

Załącznik nr 2
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Dr Sylwia Michlewska
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

Łódź 2023 r.

Spis treści

1.	Imię i nazwisko.....	3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
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	4
4.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2.	Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej.....	4
4.3.	Opis osiągnięcia naukowego.....	6
4.3.1.	Wprowadzenie.....	6
4.3.2.	Metalodendrymery z rutenem, jako czynniki terapeutyczne w terapii chorób nowotworowych.....	11
4.3.3.	Zastosowanie metalodendrymerów z miedzią jako nośników leków i siRNA.....	21
4.3.4.	Podsumowanie	25
4.3.5.	Opis pozostałych osiągnięć naukowych lub artystycznych, niewymienionych w pkt. 4.	25
5.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.....	34
5.1.	Po doktoracie	34
5.2.	Przed doktoratem	36
6.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	37
6.1.	Działalność popularyzująca naukę	37
6.2.	Działalność dydaktyczna	38
6.3.	Działalność organizacyjna	40
7.	Plany badawcze.....	40
8.	Bibliometryczne podsumowanie dorobku publikacyjnego	41
9.	Piśmiennictwo.....	41

1. Imię i nazwisko

Imię i nazwisko	Sylwia Michlewska
ORCID:	0000-0002-8952-469X
Researcher-ID:	HHS-6666-2022
Scopus ID:	https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=16417133300
Google Scholar:	https://scholar.google.com/citations?user=PlhucAEAAAAJ&hl=en

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

- 2020 Stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, specjalność biofizyka medyczna, nadany w dn. 21-01-2020 r. przez komisję Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne.
- 2009 Tytuł magistra na kierunku Biologia w zakresie Biologii Doświadczalnej, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2022 – obecnie Pracownia Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych, Uniwersytet Łódzki, adiunkt badawczy
- 2014 – 2022 Pracownia Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych, Uniwersytet Łódzki, starszy specjalista biolog
- 2010 – 2014 Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Uniwersytet Łódzki, specjalista biolog

2001 – 2010 Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, pracownik naukowo – techniczny

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Karbokrzemowe metalodendrymery z rutenem i miedzią jako nośniki leków i proapoptotycznego siRNA do komórek nowotworowych

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej

Listę publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgłoszonego we wniosku habilitacyjnym, wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi i opisem mojego wkładu w powstanie prac zamieszczono poniżej. Kopie publikacji zawarto w Załączniku 4, a oświadczenia współautorów, określające ich wkład w każdej z prac w Załączniku 5.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania 6 publikacji (Impact Factor, IF) zgodnie z rokiem 2022 wynosi 35,875. Łączna liczba punktów według wykazu MEiN z roku 2021 równa jest 680.

W czterech pracach (1, 2, 3 i 4) jestem pierwszym autorem. W publikacjach 2, 3, 4 i 6 jestem także autorem korespondencyjnym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR (Journal Citation Report).

Zgłoszony cykl publikacji jest wynikiem mojej pracy w krajowych i międzynarodowych zespołach badawczych ze współautorami z Polski, Słowacji, Hiszpanii, Grecji i Czech.

* - pierwsi współautorzy; # – autor/autorzy do korespondencji.

1. **Michlewska S.***, Kubczak M., Maroto-Díaz M., Sanz del Olmo N., Ortega P., Shcharbin D., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Ionov M. #, Bryszewska M. *Synthesis and Characterization of FITC Labelled Ruthenium Dendrimer as a Prospective Anticancer Drug.*

Biomolecules, 9/9 (2019) 411; doi.org/10.3390/biom9090411. IF₂₀₂₂= 6,064, punkty MEiN₂₀₂₂ = 100.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: byłam współtwórcą koncepcji badawczej, zaplanowałam i wykonałam większość eksperymentów, zinterpretowałam dane w kontekście wyników eksperymentalnych, przygotowałam materiał ilustracyjny, napisałam manuskrypt. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy wynosi 60%.

- 2 **Michlewska S.****, Maroto M., Hołota M., Kubczak M., Sanz del Olmo N., Ortega P., Shcharbin D., de la Mata J.F., Bryszewska M., Ionov M#. 2021 *Combined therapy of ruthenium dendrimers and anti-cancer drugs against human leukemic cells*. Dalton Trans., 13;50/27 (2021) 9500-9511. [doi:10.1039/d1dt01388b](https://doi.org/10.1039/d1dt01388b). IF₂₀₂₂ = 4,569, punkty MEiN₂₀₂₂ = 140.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: byłam współtwórcą koncepcji badawczej, zaplanowałam i wykonałam większość eksperymentów, zinterpretowałam dane w kontekście wyników eksperymentalnych, przygotowałam materiał ilustracyjny napisałam manuskrypt, a także pełniłam rolę autora korespondencyjnego (wysłałam pracę do czasopisma, prowadziłam korespondencję z Edytorem, zmodyfikowałam manuskrypt zgodnie z sugestiami recenzentów, a także odpowiedziałam na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy). Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy wynosi 65%.

