2022</sub> = 6.000, ##MEiN<sub>2021</sub> = 140 pkt, cyt . = 0**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: I. koordynowaniu prac badawczych, II udziale w realizacji części eksperymentów: 1) pomiar cytotoxyczności badanych nanokapsuł SDS/PLL i SDS/PLL/PGA (pustych lub wypełnionych PTX) metodami MTT i CellTiter-Glo, 2) oszacowanie odsetka komórek, które uległy apoptozie za pomocą podwójnego barwienia mieszaniną fluorochromów Aneksyna V- FITC/jodek propidyny, 3) obserwacje mikroskopowe zmian morfologii komórek, 4) oznaczenie zmian potencjału błonowego mitochondriów, 5) ocena stopnia proliferacji komórek wybarwionych sondą CyQuant, 6) pomiar aktywności kaspazy 3/7. III. zaplanowaniu koncepcji pracy; IV. opracowaniu, dyskusji i interpretacji wyników wraz z ich analizą statystyczną, V. głównym udziale w napisaniu i zredagowaniu pracy, odpowiedzi na recenzje. Autor korespondencyjny.*

*\*Dane dotyczące wskaźników IF pochodzą z Journal Citation Reports z bazy Clarivate (<https://jcr.clarivate.com/>) zgodnie z rokiem opublikowania pracy oraz z rokiem ostatniej oceny bazy Clarivate.*

*#Dane dotyczące wskaźników MNiSW pochodzą z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów stanowiący załącznik do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania danej pracy.*

*##Dane dotyczące wskaźników MEiN pochodzą z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów z dnia 9 lutego 2021 r. ogłoszonego na podstawie art. 267 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85, 374, 695, 875 i 1086 oraz z 2021 r. poz. 159) stanowiący załącznik do Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki.*

Sumaryczny Impact Factor publikacji\* wynosi **IF= 32,861 (5 prac)**. Sumaryczna liczba punktów MEiN dla wszystkich publikacji (zgodnie z rokiem opublikowania) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **660**.

## **IC. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

### **IC-1. Wprowadzenie**

Jednym z poważnych wyzwań jakie stawia sobie za priorytet medycyna XXI wieku jest skuteczna walka z nowotworami. Spośród codziennie diagnozowanych, nowych przypadków chorób rozrostowych, najczęściej występującymi, zarówno w Polsce, jak i na całym świecie są nowotwory sutka. Zgodnie z danymi statystycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) w 2020 roku choroba ta dotknęła 2.2 miliona kobiet na świecie [1]. W Polsce, informacje dostarczone przez Krajowy Rejestr Nowotworowy (KRN) dowodzą,

że w latach 2017-2018 liczba zachorowań na nowotwory złośliwe wzrosła o 1451 przypadków wśród kobiet, a tym samym zwiększyła się również liczba zgonów towarzysząca tym chorobom. Przenosząc wartości liczbowe na obszar bardziej lokalny wiemy, że w 2018 województwo łódzkie zajęło 4 pozycję w zestawieniach dla populacji chorych z nowo zdiagnozowanym rakiem piersi i stosunkowo wysokim odsetkiem zgonów, gdyż zmarło wtedy 476 kobiet.

Podłoże molekularne rozwoju raka piersi jest złożone i obejmuje mechanizmy kontrolujące ekspresję wielu genów, podziały komórki oraz bodźce środowiskowe i hormonalne. Warto podkreślić, że patogeneza nowotworów sutka pozytywnie koreluje z uwarunkowaniami dotyczącymi funkcjonowania całego organizmu kobiety takimi jak: wczesne miesiączkowanie, pierwsza ciąża po 30 roku życia, bezdzietność i wydłużenie okresu prokreacyjnego [2]. Nie bez znaczenie pozostają również: dieta, aktywność fizyczna, stosowanie używek, występowanie nadwagi lub otyłości [3]. Wszystkie te czynniki stymulują nagromadzenie się w materiale genetycznym wielu nieletalnych mutacji, które na trwale wprowadzone do genomu komórki, mogą prowadzić do błędnej ekspresji informacji genetycznej, a tym samym inicjować transformację nowotworową [4].

Proces kancerogenezy rozpoczyna się wraz z mutacją pojedynczego allele protoonkogenu, czyli takiego genu, który w prawidłowych komórkach bierze udział w regulacji procesów ich proliferacji i różnicowania. Literatura naukowa, opisująca podłoże molekularne raka piersi najczęściej odnosi się do onkogenów *cerb2/Her-2/neu*, *c-myc* i *N-myc* oraz *int2* [3]. W „molekularnej opozycji” do aktywacji onkogenów, stoją geny supresorowe, których białkowe produkty w warunkach prawidłowych rozpoznają uszkodzenia DNA i pośredniczą w negatywnej kontroli cyklu komórkowego, kierując komórkę na drogę programowanej śmierci – apoptozy. Dobrze opisanymi w literaturze są typowe dla nowotworów piersi mutacje np. genów supresorowych *BRCA1* (ang. *BReast CAncer gene 1*) i *BRCA2* (ang. *BReast CAncer gene 2*) oraz genu kodującego białko p53 [2]. Podczas trwającego procesu transformacji nowotworowej, specyficzną funkcję regulowania ekspresji onkogenów i genów supresorowych pełni niekodujące mikroRNA. Liczne badania wskazują na udział krótkich, około 20-nukleotydowych, niekodujących, jednoniciowych cząsteczek RNA w procesie nowotworzenia, przy czym sam mikroRNA może też funkcjonować jako niezależny supresor lub onkogen [5].

Powyżej opisane czynniki uczestniczą w wieloetapowym procesie transformacji nowotworowej, który dotyczy wszystkich jednostek chorobowych opisanych w literaturze naukowej jako rak piersi. Zgodnie z kryteriami WHO, opartymi głównie na badaniach histopatologicznych, wyodrębniono dwadzieścia trzy typy raka piersi, wśród których dwa główne typy to raki przedinwazyjne (nienaciekające) oraz raki inwazyjne (naciekające) [6]. Mając jednak na względzie dodatkowe parametry, takie jak lokalizację ognisk choroby w węzłach chłonnych oraz występowanie przerzutów, można wywnioskować, że podobne strukturalnie guzy charakteryzują się różnym rokowaniem i zmienną wrażliwością na leczenie. Dlatego też lepszą klasyfikację raka piersi, przedstawia ta, która opiera się na różnicach w profilach molekularnych komórek nowotworowych.

Spośród typów raków piersi, których podział przedstawiony jest w tabeli nr 1, jedne z najgorszych rokowań ma rak potrójnie negatywny (TNBC, ang. triple negative breast cancer), który cechuje się wysokim stopniem złośliwości histopatologicznej i dużym ryzykiem wystąpienia zgonu pacjentki w pierwszych pięciu latach choroby [7]. Dlatego też wysiłki lekarzy i naukowców nakierowane są na odpowiedni dobór takiego postępowania terapeutycznego, które pozwoli na skuteczną walkę z chorobą, przy jednoczesnym zniwelowaniu ryzyka wystąpienia skutków ubocznych.

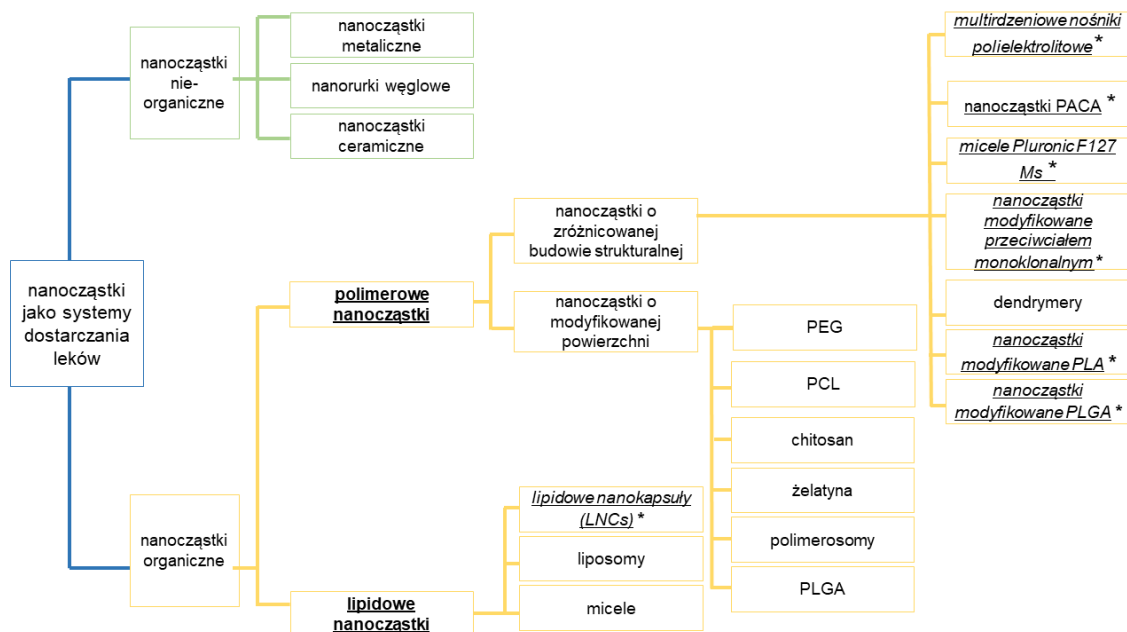
*Tabela 1 Klasyfikacja molekularnych podtypów raka piersi; na podstawie [8].*

<b>Podtyp molekularny</b>	<b>Receptor dla estrogeny</b>	<b>Ludzki receptor EGFR2</b>	<b>Receptor dla progesteronu</b>
Luminalny A	pozytywny	negatywny	pozytywny
Luminalny B	minimalny	pozytywny/ negatywny	minimalny
HER2	negatywny	pozytywny	negatywny
Potrójnie negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Zgodnie z wytycznymi Polskiej Unii Onkologii, wykonanie zabiegu chirurgicznego w skojarzeniu z radioterapią i leczeniem systemowym, tj. hormonoterapią lub chemioterapią, jest głównym sposobem działania dla przedinwazyjnego i inwazyjnego raka piersi. Warto jednak zaznaczyć, że samo leczenie systemowe (prowadzone głównie w celu zmniejszenia rozmiarów guza) może poprzedzać zabieg chirurgiczny, albo może być zastosowane jako terapia uzupełniająca po operacji. Do podstawowych chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu raka piersi zalicza się doksorubicynę (DOX, ang. doxorubicin), cyklofosamid i taksany (w tym paklitaksel (PTX, ang. paclitaxel lub docetaksel, DTX ang. docetaxel). Leki te są składowymi skutecznymi schematów leczenia wykorzystywanych w terapii neoadjuwantowej (przygotowującej pacjenta do resekcji guza), jak i uzupełniającej terapii adjuwantowej. Wśród 429 kobiet, u których zastosowano schemat leczenia **TAC**, tj., **(T)** taksan, tutaj DTX 75 mg/m<sup>2</sup>, **(A)** DOX 50 mg/m<sup>2</sup>, **(C)** cyklofosamid 500 mg/m<sup>2</sup>, u 60% pacjentek zanotowano całkowitą remisję choroby [9]. Terapia ta ma jednak jedno poważne ograniczenie, którym jest wysokie prawdopodobieństwo pojawienia się niepożądanych skutków ubocznych, wynikające m.in. z wysokiej toksyczności ogólnoustrojowej i niskiej selektywności stosowanych chemioterapeutyków. Szczególnie narażone na negatywne skutki chemioterapii są szybko proliferujące komórki szpiku kostnego, nabłonka przewodu pokarmowego i gonad [10]. Innym czynnikiem ograniczającym efektywność chemioterapii jest oporność komórek nowotworowych na leki. Przyczyną tego zjawiska jest obniżona wewnątrzkomórkowa akumulacja leku i w konsekwencji jego zmniejszona cytotoksyczność [11]. Oporność na chemioterapię jest bardzo często skorelowana z obecnością w błonach komórek nowotworowych specyficznych białek, które na drodze aktywnego transportu usuwają ksenobiotyki z komórki [12]. Dlatego w chemioterapii coraz częściej stosuje się przenośniki leków, głównie po to, aby lek w większej



ilości docierał do komórek nowotworowych, pozostawiając nienaruszone komórki prawidłowe. Idea zastosowania systemów dostarczania leków (DDS ang. drug delivery system) do obszaru niszy nowotworu opiera się na koncepcji magicznej kuli (ang. magic ball) stworzonej na początku XX wieku przez Paula Ehrlicha. Zgodnie z jej założeniem idealny nośnik powinien charakteryzować się optymalnymi parametrami akumulacji i uwalniania leku, możliwie długim czasem połowicznego rozpadu i niską toksycznością ogólnoustrojową. Oznacza to, że tylko komórki nowotworowe powinny być miejscem docelowym działania leku uwalnianego z nośnika, podczas gdy tkanki zdrowe pozostawałyby nienaruszone.



Rys. 1 Nanosystemy zaprojektowane dla dostarczenia substancji terapeutycznych do komórek nowotworowych raka piersi (\*również te, które badałam w osiągnięciu naukowym); na podstawie [8], zmodyfikowany. W przedstawionym osiągnięciu naukowym skupiono uwagę na lipidowych i polimerowych nanocząstkach, których powierzchnie mogą być modyfikowane: glikolem polietylenowym (PEG, ang. polyethylene glycol), kwasem poli-L-mlekowo-ko-glikolowym (PLGA, ang. poly(lactic-co-glycolic acid), polikaprolaktonem (PCL, ang. polycaprolactone), octanem kwasu polimlekowego (PLA, ang. polylactic acetate). Bezpośrednim przedmiotem badań opisywanych osiągnięciu były: lipidowe nanokapsuły, nanocząstki PACA, multirdzeniowe nośniki polielektrolitowe, micele Pluronic F127 Ms, nanocząstki modyfikowane przeciwciałem monoklonalnym TRASTUZUMAB (PLA/MMT/TRA), nanocząstki kwasu etylenodiamino-N,N,N',N' tetrametylenofosfonowego powlekane PLA (PLA/EDTMP), nanocząstki krzemionkowe (PLGA/MDP) modyfikowane difosforanem metylenu (MDP) sprzężone z kwasem PLGA.

Narzędzi molekularnych, które pozwalają na stworzenie niespotykanych dotąd cząstek, o submikronowych rozmiarach (od 1 do 500 nm) dostarcza nanotechnologia. Nanocząstki (NPs, ang. nanoparticles), będące wytworem technologii w skali nano, dzięki swoim unikalnym właściwościom (duża powierzchnia właściwa w stosunku do masy oraz wysoka reaktywność), dość szybko zyskały status kandydatów na przenośniki leków, które w przyszłości mogą być stosowane w chemioterapii różnego typu nowotworów. Za zastosowaniem nanoukładów jako składowych chemioterapii przemawia również specyficzna budowa niszy nowotworu, w której

średnicę szczelin międzykomórkowych szacuje się na około 100-800 nm. W zdrowych tkankach (w tym w prawidłowym śródbłonku), średnica przestrzeni międzykomórkowych wynosi jedynie 2 nm [13]. Wykorzystując tę dysproporcję, stwierdzono, że przenośniki leków łatwo przedostaną się do niszy guza, co będzie sprzyjało ich gromadzeniu się w środowisku nowotworu [14]. Zjawisko selektywnego gromadzenia się nanośników w obszarze, który uległ transformacji nowotworowej określane jest jako efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR, ang. enhanced permeability and retention). Dysproporcje w budowie nowotworu i tkanki prawidłowej zostały także wykorzystane w projektowaniu takich nanocząstek, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii raka piersi.

Obecnie literatura naukowa opisuje różne, bardziej lub mniej skomplikowane nanoukłady, których główną funkcją jest dostarczanie substancji terapeutycznych do komórek nowotworowych. Spośród zaprezentowanych na Rys. 1 nanosystemów, w przedstawionym do oceny osiągnięciu naukowym, skupiłam uwagę na wybranych biodegradowalnych nanoukładach, to jest polimerach alkilocyanoakrylanu (**PACA**, ang/ **poly(alkyl cyanoacrylate)**), lipidowych nanokapsułach (**LNCs**, ang. lipid nanocapsules) i multirdzeniowych nośnikach polielektrolitowych opartych na siarczanie dodecyłu sodu (SDS, ang. sodium dodecyl sulfate). Ponadto na jednym z etapów prowadzonych prac badawczych, sprawdziłam jak na nanomateriały (Rys. 1) zaprojektowane dla terapii i diagnostyki raka piersi człowieka (tj. PLA/MMT/TRA, PLA/EDTMP, PLGA/MDP, Micele Pluronic F127) reagują nienowotworowe komórki śródbłonka naczyniowego *in vitro*. Badanie te są niezwykle istotne, gdy rozpatrujemy endotelium jako pierwszą barierą biologiczną jaką napotykają na swojej drodze nanomateriały, jeśli będą podawane drogą iniekcji dożylną.

## **IC-2. Cel naukowy badań, rezultaty osiągnięcia naukowego i stosowana metodyka badawcza.**

Głównym celem pracy była **ocena cytotoksyczności nowosyntetyzowanych i niebadanych dotychczas nanoform paklitakselu** (chemioterapeutyku stosowanego obecnie w onkologii klinicznej) wobec komórek nowotworowych człowieka, wywodzących się z odmiennych subtypów raka piersi o różnym fenotypie, genotypie, złośliwości i wrażliwości na terapię hormonalną i chemioterapię oraz nienowotworowych komórek endotelialnych śródbłonka naczyniowego. Ponadto celem pracy było **zbadanie oddziaływania pustych nanośników** przeznaczonych do transportowania leków przeciwnowotworowych i znaczników fluorescencyjnych na komórki raka piersi człowieka

Uzyskane wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dostarczyły istotnych informacji o mechanizmach cytotoksyczności nanoukładów, które w przyszłości mają szanse być dopuszczone do wykorzystania w nanomedycynie. Wskazanie molekularnych mechanizmów działania nanomateriałów na komórki eukariotyczne, zarówno nowotworowych i prawidłowych, może mieć duże znaczenie przy projektowaniu nowych systemów dostarczających chemioterapeutyki i przewidywaniu odpowiedzi biologicznej. Dodatkową korzyścią płynącą

ze zrealizowanych prac doświadczalnych było zbadanie cytotoksyczności leków enkapsulowanych tj. umieszczanych, w nanoprzenośnikach. Prowadzone przeze mnie badania poszerzyły wiedzę na temat wpływu enkapsulowanego w nanonośnikach PTX na cytotoksyczność całego układu.

Eksperymenty, które są podstawą omawianego osiągnięcia naukowego wykonano stosując techniki: spektrofotometryczne, spektrofluorometryczne, cytofluorometryczne, radiometryczne, immunobloting, mikroskopię fluorescencyjną, konfokalną, elektronową i wysokorozdzielczą mikroskopię SIM, elektroforezę DNA w żelu agarozowym, wyciszanie genów za pomocą antysensownego siRNA, PCR w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR). Uzyskane wyniki badań przedstawiono jako średnia arytmetyczna  $\pm$  odchylenie standardowe (SD),  $n \geq 3$ ). Wyliczono wielkość próby badanej i moc testu, sprawdzano normalność rozkładu oraz homogenność wariancji W zależności od wariantu eksperymentu przeprowadzono jedno- bądź wieloczynnikową analizę wariancji (odpowiednio ANOVA I i ANOVA II) oraz test post hoc Tukeya (STATISTICA 2015 StatSoft Inc., Tulsa, USA), a dla danych uszeregowanych w dwóch grupach (próby zależne) wykonano test t-Studenta.

Materiałem badawczym w doświadczeniach *in vitro* były komórki, nabyte w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Tkankowych (ATTC, ang. American Type Culture Collection) będące modelami komórkowymi dla:

- ludzkiego raka piersi tj. linia MCF-7 (podtyp luminalny A, ER+, PR+, Her 2-), linia MDA-MB-231 (podtyp z niską ekspresją kładyny, ER-, PR-, Her 2-) oraz linia MDA-MB-468 (podtyp podstawnokomórkowy ER-, PR- Her 2-)
- śródbłonna człowieka (linia HUVEC-ST)
- innych nowotworowych linii komórkowych: SW480, HCT116 (rak jelita grubego), PC3 (nowotwór prostaty), HeLa (rak szyjki macicy), Huh7 (nowotwór wątroby).

W niektórych wariantach eksperymentów wykorzystano komórki HAP-1 typu *CRISPR/Cas9 knockout* z inaktywacją genów dla każdej z czterech kinaz fosforylujących czynnik inicjujący translację (eIF2 $\alpha$ , ang. Eukaryotic Initiation Factor 2), tj.  $\Delta HRI$ ,  $\Delta PERK$ ,  $\Delta GCN2$  i  $\Delta PKR$ . Komórki dostarczył dr Paweł Ivanov z Brigham and Women's Hospital (Boston, USA). W badaniach nad mechanizmami endocytozy wykorzystano stabilnie transfekowaną (z wykorzystaniem cDNA dla podjednostki dynaminy dynK44A) linię HeLa K44A, która została udostępniona przez prof. S.L. Schmid z Katedry Biologii Komórki, Szpital Uniwersytecki w Dallas, USA. Część wyników opisanych w osiągnięciu naukowym dotyczy badań prowadzonych

na poziomie *in vivo*. Doświadczenia te zostały wykonane na atymicznych myszach typu nude foxn1nu.

**Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały następujące etapy:**

#### **Etap 1**

**1.1. Poznanie molekularnych mechanizmów cytotoksyczności pustych nanonośników zbudowanych z polimerów PACA wobec komórek raka piersi człowieka.**

## 1.2. Poznanie interakcji pustych lipidowych nanokapsuł z komórkami raka piersi człowieka.

### Etap 2

#### 2.1. Ocena aktywności paklitakselu dostarczanego w nanokapsułach lipidowych do komórek raka piersi człowieka.

#### 2.2. Analiza możliwości zastosowania w terapii raka piersi multirdzeniowych nanonośników polielektrolitowych opartych na wodorozpuszczalnym surfaktancie SDS przeznaczonych do enkapsulacji paklitakselu.

### Etap 3

#### 3.1. Zbadanie oddziaływania nanocząstek zaprojektowanych do terapii i diagnostyki raka piersi i raka kości (scyntygrafia) na komórki śródbłonka naczyniowego człowieka.

### Etap 1

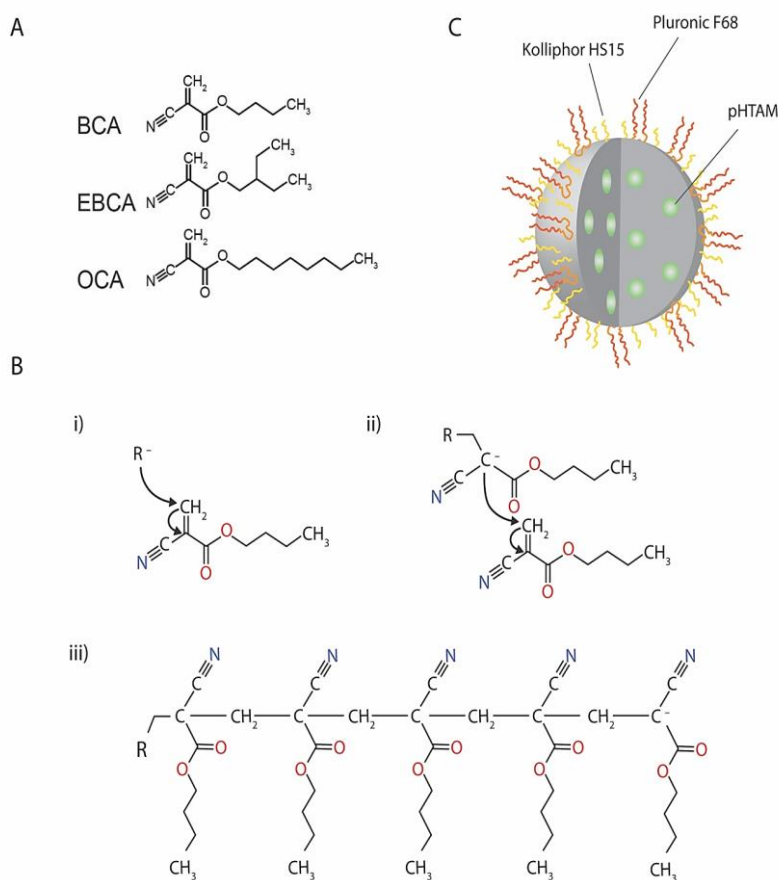
#### 1.1. Poznanie molekularnych mechanizmów cytotoksyczności pustych nanonośników zbudowanych z polimerów PACA wobec komórek raka piersi człowieka.

Głównym celem zastosowania nanonośników jako systemów dostarczających leki do komórek nowotworowych jest poprawa profilu farmakokinetycznego substancji terapeutycznej i zmniejszenie ryzyka wystąpienia skutków ubocznych jakie towarzyszą konwencjonalnej chemioterapii [15]. Enkapsulacja, tj. zamykanie wysoce toksycznych leków wewnątrz nanoprzenośników może zwiększyć rozpuszczalność i stabilność terapeutyków, umożliwiając wydłużenie ich czasu półtrwania i biodostępność. Wykorzystując unikalne właściwości nanocząstek, można zaprojektować takie nanoukłady, które umożliwią zmniejszenie podawanej dawki chemioterapeutyku, poprawią specyficzność dystrybucji i ominą ważne bariery fizjologiczne [16].

Chociaż poczyniono znaczne postępy w wykorzystaniu nanocząstek jako nanoprzenośników leków, to wciąż pozostaje wiele spornych kwestii, których rozwiązanie przyspieszyłoby ich powszechne zastosowanie kliniczne. **Po pierwsze**, po interakcji z żywymi komórkami, nanomateriały zmieniają swoją reaktywność powierzchniową i przez to mogą prowadzić do niepożądanych i nieprzewidzianych konsekwencji fizjologicznych. **Po drugie**, właściwości fizykochemiczne nanocząstek takie jak rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy i rodzaj materiału z którego jest wykonana zewnętrzna powłoka, odgrywają kluczową rolę w określaniu „biogodności” testowanych nanomateriałów [17]. **Po trzecie**, odkryte już w 1962 roku przez Leo Vromana [18] zjawisko adsorpcji białek na powierzchniach makrocząstek, które w nanotechnologii znane jest jako „efekt korony białkowej”, definiuje biologiczną tożsamość nanocząstek i może mieć istotne znaczenie w biologicznej odpowiedzi ogólnoustrojowej jaka jest generowana przez substancje w skali nano [19].

Pierwszymi nanostrukturami, które zostały dopuszczone przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. U.S. Food and Drug Administration) do zastosowania klinicznego były liposomy. Są to koliste pęcherzyki złożone z dwuwarstwy lipidowej, wewnątrz których

znajduje się faza wodna [20]. Liposomalna forma doksorubicyny (DOX, ang. doxorubicin), występująca pod handlową nazwą Doxil®(USA)/ Caelyx® (kraje Unii Europejskiej) początkowo była zaprojektowana do leczenia mięsaka Kaposiego i szpiczaka mnogiego. W porównaniu z wolnym lekiem, Doxil® charakteryzował się większą skutecznością i niższą kardiotoxycznością. Jednakże niska trwałość preparatu Doxil® oraz zjawisko „przeciekania”, objawiające się niepożądanym uwalnianiem DOX z liposomów do krwioobiegu znacznie ograniczyły ich możliwości powszechnego zastosowania w medycynie [21]. Dlatego, alternatywną dla liposomów, która wzbudziła duże zainteresowanie środowiska naukowego są nanocząstki polimerowe, a szczególnie biodegradowalne polimerowe nanocząstki.



Rys. 2. Nanocząstki PACA opisane w pracy **IB-1** zostały zsyntetyzowane w procesie polimeryzacji miniemulsyjnej przy użyciu monomerów: cyjanoakrylanu butylu (BCA), cyjanoakrylanu etylu (EBCA) i cyjanoakrylanu oktylu (OCA) (A). W procesie polimeryzacji anionowej monomerów BCA (B): grupa zawierająca wolny elektron wiąże grupę  $\text{CH}_2$ , a wolny elektron jest przenoszony do centralnego atomu węgla i); następnie ujemnie naładowany monomer BCA może oddziaływać na sąsiednią cząsteczkę BCA, ii); reakcja łańcuchowa prowadzi do polimeryzacji i utworzenia cząsteczek PBCA, iii); finalny produkt – nanocząstka PACA z barwnikiem pHTAM lub lekiem np. Cabazitaxel, związanym poprzez oddziaływania hydrofobowe oraz polimery PEG, Kolliphor HS15 i Pluronic F68 stabilizujące cały nanoukład PACA (C), na podstawie **IB-1**.

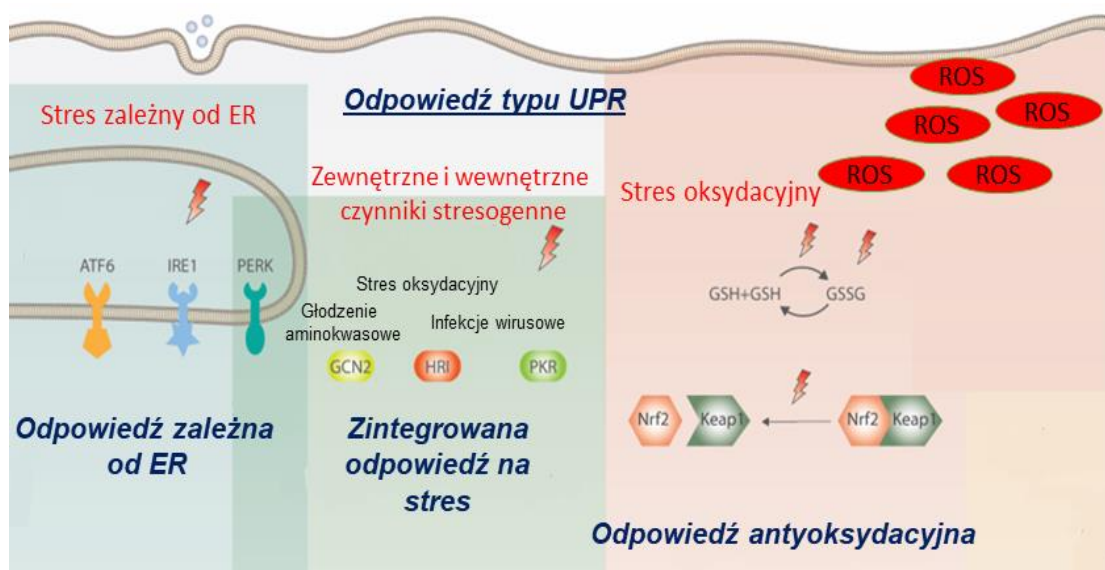
Ich wysoki potencjał aplikacyjny w farmakologii wiąże się z poprawą skuteczności terapeutycznej przy jednoczesnym obniżeniu ryzyka wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych. Nanoukładami o obiecujących parametrach biokompatybilności, są te zsyntetyzowane na drodze polimeryzacji monomerów alkilocyjanoakrylanu, które do tej pory były stosowane jako składowe kleju chirurgicznego. Biodegradowalne nanocząstki PACA można

uzyskać za pomocą technik polimeryzacji i spontanicznej emulsyfikacji (Rys. 2) przy użyciu monomerów: cyjanoakrylanu butylu (PBCA, ang. poly(**b**utyl **c**yanoacrylate), cyjanoakrylanu etylu (PEBCA, ang. poly(**e**thyl**b**utyl **c**yanoacrylate) i cyjanoakrylanu oktylu (POCA, ang. poly(**o**ctyl **c**yanoacrylate) [22]. Dodatkowo, biodegradowalne nanosystemy PACA są hydrofobowe, a ponieważ leki nie są związane z nimi kowalencyjnie, lecz poprzez oddziaływanie hydrofobowe, to polimery PACA są zaprojektowane dla enkapsulowania terapeutyków o trudnej rozpuszczalności w płynach biologicznych [23].

W badaniach nad cytotoksycznością nanopreparatów, w których zamykane są chemioterapeutyki, nie sposób pominąć oddziaływania pustych nanonośników na układy biologiczne. Ryzyko wystąpienia trudnej do wyjaśnienia cytotoksyczności krzyżowej, która wynika z interakcji między nanonośnikiem i enkapsulowanym w nanonośniku lekiem wskazuje na konieczność poznania reakcji biologicznych jakie wywołuje sam nanosystem przeznaczony do transportowania terapeutyków. Dużym atutem jest więc wykonanie doświadczeń, które skupiają się nie tylko na aktywności przeciwnowotworowej zamykanych w nanonośnikach leków, ale też ocenie cytotoksyczności pustych nanonośników [24].

W przedstawionym cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, odpowiedź komórek raka piersi człowieka na stres jaki jest generowany przez nanomateriały rozpoczęłam od porównania reakcji biologicznych jaką indukowały nanocząstki PACA, które różnią się łańcuchami bocznymi budujących je monomerów, tj. nanocząstki PBCA, PEBA i POCA. Wraz z zespołem prof. Sandvig zbadalam w jaki sposób niewielkie zmiany w składzie monomerów należących do grupy PACA, mogą wpływać na rodzaj i zakres stresu komórkowego, procesy śmierci komórki i cytotoksyczność tych nanocząstek (**IB-1**). Zjawiska te są o tyle istotną sprawą, że reakcje stresowe wywołane przez nanomateriały mogą przyczyniać się do całkowitej odpowiedzi terapeutycznej stosowanych nanoprzenośników leków i co gorsze przeciwdziałać ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej. W prowadzonych badaniach zastosowałam, wykonane z monomerów alkilocyjanoakrylanu, różniące się jedynie alkilowymi łańcuchami bocznymi, nanocząstki: butylowe - PBCA, etylbutylowe - PEBCA i oktylowe – POCA (Rys. 2). Nanocząstki wykazywały podobne właściwości fizykochemiczne, takie jak rozmiar (133-153 nm), polidispersyjność (0,13-0,16) i ładunek powierzchniowy (-2,4 do -3,4 mV). Nie zaobserwowałam istotnych różnic w mechanizmach internalizacji nanocząstek PACA do komórek. Wyniki pokazane w suplemencie do pracy **IB-1** dowodzą, że nanocząstki PACA były transportowane do komórki z wykorzystaniem mechanizmu endolizosomalnego, a same nanocząstki nie wywoływały dysfunkcji lizosomów. Jednakże już pierwsze pomiary wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, dokonane po 24 godzinach inkubacji z nanocząstkami wykazały duże różnice w cytotoksyczności tych nanomateriałów. Wobec wszystkich przebadanych linii komórkowych, nanocząstki POCA były najbardziej cytotoksyczne, podczas gdy nanocząstki PEBCA były najmniej toksyczne. Efekt ten był szczególnie widoczny w komórkach MDA-MB-231 i dlatego też dalsze eksperymenty prowadzone były głównie na tej linii komórkowej.

Obniżenie przeżywalności komórek po działaniu nanocząstek PBCA, PEBCA i POCA korelowało ze spadkiem syntezy białka w komórce już po 4 godzinach od dodania do hodowli wszystkich badanych nanosystemów PACA w stężeniu 25 µg/ml. Ponadto dodatkowym argumentem, potwierdzającym hipotezę, że nanocząstki PACA zaburzają homeostazę komórek nowotworowych było pojawienie się znacznej ilości białek znakowanych ubiquityną, co sugerowało, że po zakończonej translacji ich duży odsetek ulegał błędnemu fałdowaniu i przez to nie pełniły one odpowiedniej, uwarunkowanej np. przez ich trzeciorzędową strukturę, funkcji w komórce. Reakcję komórki na masową akumulację w cytosolu błędnie sfałdowanych białek, literatura naukowa określiła mianem odpowiedzi typu UPR (ang. unfolded protein response). Do tej pory opisano 3 niezależne szlaki (Rys. 3), których aktywacja prowadzi do zatrzymania syntezy białka w komórce na skutek jego nieprawidłowej struktury [25].



Rys. 3. U ssaków odpowiedź typu UPR obejmuje trzy oddzielne szlaki transdukcji sygnału: odpowiedź zależna od stresu ER (z udziałem białek ATF6, IRE1 i PERK), zintegrowana odpowiedź na stres (z udziałem czterech kinaz PERK, GCN2, HRI i PKR) i odpowiedź antyoksydacyjna, na podstawie [25, 26].

W swoich rozważaniach początkowo uwzględniłam, że nagromadzenie się w cytosolu dużej ilości niepoprawnie sfałdowanych białek po działaniu nanocząstek PACA może wynikać z dysfunkcji organellum komórkowego, w którym to fałdowanie się odbywa, czyli w retikulum endoplazmatycznym (ER, ang. endoplasmic reticulum) [27]. Sprawdzając, które z nanocząstek aktywują kinazę PERK (ang. Protein kinase RNA-Like ER kinase), białko związane z retikulum endoplazmatycznym, odpowiedzialne za fosforylację czynnika inicjującego translację eIF2 $\alpha$ , wykazałam, że nanocząstki POCA (stosowane nawet w niskich stężeniach) hamowały całkowitą syntezę białka w komórce w sposób zależny od ER, podczas gdy nanocząstki PEBCA i PBCA dawały podobne wyniki, ale tylko kiedy były stonowane w wysokich stężeniach i przy dłuższych czasach inkubacji. Dodatkowo zaobserwowałam, że nie tylko nanocząstki POCA, ale również nanocząstki PEBCA i PBCA indukowały translokację do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego ATF4 (ang. Activating Transcription Factor 4), który inicjuje transkrypcję genów dla wielu białek opiekuńczych (chaperonów), transporterów aminokwasów i enzymów

antyoksydacyjnych, przyczyniając się do przywrócenia całkowitej homeostazy komórki. Choć wyniki eksperymentów jasno dowiodły, że to głównie nanocząstki POCA indukowały w komórkach raka piersi MDA-MB-231 stres zależny od ER, to postanowiłam zbadać jakie inne zaburzenia równowagi komórkowej były inicjowane przez nanocząstki PEBCA i PBCA. Dane literaturowe dowodzą, że oprócz kinazy PERK, która prowadzi do fosforylacji czynnika eIF2 $\alpha$ , w komórce istnieją jeszcze 3 inne kinazy: GCN2 (ang. general control nonderepressible 2), PKR (ang. protein kinase R), HRI (ang. eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1), które inicjują zintegrowaną odpowiedź komórki na stres (ISR, ang. integrated stress response). Kinazy te są aktywowane pod wpływem różnych czynników zewnętrznych np.: głodzenia metabolicznego, infekcji wirusowej, stresu oksydacyjnego i dysfunkcji proteasomów [26]. Gdy w prowadzonych badaniach, podczas inkubacji komórek z nanocząstkami POCA, zastosowałam ISRIB – inhibitor dla szlaku ISR to fosforylacja czynnika eIF2 $\alpha$  wciąż miała miejsce, co zasugerowało, że wszystkie 4 kinazy mogą być indukowane przez nanocząstki. Dopiero zastosowanie komórek HAP-1 typu CRISPR/Cas9 knockout z pojedynczą inaktywacją genów dla każdej z czterech analizowanych kinaz, tj.  $\Delta$ HRI,  $\Delta$ PERK,  $\Delta$ GCN2 i  $\Delta$ PKR pozwoliło stwierdzić, że nanocząstki PBCA indukują stres zależny od kinazy HRI, która jest aktywowana przez reaktywne formy tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species).

Zróznicowana odpowiedź komórek na stres i ich wrażliwość na badane nanomateriały dały przesłanki, aby odpowiedzieć na pytanie, jaki typ śmierci komórki był indukowany przez nanocząstki PACA. Już na etapie prowadzenia obserwacji mikroskopowych zauważyłam, że nanocząstki POCA wywoływały kondensację chromatyny i formowanie się ciałek apoptotycznych. Przypuszczenia co do indukowania przez te nanocząstki apoptozy zostały potwierdzone metodą immunoblotingu, w której wykryłam fragmentację polimerazy poliADP rybozy (PARP, ang. poly (ADP-ribose) polymerase) i prokaspazy-3. Ponadto, w prowadzonych badaniach, zmierzyłam aktywność kaspaz 3/7 (casp 3/7, ang. caspase-3/7) po działaniu wszystkich testowanych nanocząstek PACA. Zaobserwowałam, że tylko komórki potraktowane nanocząstkami POCA przez 8 godzin w stężeniu 25  $\mu$ g/ml, indukowały wzrost aktywności kaspazy-3. Natomiast, w eksperymencie, w którym komórki były poddane działaniu nanocząstek PEBCA i PBCA zauważyłam jedynie przerwanie ciągłości błony komórkowej z widoczną frakcją komórek wybarwionych jodkiem propidyny. Takie obserwacje zasugerowały, że nanocząstki PEBCA i PBCA indukowały inny, nieapoptotyczny typ śmierci komórki.

W ostatnich latach, literatura naukowa opisała kilka podtypów nekroptotycznej śmierci komórki, a spośród nich ferroptoza wydaje się być rodzajem śmierci charakterystycznym dla macierzystych komórek nowotworowych (CSC, ang. cancer stem cells). Najnowsze badania dowodzą, że ferroptoza jest zależną od jonów żelaza programowaną śmiercią komórki, w której dochodzi do produkcji ROS, spadku wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu (GSH, ang. glutathione) i nadmiernego nagromadzenia się produktów peroksydacji lipidów. Istnieją doniesienia, że ferroptoza jest mechanizmem śmierci, który może być indukowany w lekoopornych, trudnych do wyleczenia nowotworach [28]. Takie, wrażliwe na ferroptozę komórki nowotworowe cechują się dużym zapotrzebowaniem cystynę, aminokwas, który transportowany

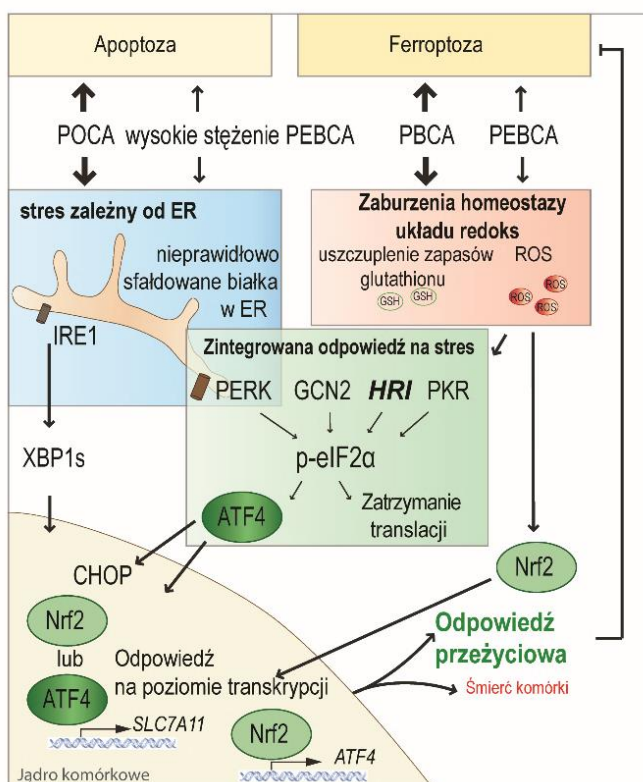


z przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest konieczny w komórce do syntezy GSH. Ponieważ prowadzone przeze mnie rozważania nad toksycznością nanocząstek PACA dotyczyły głównie komórek MDA-MB-231, przypominających w swojej fizjologii komórki typu CSC [28], sprawdziłam czy ferroptoza jest typem śmierci indukowanym przez nanocząstki PEBCA i PBCA. W oznaczeniu żywotności komórek testem CellTox Green i przy zastosowaniu inhibitorów specyficznych dla ferroptozy, to jest liproksstatyny, ferostatyny i DFP (ang. deferiprone) zaobserwowałam, że oba typy nanocząstek indukowały ferroptozę. Innymi typowymi markerami dla ferroptozy, które także wykryłam po działaniu nanocząstek PEBCA i PBCA były: wysoka produkcja ROS, peroksydacja lipidów i spadek wewnątrzkomórkowego stężenia GSH. Dodatkowo zauważyłam, że cytotoksyczność nanocząstek PEBCA i PBCA była większa, gdy komórki były hodowane w medium pozbawionym cystyny, aminokwasu, który po konwersji do cysteiny jest kluczowym substratem do syntezy GSH. Znaczenie dostępności cystyny przy wglądzie w mechanizm toksyczności nanocząstek PEBCA i PBCA potwierdziłam również podczas oznaczenia żywotności komórek, kiedy komórki MDA-MB-231 były transfekowane antysensownym siRNA dla SLC7A11 - błonowego transportera cystyny. Mając na uwadze, że różniące się cytotoksycznością nanocząstki PEBCA i PBCA, w medium pozbawionym cystyny, niemalże w takim samym stopniu obniżały żywotność komórek MDA-MB-231, zbadalam czy nanocząstki PACA mogą inicjować translokację do jądra innych czynników transkrypcyjnych, poza ATF4, które uruchamiają szlaki przeżyciowe komórki. Okazało się, że nanocząstki PEBCA już po 4 godzinach od dodania do hodowli w stężeniu 25 µg/ml powodowały masową akumulację czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2), odgrywającego istotną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks komórki i kierującego komórkę w momencie nasilenia warunków stresowych na drogę ferroptozy. Ponadto, kiedy komórki były transfekowane antysensownym siRNA dla czynnika transkrypcyjnego Nrf2, to toksyczność nanocząstek PEBCA rosła w funkcji stężenia.

Dlaczego tak podobne nanocząstki PACA generują różne reakcje komórek na ich dodanie do hodowli *in vitro*? Zwróciłam uwagę na interakcje jakie zachodzą pomiędzy błoną komórkową, a nanomateriałem. Pomimo, że nanocząstki PACA mają podobny ładunek, średnicę i indeks polidispersyjności to monomery je budujące cechuje różna hydrofobowość (POCA>PEBCA>PBCA). Istnieją doniesienia literaturowe, w których dowiedziono, że polarność nanocząstek definiuje skład korony białkowej, jaka tworzy się na powierzchni nanomateriałów w płynach biologicznych [29]. Korona białkowa może mieć kluczowe znaczenie w modyfikowaniu fizjologii błony komórkowej przez nanocząstki, na przykład poprzez zmiany w płynności błony lub składu jej mikrodomen [30]. Takie zmiany błony wpływają na aktywność białek błonowych, w tym receptorów, enzymów, kanałów jonowych i transporterów składników odżywczych [31]. Na cytotoksyczność nanocząstek PACA wpływa także uwalnianie się specyficznych produktów ich degradacji. Nie należy zapominać, że podczas degradacji nanocząsteczek PACA uwalniany jest kwas cyjanoakrylowy i odpowiadające mu (różniące się hydrofobowością) alkohole alkilowe, tj. alkohol etylo-butylowy, butanol lub oktanol [32]. Na przykład wysoce hydrofobowy oktanol najprawdopodobniej wnika do dwuwarstwy lipidowej

i wpływa na właściwości błony w większym stopniu niż hydrofilowy butanol. Taką hipotezę popierają badania Garic-Stankovic, w których pokazano, że oktanol indukował uwalnianie wapnia i apoptozę w neuronach, podczas gdy ten sam efekt wywoływały dopiero milimolarne stężenia butanolu [33].

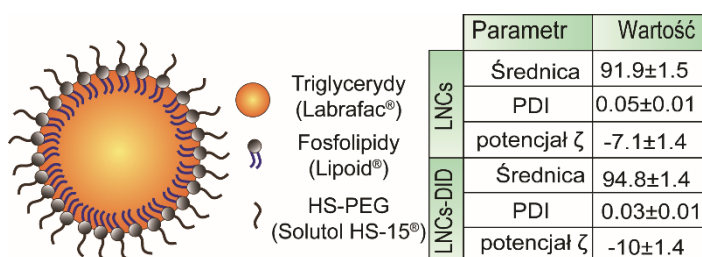
Podsumowując, w prowadzonych w pierwszym etapie badaniach wykazałam, że alkilocyjanoakrylanowe nanocząstki PBCA, PEBCA i POCA które różniły się budującymi je monomerami, generowały różne typy odpowiedzi komórek na zaburzenia stanu równowagi (Rys. 4). **Po pierwsze** najbardziej toksyczne nanocząstki POCA powodowały destabilizację retikulum endoplazmatycznego i indukowały apoptozę, która była całkowicie zahamowana przez z-VAD, inhibitor specyficzny dla kaspazy-3. **Po drugie** nanocząstki PEBCA i PBCA indukowały stres oksydacyjny, prowadziły do wyraźnej akumulacji czynników transkrypcyjnych ATF4 i Nrf2 oraz indukowały w komórkach ferroptozę. Ponadto nanocząstki PEBCA i PBCA była bardziej cytotoksyczne w warunkach niedoboru cystyny. Nanocząstki PBCA aktywowały w komórkach modelowych potrójnie negatywnego raka piersi zintegrowaną odpowiedź komórek na stres poprzez fosforylację eIF2 $\alpha$  przez kinazę HRI. **Po trzecie**, nanocząstki PEBCA powodowały przeżyciową aktywację czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w większym stopniu niż nanocząstki PBCA, stymulując nadekspresję transportera SLC7A11.



Rys. 4 Schemat podsumowujący mechanizmy cytotoksycznego działania nanosystemów PACA [IB-1].

## 1.2. Poznanie interakcji pustych lipidowych nanokapsuł z komórkami raka piersi człowieka.

Przy projektowaniu nanosystemów przeznaczonych do dostarczania leków do obszaru nowotworu niezwykle istotny jest sposób w jaki nanoprzenośniki będą ostatecznie docierały do niszy guza. Wcześniej opisane zjawisko EPR, wykorzystujące dysproporcje w szczelności sieci naczyń krwionośnych i przestrzeni międzykomórkowych tkanki prawidłowej i tej, która uległa transformacji nowotworowej, została wykorzystana przy podawaniu pacjentom liposomalnej formy DOX (Doxil®/Caelyx®). Akumulacja nanoprzenośników w środowisku niszy, których biodystrybucja oparta jest na zjawisku EPR, ma jeszcze jedną dodatkową zaletę. Okazało się bowiem, że nanomateriały znajdujące się w regionach guza rekrutują w te obszary przeciwzapalne makrofagi M2 i przeciwnowotworowe makrofagi M1 [34]. Możliwe, że liposomy, jak również inne lipidowe nanoprzenośniki leków, mogą dłużej utrzymywać się w ustroju dzięki dużej ilości makrofagów w niszy guza. Dlatego też w przedstawionym do oceny osiągnięciu naukowym, poświęciłam także swoją uwagę lipidowym nanokapsułom (LNCs, ang. lipid nanocapsules). Wprawdzie literatura naukowa z powodzeniem opisuje zastosowanie lipidowych nanokapsuł, jako nanoukładów DDS dla leków przeciwnowotworowych zarówno na modelach komórkowych, jak i zwierzęcych, to wciąż niewiele wiadomo o interakcji pustych nanokapsuł z układami biologicznymi. Lipidowe nanokapsuły mogą być wytwarzane przez różne kombinacje lipidów i środków powierzchniowo czynnych. W prowadzonych doświadczanych, które były częścią projektu „InnoIndigo” realizowanego w Oslo Radium Hospital, swoją uwagę skupiłam na nanokapsułach LNCs zbudowanych z Labrafac™ Lipophile WL1349 (trójglicerydy, zmieniające średnicę nanokapsuł), Lipoid® S75 (fosfolipidy zwiększające stabilność) i Solutol® HS15 (surfaktant, poprawia parametry fizykochemiczne) [35], które charakteryzowały się średnicą około 90 nm, indeksem polidispersyjności równym 0.05 i potencjałem zeta wahającym się między od -7 do -10 mV (Rys. 5).