- 3 **Michlewska S.****, Maly M., Wójkowska D., Karolczak K., Skiba E., Hołota M., Kubczak M., Ortega P., Watala C., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. *Carbosilane ruthenium metallodendrimer as alternative anti-cancer drug carrier in triple negative breast cancer mouse model: a preliminary study*. Int. J. Pharm., 636 (2023) 122784. [doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122784](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122784). IF₂₀₂₂ = 6,510, punkty MEiN₂₀₂₂ = 100.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: byłam autorem koncepcji badawczej, otrzymałam pozwolenie komisji badań bioetycznych dot. wykonania doświadczeń z zwierzętami, zaplanowałam eksperymenty dotyczące charakterystyki powstawania kompleksów dendrymer/lek oraz eksperymenty *in vitro* i *in vivo*. Następnie wykonałam lub uczestniczyłam w wykonaniu zaplanowanych eksperymentów. Na bieżąco interpretowałam uzyskane wyniki i podejmowałam decyzję dotyczące dalszych eksperymentów. Następnie opracowałam dane i przygotowałam wykresy oraz rysunki, napisałam manuskrypt i jako autor korespondencyjny wysłałam pracę do czasopisma. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy wynosi 65%.

- 4 **Michlewska S.****, Garaiova Z., Šubjakova V., Hołota M., Kubczak M., Grodzicka M., Okla E., Naziris N., Balcerzak Ł., Ortega P., de la Mata F.J., Hianik T., Waczulikova I., Bryszewska M., Ionov M. *Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anticancer drug delivery: Introducing protocols*. Colloids and Surf. B, (2023) 227:113371. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113371. IF₂₀₂₂= 5,999. punkty MEiN₂₀₂₂ = 100.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: byłam współautorem koncepcji badawczej. Nadzorowałam prace laboratoryjną doktorantów zaangażowanych w wykonanie eksperymentów. Przygotowałam i przeanalizowałam nanosystemy dendrymer/liposomy/lek, oraz wykonałam doświadczenia *in vitro*. Następnie podczas stażu w Uniwersytecie Komeńskiego wraz z Prof. Ivetą Waczulikową i Dr Zuzaną Garaiovą opracowałam uzyskane wyniki, przeanalizowałam dane, przygotowałam część graficzną i napisałam manuskrypt. Pełniłam też rolę autora korespondencyjnego, odpowiadając na recenzje i wymieniając korespondencję z Edytorem. Mój udział procentowy wynosi 55%.

5. Sanz del Olmo N.*, Holota M.*, **Michlewska S.**, Gómez R., Ortega P., Ionov M.#, de la Mata F.J., Bryszewska M. *Copper (II) Metallodendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells*, *Pharmaceutics*, 12/8 (2020) 727. doi.org/10.3390/pharmaceutics12080727. IF₂₀₂₂ = 6,525, punkty MEiN₂₀₂₂ = 100.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: wraz doktorantami zaplanowałam eksperymenty i na bieżąco interpretowaliśmy uzyskane wyniki. Wykonałam analizy z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Brałam udział w przygotowaniu szkicu manuskryptu, a następnie w jego edycji i korekcie. Uczestniczyłam również w odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy 23%.

6. Hołota M.*, **Michlewska S.#**, Garcia-Gallego S., Sanz del Olmo N., Ortega P., Bryszewska M., de la Mata F.J., Ionov M. *Combination of copper metallodendrimers with conventional antitumor drugs to combat cancer in in vitro models*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24/4 (2023) 20234076. doi.org/10.3390/ijms24044076. IF₂₀₂₂ = 6,208. punkty MEiN₂₀₂₂ = 140.

Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: Brałam udział w przygotowaniu koncepcji badawczej, zaplanowałam eksperymenty, wykonałam część doświadczeń i wraz z doktorantem mgr Marcinem Hołotą interpretowaliśmy, a także opracowywaliśmy uzyskane wyniki, przygotowaliśmy ryciny i napisaliśmy manuskrypt. Następnie brałam udział w edycji i korekcie pracy. Jako autor korespondencyjny wysłałam pracę do czasopisma i odpowiadałam na pytania recenzentów. Mój udział procentowy wynosi 25%.