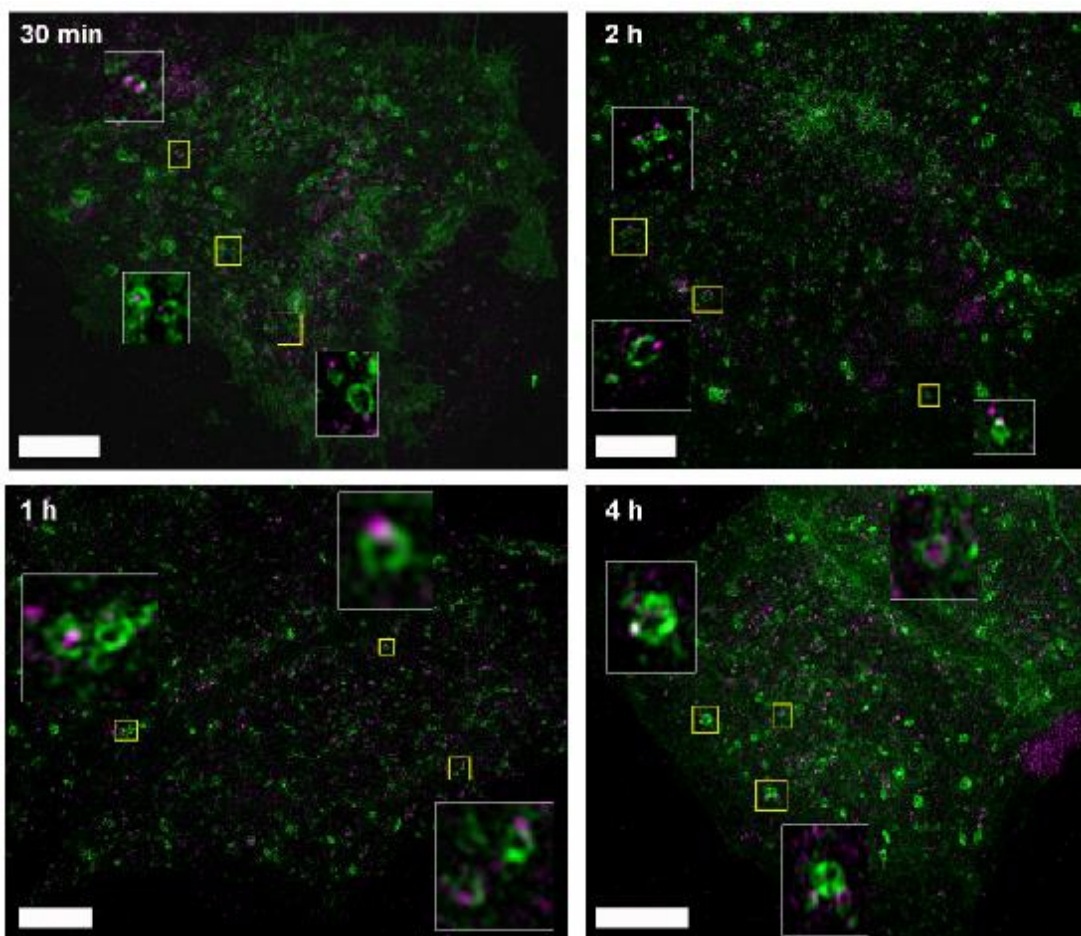


Rys. 5 Schemat budowy i parametry fizykochemiczne charakteryzujące lipidowe nanokapsuły o średnicy 90 nm, zarówno puste jak i wyznakowane znacznikiem DID [IB-2].

w ich wnętrzu, wysoce hydrofobowym znacznikiem fluorescencyjnym DID (ang. 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate), którego widmo emisji przesunięte jest w kierunku podczerwieni. Prowadząc pomiary cytotoksyczności dwoma metodami, to jest MTT i CellTiterGlo, zaobserwowałam, że lipidowe nanokapsuły obniżały przeżywalność komórek raka piersi w sposób niezwykle zróżnicowany, a linią komórkową, która

Pierwsze eksperymenty rozpoczęłam od poznania interakcji pustych lipidowych nanokapsuł z trzema różnymi liniami komórkowymi raka piersi człowieka, to jest MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468. W części eksperymentów stosowałam nanokapsuły z zamkniętym

przejawiała największą wrażliwość względem nanokapsuł LNCs były komórki MDA-MB-468. Zapewne zanotowane spadki poziomu aktywności metabolicznej komórek (pomiar redukcji MTT) jak i ich wewnątrzkomórkowego poziomu ATP (CellTiterGlo) były bezpośrednim następstwem transportu lipidowych nanokapsuł do komórek. Dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczej mikroskopii 3D SIM (ang. super resolution 3D SIM microscopy), udowodniłam, że lipidowe nanokapsuły już po 30 minutach znajdowały się w lizosomach, ale zawsze blisko błony tych przedziałów komórkowych, podczas gdy stosunkowo niewiele nanokapsuł można było zobaczyć wewnątrz światła lizosomów (Rys. 6). Toksyczne właściwości lipidowych nanokapsuł ujawniły się także, kiedy: 1) oszacowałam tempo syntezy białka na podstawie pomiaru inkorporacji do komórek radioaktywnie znakowanej leucyny i 2) oznaczyłam frakcję przeznaczonych do degradacji białek, które w komórkach były wyznakowane ubikwityną. Choć synteza białka we wszystkich testowanych liniach komórkowych raka piersi człowieka ulegała redukcji, to proces ten był odwracalny. Kiedy komórki były traktowane lipidowymi nanokapsułami (0.5 mg/ml) przez 4 godziny inkubacji, a potem hodowla była prowadzona w warunkach wzrostu *in vitro*, ale już bez nanocząstek, to po 20 godzinach całkowita synteza białka w komórkach wracała do poziomu kontroli.



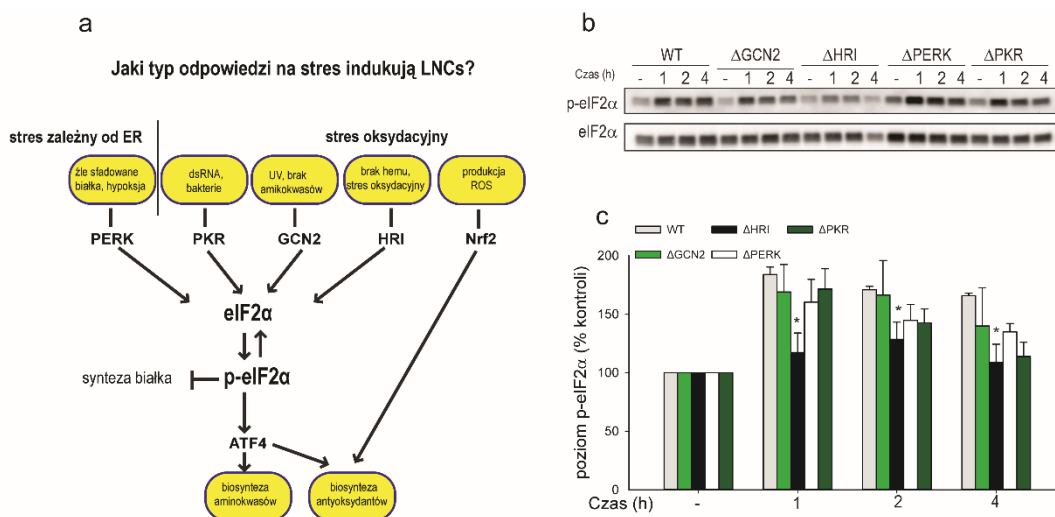
Rys. 6 Lokalizacja nanokapsuł typu LNCs o średnicy 90 nm w lizosomach. Zdjęcia 3D komórek linii MCF-7 inkubowanych z lipidowymi nanokapsułami (0.5 mg/ml) wyznakowanymi DiD (kolor fioletowy) wykonano stosując mikroskopię o wysokiej rozdzielczości SIM. Przed dodaniem nanokapsuł, komórki były poddane całonocnej transdukcji odczynnikiem CellLight™ Lysosomes-GFP co umożliwiło zobrazowanie lizosomów (kolor zielony). Skala na zdjęciu odpowiada 5  $\mu$ m [IB-2].

Widoczna frakcja białek wyznakowanych ubikwityną i spadek tempa syntezy białka w komórce były dla mnie sygnałem, że lipidowe nanokapsuły mogły uszkadzać retikulum endoplazmatyczne i indukować w komórkach odpowiedź typu ISR. Dlatego swoje rozważania rozpoczęłam od oznaczenia aktywacji kinazy PERK, która jest wspólnym markerem dla integralnej odpowiedzi ISR oraz stresu typu ER. Wyniki eksperymentów wykonanych metodą immunoblotingu wskazały na aktywność kinazy PERK oraz akumulację ufosforylowanej formy czynnika inicjującego translację eIF2 $\alpha$  i czynnika transkrypcyjnego ATF4. Te obserwacje potwierdziły moją hipotezę, że lipidowe nanokapsuły indukowały destabilizację retikulum endoplazmatycznego. Zaobserwowałam również, że stres zależny od ER był indukowany tylko przez wysokie stężenia lipidowych nanokapsuł i to w komórkach, w których całkowita synteza białka była najszybciej zredukowana, tj. MDA-MB-231 i MDA-MB-438. Kontynuując badania, uwzględniłam, że inne kinazy, to jest GCN2, PKR i HRI (podobnie jak kinaza PERK) prowadzą do fosforylacji eIF2 $\alpha$ , a tym samym inicjują akumulację i translokację do jądra czynnika ATF4. Dlatego, aby sprawdzić, czy któraś z tych kinaz pośredniczy w odpowiedzi typu ISR zastosowałam wcześniej opisane komórki HAP-1 typu CRISPR/Cas9 knockout z pojedynczą inaktywacją genów dla każdej z czterech analizowanych kinaz, tj.  $\Delta HRI$ ,  $\Delta PERK$ ,  $\Delta GCN2$  i  $\Delta PKR$ . Wykazałam, że nanokapsuły LNCs nie powodowały akumulacji ufosforylowanej postaci eIF2, gdy traktowanymi komórkami były tylko komórki  $\Delta HRI$  HAP-1, co zasugerowało, że cytotoksyczne właściwości lipidowych nanokapsuł mogły wynikać z indukowania zaburzeń homeostazy redoks (Rys. 7). Pośrednim dowodem tej hipotezy było zaobserwowana przeze mnie akumulacja i translokacja do jądra komórkowego, wrażliwego na zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej, czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Prooksydacyjne właściwości nanokapsuł typu LNCs zostały potwierdzone przez pomiary poziomu ROS i peroksydacji lipidów, które były widoczne tylko w komórkach MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Ponadto zastosowanie antyoksydantów, to jest na NAC i GSH zwiększało przeżywalność tych komórek po dodaniu do hodowli lipidowych nanokapsuł, co dowiodło, że wolne rodniki odgrywają istotną rolę w cytotoksyczności nanokapsuł LNCs. Podczas prowadzenia tej części badań pojawiła się dodatkowa wątpliwość – z czego wynikała różnica we wrażliwości komórek MCF-7 i MDA-MB-231 na lipidowe nanokapsuły po zastosowaniu antyoksydantów? Odpowiedzią na to pytanie może być fakt, że w komórkach MCF-7 obserwuje się wyjątkowo wysoką ekspresję peroksydazy glutationowej [36], która utleniając GSH do disiarczku glutationu chroni komórkę przed nagromadzeniem w niej utlenionych biomolekuł np. lipidów. Proces peroksydacji lipidów, jednego z markerów ferroptozy był obserwowany głównie w komórkach linii MDA-MB-231. A gdy zastosowano inhibitory tego typu śmierci komórki, tj. lipofilowy przeciwutleniacz liproksatynę i chelator jonów żelaza - DFP, to tylko komórki MDA-MB-231 były chronione przed cytotoksycznym działaniem nanokapsuł LNCs. Dodatkowo, rolę różnic profilu oksydoredukcyjnego komórek MCF-7 i MDA-MB-231 w ich wrażliwości na lipidowe nanokapsuły potwierdzono także podczas prowadzenia badań z wykorzystaniem siRNA. Wyciszenie ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych kluczowych dla tworzenia bariery antyoksydacyjnej komórki tj. Nrf2 i ATF4 zwiększyło cytotoksyczność

lipidowych nanokapsuł tylko wobec komórek MDA-MB-231. Natomiast oporność linii MCF-7 na działanie nanokapsuł LNCs nie zależała od tych dwóch czynników transkrypcyjnych.

Dużym sukcesem było wykazanie przeze mnie, że lipidowe nanokapsuły dostają się do komórki z wykorzystaniem maszynerii endocytarno-lizosomalnej (Rys. 6). Ponadto w internalizację do komórki nanokapsuł LNCs zaangażowanych jest dużo różnych mechanizmów zależnych od ATP. Nanonośniki LNCs konkurują z innymi biomolekułami, które dostają się do komórki na drodze endocytozy i wygrywają niekiedy tę molekularną rywalizację.

Zaobserwowałam na przykład, że 2-godzinna preinkubacja komórek MCF-7 z lipidowymi nanokapsułami zmniejszyła wychwyty transferyny o około 30%. Natomiast kiedy inkubacja komórek z nanokapsułami LNCs była przedłużona do 4 godzin to zauważyłam, że lipidowe nanokapsuły zmieniały morfologię lizosomów, powodując m.in. ich agregację przy jądrze komórkowym. Takie obserwacje zasugerowały mi również, że nanokapsuły LNCs zmieniały fizjologię lizosomów np. poprzez podwyższenie pH tych organelli. Enzymy proteolityczne działające w lizosomach są aktywne tylko w kwaśnym środowisku. Kiedy pH wewnątrz lizosomów rośnie, to lizosomalne proteazy nie działają, a sondy fluorescencyjne, np. DQ-Red BSA z sekwencją peptydową specyficzną dla tych enzymów, nie ulegały charakterystycznej fragmentacji wraz z uwolnieniem fluoryzującego produktu [37]. Podobna sytuacja, miała miejsce, kiedy po dwóch godzinach inkubacji z lipidowymi nanokapsułami spadała fluorescencja znacznika LysoTracker Red, który jest magazynowany w lizosomach tylko wtedy, gdy stężenie protonów jest odpowiednio wysokie, to znaczy przy pH między 4.5, a 5. Ta obserwacja zrodziła kolejne pytanie - w jaki sposób lipidowe nanokapsuły zmieniały gospodarkę protonową w komórkach?



Rys. 7 Reakcje komórek raka piersi na stres jaki indukują lipidowe nanokapsuły: (a) schemat zintegrowanej odpowiedzi na stres w komórkach ssaków, (b) immunoblot z rozdzielania elektroforetycznego lizatów komórek HAP1 typu CRISPR/Cas9 knockout z pojedynczą inaktywacją genów dla każdej z czterech analizowanych kinaz, tj. ΔHRI, ΔPERK, ΔGCN2 i ΔPKR, które były inkubowane z nanokapsułami LNCs, (c) wartości odczytów chemiluminescencyjnych dla ekspresji p-eIF2α na poziomie białka w komórkach HAP-1 [IB-2].

Prawdopodobnie, dostając się do lizosomów nanokapsuły LNCs ulegały hydrolizie, co prowadziło do uwolnienia z ich lipidowego płaszcza wolnych grup acylowych, a te mogły ulegać protonacji i podwyższać pH wewnątrz lizosomów. Nie jest wykluczone także, iż wolne grupy acylowe, po penetracji błony lizosomalnej, przemieszczały się do cytosolu i tam, dysocjując uwalniały protony. W konsekwencji dochodziło do obniżenia pH cytoplazmy. Taki przebieg zdarzeń był wysoce prawdopodobny, ponieważ podczas pomiaru pH cytosolu z zastosowaniem sondy pHrodo™ Green AM okazało się, że 2 godzinna inkubacja z lipidowymi nanokapsułami prowadziła do spadku pH cytosolu do wartości 5.8. Ponadto, zakwaszenie cytosolu, które obserwowałam mogło sprzyjać obniżeniu tempa syntezy białka i zahamowaniu endocytozy, która dla transferyny jest zależna od klatryny. Na podstawie opublikowanych wcześniej badań prowadzonych na komórkach HaCaT i RAW246.7 można wnioskować, że składniki niejonowego surfaktanta Solutol® HS15 mogą być bezpośrednią przyczyną cytotoksyczności lipidowych nanokapsuł i hamować akumulację w lizosomach barwników typowych dla tych przedziałów komórkowych, np. czerwieni obojętnej w podobnym zakresie, tak jak obserwowałam dla znaczników: LysoTracker Red i DQ-Red BSA. Ponadto dużą rolę w cytotoksyczności nanokapsuł LNCs odegrał skład korony białkowej, jaka utworzyła się po dodaniu nanocząstek do medium wzrostowego. W wielu doświadczeniach inkubacja z lipidowymi nanokapsułami była prowadzona w obecności 10% lub 1% surowicy. Zaobserwowałam, że przy mniejszej dostępności składników białkowych, to jest, gdy inkubacja z lipidowymi nanokapsułami była prowadzona w medium suplementowanym 1% surowicą, cytotoksyczność nanokapsuł LNCs była większa. Taka obserwacja była zgodna z wyższą akumulacją nanokapsuł w komórce po 2 godzinach inkubacji, niż miało to miejsce przy dostępie 10% surowicy.

**Najważniejszymi osiągnięciami pierwszego etapu badań było wykazanie, że:**

- nanocząstki PACA (PBCA, PEBCA, POCA) różniące się jedynie alkilowymi łańcuchami bocznymi wykazywały duże różnice w cytotoksyczności wobec komórek potrójnie negatywnego raka piersi człowieka; nanocząstki POCA były najbardziej cytotoksyczne, a nanocząstki PEBCA najmniej cytotoksyczne
- nanocząstki PACA indukowały różne typy zintegrowanej odpowiedzi na stres (ISR):
  - 1) nanocząstki PEBCA stymulowały przeżyciową odpowiedź antyoksydacyjną zależną od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i ferroptozę
  - 2) nanocząstki PBCA indukowały stres oksydacyjny (wzrost poziomu ROS, uszczerpienie puli GSH) i ferroptozę
  - 3) nanocząstki POCA powodowały stres zależny od ER i apoptozę (fragmentacja PARP, aktywacja kaspazy 3/7, kondensacja chromatyny)
- lipidowe nanokapsuły w wysokich stężeniach (1-2 mg/ml) hamowały proliferację komórek i redukowały znacząco ich żywotność, generowały stres oksydacyjny (wzrost poziomu ROS i peroksydację lipidów) zależny od aktywacji czynników transkrypcyjnych ATF4 i Nrf2 oraz indukowały ferroptozę

- lipidowe nanokapsuły lokowały się w lizosomach komórek, w pobliżu błony lizosomalnej zaburzały funkcjonowanie lizosomów i ich (wzrost pH lizosomów) oraz destabilizowały transport dkomórkowy i obniżały tempo endocytozy
- lipidowe nanokapsuły:
  - 1) wywoływały stres zależny od ER i odpowiedź UPR komórek (obniżenie biosyntezy białka, zwiększenie puli nieprawidłowo sfałdowanych białek, wzrost ekspresji kinazy PERK) oraz aktywację czynników transkrypcyjnych ATF4 i Nrf2
  - 2) indukowały zintegrowaną odpowiedź komórek na stres (ISR): fosforylację czynnika eIF2 $\alpha$  z udziałem kinazy HRI
  - 3) indukowały ferroptozę (tylko w komórkach potrójnie negatywnego raka piersi)

## Etap 2

### 2.1. Ocena aktywności paklitakselu dostarczanego w nanokapsułach lipidowych do komórek raka piersi człowieka

Opisane powyżej cytotoksyczne właściwości pustych, lipidowych nanokapsuł były widoczne w komórkach raka piersi tylko wtedy, kiedy stosowane nanoprzenośniki podawane były w bardzo wysokich stężeniach. Należy jednak pamiętać, że podstawowym zadaniem nanokapsuł LNCs jest dostarczenie wysoce toksycznych terapeutyków do komórek nowotworowych. Dlatego też w dalszej części prowadzonych badań sprawdziłam, jak wyglądała aktywność przeciwnowotworowa paklitakselu (PTX) umieszonego w lipidowych nanokapsułach. W zastosowaniu klinicznym w Polsce, PTX jest używany jako składnik chemioterapii dla pacjentek z potrójnie negatywnym nowotworem piersi, ale czasem również w przypadkach zdiagnozowanych jako HER2+. Lek najczęściej podaje się w połączeniu z cyklofosfamidem i DOX. Jako monoterapia, PTX jest stosowany w leczeniu uzupełniającym raka piersi, w cyklach leczenia trwających od 3 do 6 miesięcy [39].

Lipidowe nanokapsuły pełniące rolę nanoprzenośników dla PTX były stosowane w nietoksycznych stężeniach [IB-3], 1600 razy niższych od tych opisywanych w etapie 1.2. i stosowanych w pracy IB-2. Ze względu na wysoką toksyczność ogólnoustrojową PTX, niską swoistość działania wobec komórek nowotworowych oraz indukowanie zjawiska oporności wielolekowej, dostarczenie leku bezpośrednio do regionu niszy guza jest zabiegiem wysoce pożądanym. PTX będący inhibitorem depolimeryzacji mikrotubul hamuje podziały komórkowe i indukuje apoptozę. W pracy IB-3 sprawdziłam możliwości zastosowania lipidowych nanokapsuł, o trzech średnicach hydrodynamicznych, tj. 50, 90 i 120 nm jako potencjalnych nanotransporterów dla PTX. Dodatkowo, w części eksperymentów stosowałam nanokapsuły LNCs wyznakowane DID. Lipidowe nanokapsuły, syntetyzowane przez zespół prof. Giri z Indyjskiego Instytutu Technologii w Hyderabad (Indie), cechowały się ujemnym potencjałem zeta (od -9 mV do -5mV), niskim indeksem polidispersyjności oraz rzeczywistą średnicą bardzo zbliżoną do oczekiwanych wartości. Skuteczność enkapsulacji PTX wynosiła >98% w odniesieniu do teoretycznego wypełnienia nanokapsuł lekiem, który był rozpuszczony w 1,5% (w/w) roztworze fosfolipidów - Labrafac. Wszystkie trzy testowane nanoukłady były stabilne



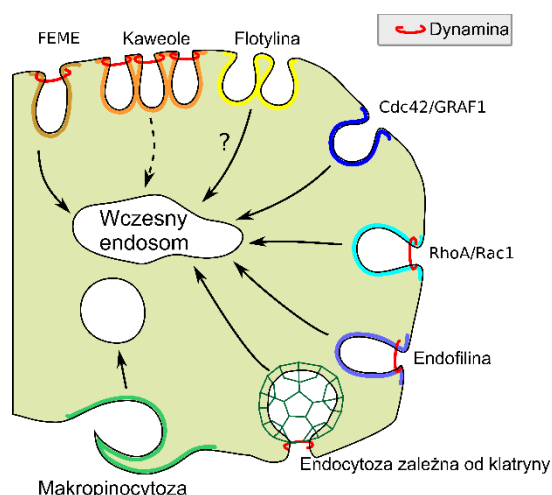
w temperaturze 4°C nawet do 2 miesięcy od syntezy. Uwalnianie PTX z lipidowych nanokapsuł, mierzone za pomocą HPLC przy pH 5,0 i 7,4, w ciągu pierwszych 12 godzin inkubacji było szybkie i wynosiło około 12%, a potem, przez resztę inkubacji trwającej aż do 72 godzin znacznie spadało. Jednocześnie, podczas trwania tego doświadczenia, parametry fizykochemiczne charakteryzujące lipidowe nanokapsuły były niezmiennie.

Przenosząc badania na *poziom in vitro*, eksperymenty rozpoczęto od pomiaru internalizacji nanokapsuł LNCs do komórek raka piersi człowieka. W tym celu zastosowano: technikę HPLC, mikroskopię fluorescencyjną i cytofluorometrię przepływową. Zaobserwowano, że akumulacja różnej wielkości lipidowych nanokapsuł była największa w komórkach linii MDA-MB-468 i rosła wraz ze zwiększeniem się średnicy nanoukładów LNCs. Korelację między średnicą nanocząstek i ich zwiększonym transportem dokomórkowym nanokapsuł LNCs zaobserwowali także inni badacze prowadząc doświadczenia na komórkach raka jelita grubego Caco-2 [38] i neuroblastomy C-6 [39].

Wyniki otrzymane z pomiarów HPLC potwierdziły, że lek, który uwalniał się z lipidowych nanokapsuł po 3 godzinach inkubacji, osiągał w cytosolu komórek MDA-MB-468 około 9-krotne wyższe stężenie niż PTX podawany w wolnej formie i zachowywał swoje przeciwnowotworowe właściwości. Porównując wyniki otrzymane z testu redukcji MTT oraz pomiaru inkorporacji [<sup>3</sup>H] tymidyny do DNA, nie zanotowano różnic między spadkiem przeżywalności komórek traktowanych wolnym PTX lub lekiem enkapsulowanym w nanonośnikach LNCs odpowiednio o średnicach 50, 90 i 120 nm. Zaobserwowano natomiast, że PTX, dodany do hodowli w każdej badanej formie, wyraźnie hamował aktywność metaboliczną komórek, gdy inkubacja z nanosystemami LNCs-PTX była wydłużona do 72 godzin. Na tym etapie badań dowiodłam, że **przenoszenie PTX w lipidowych nanokapsułach okazało się skutecznym sposobem dostarczenia leku do komórek nowotworowych z zachowaniem jego cytotoksycznych właściwości.**

Dla zachowania cytotoksyczności PTX enkapsulowanego w lipidowych nanokapsułach duże znaczenie mogą mieć mechanizmy transportu nanosystemów do komórek raka piersi człowieka. Wprawdzie wyniki prowadzonych badań z zastosowaniem techniki HPLC pokazały, że lipidowe nanokapsuły są stabilne w roztworach, to mogą one być w pewnym stopniu hydrolizowane po absorpcji do komórek. W pracy **IB-2** wykazałam, że nanokapsuły LNCs wypełnione DID były endocytowane i transportowane do lizosomów, ale inkubacja komórek raka piersi człowieka z wysokimi stężeniami tych nanoukładów hamowała syntezę białek, indukowała odpowiedź komórek na warunki stresowe i wpływała (w odwracalny sposób) na lizosomalne pH. Mając na uwadze, że powyższe zjawiska mogły wpływać na uwalnianie się leku do cytosolu, zbadałam mechanizmy endocytozy lipidowych nanonośników do komórek MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-438 (Rys.8). Ze względu na brak różnic w antyproliferacyjnych właściwościach nanokapsuł o różnej średnicy wypełnionych PTX, w dalszych doświadczeniach zastosowałam nanoprzenośniki LNCs-DID o średnicy 90 nm. Pierwszym etapem tej części badań było sprawdzenie czy dynamina, tj. GTPaza, która: 1) pośredniczy w formowaniu się kaweoli, 2) bierze udział w endocytozie zależnej od endofiliny (FEME, ang. fast endophilin-mediated

endocytosis) lub 3) białka Rho, 4) jest konieczna do zamknięcia się „klatrynowej klatki”; uczestniczy w transporcie lipidowych nanokapsuł do komórki [40]. Wykorzystując linię komórkową HeLaK44A, która przy braku tetracykliny w medium hodowlanym wykazuje ekspresję zmutowanej, niezaangażowanej w endocytozę dynaminy [41], zauważyłam, że lipidowe nanokapsuły były transportowane do komórek. Ich akumulacja była nawet wyższa niż w macierzystej linii komórkowej HeLa, w której to ekspresji ulegała prawidłowa dynamina. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie potwierdziły, że pomimo braku biorącej udział w endocytozie dynaminy, lipidowe nanokapsuły były dostarczane do komórek nowotworowych. Dowiodłam, że obecność dynaminy nie jest konieczna do tego, aby lipidowe nanokapsuły dostawały się do komórek nowotworowych raka piersi człowieka. Z kolei kaweole, które są pęcherzykami błonowymi o wymiarach 50 - 80 nm [42], nie mogły być zaangażowane w transport lipidowych nanokapsuł, których średnica była równa około 90 nm. Ponadto zastosowanie genisteiny, inhibitora kinazy tyrozynowej [43], który blokuje formowanie się kaweoli nie ograniczyło transportu nanokapsuł LNCs do komórek. Zresztą do powstania kaweoli konieczny jest też cholesterol [44], który został usunięty z błony komórkowej po działaniu metyl- $\beta$ -cyklodekstranu. Po działaniu tego inhibitora, dochodziło do obniżonej akumulacji lipidowych nanokapsuł w komórkach. Warto jednak zaznaczyć, że cholesterol jest podstawowym steroidem błony komórkowej w każdej komórce zwierzęcej, a zatem musi być zaangażowany w większość procesów transportu dokomórkowego, w tym także makropinocytozę [45]. Dowodem na to, że makropinocytoza bierze udział w wewnątrzkomórkowej akumulacji lipidowych nanokapsuł, głównie w komórkach MCF-7 i MDA-MB-438, był widoczny efekt inhibitora EIPA (ang. 5-[N-ethyl-N-isopropyl] amiloride). Inhibitor ten hamuje wymianę jonów sodowych i protonów oraz obniża rekrutowanie białka Rac, służącego do utworzenia funkcjonalnych makropinosomów [46].



Inhibitor	Rola w komórce
<b>metyl-<math>\beta</math>-cyklodekstran</b>	usuwa cholesterol z błony komórkowej
<b>ML-141</b>	inhibitor białka Cdc-42
<b>latrankulina B</b>	blokuje polimeryzację aktyny
<b>wortmanina</b>	inhibitor kinazy fosfatydyloinozytolu
<b>genisteina</b>	inhibitor kinazy tyrozynowej
<b>EIPA</b>	hamuje wymianę jonów sodu i protonów

Rys. 8 Szlaki endocytozy w komórce ssaków i inhibitory stosowane w badaniach [IB-3].

Do utworzenia makropinosomów potrzebne są też aktywne filamenty [47], których formowanie zostało zablokowane przez latranukulinę B, co w konsekwencji doprowadziło do redukcji transportu

lipidowych nanokapsuł do komórek (głównie komórek linii MCF-7 i MDA-MB-438) w podobnym stopniu jak po działaniu EIPA. Innym mechanizmem, który był zaangażowany w transport lipidowych nanokapsuł do komórek raka piersi był szlak niezależny od dynaminy Cdc42/GRAF1, który jest odpowiedzialny za transport do komórki substancji odżywczych w fazie płynnej [48]. Świadczą o tym: **po pierwsze** widoczny efekt działania ML141 - inhibitora dla GTPazy Cdc42 [49], białka wspomagającego polimeryzację aktyny i tworzenie się wypustek cytoplazmatycznych – filopodiów. **Po drugie**, zauważalny był efekt inhibitora wortmaniny, która prowadziła do inhibicji kinazy 3-fosfatydyloinozytolu [48]. Warto jednak podkreślić, że zarówno kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, jak i GTPaza Cdc42 są konieczne także do prawidłowego przebiegu makropinocytozy, a działanie wortmaniny i inhibitora ML141 nie jest w pełni specyficzne. Doświadczenia prowadzone z zastosowaniem lipidowych nanokapsuł wyznakowanych DID dowiodły, że **w dokomórkowy transport nanokapsuł LNCs zaangażowane są: makropinocytoza i szlak Cdc42/GRAF1, które do pełnego funkcjonowania nie wymagają udziału dynaminy.**

Ponadto udział makropinocytozy i szlaku Cdc42/GRAF1 potwierdziłam podczas oznaczeń cytotoksyczności nanokapsuł wypełnionych PTX, wykonanych za pomocą testu inkorporacji do DNA [<sup>3</sup>H] tymidyny. Wykazałam, że 2 godzinna preinkubacja ze stosowanymi inhibitorami (poza latrankuliną B, która działała tylko wtedy, kiedy była obecna w medium hodowlanym) obniżała cytotoksyczność lipidowych nanokapsuł z enkapsulowanym PTX w komórkach MCF-7. Jednakże w komórkach HeLaK44A cechujących się ekspresją zmutowanej (niezaangażowanej w endocytozę dynaminy), zaobserwowałam działanie leku zamykanego w nanokapsułach LNCs. Taki wynik dowodzi, że pomimo braku funkcjonalnej dynaminy, PTX był dostarczany do komórek raka piersi człowieka. **Na tym etapie badań pokazałam, że internalizacja lipidowych nanokapsuł jest konieczna do uwolnienia się z nich PTX i obniżenia syntezy DNA w komórkach.** Ponadto, moje obserwacje dowodzą, że szlaki endocytozy, w których bierze udział dynamina, nie są konieczne do transportu nanokapsuł LNCs-PTX do komórek i cytotoksycznego działania leku, który w tych nanokapsułach był transportowany. Zastosowany panel inhibitorów dla procesów endocytozy nanokapsuł LNCs jednoznacznie nie wykluczył możliwości zaangażowania szlaków transportu dokomórkowego zależnych od dynaminy (Rys. 8). **Głównymi mechanizmami, które sprzyjają akumulowaniu się w komórce lipidowych nanokapsuł są makropinocytoza i endocytoza typu Cdc42/GRAF.**

W kolejnym etapie badań skupiłam się na sprawdzeniu czy lek enkapsulowany w nanonośnikach LNCs wykazywał działanie proapoptotyczne. Stosując metodę immunoblotingu, wykazałam, że lipidowe nanokapsuły wypełnione PTX indukowały fragmentację PARP po 48 i 72 godzinnej inkubacji. Ponadto, w tych samych warunkach eksperymentu, zaobserwowałam również fragmentację prokaspazy-3, ale tylko w komórkach MDA-MB-231 i MDA-MB-438, ponieważ w komórkach MCF-7 to białko nie ulega ekspresji [50]. Kiedy komórki były poddane obserwacjom mikroskopowym zauważyłam charakterystyczne dla apoptozy zmiany morfologiczne, to jest obkurczanie się komórek i uwypuklenia błony komórkowej. Warto

zaznaczyć, że tych markerów apoptozy nie zaobserwowałam, gdy komórki były traktowane pustymi lipidowymi nanokapsułami, w stężeniach równym stężeniom nanomateriału, które były wykorzystane do enkapsulacji leku.

Jednym z pierwszych etapów badań biologicznych, które tyczą się zastosowania nowych nanoprzenośników leków są doświadczenia obrazujące biodystrybucję tych nanosystemów na poziomie całego organizmu. Istnieje wiele danych literaturowych dowodzących, że tylko 1% podawanych nanopreparatów dociera do niszy nowotworu. Już pierwsze badania prowadzone na zwierzętach, bez wyindukowanego guza, pozwoliły uzyskać odpowiedź na pytanie co dzieje się z resztą podawanych do ustroju nanoprzenośników [51]. W prowadzonych badaniach wykorzystano samice atymicznych myszy typu nude foxn1nu, którym podawano dożylnie nanokapsuły LNCs-DID o średnicy 90 nm w dwóch stężeniach: 0.4 i 0.8 mg/iniekcję. Pomiar natężenia fluorescencji całego ciała zwierząt były prowadzone po 1 i 24 godzinach, natomiast eksperymenty dotyczące akumulacji lipidowych nanoprzenośników w różnych organach przeprowadzono po 2, 4 i 48 godzinach. Wyniki tych eksperymentów pokazały, że nanokapsuły LNCs akumulowały się głównie w wątrobie i nerkach, ale i bardzo szybko były z tych organów usuwane. Prowadzone badania były zgodne z wynikami grupy Lacoueille i wsp., które pokazały, że PTX podawany w formie lipidowych nanokapsuł, znakowanych izotopem węgla  $^{14}\text{C}$ , utrzymywał się w ustroju tak samo długo jak monitorowany przez nas znacznik fluorescencyjny DID, wypełniający nanokapsuły LNCs [52]. **Badania prowadzone na poziomie *in vivo* potwierdziły, że lipidowe nanokapsuły są dobrymi kandydatami, przeznaczonymi do dostarczania do ustroju substancji hydrofobowych, w tym leków przeciwnowotworowych (np. PTX) lub znaczników fluorescencyjnych (np. DID).**

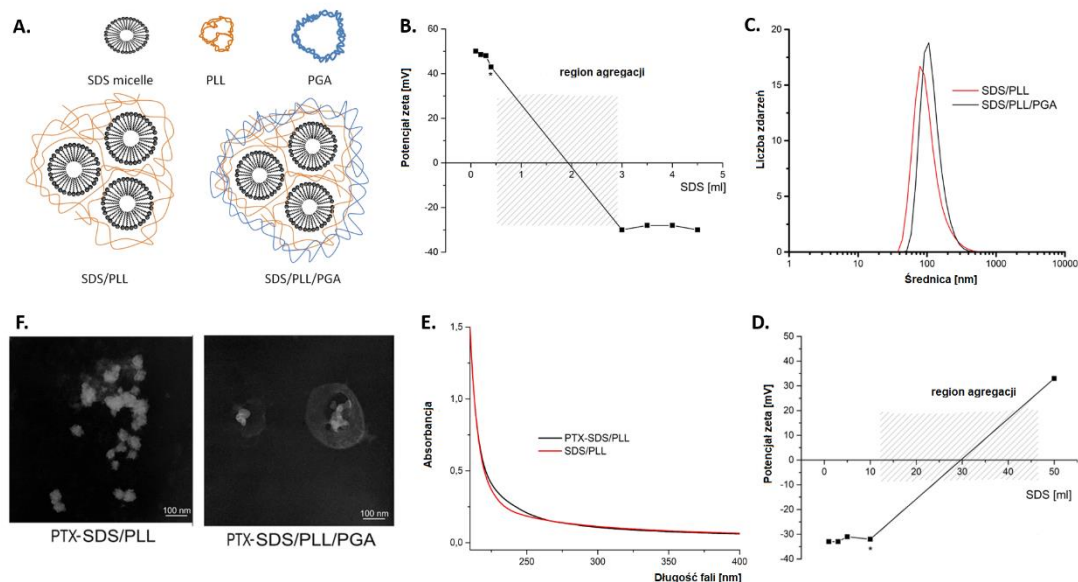
## **2.2. Analiza możliwości zastosowania w terapii raka piersi multirdzeniowych nanonośników polielektrolitowych opartych na wodorozpuszczalnym surfaktancie SDS przeznaczonych do enkapsulacji paklitakselu.**

Do grupy opisywanych wcześniej w osiągnięciu naukowym polimerowych nanomateriałów można zaliczyć także nanonośniki wytwarzane na bazie polielektrolitów, które w roztworze wodnym dysocjują na polianiony i polikationy. Wiele biomakromolekuł, takich jak np. kwasy nukleinowe (DNA, RNA), białka lub polisacharydy jest polielektrolitami [53]. Ich zastosowanie w przygotowywaniu nanonośników jest wysoce pożądane, ponieważ może spowodować wzrost akceptacji nanosystemów przez układy biologiczne oraz wydłużyć ich czas półtrwania w organizmie pacjenta. Wielokrotnie dowiedziono, że zawiesiny nanocząstek w płynach ustrojowych ulegają szybkiej agregacji. Dzieje się tak na skutek różnicy sił jonowych płynów ustrojowych i nanoukładów lub adsorpcji białek surowicy przez podawane nanomateriały. Dlatego, aby obniżyć ryzyko niepożądanych reakcji nanonośnik – płyny biologiczne, powierzchnie nanomateriałów powlekane są hydrofilowymi, elastycznymi i niejonowymi polimerami polielektrolitowymi. Polielektrolity takie jak poli-L- aminokwasy, np. poli-L-lizyna (PLL, ang. poly-

l-lysine) i kwas poli - L- glutaminowy (PGA ang. poly-l-glutamic acid) mają podobne właściwości do łatwo dysocjujących w roztworach wodnych biomakromolekuł, dlatego z powodzeniem zostały wykorzystane do wytwarzania biodegradowalnych nanoonośników polimerowych, metodą sekwencyjnej adsorpcji przeciwnie naładowanych polielektrolitów (LbL, ang. layer by layer) [54].

Dużym przełomem w badaniach nad techniką LbL była propozycja zespołu Sukhorukova [55], w której wykorzystano tę metodę do tworzenia wielowarstwowych polielektrolitów na cząstkach koloidalnych w celu otrzymania nanokapsuły. Cząstki koloidalne mogą zawierać składnik aktywny lub mogą być użyte jako rdzeń kapsuły [56, 57]. Z czasem, zaproponowana metoda tworzenia wielowarstwowych kapsuł powłokowych została rozszerzona na inne rodzaje rdzeni [58], w tym także rdzenie ciekłe [59, 60]. Szczególnym przypadkiem ciekłych rdzeni nanokapsuł są wytwarzane metodą saturacyjną i otulone otoczką polimerową nanoemulsje. Nanokapsuły zawierające ciekły rdzeń nanoemulsji typu olej w wodzie i stabilizowane kationowym surfaktantem, czyli np. solą sodową dokuzanu (AOT, ang. docusate sodium salt) lub bromkiem dioctadecyldimetyloamoniowym (DODBR, ang. dioctadecyldimethylammonium bromide) zostały dobrze scharakteryzowane w badaniach zespołu prof. Szczepanowicza z IKiFP PAN w Krakowie [61, 62], z którym nawiązałam współpracę w 2020 roku. Ponadto, dotychczas opublikowane prace tej grupy dowiodły, że technika LbL jest zasadniczo przeznaczona do enkapsulacji leków hydrofobowych i materiałów rozpuszczalnych w fazie hydrofobowej. Do tej pory, surfaktantami stosowanymi podczas syntezy rdzeni nanokapsuł polielektrolitowych były wyłącznie olejorozpuszczalne środki powierzchniowo czynne. Jednakże, ze względu na konieczność zastosowania wysoce toksycznych rozpuszczalników to jest: chloroformu, cykloheksanu lub etyloglikolu, użycie olejorozpuszczalnych surfaktantów podczas syntezy nanokapsuł metodą LbL stało pod wielkim znakiem zapytania. Prowadzone są intensywne badania nad takimi układami zdyspergowanymi, które dzięki wysokiemu rozdrobieniu substancji aktywnej pozwalają osiągnąć zadowalającą dystrybucję leków w organizmie oraz kontrolę czasu i miejsca ich uwalniania [63]. Biorąc pod uwagę zastosowanie końcowego produktu, to jest nanoonośnika leku do komórki nowotworowej, alternatywnym i bezpieczniejszym rozwiązaniem jest wykorzystanie rozpuszczalnych w wodzie surfaktantów, które to z przeciwnie naładowanym polielektrolitem tworzą kompleks objętościowy (micelle/poliektrolit). Taki kompleks może stanowić również rdzeń tzw. multirdzeniowej, polielektrolitowej nanokapsuły, a wewnątrz miceli tworzy dogodne warunki do enkapsulacji hydrofobowych leków. W realizowanym przeze mnie projekcie Miniatura 4, którego efektem była praca **IB-4** wykorzystałam multirdzeniowe nanokapsułki oparte na wodorozpuszczalnym surfaktancie dodecylosiarczanie sodu (SDS, ang. sodium dodecyl sulphate), którego micelle wraz z przeciwnie naładowanym polielektrolitem – PLL tworzą kompleks SDS/PLL. Kompleks ten wykorzystano jako rdzeń (multirdzeń) nanoonośnika. Cały układ stabilizował PGA, który nadawał nośnikowi ładunek ujemny, poprawiając przy tym jego parametry biologiczne. Mając na uwadze hydrofilowe środowisko komórki nowotworowej, dodatkową zaletą stosowanego nanoonośnika było wyeliminowanie podczas syntezy rozpuszczalników organicznych, np. wspomnianego wcześniej chloroformu. Takie rozwiązanie znacznie ograniczyło ryzyko wystąpienia

niepożądanych efektów cytotoksycznych samego nanomateriału, tworzącego nanokapsułę przeznaczoną do końcowej enkapsulacji leku przeciwnowotworowego, to jest nierozpuszczalnego w wodzie PTX. Opisywane w osiągnięciu naukowym multirdzeniowe nośniki polielektrolitowe SDS/PLL i SDS/PLL/PGA, zostały zsyntetyzowane metodą LbL przez zespół dr hab. Krzysztofa Szczepanowicza.



G.	Nanoukład	Średnica	Potencjał zeta	Stężenie nanonośnika	Stężenie PTX
	SDS/PLL	70 -90 nm	+43 mV	$1 \times 10^8$ nanocząstek/ml	-
	SDS/PLL/PGA	90-110 nm	-33 mV	$1 \times 10^8$ nanocząstek /ml	-
	PTX-SDS/PLL	70 -90 nm	+49 mV	$1 \times 10^8$ nanocząstek /ml	2.07 mg/l
	PTX-SDS/PLL/PGA	90-110 nm	-32 mV	$1 \times 10^8$ nanocząstek /ml	1.85 mg/l

Rys. 9 Właściwości fizykochemiczne multirdzeniowych nanonośników polielektrolitowych: (A) schematyczny model nanokapsuł (B-D), zmiany potencjału zeta multirdzeniowych nanonośników syntetyzowanych na bazie SDS tj. SDS/PLL i SDS/PLL/PGA (C) - optymalne warunki syntezy oznaczono gwiazdką; Rozkład średnicy nanonośników SDS/PLL i SDS/PLL/PGA (E); zmiany potencjału zeta otrzymanych nanonośników, widma absorpcji UV-vis pustych nanonośników wielordzeniowych i nanonośników zawierających PTX (E); obrazy TEM dla multirdzeniowych nanonośników wypełnionych PTX (G), wartości liczbowe dla parametrów fizykochemicznych nanoukładów opisanych w pracy **IB-4**.

Scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne dokonując pomiaru hydrodynamicznej średnicy nanokapsuł oraz ich potencjału zeta. Dodatkowo nanokapsuły zobrazowano za pomocą mikroskopu elektronowego, a efektywność przeprowadzonej enkapsulacji PTX sprawdzono wykreślając widma absorpcji UV-Vis dla nanokapsuł pustych i tych z lekiem. Wykazano, że nanokapsuły SDS/PLL miały średnicę między 70 a 90 nm i ładunek około +43 mV. Kiedy dodano do tych nanokapsuł jeszcze jedną warstwę polielektrolitu, to jest PGA, to ich potencjał zeta osiągał

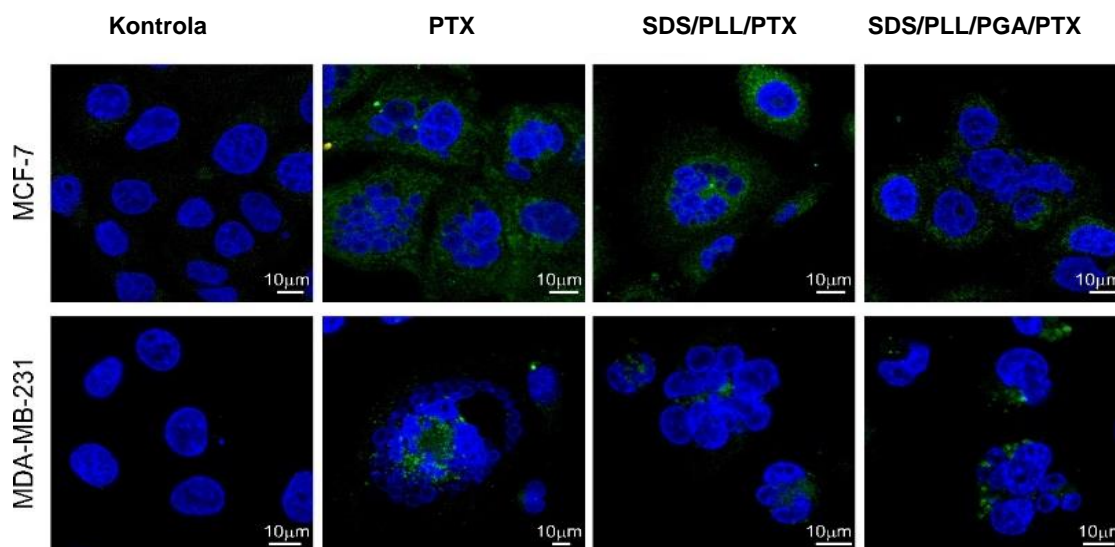
wartości  $-32\text{mV}$ , a hydrodynamiczna średnica wzrastała do  $110\text{ nm}$  (Rys. 9). Enkapsulacja PTX w nanokapsułach SDS/PLLi SDS/PLL/PGA nie zmieniała w istotny sposób ani średnicy, ani potencjału zeta multirdzeniowych nośników polielektrolitowych. Ponieważ wielokrotnie dowiedziono, że zawiesiny nanocząstek w płynach ustrojowych ulegają szybkiej agregacji, warto zaznaczyć, że podczas prowadzonej syntezy tak dobrano warunki reakcji, aby zminimalizować prawdopodobieństwo tworzenia się agregatów multirdzeniowych nanokapsuł.

Eksperymenty opisane w pracy **IB-4**, dotyczące części biologicznej projektu MINIATURA 4 rozpoczęłam od sprawdzenia cytotoksycznych właściwości samych nanonośników, które później były wypełniane lekiem. Badania wykonałam na opisywanych wcześniej, różniących się wrażliwością na estrogen, liniach komórek raka piersi, tj. MCF-7 oraz MDA-MB-231. Stosując test redukcji MTT zanotowałam, że oba typy nanokapsuł, tj. SDS/PLL i SDS/PLL/PGA były obojętne dla komórek i nie obniżały ich przeżywalności, nawet kiedy nanonośniki były obecne w hodowli *in vitro* w stężeniu  $10^7$  NPs/ml przez 96 godzin. Jednocześnie, monitorując tempo wzrostu hodowli przy zastosowaniu mikroskopii świetlnej nie zaobserwowałam zmian w morfologii komórek. Druga część doświadczeń dotyczyła oceny aktywności przeciwnowotworowej PTX, który był enkapsulowany w multirdzeniowych nośnikach polielektrolitowych i dodawany do hodowli komórkowych *in vitro* w formie preparatów SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA/PTX. Ten etap doświadczeń rozpoczęłam od porównania poziomu wewnątrzkomórkowego ATP oraz aktywności metabolicznej mitochondriów (odpowiednio metodami CellTiterGlo i MTT) w komórkach traktowanych wolnym PTX i preparatami SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA/PTX. Oznaczenia przeprowadziłam w czasach 24, 48, 72 i 96 godzin, zauważając, że badane formy leku tj. wolny PTX i ten zamknięty w nanokapsułach, miały podobne właściwości cytotoksyczne. Początkowo, wolny lek wydawał się być bardziej toksyczny w stosunku do obu form enkapsulowanego PTX. Jednakże wydłużenie czasu inkubacji z komórkami sprzyjało utrzymywaniu się cytotoksycznych właściwości jego enkapsulowanej formy, co wskazywałoby na to, że nanokapsuły długo utrzymują się w środowisku i nie ulegają tak szybkiej biodegradacji.

Wykonane oznaczenia poziomu ATP oraz redukcji MTT posłużyły również do wybrania stężeń wolnego PTX i leku zamykanego w nanokapsułkach (tj. 12.5, 25 i 50 nM), które były wykorzystane do dalszych eksperymentów. Z uwagi na fakt, że w swoim działaniu przeciwnowotworowym PTX cechują wysokie właściwości cytostatyczne, sprawdziłam również jak enkapsulowana postać leku wpływa na podziały komórkowe. Oznaczyłam szybkość proliferacji komórek potraktowanych wolnym i enkapsulowanym PTX, mierząc zawartość DNA w komórkach. W tym celu wykorzystywałam sondę molekularną CyQuant, którą cechuje wysoka stała wiązania do DNA. Wykazałam, że wolny PTX, jak i ten zamykany w nanośnikach, w podobny sposób ograniczały podziały komórek. Efektywniejsze wydawały się jednak wysokie stężenia PTX, tj. 50 nM, które w znaczący sposób obniżały tempo proliferacji po 72 i 96 godzinnej inkubacji. Obniżenie tempa syntezy DNA szybko dzielących się komórek nowotworowych wynikało również z indukowania przez PTX apoptozy - jednego z typów programowanej śmierci komórki. Dlatego, w kolejnym etapie prowadzonych badań sprawdziłam w jakim stopniu paklitaksel dostarczany do komórek nowotworowych za pomocą nanonośników SDS/PLL

i SDS/PLL/PGA powodował aktywację kaspaz 3/7. Wiarygodność uzyskanych rezultatów potwierdziłam stosując specyficzny inhibitor kaspazy 3 – zVAD-FMK. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że do autokatalitycznego cięcia kaspaz 3 /7 dochodziło w komórkach MDA-MB-231. Z uwagi na fakt, że komórki MCF-7 nie posiadają aktywnej kaspazy 3, w tej linii komórkowej nie zanotowałam wzrostu aktywacji tego enzymu. Interującym wydaje się fakt, że wolny paklitaxel i obie jego enkapsulowane formy prowadziły do wzrostu poziomu aktywności kaspaz 3/7 w takim samym stopniu, bez wyraźnych różnic między badanymi formami leków.

Równocześnie przy monitorowaniu zmian aktywności kaspaz 3/7 w komórkach poddanych inkubacji PTX, SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA/PTX prowadziłam obserwacje mikroskopowe. Zaobserwowałam, że do widocznego zmniejszenia się liczebności populacji komórek dochodziło przy 48 i 72 godzinnej inkubacji, a zmiany morfologii komórek, takie jak ich obkurczanie się komórek i formowanie się ciałek apoptotycznych zanotowałam przy 50 nM wolnego i zamykanego w obu typach nanonośników PTX. Takie wyniki wykonanych obserwacji skłoniły mnie do zbadania eksternalizacji fosfatydyloseryny, jednego z markerów programowanej śmierci komórki. Stosując cytofluorymetrię przepływową, zmierzyłam odsetek komórek apoptotycznych, który znacznie przekraczał 50% w hodowli komórek MDA-MB-231, poddanych ciągłej 72 godzinnej inkubacji wolnym PTX lub SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA/PTX w stężeniu 50 nM.