4.3. Opis osiągnięcia naukowego

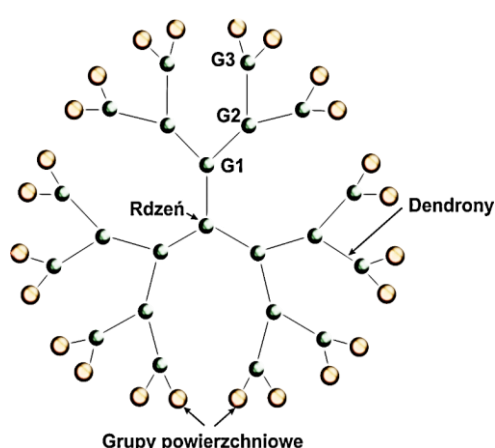
4.3.1. Wprowadzenie

Pomimo imponujących postępów medycyny, leczenie chorób nowotworowych wciąż pozostaje wyzwaniem. Każdego roku diagnozuje się wiele różnych typów nowotworów, które mimo stosowania odpowiednio dobranej i stosunkowo efektywnej terapii wciąż prowadzą do śmierci pacjentów (Golbaghi i Castonguay, 2020). Dodatkowym problemem, z którym boryka się

aktualna medycyna jest lekooporność komórek zmienionych nowotworowo (Creixell i Peppas, 2012; Zhang c, 2014). Mimo licznych badań skupionych na rozwiązaniu tego problemu wciąż poszukuje się nowych, alternatywnych metod leczenia w tym zakresie. Poza opornością na działanie chemioterapii istotną przeszkodę stanowią również skutki uboczne, często prowadzące do osłabienia organizmu, a nawet do poważnych stanów patologicznych (Zhang i wsp., 2016). Jednym z potencjalnych sposobów poprawy efektywności chemioterapii jest wykorzystanie nanonośników toksycznych leków (Hołota i wsp., 2023; Michlewska i wsp., 2023a).

Obecnie sugeruje się, że leki bazujące na nanonośnikach mogą być bardziej skutecznymi i mniej toksycznymi, niż konwencjonalne chemioterapeutyki (Cho i wsp., 2008). W ostatnich latach uwaga naukowców skupia się na rozwijaniu nowych, udoskonalonych narzędzi do zastosowań medycznych. W ich polu zainteresowania znajdują się nanocząstki, takie jak nanorurki węglowe, kropki kwantowe, nanowłókna, liposomy, czy nanocząstki polimerowe, na przykład dendrymery (Kesharwani i wsp., 2014a; Pedziwiatr-Werbicka i wsp., 2019).

Według literatury, wśród innych nanocząstek, dendrymery ze względu na swoją budowę wydają się być najbardziej perspektywiczne i przyciągają wiele uwagi, jako narzędzia do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych (Białkowska i wsp., 2021). Dendrymery to syntetyczne, rozgałęzione polimery o sferycznym kształcie, których średnica wynosi około 2-10 nm. Zbudowane są z rdzenia, do którego dołączone są rozgałęzione monomery, których liczba determinuje generację nanocząstki (Rys. 1) (Noriega-Luna i wsp., 2014).



Rysunek 1.
Budowa dendrymeru

Konsekwencją takiej budowy jest nie tylko obecność wolnych przestrzeni wewnątrz molekuly, gdzie mogą być enkapsulowane różnego rodzaju cząsteczki, ale także liczne grupy funkcyjne na powierzchni dendrymeru, które stosunkowo łatwo można modyfikować. Dzięki

temu możliwe jest dołączanie do dendrymeru różnych biomolekuł, w tym leków czy kwasów nukleinowych, co może prowadzić do poprawy ich efektywności terapeutycznej (Hołota i wsp., 2019; Michlewska i wsp., 2017). Dodatkowe cechy, które czynią dendrymery atrakcyjnymi pod kątem zastosowań medycznych to ich stabilność w roztworach fizjologicznych, monodispersyjność, a także wysoka masa cząsteczkowa (Ionov i wsp., 2015). Co więcej, według aktualnie dostępnej wiedzy dendrymery mogą zwiększać stabilność, biokompatybilność, bioaktywność, bioprzyswajalność i rozpuszczalność skoniugowanych z nimi leków (Michlewska i wsp., 2021). Ponadto zaobserwowano, że zastosowanie dendrymerów może powodować znaczącą redukcję cytotoksyczności terapeutyków (Kesharwani i wsp., 2014b).