Rys. 10 Komórki raka piersi człowieka (MCF-7 i MDA-MB-231) wybarwione mieszaniną Aneksyna V – FITC/DAPI po 72 godzinnej inkubacji z multirdzeniowymi nośnikami polielektrolitowymi z enkapsulowanym PTX.

Równocześnie, morfologiczne markery charakterystyczne dla komórek apoptotycznych (kondensacja chromatyny, formowanie się ciałek apoptotycznych i intensywna, zielona fluorescencja wynikająca z eksternalizacji fosfatydyloseryny) zilustrowano dzięki obrazowaniu wykonanemu na mikroskopie konfokalnym (Leica microsystems, Niemcy) stosując mieszaninę barwników Aneksyna-V – FITC i DAPI (Rys. 10). Mając na uwadze fakt, że mitochondria są ważnymi dla apoptozy organellami komórkowymi, w kolejnych etapach badań zmierzyłam zmiany



potencjału błonowego mitochondriów ( $\Delta\psi$ ), które były indukowane przez obie testowane nanoformy PTX. Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że  $\Delta\psi$  spadał poniżej 50 % jeśli badane komórki nowotworowe były inkubowane przez 72h z SDS/PLL/PTX oraz SDS/PLL/PGA/PTX. Okazało się również, że zaburzenia homeostazy mitochondriów wynikały nie tylko z funkcjonalnych uszkodzeń tych organelli, ale także ze zmian ekspresji proapoptotycznych genów, które są kluczowe w aktywowaniu zależnej od mitochondriów apoptozy. Stosując technikę RT-PCR zaobserwowano, że preparaty SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA /PTX zwiększały poziom mRNA dla Bax, AIF, cyt c, casp-3 w podobnym zakresie jak wolna forma leku. Tym samym potwierdziłam hipotezę, że PTX enkapsulowany w multirdzeniowych nośnikach polielektrolitowych indukuje apoptozę podobnie jak sam PTX.

**Najważniejszymi osiągnięciami drugiego etapu badań było wykazanie, że:**

- *lipidowe nanokapsuły mogą być stosowane jako nanoprzenośniki leków*
- *internalizacja lipidowych nanokapsuł do komórek odbywała się na drodze endocytozy, bez udziału dynaminy (makropinocytozy lub endocytozy typu Cdc42/GRAF), a przy zahamowanej endocytozie enkapsulowany paklitaxel wykazywał mniejszą cytotoksyczność wobec komórek raka piersi*
- *PTX enkapsulowany w lipidowych nanokapsułach zachowywał swoje właściwości cytotoksyczne wobec komórek raka piersi człowieka: hamował proliferację, obniżał przeżywalność i indukował apoptozę (fragmentacja PARP, aktywacja kaspazy 3)*
- *nie stwierdzono różnic między spadkiem przeżywalności komórek traktowanych wolnym PTX i PTX enkapsulowanym w lipidowych nanokapsułach*
- *multirdzeniowe nanonośniki SDS/PLL I SDS/PLL/PGA były nietoksyczne dla komórek raka piersi człowieka*
- *PTX enkapsulowany w nanonośnikach i stosowany w formie nanopreparatów SDS/PLL/PTX i SDS/PLL/PGA/PTX wykazywał podobną cytotoksyczność wobec ludzkich komórek raka piersi jak wolny PTX*
- *PTX zamykany w multirdzeniowych nanokapsułach polielektrolitowych indukował apoptozę i charakterystyczne dla niej zaburzenia funkcjonowania komórek (eksternalizację fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej, spadek potencjału błonowego mitochondriów, wzrost ekspresji proapoptotycznych genów Bax, cyt c i AIF).*

### **Etap 3**

#### **3.1. Zbadanie oddziaływania nanocząstek zaprojektowanych do terapii i diagnostyki raka piersi i raka kości (scyntygrafia) na komórki śródbłonka naczyniowego człowieka.**

W prowadzonych do tej pory rozważaniach naukowych skupiłam się głównie na oznaczeniu cytotoksycznych właściwości nanosystemów wobec modelowych komórek nowotworowych raka piersi człowieka. Nie należy jednak zapominać, że opisywane

w osiągnięciu naukowym nanopreparaty, jeśli byłyby w przyszłości stosowane klinicznie, będą prawdopodobnie podawane na drodze dożylnych iniekcji. Toteż istotnym elementem przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego było zbadanie w jaki sposób śródbłonek naczyniowy reaguje na działanie nanomateriałów. Podczas badań nad odpowiedzią indukowaną przez nanomateriały wobec endotelium człowieka, należy wziąć pod uwagę, że komórki śródbłonek tworzą w organizmie dynamiczną tkankę pokrywającą światło ludzkich naczyń krwionośnych [64]. Ze względu na heterogenność fenotypu i obecność połączeń ścisłych, śródbłonek reguluje przepływ substancji rozpuszczonych i przepuszczalność płynów między krwią, a innymi tkankami. Jednakże wiele substancji (w tym leki, przeciwciała, hormony) oddziałuje ze ścianą naczynia krwionośnego i moduluje zarówno metabolizm, jak i funkcję bariery endotelialnej [65]. Z tego powodu badania prowadzone na komórkach śródbłonek są niezwykle ważne w ujęciu nanotoksykologicznym, głównie ze względu na możliwe interakcje na poziomie endotelium – nanomateriały [66]. Ponadto, substancje w skali nano- mogą modulować szczelność śródbłonek, a zjawiska temu towarzyszące są coraz częściej stosowane w celu pokonania barier naczyniowych i zwiększenia wychwytu komórkowego substancji terapeutycznych w docelowym miejscu np. niszy nowotworu piersi.

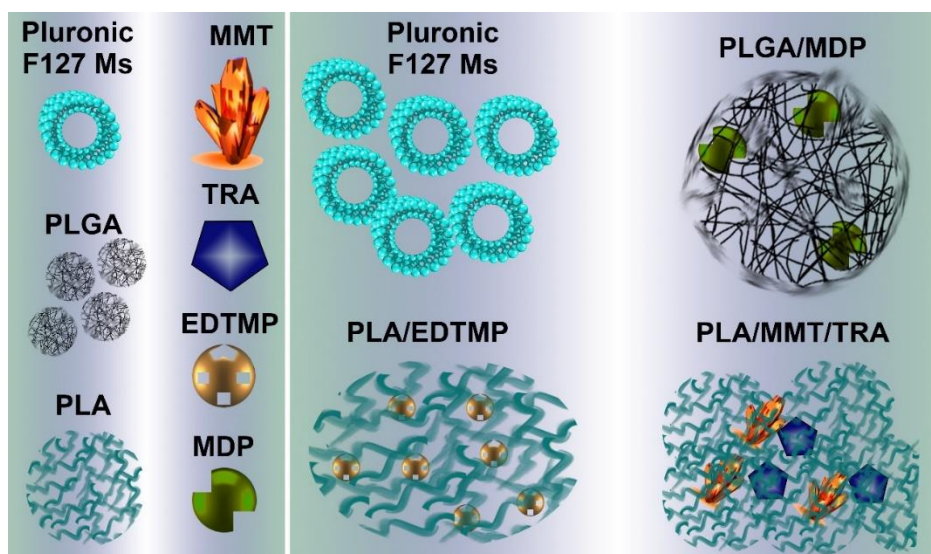
W odniesieniu do nanocząstek, żywotność i proliferacja komórek śródbłonek jest konsekwencją właściwości fizykochemicznych stosowanych nanomateriałów, to jest rozmiaru, kształtu, rozpuszczalności i ich ładunku powierzchniowego [67]. Nanocząstki mogą indukować sieciowanie receptorów komórkowych, inicjować procesy sygnalizacyjne, indukować zmiany strukturalne na powierzchni komórek i zakłócać prawidłowe funkcjonowanie śródbłonek [68]. Wpływ nanomateriałów na funkcjonowanie śródbłonek jest bardzo często pierwszym etapem badań, których efekt może być pomocny w zrozumieniu potencjalnego wpływu NPs na układy *in vivo*. W badaniach opisywanych w tej części osiągnięcia naukowego, podjęto próbę zweryfikowania hipotezy badawczej, że nanocząstki mogą ujawniać właściwości cytotoksyczne i wpływać na homeostazę komórek śródbłonek, nawet gdy nie zawsze obniżają żywotności tych komórek. Materiałem biologicznym w prowadzonych rozważaniach [IB-5] były immortalizowane komórki śródbłonek naczyniowego żyły pępowinowej człowieka (HUVEC-ST), a w pracach badawczych wykorzystano cztery rodzaje nanoukładów (Rys. 11):

- nanocząstki polimerowe octanu kwasu polimlekowego (PLA, ang. polylactic acetate) i montmorylonitu (MMT, ang. montmorillonite) modyfikowane przeciwciałem monoklonalnym TRASTUZUMAB (**PLA/MMT/TRA**), które jest specyficznie ukierunkowane na zewnątrzkomórkową domenę receptora HER2 [69]
- nanocząstki **PLA/EDTMP** będące polimerami kwasu etylenodiamino-N,N,N',N' tetrametylenofosfonowego (EDTMP, ang. Ethylene-diamine-tetramethylene-phosphonate) powlekane kwasem polimlekowym (PLA, ang. polylactic acetate), które są zaprojektowane do leczenia raka piersi i kości [70]
- NPs krzemionkowe (**PLGA/MDP**) modyfikowane difosforanem metylenu (MDP, ang. methylene diphosphate) sprzężonym z kwasem polimlekowo-glikolowym (PLGA, ang.), które mogą być stosowane w scyntygrafii [71]

- nanomicelle niejonowego surfaktanta (**Pluronic F127 Ms**), które są nanosystemami zaprojektowanymi do transportowania substancji hydrofobowych i przeznaczone do podania doustnego, podskórnego i przez drogi oddechowe [71].

Nanocząstki (Rys. 11) miały średnicę hydrodynamiczną w zakresie od 140 do 278 nm i ładunek zbliżony do neutralnego lub słabo dodatniego (potencjał zeta był w granicach od + 0,4 do + 7,9 mV). Indeks polidispersyjności (PDI, ang. polydispersity index) wahający się od 0,19 do 0,30 wskazywał na niskie prawdopodobieństwo tworzenia agregatów przez badane nanoukłady.

## A



B	Nanopreparaty	Średnica (nm)	Potencjał zeta (meV)	PDI	Efektywność enkapsulacji (%)
	PLA/MMT/TRA	278 ± 4.2	0.4 ± 0.6	0.21	90
	PLA /EDTMP	265.9 ± 2.8	0.2 ± 0.1	0.19	70
	PLGA/MDP	207 ± 2.4	4.6 ± 1.5	0.27	78
	NMs	140 ± 1.2	7.9 ± 0.2	0.3	100

Rys. 11 Schemat budowy (A) i właściwości fizykochemiczne nanosystemów opisywanych w pracy **IB-5** (B) tj.: średnica hydrodynamiczna, potencjał zeta, PDI i efektywność enkapsulacji dla nanoukładów PLA/MMT/TRA, PLA/EDTMP, PLGA/MDP i Pluronic F127 Ms.

Opisywane w pracy **IB-5** nanoukłady w różny sposób zmieniały przeżywalność komórek HUVEC-ST. Oznaczenia wykonano dwoma metodami, tj. wychwytem czerwieni obojętnej (Neutral Red) i testem redukcji resazury (Alamar blue). Omawiając różnice w przeżywalności komórek śródbłonna po działaniu nanocząstek, nie sposób pominąć większego efektu toksycznego dla nanomiceli Pluronic F127, który zaobserwowano w teście Neutral Red. Różnice te wynikały z uszkodzeń lizosomów, w których dochodzi do mierzonej w tym doświadczeniu wychwyte czerwieni obojętnej. Toksyczne właściwości nanocząstek potwierdziłam obserwując: spadek szybkości proliferacji komórek HUVEC-ST i obniżenia stopnia ich konfluencji w hodowli *in vitro*. Mając na uwadze, że zahamowanie szybkości podziałów komórkowych może wynikać z uszkodzeń DNA jakie są indukowane przez nanomateriały,

sprawdziłam metodą kometową czy dochodziło do tworzenia jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA (SSBs, ang. single strand breaks, DSBs, ang. double strand breaks) oraz miejsc alkilolabilnych w komórkach śródbłonna traktowanych nanocząstkami. Największą genotoksyczność (tj. około 25%) obserwowano dla nanoemulsji Pluronic F127 Ms już po 24 godzinach inkubacji. Jednakże, kiedy komórki HUVEC-ST traktowano przez 72 godziny nanoukładami: PLA/MMT/TRA, PLGA/MDP zanotowano uszkodzenia DNA na poziomie około 12 %, ale tylko przy najwyższym stężeniu 100 µg/ml. Najmniejsze uszkodzenia DNA powodowały nanocząstki PLA-EDTMP. Różnice w genotoksyczności nanocząstek zasugerowały, że komórki śródbłonna naczyniowego człowieka mogły naprawić uszkodzenia DNA indukowane przez nanomateriały dzięki m.in. ekspresji genów dla kinaz ATM (ang. Ataxia-telangiectasia mutated kinase) lub ATR (ang. Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase). Komórki eukariotyczne posiadają w swojej maszynerii genetycznej szlaki przekazywania sygnałów zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA podczas ciągłej ekspozycji na egzogenne i endogenne czynniki genotoksyczne [72]. Wysoce konserwatywne kinazy ATM i ATR nazywane są często „strażnikami” stabilności genomu komórki, toteż w dalszych etapach pracy **IB-5** oceniłam, czy ekspresja tych białek była indukowana przez nanocząstki. Okazało się, że wzrost ekspresji dla obu kinaz zanotowano tylko po podaniu nanomiceli Pluronic F127 Ms, a nanoukład PLA/EDTMP powodował aż 7-krotny wzrost mRNA dla kinazy ATR, aktywowanej głównie przez jednoniciowe pęknięcia DNA [73]. Różnice w zaangażowaniu kinaz, które biorą udział w naprawie uszkodzeń DNA zasugerowały, że oba typy uszkodzeń DNA mogą mieć różne konsekwencje dla dalszej żywotności komórki. Na przykład miejsca alkilolabilne, oznaczane w alkalicznej wersji metody kometowej [**IB-5**], mogą być przekształcone w jedno bądź dwuniciowe pęknięcia DNA. Ponadto, wiele danych literaturowych wskazuje, że w końcowych etapach apoptozy dochodzi do oligonukleosomalnej fragmentacji DNA [74]. Taka też fragmentacja była indukowana, przez wszystkie badane nanocząstki (stosowane w stężeniu 100 µg/ml), kiedy były one obecne w hodowli *in vitro* komórek HUVEC-ST przez 72 godziny. Podobne wyniki badań, uzyskałam w metodzie TUNEL, w której oznaczyłam odsetek komórek cechujących się internukleosomalną fragmentacją DNA z wolnymi grupami 3' -OH. Okazało się jednak, że wśród uszkodzeń DNA, nanocząstki indukowały również dwuniciowe pęknięcia DNA, których markerem jest fosforylacja histonu H2AX. Największy odsetek komórek, które gromadziły ten typ uszkodzeń zanotowałam po 48 godzinach z nanocząstkami co korespondowało ze zwiększoną ekspresją mRNA dla histonu H2AX po 24 godzinnej inkubacji. Obserwacja oligonukleosomalnej, charakterystycznej dla apoptozy fragmentacji DNA zasugerowała, aby dokładnie przyjrzeć się programowanej śmierci komórki indukowanej przez nanocząstki. Stosując podwójne barwienie Hoechs33258/jodek propidyny nie zanotowałam widocznych różnic w odsetku komórek żywych, wczesno apoptotycznych, późno apoptotycznych i nekrotycznych, między stosowanymi czasami inkubacji (to jest po 24, 48 i 72 godzinach). Gdy jednak oznaczono aktywność kaspazy-3, to po 24 godzinach enzym ten był na najwyższym poziomie, gdy zastosowano inkubację z PLA/MMT/TRA, PLA/EDTMP i PLGA/MDP (wyniki zgodne z pomiarem ekspresji mRNA dla kaspazy-3), podczas gdy dla nanoemulsji Pluronic F127 Ms maksymalną aktywność kaspazy-3

osiągnęła po 48 godzinach. W tych samych warunkach eksperymentu sprawdziłam także czy dochodziło w komórkach HUVEC-ST do zaburzenia funkcjonowania mitochondriów. Zaobserwowałam, że  $\Delta\psi$  inicjowane przez cytotoksyczne nanoemulsje Pluronic F127 Ms były na poziomie około 70 %. Natomiast już 24 godzinna inkubacja z nanosystemami PLA/MMT/TRA, PLA/EDTMP obniżała parametr  $\Delta\psi$  do 50%, prowadząc później do hyperpolaryzacji błony mitochondrialnej, obserwowanej po 72 godzinnej inkubacji z nanocząstkami. Jednocześnie już po 24 godzinnej inkubacji z nanocząstkami wzrastała ekspresja mRNA dla *cyt c* i *AIF*, które są markerami wewnętrznej, zależnej od mitochondriów ścieżki apoptozy. Prawdopodobnie zaburzenia homeostazy mitochondriów, do jakich dochodziło głównie po zastosowaniu PLA/MMT/TRA, PLA/EDTMP, PLGA/MDP oraz nanomiceli Pluronic F127 Ms wynikały ze wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu, które były indukowane przez wszystkie badane nanocząstki. Należy jednak pamiętać, że komórki śródbłonna cechują się swoistą wrażliwością na wolne rodniki, które pełnią w endotelium rolę wtórnych przekaźników informacji dla: kinazy Ras (ang. **rat sarcoma virus**), kinazy p-38 aktywowanej mitogenem, białka c-Src (ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) lub receptora dla EGF (ang. **endothelial growth factor**). Ponadto reaktywne formy tlenu produkowane w nadmiernej ilości, głównie w łańcuchu oddechowym mitochondriów, uczestniczą w patogenezie wielu chorób o podłożu sercowo naczyniowym, co wydaje się istotną kwestią przy rozważaniach dotyczących zastosowania nanomateriałów w medycynie.

Choć opisywane w pracy **IB-5** nanocząstki nie zawsze obniżały przeżywalność endotelium, to jednak w swoim działaniu cytotoksycznym zaburzały ich homeostazę. Najbardziej cytotoksyczne były nanomicele Pluronic F127 Ms, a najmniejszą cytotoksycznością cechowały się nanocząstki PLA/EDTMP. Gdzie zatem upatrywać różnic w toksyczności testowanych nanocząstek? Odpowiedzą na to pytanie mogą być przemyślenia dotyczące się wcześniej przedstawionych różnic we właściwościach fizyko-chemicznych nanocząstek. **Po pierwsze**, nanomateriały, o dodatnim potencjale zeta są łatwiej internalizowane do komórek o ujemnym ładunku błony komórkowej. **Po drugie**, to w jaki sposób nanocząstki są transportowane do komórek śródbłonna zależy od średnicy hydrodynamicznej podawanych nanomateriałów. Na przykład endocytoza zależna lub niezależna od klatryny jest typowa dla nanocząstek o średnicy mniejszej niż 150 nm, podczas gdy makropinocytoza jest najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wychwytu nanocząstek większych niż 150 nm [75]. Z kolei, tak typowy dla komórek śródbłonna transport dokomórkowy za pośrednictwem kaweoli, można w tym przypadku wykluczyć, ponieważ opisywane w pracy **IB-5** nanoukłady mają średnicę hydrodynamiczną niekiedy bliską 280 nm, a kaweole opisywane są w literaturze naukowej jako pęcherzyki błonowe nie większe niż 80 nm. **Po trzecie** średnica nanocząstek, to ważny parametr przy rozważaniach dotyczących genotoksyczności nanomateriałów. Należy pamiętać, że wraz ze zmniejszaniem się rozmiaru cząstek wzrasta ich ogólna powierzchnia, a atomy budujące zewnętrzne powłoki nanomateriałów tworzą wiązania chemiczne o wysokiej energii. Tym samym najwyższa toksyczność miceli Pluronic F127 Ms (spośród opisywanych

w pracy **IB-5** nanomateriałów) może być częściowo związana z niewielkim rozmiarem tych nanocząstek i ich stosunkowo dużą reaktywnością.

**Najważniejszymi osiągnięciami trzeciego etapu badań było wykazanie, że:**

- *nanocząstki stosowane w diagnostyce i terapii raka piersi, podawane drogą dożylną, mogą wykazywać właściwości cytotoksyczne wobec komórek śródbłonna mikronaczyniowego człowieka in vitro, pomimo że nie obniżają przeżywalności endotelium.*
- *dla komórek śródbłonna naczyniowego człowieka najbezpieczniejsze były nanocząstki PLA/EDTMP, zaprojektowane do leczenia raka piersi i kości, a nanomicelle Pluronic F127 Ms były najbardziej cytotoksyczne*

**Podsumowanie wyników opisanych w osiągnięciu naukowym, ich znaczenie oraz możliwości zastosowania**

Przedstawione w cyklu publikacji wyniki doświadczeń nad nanopreparatami ukierunkowanymi na leczenie najbardziej agresywnych i lekoopornych nowotworów piersi przyczynią się do stworzenia nowych, lepszych metod terapii tych nowotworów. Chciałabym tutaj zaznaczyć, że moje badania nad nanosystemami przeznaczonymi do dostarczania chemioterapeutyków do obszaru niszy guza **to dziedzina interdyscyplinarna łącząca nauki chemiczne, biologiczne i medyczne**. Nadmieniam, że współpraca naukowa, prowadzona m.in. z: Oslo University Hospital, Indyjskim Instytutem Technologii w Indiach, Uniwersytetem w Rio de Janeiro, oraz Instytutem Katalizy i Fizyko-Chemii Powierzchni im. J. Habera PAN w Krakowie **dostarczyła wielu wyników badań, które poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat nanopreparatów** przeznaczonych do leczenia nowotworów piersi. W osiągnięciu naukowym wykazałam, że budowa stosowanych nanosystemów i ich właściwości fizyko-chemiczne dyktują tożsamość biologiczną nanocząstek, wpływając na to, jak oddziałują one z komórkami raka piersi człowieka i jaki typ stresu w tych komórkach wywołują. Rezultaty prac badawczych jakie wykonywałam na poziomie *in vitro* i *in vivo* pokazały, że już niewielkie różnice w składzie monomerów, które budują testowane nanosystemy korelowały z różną reakcją komórek na stres i typem indukowanej śmierci komórki, wywoływanych przez polimerowe i lipidowe nanoukłady. Ponadto, we wszystkich spośród badanych nanomateriałów zwróciłam szczególną uwagę na ich prooksydacyjne właściwości. Stres oksydacyjny, jaki był indukowany przez opisywane nanoprzenośniki okazał się kluczowy dla aktywności przeciwnowotworowej badanych nanopreparatów.

Warto podkreślić, że równocześnie z prowadzonymi przeze mnie badaniami *in vitro* nad nanocząstkami PACA, w fazie badań klinicznych dotyczących raka wątrobowokomórkowego (ClinicalTrials.gov NCT01655693) znajdują się nanosystemy PEBCA wypełnione doksorubicyną. Obiecujące są również wyniki doświadczeń, będących kontynuacją moich prac badawczych, w których zastosowano nanocząstki PEBCA jako nanonośniki dla cabazitakselu (PEBCA-Cbz) i zbadano toksyczne właściwości tego nanoukładu u myszy z przeszczepem heterogenicznym typu „xenograft” pochodzącym od pacjentek ze zdiagnozowanym potrójnie negatywnym rakiem

piersi. W porównaniu z wolnym Cbz nanosystemem PEBCA-Cbz, cechował się m.in. dłuższym czasem krążenia we krwi, zwiększonym stężeniem leku w guzie i wyższą infiltracją przeciwnowotworowych makrofagów [34].

Chciałabym także nadmienić, że po raz pierwszy na świecie opisałam, w zgłoszeniu patentowym nr WIPO ST 10/C PL443843 możliwość wykorzystania multirdzeniowych nanokapsuł polielektrolitowych (o ciekłych rdzeniach emulsyjnych zbudowanych z miceli SDS) jako nanoprzenośników dla PTX. Badania, które zakończyłam na poziomie *in vitro* dostarczają dowodów na możliwe reakcje, jakie mogą być indukowane przez multirdzeniowe nanoformy PTX na poziomie organizmu i zachęcają mnie do prowadzenia dalszych eksperymentów z wykorzystaniem organoidów i modeli zwierzęcych. Warto podkreślić, że badania jakie prowadziłam będą także kontynuowane z wykorzystaniem narzędzi medycyny translacyjnej, dzięki planowanej współpracy ze szpitalami onkologicznymi na terenie województwa łódzkiego. Wszystkie te argumenty sprawiają, że istnieją realne szanse na to, że badane przeze mnie nanoterapeutyki mogą zaistnieć jako preparaty stosowane w leczeniu nowotworów.

#### **Wnioski, które wynikają z osiągnięcia naukowego:**

- 1) *Lipidowe nanokapsuły mogą być stosowane jako nanoosiężniki substancji hydrofobowych: leków przeciwnowotworowych (PTX) i znaczników fluorescencyjnych (DID)*
- 2) *Lipidowe nanokapsuły, stosowane jako puste nanoprzenośniki, w wysokich stężeniach (1 i 2 mg/ml) hamowały biosyntezę białka oraz powodowały destabilizację lizosomów i spadek pH w cytosolu komórek raka piersi człowieka *in vitro*.*
- 3) *Multirdzeniowe nanokapsuły polielektrolitowe zbudowane z miceli SDS mogą być stosowane jako nanoosiężniki dla paklitakselu, gdyż enkapsulowany lek wykazywał podobne właściwości cytotoksyczne*
- 4) *Nanocząstki zaprojektowane do leczenia raka piersi i kości w niewielkim stopniu obniżyły przeżywalność komórek śródbłonna naczyńowego człowieka i zaburzały homeostazę endotelium.*
- 5) *Niewielkie różnice w budowie chemicznej nanocząstek PACA (PBCA, PEBCA i POCA) wywoływały różną odpowiedź komórek na stres i typ indukowanej śmierci.*

#### **Bibliografia:**

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.
3. Barba, D., et al., *Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know*. Crit Rev Oncol Hematol, 2021. **157**: p. 103174.
4. Gucalp, A., et al., *Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2019. **173**(1): p. 37-48.
5. Sengupta, D., et al., *Dissecting miRNA facilitated physiology and function in human breast cancer for therapeutic intervention*. Semin Cancer Biol, 2021. **72**: p. 46-64.
6. Barzaman, K., et al., *Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments*. Int Immunopharmacol, 2020. **84**: p. 106535.

7. Derakhshan, F. and J.S. Reis-Filho, *Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2022. **17**: p. 181-204.
8. Nikdouz, A., et al., *Comprehensive comparison of theranostic nanoparticles in breast cancer*. *Am J Clin Exp Immunol*, 2022. **11**(1): p. 1-27.
9. Jones, S.E., et al., *Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(34): p. 5381-7.
10. Al-Mahmood, S., et al., *Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options*. *Drug Deliv Transl Res*, 2018. **8**(5): p. 1483-1507.
11. Ghosh, S., et al., *Triple negative breast cancer and non-small cell lung cancer: Clinical challenges and nano-formulation approaches*. *J Control Release*, 2021. **337**: p. 27-58.
12. Robey, R.W., et al., *Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2018. **18**(7): p. 452-464.
13. Sun, R., et al., *The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022. **191**: p. 114614.
14. Subhan, M.A., et al., *Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment*. *J Pers Med*, 2021. **11**(6).
15. Vauthier, C., et al., *Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(4): p. 519-48.
16. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(9): p. 941-51.
17. Savage, D.T., J.Z. Hilt, and T.D. Dziubla, *In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1894**: p. 1-29.
18. Vroman, L., *Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids*. *Nature*, 1962. **196**: p. 476-7.
19. Cedervall, T., et al., *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2050-5.
20. Akkewar, A., et al., *Liposomes in the Targeted Gene Therapy of Cancer: A Critical Review*. *Curr Drug Deliv*, 2023. **20**(4): p. 350-370.
21. Fulton, M.D. and W. Najahi-Missaoui, *Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(7).
22. Landfester, K., *SYNTHESIS OF COLLOIDAL PARTICLES IN MINIEMULSIONS*. *Annual Review of Materials Research*, 2006. **36**(1): p. 231-279.
23. Nicolas, J. and P. Couvreur, *Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2009. **1**(1): p. 111-127.
24. Peynshaert, K., et al., *Exploiting intrinsic nanoparticle toxicity: the pros and cons of nanoparticle-induced autophagy in biomedical research*. *Chem Rev*, 2014. **114**(15): p. 7581-609.
25. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(2): p. 89-102.
26. Pakos-Zebrucka, K., et al., *The integrated stress response*. *EMBO Rep*, 2016. **17**(10): p. 1374-1395.
27. Cao, Y., et al., *A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure*. *Life Sci*, 2017. **186**: p. 33-42.
28. Viswanathan, V.S., et al., *Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway*. *Nature*, 2017. **547**(7664): p. 453-457.
29. Barbero, F., et al., *Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System*. *Semin Immunol*, 2017. **34**: p. 52-60.
30. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. *Nat Mater*, 2009. **8**(7): p. 543-57.
31. Mouritsen, O.G., *Lipids, curvature, and nano-medicine*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011. **113**(10): p. 1174-1187.
32. Vezin, W.R. and A.T. Florence, *In vitro heterogeneous degradation of poly(n-alkyl alpha-cyanoacrylates)*. *J Biomed Mater Res*, 1980. **14**(2): p. 93-106.
33. Garic-Stankovic, A., et al., *Structural constraints for alcohol-stimulated Ca<sup>2+</sup> release in neural crest, and dual agonist/antagonist properties of n-octanol*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006. **30**(3): p. 552-9.
34. Fusser, M., et al., *Cabazitaxel-loaded Poly(2-ethylbutyl cyanoacrylate) nanoparticles improve treatment efficacy in a patient derived breast cancer xenograft*. *J Control Release*, 2019. **293**: p. 183-192.
35. Puri, A., et al., *Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2009. **26**(6): p. 523-80.
36. Theodosiou, T.A., et al., *The diverse roles of glutathione-associated cell resistance against hypericin photodynamic therapy*. *Redox Biol*, 2017. **12**: p. 191-197.
37. Chen, X., et al., *Lysosomal targeting with stable and sensitive fluorescent probes (Superior LysoProbes): applications for lysosome labeling and tracking during apoptosis*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 9004.



38. Roger, E., et al., *Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model*. Journal of Controlled Release, 2017. **253**: p. 11-18.
39. Lacoeyille, F., et al., *Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs*. J Nanosci Nanotechnol, 2007. **7**(12): p. 4612-7.
40. Sandvig, K., S. Kavaliauskiene, and T. Skotland, *Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity*. Histochemistry and Cell Biology, 2018. **150**(2): p. 107-118.
41. Damke, H., et al., *Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin*. J Cell Biol, 1995. **131**(1): p. 69-80.
42. Lamaze, C., et al., *The caveolae dress code: structure and signaling*. Current Opinion in Cell Biology, 2017. **47**: p. 117-125.
43. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 311-20.
44. Luchetti, F., et al., *LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims?* Br J Pharmacol, 2021. **178**(16): p. 3104-3114.
45. Costa Verdera, H., et al., *Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis*. J Control Release, 2017. **266**: p. 100-108.
46. Grimmer, S., B. van Deurs, and K. Sandvig, *Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2953-62.
47. Wakatsuki, T., et al., *Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 1025-36.
48. Thottacherry, J.J., et al., *Spoiled for Choice: Diverse Endocytic Pathways Function at the Cell Surface*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2019. **35**: p. 55-84.
49. Chan, S., et al., *Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(8): p. 2341-54.
50. Jänicke, R.U., *MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3*. Breast Cancer Research and Treatment, 2009. **117**(1): p. 219-221.
51. Skotland, T., T.-G. Iversen, and K. Sandvig, *New metal-based nanoparticles for intravenous use: requirements for clinical success with focus on medical imaging*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. **6**(6): p. 730-737.
52. Lacoeyille, F., et al., *In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **344**(1): p. 143-149.
53. Ivanov, A.S., et al., *Recent Progress of Layer-by-layer Assembly, Free-Standing Film and Hydrogel Based on Polyelectrolytes*. Macromol Biosci, 2021. **21**(10): p. e2100117.
54. Elizarova, I.S. and P.F. Luckham, *Layer-by-layer adsorption: Factors affecting the choice of substrates and polymers*. Adv Colloid Interface Sci, 2018. **262**: p. 1-20.
55. Sukhorukov, G.B., et al., *Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1998. **137**(1): p. 253-266.
56. Szczepanowicz, K., et al., *Formation of biocompatible nanocapsules with emulsion core and pegylated shell by polyelectrolyte multilayer adsorption*. Langmuir, 2010. **26**(15): p. 12592-7.
57. Grigoriev, D.O., et al., *New method for fabrication of loaded micro- and nanocontainers: emulsion encapsulation by polyelectrolyte layer-by-layer deposition on the liquid core*. Langmuir, 2008. **24**(3): p. 999-1004.
58. Borodina, T.N., et al., *Polyelectrolyte multilayered nanofilms as a novel approach for the protection of hydrogen storage materials*. ACS Appl Mater Interfaces, 2009. **1**(5): p. 996-1001.
59. Bazylińska, U., et al., *Influence of dicephalic ionic surfactant interactions with oppositely charged polyelectrolyte upon the in vitro dye release from oil core nanocapsules*. Bioelectrochemistry, 2012. **87**: p. 147-53.
60. Szczepanowicz, K., et al., *Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact*. Adv Colloid Interface Sci, 2015. **222**: p. 678-91.
61. Szczepanowicz, K., et al., *Encapsulation of liquid cores by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes*. J Microencapsul, 2010. **27**(3): p. 198-204.
62. Szczęch, M. and K. Szczepanowicz, *Polymeric Core-Shell Nanoparticles Prepared by Spontaneous Emulsification Solvent Evaporation and Functionalized by the Layer-by-Layer Method*. Nanomaterials (Basel), 2020. **10**(3).
63. Karabasz, A., M. Bzowska, and K. Szczepanowicz, *Biomedical Applications of Multifunctional Polymeric Nanocarriers: A Review of Current Literature*. Int J Nanomedicine, 2020. **15**: p. 8673-8696.
64. Kalebic, T., et al., *Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells*. Science, 1983. **221**(4607): p. 281-3.
65. Freese, C., et al., *In vitro investigation of silica nanoparticle uptake into human endothelial cells under physiological cyclic stretch*. Particle and Fibre Toxicology, 2014. **11**(1): p. 68.
66. Cao, Y., et al., *The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review*. J Appl Toxicol, 2017. **37**(12): p. 1359-1369.
67. Kocherova, I., et al., *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts*. J Clin Med, 2019. **8**(10).

68. Klingberg, H., et al., *Uptake of gold nanoparticles in primary human endothelial cells*. Toxicology Research, 2014. **4**(3): p. 655-666.
69. Nami, B. and Z. Wang, *HER2 in Breast Cancer Stemness: A Negative Feedback Loop towards Trastuzumab Resistance*. Cancers (Basel), 2017. **9**(5).
70. Pacilio, M., et al., *Improving the dose–myelotoxicity correlation in radiometabolic therapy of bone metastases with <sup>153</sup>Sm-EDTMP*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2014. **41**(2): p. 238-252.
71. Gaut, C., et al., *SPECT Imaging of Muscle Injury with [<sup>99m</sup>Tc]MDP in a Mouse Model of Muscular Dystrophy*. Molecular Imaging and Biology, 2020. **22**(3): p. 562-568.
72. Guedes, A.P., et al., *Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits*. Nuclear Medicine and Biology, 2006. **33**(7): p. 915-921.
73. Manic, G., et al., *Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy*. Mol Cell Oncol, 2015. **2**(4): p. e1012976.
74. Zhang, J.H. and M. Xu, *DNA fragmentation in apoptosis*. Cell Res, 2000. **10**(3): p. 205-11.
75. Skotland, T. and K. Sandvig, *Transport of nanoparticles across the endothelial cell layer*. Nano Today, 2021. **36**: p. 101029.
76. Nyitrai, G., et al., *Polyamidoamine dendrimer impairs mitochondrial oxidation in brain tissue*. J Nanobiotechnology, 2013. **11**: p. 9.
77. Labieniec, M., et al., *Effect of poly(amido)amine (PAMAM) G4 dendrimer on heart and liver mitochondria in an animal model of diabetes*. Cell Biol Int, 2009. **34**(1): p. 89-97.

## **5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.**

### **5.1. Opis działań prowadzonych w ramach stażu po-doktorskiego odbytego w Oslo Radium Hospital**

W latach 2016-2019 odbyłam staż podoktorski w zespole prof. Kirsten Sandvig (indeks H=79, liczba opublikowanych prac 336) w Oslo Radium Hospital w Norwegii, w Katedrze Biologii Molekularnej Komórki. Grupa kierowana przez prof. Sandvig, jako jedna z wiodących na świecie od wielu lat zajmuje się badaniem mechanizmu transportu substancji niskocząsteczkowych (w tym trucizn) oraz nanocząstek do komórek człowieka.

Podczas 3 letniego pobytu w Instytucie Badań nad Rakiem, który jest integralną częścią jednostki Oslo University Hospital, pracowałam jako jeden z głównych wykonawców w dwóch projektach badawczych, to jest: "NANOCAN - Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis" oraz „InnoIndigo Nanoplatform-based drug delivery system: combinational therapy against breast and colorectal cancer”.

Celem pierwszego z projektów, w realizację którego byłam zaangażowana, była ocena mechanizmu toksyczności nanocząstek PACA, które w przyszłości mogą być zastosowane jako nanoosiłki dla doksorubicyny i taksanów. Były to pionierskie badania, które trafnie zweryfikowały hipotezę badawczą, że nieznaczące różnice w monomerach, budujących nanocząstki PACA (PBCA, PEBCA, POCA) przekładają się na mechanizmy toksyczności tych nanocząstek. Wyniki prowadzonych przeze mnie doświadczeń dostarczyły przydatnych informacji m.in. o nanocząstkach PEBCA przewidzianych do enkapsulacji cabazitakselu, wysoce toksycznego taksanu stosowanego obecnie w ograniczonych dawkach u pacjentek ze zdiagnozowanym potrójnie negatywnym nowotworem piersi. Badania prowadzone na poziomie *in vivo* sugerują, że nanoukład PEBCA-Cbz poprawia farmakokinetykę Cbz, podczas gdy stosowany do tej pory w wolnej formie lek, ze względu na swoją hydrofobowość, nie może

dawać pożądaných efektów terapeutycznych. Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów zostały opisane w pracy doświadczalnej, która jest częścią przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego. Pozostałe dwa artykuły [IB-2 i IB-3] będące efektem mojego pobytu w Oslo Radium Hospital, dotyczyły oddziaływania lipidowych nanokapsuł, zarówno tych pustych jak i wypełnionych PTX nanonośników z komórkami nowotworowymi raka piersi człowieka. W pierwszej z wymienionych prac [IB-2] przedstawiłam dowody na cytotoksyczność samych, lipidowych nanokapsuł, kiedy badane nanonośniki były stosowane w wysokich stężeniach, to znaczy takich jakie w ustroju mogą być osiągnięte w wątrobie, śledzionie i nerkach. W drugiej dowiodłam, że lipidowe nanokapsuły są dobrymi kandydatami na nanonośniki dla PTX i znacznika fluorescencyjnego DID.

W ostatnich tygodniach pracy w grupie profesor Sandvig, uczestniczyłam także przy realizacji grantu kierowanego przez dr Marię Lyngaas Torgersen na temat "nanoAUTOPHAGY – health implications of nanoparticle-induced changes in autophagy". To praca w tym projekcie wzbudziła moje zainteresowanie tematyką autofagii i możliwościami modyfikacji tego procesu przez nanomateriały. Wiedza zdobyta podczas działań w ramach grantu umożliwiła mi na kierowanie pracą licencjacką o zbliżonych zagadnieniach.

## **5.2. Współpraca naukowa z innymi jednostkami badawczymi**

### Współpraca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora podczas pracy w UŁ:

- prof. Jaques Robert, dr Audrey Laroche-Clary, INSERM U916, Institut Bergonié, Université Bordeaux Segalen, Francja
- dr Ilona Marszałek, Pracownia Chemii Biologicznej Jonów Metali, Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska
- dr Agnieszka Śliwińska, Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

### Współpraca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora podczas pracy w UŁ:

- prof. Ralph Santos Oliveira, Laboratorium Nanoradiofarmaceutyków Uniwersytet Stanowy Zona Oste, Rio de Janeiro, Brazylia
- dr hab. Krzysztof Szczepanowicz, prof. IKiFP PAN, Kraków, Polska
- dr hab. Agnieszka Majkowska prof. Instytutu IChTJ PAN, prof. dr hab. Aleksander Bilewicz, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej, Warszawa, Polska
- prof. Kirsten Sandvig – Katedra Biologii Molekularnej Komórki, Instytut Badań nad Rakiem, Oslo University Hospital, Norwegia
- dr Katarzyna Kania, dr Katarzyna Bednarska – Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź, Polska

- prof. Tomasz Śliwiński, Katedra Genetyki Molekularnej UŁ, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska
- dr hab. Agnieszka Śliwińska, Katedra Biochemii Kwasów Nukleinowych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

#### Współpraca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora podczas pracy naukowej w Olso Rhadium

##### Hospital:

- prof. Jyotsendu Giri - Wydział Inżynierii Biomedycznej, Indyjski Instytut Technologii, Hyderabad, Indie
- prof. Veronique Preat, Katolicki Uniwersytet w Leuven, Instytut Badań nad Lekami, Wydział Farmacji i Nauk Biomedycznych Bruksela, Belgia
- prof. Gunhild Mari Mælandsmo, Katedra Biologii Nowotworów, Instytut Badań nad Rakiem, Oslo University Hospital, Norwegia
- dr Yrr Morch, Katedra Biotechnologii i Nanomedycyny, SINTEF AS, Trondheim, Norwegia
- dr Einar Sulheime, Wydział Nauk Przyrodniczych, Katedra Fizyki, Norweski Uniwersytet Nauki i Technologii (NTNU), Trondheim, Norwegia

### **5.3. Omówienie działań naukowych prowadzonych w jednostce macierzystej, poza badaniami, których tematyka została włączona w osiągnięcie naukowe**

Swoje zainteresowania naukowe miałam szansę rozwinąć już w 2004 roku, na III roku studiów magisterskich. Dzięki działaniom prowadzonym w Studenckim Kole Naukowym Młodych Biofizyków, którego opiekunem był dr Łukasz Pułaski (obecnie dr hab., prof. UŁ), mogłam towarzyszyć mgr Joannie Drzewińskiej (obecnie dr Joanna Drzewińska – Chańko) w Jej badaniach nad seladyną – 1, kluczowym białkiem uczestniczącym w biosyntezie cholesterolu. Warsztat metod biologii molekularnej wzbogaciłam później w 2005 roku, podczas praktyk zawodowych, realizowanych w Zakładach: Biochemii Medycznej i Enzymologii Medycznej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

W roku akademickim 2006/2007, w ramach pracy magisterskiej wykonywanej w Katedrze Termobiologii pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Józwiak i pod opieką mgr Anety Zych (obecnie dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ) zbadałam wpływ akklarubicyny, leku antracyklinowego III generacji, na komórki niedrobnokomórkowego raka płuc człowieka *in vitro*. Wykorzystując cytofluorymetrię przepływową, spektrofotometrię i mikroskopię fluorescencyjną oceniłam: przeżywalność i zmiany morfologii komórek linii A549 po działaniu akklarubicyny, proapoptotyczne uszkodzenia DNA, proces akumulacji leku oraz kinetykę jego transportu do komórek. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów przedstawiłam w pracy magisterskiej pt. „Oddziaływanie akklarubicyny z komórkami nowotworowymi linii A549”, w której dowiodłam, że akklarubicynę cechują szerokie właściwości cytotoksyczne wynikające między innymi z jej cytoplazmatycznej lokalizacji. Badania nad akklarubicyną i przełamaniem zjawiska lekooporności przez tę antracyklinę kontynuowałam także po uzyskaniu tytułu zawodowego

magistra. Ostatecznie, wyniki prowadzonych doświadczeń zostały zawarte w 2 oryginalnych artykułach: [IIA-8, II A-17] oraz w 7 doniesieniach konferencyjnych [IIB-5, IIB-6, IIB-7, IIB-19, IIB-20, IIB-21, IIB-22]. Z pewnością, dużym atutem obu opublikowanych prac było pozytywne zweryfikowanie hipotezy badawczej, że aklarubicyna wykazywała właściwości przeciwnowotworowe w warunkach *in vitro* wobec modelowych komórek guzów litych, a nie tylko względem białaczek, jak do tej pory donosiła o tym fachowa literatura naukowa. Po zakończeniu studiów magisterskich, podjęłam studia doktoranckie (2007- 2012) w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego i kontynuowałam swoją pracę naukową w Katedrze Termobiologii (później w Katedrze Biofizyki Medycznej) pod opieką prof. dr hab. Zofii Józwiak. Pracę doktorską, pt: „Oddziaływanie koniugatu doksorubicyny z transferyną na wybrane linie komórkowe białaczki człowieka”, obroniłam w 2012 roku. Recenzentami pracy byli: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska z Katedry Cytobiochemii UŁ oraz prof. dr hab. n.med. Tadeusz Robak z Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego otrzymałam stopień naukowy doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka uchwałą z dnia 26 czerwca 2012 r. Rada Wydziału BiOŚ przyjęła także wniosek o wyróżnienie mojej rozprawy doktorskiej.

W 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Termobiologii UŁ. Tematyka badań realizowanych w ramach mojej pracy doktorskiej dotyczyła wpływu samodzielnie przeze mnie otrzymanego koniugatu doksorubicyny z transferyną (DOX-TRF) na trzy linie komórkowe białaczki człowieka: CCRF-CEM i K562, będących modelami *in vitro*: ostrej białaczki T limfoblastycznej i przewlekłej białaczki szpikowej. Niewątpliwie dużą zaletą prowadzonych przeze mnie prac badawczych były eksperymenty prowadzone na linii odpornej na doksorubicynę (K562/DOX). Linia ta została pozyskana dzięki uprzejmości profesora Jaques'a Robert z Institut Bergonié, Université de Bordeaux we Francji, w ramach współpracy naukowej między naszymi ośrodkami. Jednocześnie eksperymenty były prowadzone na komórkach prawidłowych, tj. białych jednojądrzastych komórkach krwi człowieka.

W realizowanym przeze mnie pomyśle naukowym wykorzystałam fakt, że komórki nowotworowe cechuje nadekspresja receptorów dla transferyny, będącej w warunkach fizjologicznych nośnikiem dla jonów żelaza. Transferyna obecna w koniugacie pełniła funkcję nośnika dla doksorubicyny, leku przeciwnowotworowego, wnikającego zazwyczaj w sposób nieselektywny zarówno do komórek nowotworowych, jak i prawidłowych. Warto zaznaczyć, że zagadnienia związane z cytotoksycznością koniugatu DOX-TRF względem komórek nowotworowych człowieka rozpoczęła w Katedrze Termobiologii dr hab. Dorota Łubgan, obecnie prowadząca badania naukowe na stanowisku „clinical trial specialist” w Universitätsklinikum Erlangen, w Niemczech. Dzięki wskazówkom udzielonym przez prof. dr hab. Zbigniewa Kudzina z Katedry Chemii Organicznej UŁ, synteza koniugatu DOX-TRF została usprawniona, a produkt reakcji koniugacji był bardziej homogenny. Dodatkowo, autentyczność uzyskanego przeze mnie koniugatu, potwierdziłam m.in. przy zastosowaniu spektrometrii mas. Doświadczenia były wykonane w Pracowni Chemii

Biologicznej Jonów Metali, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Szczegóły syntezy i charakterystyki fizyko-chemicznej koniugatu DOX-TRF zostały zastrzeżone w patencie, autorstwa Zofii Józwiak i Marzeny Szwed [Pat. 231392, data udzielenie prawa 2018-10-19].. Wyniki badań opisane w mojej rozprawie doktorskiej były finansowane ze: 1) środków MNiSW/NCN w ramach grantu promotorskiego pt. „Charakterystyka apoptozy indukowanej przez koniugat doksorubicyny z transferyną w wybranych liniach białaczki człowieka” oraz z 2) projektu pt. ”Indukcja apoptozy przez koniugat doksorubicyny z transferyną w wybranych komórkach białaczki człowieka”, którego zaplecze finansowe stanowiło stypendium wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego i Budżetu Państwa. Zdobyte środki pozwoliły mi na dokonanie kompleksowej oceny koniugatu DOX-TRF pod względem jego: cytotoksyczności, prooksydacyjnych i proapoptotycznych właściwości, szybkości transportu do komórki oraz wpływu na uszkodzenia DNA. W swojej rozprawie doktorskiej wykazałam, że:

- koniugat DOX-TRF, w przeciwieństwie do wolnej doksorubicyny, był bardziej toksyczny dla komórek nowotworowych (szczególnie opornych na leki) niż dla komórek prawidłowych
- stałe szybkości transportu wolnej DOX do komórek białaczki człowieka były wyższe niż dla koniugatu DOX-TRF, ale to koniugat cechował się dłuższą wewnątrzkomórkową akumulacją
- indukowana przez koniugat apoptoza była procesem kaspazo-zależnym, dominującym w komórkach nowotworowych
- koniugat doksorubicyny z transferyną, podobnie jak i wolna doksorubicyna, produkował reaktywne formy tlenu. Były one odpowiedzialne za procesy towarzyszące apoptozie takie jak: zmiany morfologii komórek, zaburzenia funkcji mitochondriów oraz uszkodzenia jądrowego DNA.

Bezpośrednim wyznacznikiem wykonanych doświadczeń, tematycznie związanych z pracą dokorską, było opublikowanie (już po uzyskaniu stopnia doktora, ze względu na wydłużoną procedurę patentową) 12 artykułów doświadczalnych [IIA-15, IIA-18, IIA-19, IIA-20, IIA-21, IIA-22, IIA-23, IIA-24, IIA-25, IIA-27, IIA-34, IIA-36], z listy JCR oraz 11 doniesień konferencyjnych [IIB-2, IIB-4, IIB-8, IIB-9, IIB-12, IIB-14, IIB-15, IIB-16, IIB-23, IIB-24, IIB-25].

Będąc zatrudnioną na etacie asystenta w Katedrze Termobiologii, prowadziłam również badania w ramach grantu kierowanego przez dr hab. Agnieszkę Śliwińską pt. „Określenie wpływu gliklazydu na apoptozę indukowaną stresem oksydacyjnym”. Projekt był finansowany ze środków Polskiego Towarzystwa Chorób Metabolicznych. Zadania badawcze realizowane we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi skupiały się na ocenie antyapoptotycznych właściwości gliklazydu, leku przeciwcukrzycowego należącego do pochodnych sulfonylomocznika II generacji, który przejawiał również silne działanie przeciwnowotworowe. Eksperymenty były prowadzone na nienowotworowych komórkach śródbłonna wyizolowanych z żyły pępowinowej człowieka (HUVEC-c) oraz na nowotworowych liniach komórkowych (Hs578T i PANC-1), będących komórkami modelowymi odpowiednio

dla: nowotworu ludzkiego gruczołu sutkowego i raka przewodu trzustkowego, dwóch typów nowotworów, które są najczęściej diagnozowane u chorych z cukrzycą typu 2. W pracy **IIA-9** wykazano, że gliklazyd chronił badane komórki przed (indukowaną nadtlaniem wodoru) programowaną śmiercią, najprawdopodobniej poprzez hamowanie produkcji ROS. Ponadto, lek zapobiegał spadkom potencjału błony mitochondrialnej i zmniejszał niekontrolowany wyciek jonów wapnia do cytosolu, a preinkubacja komórek z gliklazydem znacznie poprawiała ich przeżywalność.

W okresie przed obroną doktoratu uczestniczyłam również w badaniach nad toksycznością należącego do bifosfonianów, alendronianu sodu, leku, który jest powszechnie stosowany w leczeniu osteoporozy. Substancja ta podawana jest pacjentom najczęściej w tabletkach. W celu poprawy przyswajalności leku, zaproponowano, aby alendronian sodu był aplikowany także we wlewach dożylnych. Tym samym, pojawiło się ryzyko wystąpienia niepożądanych skutków oddziaływania tego leku na komórki krwi człowieka. Był to jeden z powodów, dla którego zespół prof. dr hab. Bożeny Bukowskiej z Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ, w którego pracach uczestniczyłam, zbadał interakcje soli sodowej alendronianu z ludzkimi erytrocytami. W badaniach, których efekty opisano w pracy **IIA-10**, nie stwierdzono zmian w: aktywności acetylocholinoesterazy, poziomie tioli, jak również w morfologii erytrocytów inkubowanych z alendronianem sodu przez 24 godziny inkubacji z lekiem. Zaobserwowano także, że alendronian sodu zwiększa poziom reaktywnych form tlenu, ale dopiero po 24 godzinach od dodania leku. Dowiedziono tym samym, że stosowanie bisfosfonianów nie powinno być niebezpieczne dla erytrocytów u osób leczonych tymi lekami, a ryzyko wystąpienia bezpośrednich interakcji alendronian sodu – krwinki czerwone jest minimalne.