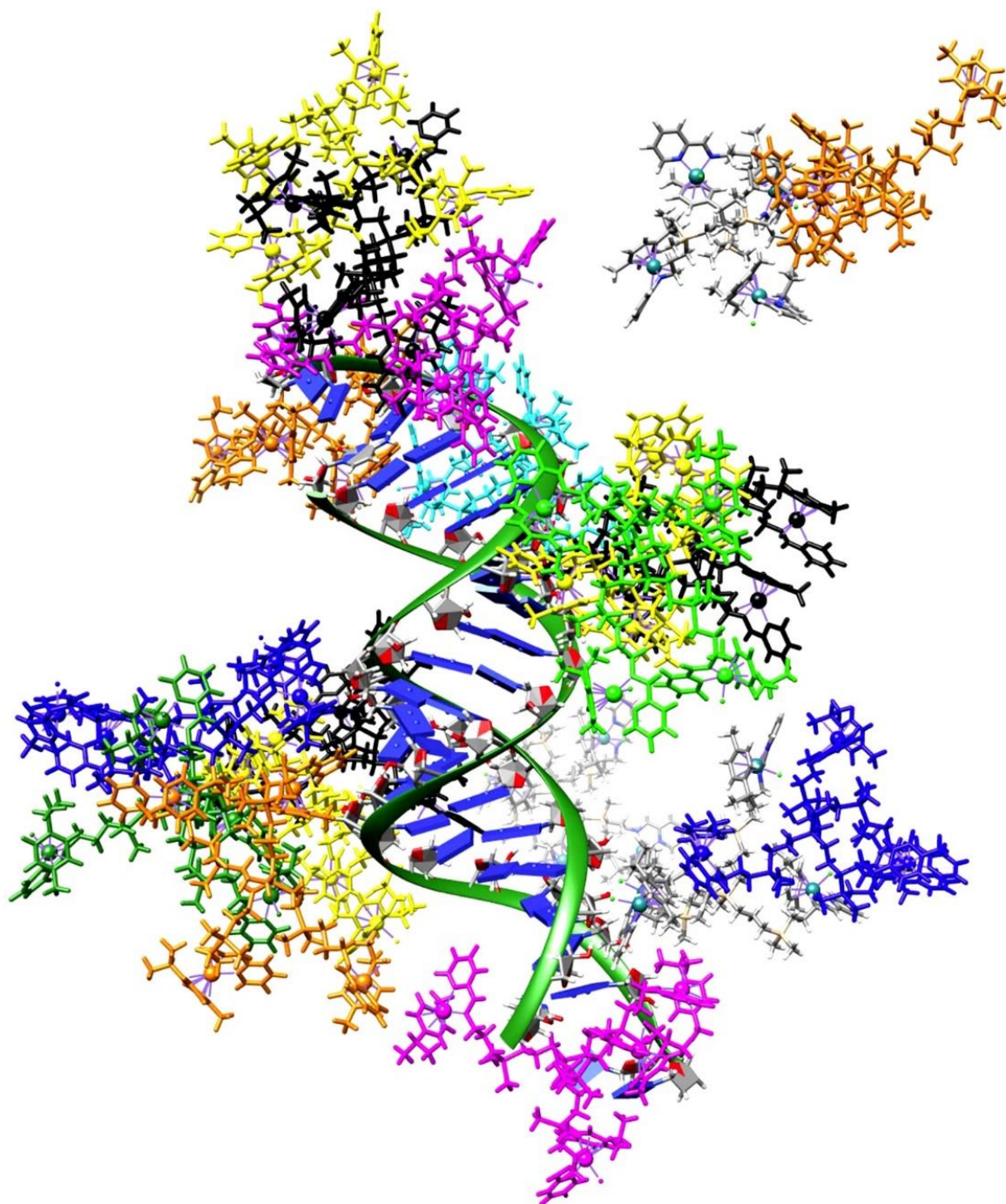
W ostatnich latach za jedną z alternatywnych terapii nowotworów uznaje się terapię genową. Komórki rakowe wykazują nadekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek z rodziny Bcl-2, które są m.in. odpowiedzialne za regulację procesu apoptozy (Dzmitruk i wsp., 2015; Ionov i wsp., 2015). Dlatego też wyciszenie tych genów na drodze interferencji pozostaje w polu zainteresowania naukowców. W procesie tym siRNA (z ang. *small interfering RNA*) o długości około 20 nukleotydów jest dołączane do komplementarnego mRNA (Białkowska et al., 2021; Michlewska i wsp., 2018). Mechanizm działania siRNA rozpoczyna się, gdy nić „antysensowna” łączy się z kompleksem wyciszającym RISC (z ang. *RNA-induced silencing complex*). RISC powoduje cięcie mRNA na małe fragmenty, które są degradowane przez mechanizmy komórkowe prowadząc do zablokowania ekspresji genu, a w konsekwencji blokady syntezy docelowego białka (Dzmitruk i wsp., 2015). Skutkiem tego jest wprowadzenie komórek nowotworowych, na drogę apoptozy. Niestety wprowadzenie siRNA do komórek ze względu na jego ujemny ładunek i wrażliwość na działanie nukleaz, wciąż pozostaje wyzwaniem (Ferenc i wsp., 2013; Ionov i wsp., 2015; Rodríguez-Prieto i wsp., 2021). Rozwiązaniem wydaje się być, zatem znalezienie odpowiedniego nośnika, który utworzyłby stabilny kompleks z kwasem nukleinowym (Rys. 2) i w bezpieczny sposób pozwoliłby na jego wprowadzenie do wnętrza komórki (Del Olmo i wsp., 2020; Michlewska i wsp., 2018).

Według ostatnich doniesień wiadomo, że karbokrzemowe dendrymery mogą tworzyć kompleksy z kwasami nukleinowymi i chronić go przed degradacją w obecności nukleaz (Del Olmo i wsp., 2020; Michlewska i wsp., 2018).

Obecnie wiele leków oraz czynników diagnostycznych opiera się na cisplatynie, która posiada właściwości przeciwnowotworowe (Wan i wsp., 2017). Niestety terapia

z wykorzystaniem tego metalu niesie za sobą negatywny wpływ na cały organizm, znacznie zmniejszając komfort życia pacjentów (Wan i wsp., 2017). Dlatego uwaga naukowców skupia się na innych metalach wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, które mogą stanowić alternatywę dla cisplatyny. Już od dawna znane są przeciwnowotworowe właściwości rutenu i miedzi (Gan i wsp., 2016). Ruten, występuje na różnych stopniach utlenienia Ru(II), Ru(III) i Ru(IV). Wśród nich Ru(II) jest wysoce cytotoksyczny wobec komórek nowotworowych (Maroto-Díaz i wsp., 2016; S. Michlewska i wsp., 2017). Metal ten zaburza replikację DNA i syntezę RNA oraz może indukować apoptozę lub nekroptozę w komórkach nowotworowych (Michlewska i wsp., 2020, 2019). Dodatkowo, ze względu na podobieństwo do żelaza, metal ten może być intensywnie pobierany przez komórki nowotworowe mające podwyższony metabolizm, a tym samym zwiększone zapotrzebowanie na żelazo w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Z kolei miedź należy do grupy niezbędnych metali i wyróżnia się biokompatybilnością. Wchodzi ona w skład wielu biomolekuł i jest kluczowa w niektórych procesach biochemicznych (Hołota i wsp., 2019; Peña i wsp., 2019). Związki miedzi są znane, jako induktory apoptozy w komórkach nowotworowych. Metal ten wykazuje działanie antyproliferacyjne dzięki zdolności do wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT) wewnątrz komórek, które mogą uszkadzać DNA (Apelgot i wsp., 1981). Jako, że komórki rakowe mają zmieniony poziom RFT, są bardziej wrażliwe na różnice w ich poziomie niż komórki zdrowe (Peña i wsp., 2019).

W obliczu tej wiedzy interesujące wydaje się być założenie, że poprzez dołączenie atomów metali takich jak ruten i miedź do struktury dendrymerów możliwe jest nabywanie przez nie właściwości przeciwnowotworowych (Hołota i wsp., 2019; Maroto-Díaz i wsp., 2016; Michlewska i wsp., 2017). Takie związki mogłyby stanowić alternatywę dla wirusowych systemów przenoszenia kwasów nukleinowych bądź leków, cechując się jednocześnie większym bezpieczeństwem, elastycznością i efektywnością (Hołota i wsp., 2023; Michlewska i wsp., 2023b).