Byłam także współwykonawcą początkowych etapów projektu pt. „Indukcja apoptozy przez epotilon B i analog doksorubicyny WP631 w komórkach raka jajnika wrażliwych i opornych na leki przeciwnowotworowe” (numer projektu N N405 100939), kierowanego przez prof. dr hab. Agnieszkę Marczak i finansowanego ze środków MNiSW/NCN. Rak jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością wśród ginekologicznych nowotworów złośliwych i jest drugim najczęściej diagnozowanym nowotworem ginekologicznym. W konwencjonalnej terapii raka jajnika popularnym, ale też wysoce toksycznym koktajlem chemioterapeutyków jest mieszanina doksorubicyny i paklitakselu. Ze względu na liczne skutki uboczne (w tym wysoką kardiotoxyczość) oraz dość szybkie indukowanie zjawiska oporności wielolekowej, poszukuje się nowych substancji, które by efektywnie ograniczały namnażanie się komórek nowotworowych i jednocześnie poprawiały komfort życia pacjentów. Epotilony (Epo, ang. epothilone) to grupa związków o mechanizmach działania podobnych do taksanów, podczas gdy WP631 jest bisinterkalacyjną antracykliną o wyższej stałej wiązania do DNA niż antracykliny I lub II generacji. Celem pierwszego modułu zaplanowanych w projekcie badań była ocena potencjału epotilonu A i B (Epo A i Epo B) oraz antracykliny WP631 do indukowania apoptozy w komórkach raka jajnika. Doświadczenia były prowadzone w porównaniu z dobrze poznanymi lekami, to jest PTX i DOX. Zbadano poziom ROS i zmiany  $\Delta\Psi$  w komórkach raka jajnika SKOV-3 po działaniu Epo A, Epo B i PTX i WP 631. Zmierzono także antyproliferacyjne właściwości tych leków wykorzystując

metodę pomiaru redukcji MTT. Dodatkowo odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych jaki pojawił się w hodowli *in vitro* po działaniu cytostatyków oceniono za pomocą podwójnego barwienia Hoechst 33258/ jodek propidyny, jak również dzięki znakowaniu komórek aneksyną V-FITC. Uzyskane wyniki wykazały, że cytotoksyczność Epo A, Epo B i WP 631 w linii komórkowej SKOV-3 (mierzona jako IC<sub>50</sub> po 72 godzinnej ciągłej inkubacji z lekami) była odpowiednio sześć, pięć i 2,8 razy wyższa niż po działaniu PTX i DOX. Epotilony oraz WP 631 indukowały także zależną od czasu apoptozę i nekrozę. Molekularne markery apoptozy i nekrozy były częściowo blokowane przez antyoksydant N-acetylocysteinę (NAC, ang. N-acetyl L-cysteine), wskazując na istotną rolę ROS w indukowaniu przez Epotilony i WP 631 programowanej śmierci komórki. Te dokonania zespołu profesor Marczak, w których brałam udział, zostały opisane w dwóch artykułach doświadczalnych, to jest **IIA-11**, **IIA-12**, w tym jedna z nich została opublikowana w 2013 roku, już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Ponadto, moja aktywność naukowa w ramach grantu nr N N405 100939 została również zaprezentowana w postaci trzech doniesień konferencyjnych [**IIB-10**, **IIB-11**, **IIB-26**].

Na moje dokonania naukowo - badawcze przed obroną pracy doktorskiej składają się cztery prace doświadczalne [**IIA-8**, **IIA-9**, **IIA-10**, **IIA-11**] z listy JCR, cztery prace pogładowe spoza listy JCR [**IIA-4**, **IIA-5**, **IIA-6**, **IIA-7**] oraz 3 rozdziały w monografiach [**IIA-1**, **IIA-2**, **IIA-3**].

### **Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodząca w skład osiągnięcia naukowego**

#### *Małocząsteczkowe chemioterapeutyki i biodegradowalne polimery jako nowe sposoby leczenia neurodegeneracyjnych i rozrostowych chorób człowieka*

Liczne konferencje i szkolenia, w których brałam udział w trakcie doktoratu i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zachęciły mnie do poszerzenia swojej wiedzy w zakresie nowych trendów jakie wyznacza zastosowanie substancji małocząsteczkowych, jak i wielocząsteczkowych biopolimerów w terapii nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych. Efektem moich zainteresowań było kilka prac przeglądowych, które dotyczyły: przeciwciał monoklonalnych [**IIA-4**], przekaźników białkowych i peptydowych [**IIA-5**], aptamerów i ich koniugatów [**IIA-13**], niskocząsteczkowych modulatorów szlaku WNT [**IIA-14**], bisinterkalacyjnych antracyklin [**IIA-6**], eptilonów [**IIA-7**] oraz innowacyjnego wykorzystania mitoksantronu w leczeniu stwardnienia rozsianego [**IIA-16**]. Ponadto, biorąc udział w cyklu spotkań pt. „Doktoranci i Młodzi naukowcy dla nauki polskiej” organizowanych przez stowarzyszenie „Creative time” byłam współautorem trzech rozdziałów w monografiach naukowych [**IIA-1**, **IIA-2**, **IIA-3**].

#### *Badanie mechanizmów cytotoksyczności koniugatu DOX-TRF wobec modelowych linii komórkowych dla nowotworów litych i białaczek*

Po zgłoszeniu zastrzeżenia patentowego i opublikowaniu prac naukowych, których wyniki przedstawiłam w rozprawie doktorskiej, kontynuowałam badania związane tematycznie z koniugatem DOX-TRF. Działania naukowe były finansowane z grantów dla młodych naukowców UŁ, których byłam beneficjentem (**545/756**, **505/756**, **B1511000001026.02**, **B1611000001151.02**). W części artykułów, w których materiałem biologicznym



do prowadzonych doświadczeń były modelowe komórki dla nowotworów płuc, wątroby i piersi (linie komórkowe: A549, HepG2, MCF-7 i MDA-MB-231) wykazałam wysoką cytotoksyczność połączenia DOX z TRF w porównaniu z wolną formą leku. W trakcie realizacji tych badań, oprócz doświadczeń związanych ze spadkiem przeżywalności komórek potraktowanych koniugatem DOX-TRF oraz samą DOX, oznaczyłam poziom ROS i NOS z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych H<sub>2</sub>DCF-DA i DAF-FM, oszacowałam zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu (zarówno formy zredukowanej jak i utlenionej) oraz wykazałam obecność w komórkach molekularnych markerów charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego, to jest: nadtlenków, wolnych grup tiolowych, oraz spadku całkowitego potencjału antyoksydacyjnego komórek [IIA-27], co korelowało ze wzrostami poziomu mRNA dla katalazy, reduktazy glutationowej, S-transferazy glutationowej i peroksydazy glutationowej. Kolejne, wykonywane przeze mnie doświadczenia potwierdziły większe właściwości proapoptyczne koniugatu DOX-TRF niż wolnej formy leku. W wykonywanych eksperymentach stosowałam podwójne barwienie mieszaniną fluorochromów: oranż akrydyny/bromek etydyny oraz dokonałam pomiaru aktywności kaspaz: - 3 i -9. Obserwowałam także charakterystyczny obraz drabinki dla niskocząsteczkowego DNA, który został wyizolowany z komórek linii A549 i HepG2 potraktowanych koniugatem. Okazało się, że takie fizjologiczne markery dla apoptozy i stresu oksydacyjnego w komórkach linii A549 i HepG2 poddanych działaniu koniugatu, przekładały się na zmiany ekspresji kilku genów tj. *AIF*, *Bax* (ang. *bcl-2 antagonist X*), *Bcl2* (ang. *B-cell CLL/lymphoma 2*), *Casp-3*, *Calp-1* (ang. *calpain-1*) zaangażowanych w zaburzenia homeostazy mitochondriów, będących głównym źródłem ROS w komórkach. Tym samym, uzyskane przeze mnie wyniki doświadczeń jednoznacznie dowiodły, że koniugat indukował w komórkach nowotworów litych zależną od stresu oksydacyjnego apoptozę [IIA-27, IIA-25]. Warto nadmienić, że podczas dotychczas prowadzonych prac eksperymentalnych szczególnie zainteresowała mnie fakt, że połączenie DOX-TRF powodowało drastyczny spadek potencjału błonowego mitochondriów zarówno w komórkach nowotworowych guzów litych [IIA-25], jak i białaczek [IIA-23]. Tym samym sprawdziłam, czy koniugat mógł powodować uszkodzenia mitochondriów. Doświadczenia prowadzone na dwóch liniach komórkowych raka piersi człowieka to jest: MCF-7 i MDA-MB-231 [IIA- 36] pokazały, że nadmierna produkcja ROS pod wpływem działania koniugatu miała miejsce w łańcuchu oddechowym mitochondriów. Generowane tam wolne rodniki zaburzały bioenergetykę mitochondriów indukując: spadek wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, wypływ cytochromu c do cytosolu i zmianę profilu ekspresji genów zaangażowanych w zależną od mitochondriów apoptozę (*Bcl2*, *Bax*, *Cyt c*). Równolegle, mając w pamięci swoje wcześniejsze prace, w których dowiodłam, że komórkowa biodystrybucja koniugatu zależy od dynamicznej równowagi pomiędzy procesem jego napływu i wypływu z komórki, postanowiłam zbadać czy ekspresja glikoproteiny P (P-gp, ang. P glycoprotein) może mieć związek z akumulacją w komórce, uwalnianej z koniugatu DOX i cytotoksyczności leku. W tej części badań, niezwykle przydatne okazały się nowotworowe, ludzkie komórki erytromieloblastoidalne odporne na DOX, które wykazywały nadekspresję P-gp (K562/DOX). Badania prowadzone na poziomie mRNA, jak i białka wykazały,

że powolne uwalnianie DOX z koniugatu, sprawiało, że lek nie był tak efektywnie usuwany z komórki przez glikoproteinę P [IIA-22] co mogło wynikać m.in. ze zmian funkcjonalności szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina [IIA-24]. Dzięki wykorzystaniu w doświadczeniach agonisty (chlorek litu) i antagonisty (ICG 001) ścieżki Wnt wykazałam, że doksorubicyna uwalniana z koniugatu skutecznie obniżała transkrypcję genów: *Wnt3a* (ang. Wnt family member 3A, *DVL-1* (ang. dishevelled segment polarity protein 1), *FZD-3* (ang. frizzled class receptor 3), *LRP5* (ang. LDL receptor related protein 5),  $\beta$ -katenina (ang. catenin beta-1), *DKK2* (ang. dickkopf WNT signaling pathway Inhibitor 2) zaangażowanych w proces transdukcji sygnałów dla szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina. Takie zmiany molekularne na poziomie transkryptu miały bezpośrednie przełożenie na wyższą cytotoksyczność i właściwości pro-apoptotyczne koniugatu.

W prowadzonych przeze mnie badaniach, dość nietypową była obserwacja, że koniugat DOX-TRF aktywował w komórkach białaczki człowieka kaspazę-8, będącą istotnym elementem zewnętrznego szlaku apoptozy. Toteż w dalszych eksperymentach sprawdziłam czy ligand TRAIL jest zaangażowany w indukowanie przez koniugat programowanej śmierci komórki, zależnej od zewnątrzkomórkowych receptorów śmierci. Okazało się, że cząsteczka TRAIL należąca do grupy cytokin TNF, nie tylko pośredniczyła w indukcji zewnętrznej ścieżki apoptozy, ale przejawiała zwiększoną aktywność po działaniu koniugatu DOX-TRF, razem z innymi prozapalnymi molekułami, np. z interleukiną 4 i interleukiną 6 [IIA-34]. Dodatkowo, indukowanie odpowiedzi prozapalnej towarzyszyło apoptozie i nagromadzeniu się dwuniciowych pęknięć DNA, które wykryłam poprzez detekcję ufosforylowanej formy histonu H2AX.

*Cytotoksyczność i genotoksyczności leków i substancji o zastosowaniu biomedycznym wobec komórek prawidłowych i nowotworowych człowieka*

Duże znaczenie w rozwoju moich kompetencji naukowych miały dzieła naukowe prowadzone z zespołem badawczym profesora Tomasza Śliwińskiego. Okres tej współpracy można podzielić na trzy, tematycznie różne etapy, które zaowocowały opublikowaniem trzech artykułów doświadczalnych [IIA-31, IIA-32, IIA-35].

Po pierwsze, dotychczasowe umiejętności, które nabyłam przy eksperymentach wykonanych z wykorzystaniem komórek białaczki człowieka, okazały się przydatne, kiedy pomagałam przy realizacji projektu Preludium 3, pt. „Rola reaktywnych form tlenu w oporności komórek BCR/ABL+ na imatynib”, kierowanego przez mgr Sylwestra Głowackiego (obecnie doktora). W ramach realizacji tego grantu, weryfikowano hipotezę badawczą, że stres oksydacyjny jest jedną z przyczyn oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na imatynib. Pomimo dobrze poznanego celu molekularnego jakim jest kinaza serynowo – treoninowa, terapia przewlekłej białaczki szpikowej to wciąż duże wyzwanie, głównie ze względu na oporność komórek nowotworowych na inhibitory dla zmutowanej postaci białkowego produktu ekspresji genu BCR/ABL. W prowadzonych badaniach zaobserwowano, że w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez nadtlenuk wodoru, komórki odporne na imatynib wykazywały wzrost aktywności katalazy przy jednoczesnym obniżeniu potencjału błonowego mitochondriów. Dowiedziono, że ekspresja zmutowanej kinazy serynowo treoninowej

BCR-ABL zmienia metabolizm ROS, a wytworzeniu fenotypu oporności na imatynib towarzyszą zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm glutationu, jak i obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu tego antyutleniacza. Wykonując eksperymenty na liniach przewlekłej białaczki szpikowej opornych na imatynib wykazano tym samym, że stres oksydacyjny prowadzi w tych komórkach do niestabilności genomowej i rozwoju oporności na inhibitory kinaz serynowo – treoninowych [IIA-35].

W drugim etapie współpracy z profesorem Śliwińskim badałam oddziaływania związków niskocząsteczkowych na prawidłowe komórki człowieka *in vitro*. Praca dotyczyła toksyczności polimerów kwasu metakrylowego, to jest dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA ang. ethylene glycol dimethacrylate) i dimetakrylanu glikolu dietylenowego (DEGDMA, ang. diethylene glycol dimethacrylate) stosowanych do produkcji wypełnień ubytków zębowych. Substancje te są uważane za bezpieczne, jednakże ich monomery, w wyniku działania czynników mechanicznych lub enzymatycznych, mogą uwalniać się do tkanki dziąsła i osiągać tam stężenia nawet milimolarne. W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Toxicology in vitro* [IIA-31] wraz z innymi jej współautorami dowiodłam, że oba monomery kwasu metakrylowego: zmniejszały przeżywalność ludzkich fibroblastów dziąsła, indukowały apoptozę, powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/G0 i indukowały nienaprawialne uszkodzenia DNA. Ponadto monomery EGDMA i DEGDMA powodowały wzrost poziomu ROS i zwiększały ekspresję enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej, co sugeruje, że stres oksydacyjny jest jedną z składowych, który składa się na cytotoksyczność tych substancji [IIA-31].

Trzecia opublikowana, wspólnie z zespołem prof. Śliwińskiego, praca dotyczyła syntetycznej letalności jaka może być indukowana w komórkach ludzkiego glejaka, poprzez synergistyczne działanie inhibitorów PARP i pochodnych dakarbazyny. Komórki nowotworowe często gromadzą spontaniczne i indukowane chemioterapią i radioterapią dwuniciowe pęknięcia nici DNA. Ukierunkowanie działania na mechanizmy naprawy DSB za pomocą specyficznych inhibitorów tego szlaku mogą potencjalnie uwrażliwić komórki nowotworowe na letalny efekt nagromadzonych DSBs. Obecnie leczenie glejaka wielopostaciowego obejmuje resekcję guza, a następnie radioterapię i chemioterapię z wykorzystaniem temozolomidu (TMZ) środka alkilującego, który wywołuje uszkodzenia DNA. W naszych badaniach postawiliśmy hipotezę, że połączone działanie inhibitora PARP, to jest BMN673 i TMZ wobec glejaka wielopostaciowego, obniża ekspresję genów naprawy DSB i może wywołać syntetyczną śmiertelność dla komórek tego nowotworu. Wyniki prowadzonych eksperymentów dowiodły, że kluczowym enzymem, który odgrywa rolę we wrażliwości komórek glejaka na inhibitory PARP jest ligaza 4 DNA, uczestnicząca w naprawie DNA typu niehomologiczne łączenie końców (N-HEJ). Dodatkowo, dzięki dostępności materiału klinicznego pochodzącym od pacjentów [IIA-32], udowodniono, że inhibitor PARP w połączeniu z czynnikami indukującymi uszkodzenia DNA może być stosowany u pacjentów z glejakiem wykazującym defekty w naprawach N-HEJ.

Zmiany molekularne indukowane przez warunki hiperglikemii podczas formowania się adipocytów

Prace badawcze nad cukrzycą typu 2, rozpoczęte w trakcie doktoratu [IIA-9], kontynuowałam także później, będąc współwykonawcą działań naukowych, którymi kierowała dr hab. Agnieszka Śliwińska. Tym razem, cykl wykonywanych eksperymentów miał na celu sprawdzenie czy zmiany metaboliczne związane z hiperglikemią powodują transformację prekursorowych komórek w komórki tłuszczowe (adipocyty) i jakie mechanizmy molekularne towarzyszą temu zjawisku. Proces adipogenezy, czyli różnicowania się komórek tłuszczowych, w warunkach prawidłowych (normoglikemii) i patologicznych (hiperglikemii), monitorowano poprzez obserwacje mikroskopowe kropeł tłuszczu wybarwianych sondą fluorescencyjną BODIPY 505/515. Zawartość lipidów typowych dla normoglikemii i hiperglikemii w adipocytach analizowano za pomocą spektroskopii ramanowskiej, a ekspresję genetycznych markerów adipogennych to jest PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$ , oznaczono na poziomie mRNA i białka. W dalszej części badań założono, że proces adipogenezy pod wpływem hiperglikemii może być regulowany przez mikro RNA, czyli krótkie, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki RNA biorące udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w patogenezę wielu chorób, także tych o podłożu metabolicznym. Tym samym sprawdzono, czy mikro RNA (odpowiednio: miR-34a-5p i miR-137-3p) ukierunkowane na geny PPAR $\gamma$  (ang. peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) i C/EBP $\alpha$  (ang. CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ ), może regulować ich ekspresję na poziomie potranskrypcyjnym. Wykazano, że hiperglikemia zmieniała morfologię różnicujących się komórek prekursorowych, przyspieszając tworzenie się kropli tłuszczu oraz powodując wzrost ich liczby i objętości w stosunku do normoglikemii. Profil ekspresji obu tych genów zmieniał się znacząco zarówno podczas adipogenezy w warunkach fizjologicznych i hiperglikemicznych, ale tylko różnice dla genu PPAR $\gamma$  korespondowały ze zmianami ekspresji dla miR-34a-5p. Nasze obserwacje opisane w pracy [IIA-33] dowiodły, że przewlekła i przerywana hiperglikemia zmieniały morfologię trzewnych preadipocytów podczas adipogenezy. Ponadto, wykazano, że hiperglikemia jest czynnikiem epigenetycznym, który stymuluje miR-34a-5p do indukowania zmian w ekspresji w PPAR $\gamma$ .

Zastosowanie pochodnych nukleozydów skoniugowanych z klasterami metalokarboranów w przełamaniu lekooporności komórek raka jajnika

Doświadczenie badawcze jakie zdobyłam pracując na komórkach nowotworu jajnika człowieka, w grancie kierowanym przez prof. Agnieszkę Marczak mogłam później wykorzystać, będąc współwykonawcą projektu pt. „Wgląd w mechanizm odpowiedzi komórek raka jajnika na działanie nukleozydów adeninowych modyfikowanych klasterami metalokarboranów o potencjalnych właściwościach antyproliferacyjnych i proapoptycznych” (numer projektu: 2015/17/B/NZ3/03764, kierownik, dr Katarzyna Bednarska-Szczepaniak, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi). Jednymi z podstawowych cytostatyków, które są wykorzystywane w terapii raka jajnika są związki platyny. Niestety, nabyta oporność na platynę pozostaje głównym problemem w onkologii raka jajnika. Biorąc pod uwagę unikalne właściwości fizykochemiczne

metalokarboranów oraz aktywność antymetabolitową pochodnych nukleozydów, w grancie prowadzono badania nad nowosyntetyzowanymi koniugatami tych dwóch rodzajów substancji.

Dowodzono, że oparty na bazie żelaza koniugat metalakarboranu i adenozyne uwrażliwił wielokomórkowe sferoidy nowotworowe na cisplatynę, a w komórkach raka jajnika hodowanych *in vitro* indukował apoptozę i nekrozę, hamował podział komórkowy, oraz generował ROS [IIA-37]. Wykazano także, że obecność nukleozydów w strukturze koniugatów jest niezbędna do ochrony komórek przed rozwojem oporności krzyżowej na cisplatynę, karboplatinę, dokсорubicynę, paklitaksel lub gemcytabinę. Tym samym wyniki naszych badań jednoznacznie potwierdziły, że nukleozyd adeninowy modyfikowany metalakarboranami może uwrażliwić komórki raka jajnika na działanie chemioterapeutyków w terapii skojarzonej.

Interakcje substancji w skali nano- z ludzkimi komórkami prawidłowymi  
i nowotworowymi *in vitro*

Dynamiczny rozwój nanotechnologii i powszechne zastosowanie nanocząstek w przemyśle, naukach technicznych i biomedycynie wymusiły potrzebę weryfikowania ich toksycznych właściwości wobec materiału biologicznego. W prowadzonych przeze mnie badaniach oprócz nanoprzENOŚNIKÓW dla leków w terapii raka piersi, które są przedmiotem mojego głównego osiągnięcia naukowego, zajmowałam się również różnymi nanocząstkami i ich oddziaływaniem z materiałem biologicznym. Na początku tej części badań zostałam zaproszona do współpracy naukowej przez dr hab. Magdalenę Łabieniec – Watałę, prof. UŁ. Przedmiotem prowadzonych przez nas eksperymentów była ocena wpływu niskich stężeń dendrymerów poli(amido)aminowych (PAMAMS ang. polyamidoamine, generacja G2-G4) na białe jednojądrzaste komórki krwi człowieka. Dendrymery, znane są w literaturze jako wysoce rozgałęzione nanopolimery. Obecność wolnych przestrzeni wewnątrz cząsteczki dendrymeru pozwala na zamykanie i przenoszenie w ich wnętrzu mniejszych molekuł, na przykład leków. Z drugiej strony, fakt, że dendrymery posiadają na swojej powierzchni liczne grupy funkcyjne czynią je dobrymi kandydatami do przyłączania i transportowania małych cząstek w ich zewnętrznych warstwach. Niektóre prace naukowe dowodzą jednak, że PAMAMS mogą negatywnie wpływać na funkcjonowanie elementów morfotycznych krwi, prowadząc m.in. do zaburzeń w homeostazie mitochondriów tych komórek [76, 77]. Takie doniesienia literaturowe dały powody ku temu, aby zbadać jak dendrymery kationowe działają na podstawowe, fizjologiczne funkcje komórek prawidłowych człowieka. Materiałem biologicznym w prowadzonych doświadczeniach były białe jednojądrzaste komórki krwi izolowane z kożuszka limfocytarno – płytkowego. Do monitorowania zmian bioenergetyki mitochondriów wykorzystano wysokiej rozdzielczości oksygraf, natomiast morfologię komórek analizowano przy użyciu cytofluorometru przepływowego i mikroskopu świetlnego wyposażonego w obiektyw z kontrastem fazowym. Wyniki przeprowadzonych pomiarów wskazują na zależne od stężenia i generacji dendrymerów ich zróżnicowane działanie wobec białych jednojądrzastych komórek krwi. O ile nie stwierdzono zmian w rutynowym oddychaniu komórek, to zastosowanie dendrymerów należących do generacji G3 i G4 obniżało oddychanie stymulowanego ADP i FCCP. Markery

integralności błony mitochondrialnej (parametr RCR) i jej funkcjonalności (parametr OXPHOS (P/E)) uległy istotnemu obniżeniu niezależnie od zastosowanej generacji dendrymerów. Nasze badania prowadzone na poziomie *in vitro* dowiodły, że kationowe dendrymery PAMAM, stosowane w niskich stężeniach i w krótkim czasie (do 1 godziny), zmieniały wielkość i ziarnistość komórek oraz efektywnie zaburzały funkcjonowanie ich mitochondriów [IIA-30].

Białe jednojądrzaste komórki krwi okazały się także dobrym materiałem badawczym, kiedy rozpoczęłam współpracę z profesorem Ralphem Santos Oliveira z Brazylii (Uniwersytet w Rio de Janeiro) nad nanomateriałami, które w przyszłości miały być wykorzystane w radioterapii nowotworów. W pracy opublikowanej w 2016 roku [IIA-28] opisano interakcje czterech rodzajów różnych nanocząstek, z prawidłowymi jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej człowieka. Do naszych badań zostały wybrane cztery rodzaje nanocząstek, które przeznaczone do zastosowania terapeutycznego (polimerowe nanocząstki modyfikowane przeciwciałem PLA/MMT/TRA oraz nanokukład PLA/EDTMP) i nanoemulsje które miały być w przyszłości stosowane jako składowe kosmetyków. Zaobserwowałam, że żywotność prawidłowych jednojądrzastych komórek krwi ani po inkubacji z nanocząstkami PLA/MMT/TRA, ani z nanocząstkami PLA/EDTMP nie spadła poniżej 80%. Kiedy analizowałam nanocząstki pod kątem ich możliwości indukowania programowanej śmierci komórek, okazało się, że tylko nanoemulsje z chitozanem powodowały wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Ponadto zaobserwowałam, typowe dla apoptozy zmiany morfologii komórek, to jest formowanie się ciałek apoptotycznych oraz kondensację i marginalizację chromatyny, które pojawiały się w hodowli, kiedy komórki były traktowane wszystkimi testowanymi nanocząstkami. Charakterystyczne dla nekrozy nabrzmiałe i powiększone komórki obserwowano, tylko gdy te były traktowane nanoemulsjami. Wyniki badań opisane w tej pracy [IIA-28] były dalej kontynuowane na komórkach śródbłonna człowieka, a efekty tych działań zostały włączone jako jedne ze składowych dla głównego osiągnięcia naukowego. Przedmiot współpracy prowadzonej z prof. Oliveira nie ograniczał się tylko do nanocząstek zaprojektowanych do celów terapeutycznych, ale dotyczył także takich nanomateriałów, które mogą być wykorzystane w diagnostyce nowotworów przewodu pokarmowego i piersi. Nasze badania dowiodły [IIA-29], że nanocząstki PLA/MMT modyfikowane humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym bevacizumab, skierowanym przeciwko czynnikowi VEGF umożliwiło nie tylko wizualizację w ustroju miejsc zmienionych chorobowo, ale także obniżało przeżywalność komórek, które cechowały się ekspresją ligandu dla bevacizumab. Podobne właściwości wykazuje trastuzumab, który nakierowany jest na receptory Her2 i okazał się skuteczny nie tylko w leczeniu estrogenozależnego raka piersi, ale i w jego diagnostyce [IIA-26]. Dowód na to, że to przeciwciało monoklonalne może być dobrym kandydatem na składową dla nanopreparatów przeznaczonych do leczenia chorych z ekspresją receptorów HER2 przedstawiliśmy stosując w naszych badaniach polimerowe nanocząstki PLA/MMT połączone z koniugatem Tachnet-99 trastuzumab. Badany przez nas nanokukład cechowały: wysoki klirens nerkowy i dobra biodystrybucja. Poza tym obserwowaliśmy jego wysoką cytotoksyczność wobec komórek raka piersi, co dowiodło, że

nanosystemy PLA/MMT/trastuzumab mogą być wyznakowane radioizotopami, a cały nanoukład oparty na trastuzumabie i radioaktywnych izotopach ma właściwości teranostyczne.

W ostatnim czasie moje prace badawcze skupiają się nie tylko na biodegradowalnych nanomateriałach, ale też na oddziaływaniu nanocząstek metali szlachetnych z komórkami nowotworowymi człowieka. Efektem tych działań naukowych i niedawno nawiązanej współpracy z zespołem kierowany przez prof. Aleksandra Bilewicza z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie jest artykuł doświadczalny [IIA-38] na temat roli stresu oksydacyjnego w cytotoksyczności nanocząstek platyny, to jest ultramałych, 2 nm PtNPs i opartych na jonach złota, rdzeniowo-powłokowych Au@Pt o średnicy 30 nm. Wyniki doświadczeń które były prowadzone na komórkach o różnym statusie oksydacyjnym, to jest SKOV-3 i HepG2, pokazują, że poziom ROS indukowanych przez oba typy nanocząstek był podobny, podczas gdy spadek zredukowanego glutationu był bardziej widoczny już po 12 godzinach od zastosowania PtNPs. Ta obserwacja jest bardzo istotna w odniesieniu do danych literaturowych, które opisują, że właściwości pro- lub antyoksydacyjne substancji opartych na jonach platyny zależą od 1) ich rozpuszczalności w wodnym środowisku komórki 2) pH środowiska. Warto zaznaczyć, że stres oksydacyjny jaki generowały nanocząstki PNP's i Au@Pt przekładał się na blokadę faz cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz eksternalizację fosfatydyloseryny. Istotne różnice pomiędzy Au@Pt i PtNPs (z korzyścią dla PtNPs) zaobserwowano także, kiedy badano ich wewnątrzjądrową lokalizację po 24-godzinnej inkubacji z komórkami HepG2.

Toksyczność ultramałych PtNPs można było także zaobserwować wobec wielokomórkowych sferoidów dla komórek raka wątroby HepG2, co potwierdziło, że te nanocząstki są dobrymi kandydatami na nanooleki dla terapii radionuklidowej. Badania dotyczące nonaocząstek metali szlachetnych są kontynuowane, a obiecujące wyniki badań opisane w powyższej pracy będą podstawą do aplikowania o grant naukowo badawczy. Działanie te będą poszerzone o dodatkową aktywność naukową zaplanowaną na czwarty kwartał 2023 roku, podczas mojego 6 tygodniowego pobytu naukowego w Universitätsklinikum Erlangen. Środki finansowe na ten wyjazd zostały pozyskane w ramach konkursu dla pracowników Wydziału BiOŚ UŁ na finansowanie wyjazdów zagranicznych, którego jestem beneficjentką

#### **Podsumowanie dorobku naukowego oraz wskaźniki bibliometryczne**

Mój dorobek naukowy obejmuje **43 publikacje naukowe (w tym 3 rozdziały w monografiach)**, z czego 36 ukazało się w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR). Spośród tych prac na moje osiągnięcie naukowe, zgłoszone do oceny w postępowaniu habilitacyjnym, składa się z 5 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR. W 4 z nich jestem pierwszym autorem, a w 2 artykułach dodatkowo pełnię rolę autora korespondencyjnego. Sumaryczna wartość współczynników oddziaływania Impact Factor (IF) zgodna z rokiem opublikowania **wszystkich opublikowanych prac** wynosi **122,249**, a liczba punktów zgodnie z rokiem opublikowania to **2119**. Sumaryczny współczynnik IF zgodny z rokiem opublikowania 5 publikacji, wchodzących w skład mojego osiągnięcia

naukowego równy jest **32,861 (660 pkt MEiN)**. Łączna liczba cytowań moich prac wynosi **353 (389 z autocytowaniami, wg. bazy naukowej ISI Web of Science Core Collection)**, a Indeks Hirscha (h-index) ma wartość **12**. Oprócz publikacji, w moim dorobku znajduje się **27** komunikatów konferencyjnych, **11** zaprezentowanych na konferencjach o zasięgu krajowych i **16** na konferencjach międzynarodowych. Cały dorobek naukowy szczegółowo został opisany w załączniku nr **4**, a jego podsumowanie przedstawia poniższa tabela.

<b>Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b>				
	<b>Liczba publikacji</b>	<b>Liczba komunikatów</b>	<b>IF</b>	<b>Punkty MEiN</b>
Publikacje w czasopismach z IF	<b>5</b>		<b>10.036</b>	<b>134</b>
Publikacje bez IF	<b>6</b>			-
Komunikaty konferencyjne		<b>16</b>		-
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF		<b>1</b>	<b>2,095</b>	<b>70</b>
<b>Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>				
Publikacje w czasopismach z IF	<b>31</b>		<b>112,213</b>	<b>1985</b>
Publikacje bez IF	<b>1</b>		-	<b>40</b>
Komunikaty konferencyjne		<b>9</b>		
Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF		<b>1</b>	<b>2.947</b>	<b>70</b>
<b>Sumaryczny dorobek naukowy</b>	<b>43</b>	<b>27</b>	<b>122,249*</b> (134,38) **	2119* (2323) **

*Impact Factor (IF) podany jest dla roku opublikowania artykułu*

*Liczba punktów za publikacje podana została zgodnie z wykazem czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki / Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania*

*\*IF i punkty MNiE czasopism; \*\*publikacje + komunikaty konferencyjne*

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

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

#### **Promotor prac magisterskich:**



- rok akademicki 2015/2016, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Paulina Wigner**, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, tytuł pracy: „Ocena genotoksycznego działania różnych nanocząstek na ludzkie komórki śródbłonna w warunkach *in vitro*” recenzent: prof. dr hab. Aneta Koceva Chyła, praca **wyróżniona w konkursie Fundacji Uniwersytetu Łódzkiego na najlepszą pracę magisterską w kategorii nauki biologiczne**
- rok akademicki 2015/2016, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Krzysztof Zieliński**, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, tytuł pracy: „Analiza *in vitro* pro – apoptotycznych właściwości różnych nanocząstek w modelowych komórkach ludzkiego śródbłonna” recenzent: dr hab. Magdalena Łabieniec Watała, prof. UŁ
- rok akademicki 2022/2023, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Radosław Justyna**, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, tytuł pracy: „Oddziaływanie paklitakselu enkapsulowanego w multirdzeniowych nanonośnikach polielektrolitowych z komórkami raka piersi człowieka *in vitro*” recenzent: dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ

#### **Kierujący pracami licencjackimi**

- rok akademicki 2019/2020, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Amanda Kaczyńska**, kierunek: biologia, blok licencjacki Biofizyka medyczna i molekularna, tytuł pracy: „Ferroptoz – nowa forma śmierci komórki nadzieją w terapii nowotworów” recenzent: dr hab. Anna Pieniążek
- rok akademicki 2021/2022, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Sofiiia Lembirko**, kierunek: biotechnologia, tytuł pracy: „Hipertermia z zastosowaniem nanocząstek jako innowacyjna metoda wspomagająca leczenie onkologiczne” recenzent: dr hab. Anna Pieniążek
- rok akademicki 2022/2023, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Kacper Wiktorowski**, kierunek: biologia, blok licencjacki Biofizyka medyczna i molekularna, tytuł pracy: „Nanoautofagia – oddziaływanie nanomateriałów na konserwatywny ewolucyjnie proces kataboliczny w komórkach eukariotycznych.” recenzent: dr hab. Aleksandra Rodacka
- rok akademicki 2022/2023, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Kamila Podsiadło**, kierunek: biologia, blok licencjacki Biofizyka medyczna i molekularna, tytuł pracy: „Indukowanie swoistej odpowiedzi immunologicznej przez nanomateriały w immunoterapii chorób nowotworowych człowieka.” recenzent: dr hab. Anna Pieniążek

#### **Opiekun części doświadczałnej prac magisterskich i prac licencjackich**

- rok akademicki 2009/2010, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Monika Jędrzejczyk**, kierunek: biologia, specjalność: biofizyka,

tytuł pracy magisterskiej: „Indukcja apoptozy przez koniugat doksorubicyny z transferyną w komórkach linii K562” kierujący pracą: prof. dr hab. Zofia Józwiak

- rok akademicki 2009/2010, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Katarzyna Wiśniewska**, kierunek: biologia, specjalność: biofizyka, tytuł pracy magisterskiej: „Genotoksyczny efekt oddziaływania koniugatu doksorubicyny z transferyną na komórki ostrej białaczki limfoblastycznej” kierujący pracą: prof. dr hab. Zofia Józwiak
- rok akademicki 2014/2015, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Dominika Wrona**, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, tytuł pracy magisterskiej: „Zaburzenia homeostazy układu redoks w komórkach linii A549 i HepG2 poddanych działaniu koniugtu doksorubicyny z transferyną” kierujący pracą: prof. dr hab. Agnieszka Marczak
- rok akademicki 2010/ 2011 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Justyna Łukasiewicz**, kierunek: biologia, specjalność: biofizyka, tytuł pracy licencjackiej: „Zastosowanie przenośników leków przeciwnowotworowych w leczeniu białaczek” kierujący pracą: prof. dr hab. Zofia Józwiak

#### **Recenzent prac magisterskich:**

- rok akademicki 2020/2021, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Paula Kwapisz**, kierunek: biologia, specjalność biofizyka medyczna i bioinformatyka, tytuł pracy: „Mechanizm działania pochodnych stilbenowych w kombinacji z promieniowaniem jonizującym na komórki raka piersi” kierujący pracą: dr hab. Aleksandra Rodacka
- rok akademicki 2021/2022, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Joanna Korszun**, kierunek: biotechnologia, specjalność biotechnologia medyczna, tytuł pracy: „Wpływ doksorubicyny i cisplatyny na profil ekspresji białek ABC w komórkach nowotworowych” kierujący pracą: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ

#### **Recenzent prac licencjackich:**

- rok akademicki 2021/2022, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Natalia Chrzan**, kierunek: biotechnologia, tytuł pracy: „Dieta ketogeniczna a leczenie raka. Ocena przeciwnowotworowego potencjału ciał ketonowych w warunkach *in vitro*” kierujący pracą: dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ
- rok akademicki 2021/2022, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Jakub Górski**, kierunek: biotechnologia, tytuł pracy: „Leki immunosupresyjne stosowane w chorobie Leśniowskiego-Crohna” kierujący pracą: dr hab. Anna Pieniążek
- rok akademicki 2014/2015, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Dominika Komorowska**, kierunek: biologia, blok licencjacki

biofizyka, tytuł pracy: „Salinomycyna - antybiotyk dający nadzieję na pokonanie nowotworowych komórek macierzystych” kierujący pracą: dr Karolina Matczak

- rok akademicki 2014/2015, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Marlena Zygała**, kierunek: biotechnologia, tytuł pracy: „Mitochondria jako tarcze działania dla terapii przeciwnowotworowej” kierujący pracą: dr hab. Magdalena Łabieniec Watała, prof. UŁ
- rok akademicki 2013/2014, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Justyna Kasica**, kierunek: biologia, tytuł pracy: „Karbamylacja lipoprotein u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek” kierujący pracą: dr hab. Anna Pieniążek
- rok akademicki 2013/2014, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, **student: Sylwia Miksa**, kierunek: biologia, blok licencjacki biofizyka, tytuł pracy: „Markery nowotworowe wczesnego wykrywania raka jajnika” kierujący pracą: prof. dr hab. Agnieszka Marczak

#### **Opieka naukowa nad studentami w ramach ich aktywności w Kole Naukowym Młodych**

**Biofizyków:** Paulin Wigner, Krzysztof Zieliński, Sofia Lembirko, Kacper Wiktorowski

#### **Działania te zaowocowały:**

- publikacją naukową

Wigner P, Zielinski K, Labieniec-Watała M, Marczak A, Szwed M. Doxorubicin–transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 2021, 11(1), 4544, doi: 10.1038/s41598-021-84146-4, IF<sub>2021</sub> =4.996, MEiN<sub>2021</sub>= 140 pkt, IF<sub>2023</sub> = 4.997, MEiN<sub>2021</sub>= 140 pkt

- wystąpieniami na konferencjach krajowych

04. 2015 roku Konferencja Genetyczna „Genomica” w Krakowie, tytuł posteru: „Antybiotyki antracyklinowe jako popularne leki stosowane w chemioterapii – molekularny mechanizm działania”, Wigner P, Zielinski K, Szwed M

03. 2015 roku IV Konferencja Biologii Molekularnej UŁ, tytuł posteru: „Ocena toksyczności doksorubicyny i jej trzech pochodnych w komórkach nowotworowych linii A549 *in vitro*” Wigner P, Zielinski K, Szwed M

04. 2023 roku VIII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, tytuł posteru: „Multirdzeniowe nanokapsuły polielektrolitowe jako nowe nanoprzenośniki dla paklitakselu niwelujące kardiotoxycytność leku” Wiktorowski K, Poczta A, Podsiadło K, Marczak A, Szczęch M, Szczepanowicz K, Szwed M

**Opieka naukowa nad krajowym stypendystą:**

**mgr inż. Kamil Wawrowicz**, słuchacz Interdyscyplinarnego Studium Doktoranckiego "RadFarm - Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii medycznej, POWR.03.02.00-00-I009/17-00, okres stażu 5 – 30 lipca 2021 roku

**Opieka naukowa nad stażystą realizującym praktyki zawodowe w Katedrze Termobiologii:**

lipiec 2010 roku – student **Adrian Szymajda**, student 2 roku na kierunku biologia, studia stacjonarne pierwszego stopnia

**Opieka naukowa nad uczniami szkół średnich w ramach programu „Zdolny uczeń, świetny student”**

Rok akademicki 2022/2023 – uczennice Julia Sujka i Natalia Warawąsowska z VIII Liceum Ogólnokształcącego w Łodzi im. Adama Asnyka realizujące projekt pt. **„Zdolny Uczeń Świetny Student”** – tytuł zakończonego działania naukowego „Od mikstury w probówce do leku w strzykawce - jak wygląda ocena właściwości toksycznych substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym w warunkach *in vitro*?”

**6.2. Prowadzone zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału BiOŚ (od 2008 roku)**

W latach 2008-2016 uczestniczyłam w opracowywaniu programów nauczania dla kilku nowych przedmiotów, które w tym okresie zostały wprowadzone do systemu nauczania dla kierunków: biologia, biotechnologia, mikrobiologia i ochrona środowiska na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

**Podczas mojej dotychczasowej pracy jako nauczyciel akademicki:**

- byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej dla kierunków: biologia, ochrona środowiska i biotechnologia na studia stacjonarne i niestacjonarne, I stopnia, II stopnia w roku akademickim: 2009/2010 i 2013/2014
- byłam koordynatorem dla przedmiotu „Pracownia specjalistyczna” dla kierunku biologia (studia dzienne, 2 stopnia, specjalność: biofizyka medyczna i bioinformatyka)
- byłam prowadzącym dla przedmiotu „Seminarium licencjackie”, kierunek: biotechnologia III rok I stopnia, blok licencjacki – studia stacjonarne
- przygotowałam autorski przedmiot pt. „Mamalian cell culture” ćwiczenia i konwersatorium – kurs przeznaczony jest dla studentów anglojęzycznych II i III stopnia, planowane rozpoczęcie kursu luty 2024 roku
- prowadziłam również ćwiczenia z następujących przedmiotów:

---

**Genetyka**, kierunek biologia, II rok I stopnia, studia stacjonarne

---

**Podstawy technik hodowli komórek**, kierunek: biologia III rok I stopnia: blok licencjacki biochemiczny – studia stacjonarne

---

**Podstawy metod hodowli komórek**, kierunek: biologia III rok I stopnia: blok licencjacki biofizyczny – studia stacjonarne

---

**Pracownia specjalistyczna**, kierunek: ochrona środowiska, studia stacjonarne IV rok

---

**Genetyka i genom człowieka**, kierunek: biologia I rok II stopnia, specjalność biofizyka medyczna – studia stacjonarne

---

**Podstawy genetyki dla biotechnologów**, kierunek: biotechnologia, II rok, studia stacjonarne

---

**Matematyka**, kierunek: biologia II rok, studia stacjonarne

---

**Matematyka z elementami statystyki**, ćwiczenia audytoryjne, kierunek biologia II rok, studia stacjonarne

---

**Pracownia kierunkowa**, kierunek: biologia IV rok, studia stacjonarne

---

**Genetyka ogólna**, kierunek: mikrobiologia II rok I stopnia, studia stacjonarne

---

**Podstawy metod hodowli komórek i biologii molekularnej**, kierunek: biologia III rok, I stopnia specjalność: biofizyka medyczna i bioinformatyka – studia stacjonarne

---

**Zastosowanie kultur tkankowych w badaniach biomedycznych**, kierunek: biologia IV rok – studia stacjonarne

---

**Fizyka z elementami biofizyki dla biologów**, kierunek: biologia I rok I stopnia, studia stacjonarne

---

**Biofizyka II**, kierunek biologia III rok I stopnia, studia stacjonarne

**Czynnie uczestniczyłam w usprawnieniu pracy Katedry Biofizyki Medycznej UŁ i dotychczas zajmowałam się:**

- przygotowaniem grantu aparaturowego w ramach środków IDUB (październik 2021)
- koordynowaniem wymiany filtrów HEPA w szafach laminarnych w Katedrze Biofizyki Medycznej
- opieką nad sprzętem przynależącym do katedry to jest: mikroskopem fluorescencyjnym, fluorescencyjnym mikroczytnikiem płytek
- zamawianiem odczynników chemicznych

**W latach 2014 – 2016 oraz 2019-2023 byłam członkiem Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska z wyboru, jako przedstawiciel nauczycieli akademickich, nie będących samodzielnymi pracownikami naukowymi**

### **6.3. Działalność w zakresie popularyzacji nauki:**

- pokaz w ramach Nocy Biologów przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Jeszcze w zielone gramy”, 10 stycznia 2020 roku, prowadzący: dr Karolina Matczak, dr Marzena Szwed, mgr Marzena Pacholska, mgr Anna Chmurska
- wykład w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Co było pierwsze pszczoła czy kwiat – o zagadkach życia pszczelego roju?” 28 października 2022 roku
- wykład dla słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku w Aleksandrowie Łódzkim pt. „Co w ulu brzęczy?” 13 marca 2023 roku
- udział w akcji „Książka to Ogród” – przedstawiciele różnych zawodów czytają najmłodszym w ramach XXII Ogólnopolskiego Czytania Dzieciom – 1 czerwca 2023 Aleksandrów Łódzki
- ćwiczenia praktyczne dla ZSP nr 4 w Łowiczu na temat wpływu leków przeciwnowotworowych na komórki oraz sposobów przeciwdziałania skutkom ubocznym chemioterapii, maj 2010 roku, prowadzący: dr hab. Anna Pieniążek, prof. dr hab. Agnieszka Marczak, dr Marzena Szwed, mgr Arkadiusz Gajek, mgr Monika Jędrzejczyk
- pokaz i zajęcia warsztatowe dla SP z Oddziałami Integracyjnymi im. Janusza Korczaka w Rudzie Bugaj, w ramach III Międzyszkolnego Gminnego Konkursu Przyrodniczo-Ekologicznego "Kochajmy Przyrodę" – październik 2011 roku, prowadzący: dr hab. Anna Pieniążek, prof. dr hab. Agnieszka Marczak, dr Marzena Szwed, mgr Arkadiusz Gajek.
- zajęcia warsztatowe „Czy komórki mogą żyć poza organizmem człowieka – o prowadzeniu hodowli w warunkach *in vitro*?” – wydarzenie było częścią Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, kwiecień 2010 roku, prowadzący: dr Marzena Szwed, dr Anna Pieniążek
- wykład dla uczniów Liceum Ogólnokształcące im. Jana Pawła II w Tuszynie pt. „Czy warto być naukowcem w Polsce” - luty 2013 roku

## **7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia wnioskodawcy, dotyczące jego kariery zawodowej**

### **7.1. Odyte szkolenia i spotkania naukowe:**

- praktyki zawodowe z wykorzystania metod PCR i Western blot w biologii molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biochemii Medycznej, Zakład Enzymologii Medycznej, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, sierpień 2005

- Creative Time - Spotkanie naukowe „Śniadanie z Nauką” – zaprezentowanie własnych dokonań naukowych - Łódź 2011 roku
- szkolenie z zakresu procedur i doświadczeń wykonywanych na zwierzętach – Łódź 2021
- FEBS Advanced Course pt. “Analysis and Engineering of Biomolecular Systems” – Spetses, Grecja, 11-17 września 2010 roku
- FEBS Advanced Course pt.” Trends in genetics: Genomic instability and pathways of response” Erywań, Armenia, 20-26 lutego 2011 roku
- pobyt naukowy związany z badaniami nad strukturą i właściwościami koniugatu doksorubicyny z transferyną; Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, wrzesień 2011 roku
- cykl szkoleń, w skład których wchodziły warsztaty z ochrony własności intelektualnej, zarządzania projektami badawczymi oraz komercjalizacji wyników badań; KDK Info Sp. z o.o., ul. Mokotowska 14,00-561 Warszawa, Transfer Wiedzy strzałem w dziesiątkę – wspieramy małe i średnie przedsiębiorstwa – projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, 20 kwietnia-16 czerwca 2013 roku, Łódź, Polska
- warsztaty naukowe z zakresu nanotechnologii „Application of nanomaterials in nanomedicine and bionanotechnology”, organizatorzy: Faculty of Material Sciences, Technology and Bionics, Rhine-Waal University of Applied Sciences (Niemcy) i Instytut Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, w ramach projektu EU HyNANODend, przy współdziałaniu Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej i Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Biochemiczno-Biofizycznych na Wydziale BiOŚ, Uniwersytet Łódzki, 12-14 października 2015 roku, Łódź, Polska

## 7.2. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

### Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- **1999 – 2000, 2000 – 2001**, stypendium Prezesa Rady Ministrów
- **2008 – 2009**, wyróżnienie w konkursie Najlepszy Nauczyciel Akademicki na wydziale BIOŚ UŁ
- **11 - 17 września 2010 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków Federation of European Biochemical Societies na FEBS Advanced Course, Analysis and Engineering of Biomolecular Systems – Spetses
- **20 - 26 lutego 2011 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków Federation of European Biochemical Societies na FEBS Advanced Course pt.”Trends in genetics: Genomic instability and pathways of response” Erywań.
- **23-27 sierpnia 2011 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków EBSA, 8th European Biophysics Congress, Budapeszt

- **październik 2011 roku**, Nagroda Zespołowa Pierwszego Stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „Badania stresu oksydacyjnego indukowanego w komórkach nowotworowych i erytrocytach przez leki przeciwnowotworowe i czynniki środowiskowe”
- **2010 – 2011, 2011 – 2012**, stypendium motywacyjne dla doktorantów za wyniki w nauce
- **2012**, stypendium prokościowe dla najlepszych doktorantów  
Po uzyskaniu stopnia doktora
- **1 - 4 lipca 2014 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków Society for Experimental Biology Annual Meeting of Society for Experimental Biology, Manchester
- **30 czerwca – 3 lipca 2015 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków Society for Experimental Biology Annual Meeting of Society of Experimental Biology, Praga
- **październik 2015 roku**, Nagroda Zespołowa Pierwszego Stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „Wpływ antybiotyków przeciwnowotworowych i przeciwutleniaczy naturalnych i syntetycznych na komórki prawidłowe i nowotworowe oraz tkanki w układach eksperymentalnych *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* oraz w badaniach modelowych”
- **styczeń 2015 roku**, Nagroda Indywidualna Dziekana Wydziału BIOS dla pracowników naukowo- dydaktycznych i naukowych posiadających największe osiągnięcia w 2014 r. w zakresie dorobku publikacyjnego
- **24 – 27 stycznia 2016 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków International Union of Biochemistry and Molecular Biology na uczestnictwo w zjeździe naukowym Miami Winter Sympozjum
- **26 maja 2016 roku**, Nagroda Naukowa Fundacji Uniwersytetu Łódzkiego za szczególne osiągnięcia naukowe w latach 2015 – 2016 w obszarze nauk przyrodniczych i geograficznych w grupie młodych pracowników nauki UŁ
- **26 maja 2016 roku**, Nagroda Indywidualna Trzeciego Stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za rozprawę doktorską
- **15 – 17 października 2019 roku**, stypendium wyjazdowe przyznane ze środków COST Action 17140 „Cancer Nanomedicine - from the bench to the bedside” na wystąpienie ustne prezentowane na konferencji w Rydze
- **24 maja 2022 roku**, brązowa odznaka od prezydenta RP za długoletnią służbę
- **październik 2022 roku**, Nagroda Zespołowa Pierwszego Stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „Nowe strategie w leczeniu chorób o podłożu metabolicznym, w tym nowotworów i cukrzycy”.

Marzena Szwed

Marzena Szwed  
Łódź, 19 września 2023 roku