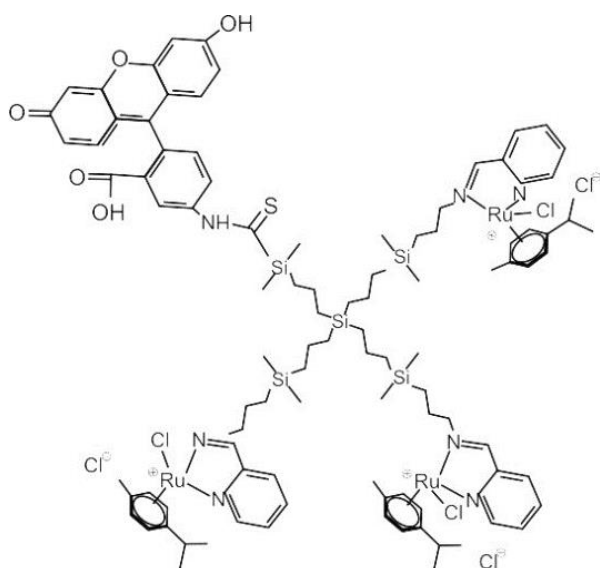
Rysunek 2. Symulowany system składający się z 1 siRNA i 20 dendrymerów CRD13. W związku z tym, że dendrymery mają tendencję do tworzenia klastrów, są one zaprezentowane w różnych kolorach dla lepszej wizualizacji. Atomy rutenu są przedstawione w postaci kul. (Michlewska i wsp. 2018, *J. Inorg. Biochem.* 181, 18–27).

W prezentowanym cyklu publikacji oceniona została możliwość wykorzystania dendrymerów karbokrzemowych z dołączonymi atomami metali rutenu lub miedzi, jako uniwersalnych narzędzi do przenoszenia kwasów nukleinowych, leków lub innych substancji pomocniczych w terapii nowotworów. Głównym celem pracy było znalezienie odpowiedzi na pytanie czy karbokrzemowe dendrymery z dołączonymi atomami miedzi lub rutenu są odpowiednimi nośnikami leków lub siRNA do komórek nowotworowych. Postawiono hipotezę, że badane metalodendrymery wykazujące aktywność przeciwnowotworową tworzą kompleksy z proapoptotycznym siRNA oraz lekami przeciwnowotworowymi.

4.3.2. Metalodendrymery z rutenem, jako czynniki terapeutyczne w terapii chorób nowotworowych.

Podczas wykonywania pracy doktorskiej zainteresowałam się niezwykle ciekawym tematem, w którym główny nacisk został położony na scharakteryzowanie i dokładny opis dendrymerów zawierających atomy rutenu, dekorowanych różnymi grupami funkcyjnymi. Z wielu przebadanych związków udało się wyselekcjonować jeden dendrymer - CRD13 (Carbosilane Ruthenium Dendrimer), który tworzył stabilne kompleksy z proapoptotycznymi siRNA (siBcl-2, siMcl-1 i siBcl-xl) i wykazywał cytotoksyczność w stosunku do komórek białaczki HL-60, zarówno w postaci nieskompleksowanego dendrymeru, jak również w kompleksie z siRNA. Jednocześnie w mniejszym stopniu wpływał na żywotność komórek prawidłowych (PBMC).

Ten etap badań zamknął się cyklem 3 artykułów opublikowanych w czasopismach: *European Polymer Journal* (01.2017), *Journal of Inorganic Biochemistry* (01.2018) oraz *Future Medicinal Chemistry* (05.2019). Wspomniane publikacje stanowiły bazę mojej pracy doktorskiej. Wprowadzone zmiany proceduralne postępowań doktorskich, których konsekwencją było trzykrotne odraczanie terminu mojej obrony (komplet dokumentów został złożony w czerwcu 2019 roku) nie powstrzymały mnie przed kontynuacją pracy naukowej. W swoich dalszych badaniach, (po złożeniu pracy doktorskiej) zajęłam się analizą potencjalnego zastosowania metalodendrymerów dla potrzeb terapii przeciwnowotworowej. W konsekwencji w zespole partnerskim Prof. de la Maty z Katedry Chemii Organicznej i Nieorganicznej, Uniwersytetu Alcalá, z Madrytu, w Hiszpanii na naszą prośbę został zsyntetyzowany dendrymer z rutenem znakowany sondą fluorescencyjną - izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) (Rys.3).



Rysunek 3. Struktura dendrymeru CRD13-FITC. Dendrymer został zaprojektowany przez zespół naszych hiszpańskich partnerów, w laboratorium Profesora F.J. de la Maty z Uniwersytetu w Alcali (Madryt). Graficzna prezentacja CRD13-FITC adoptowana z: [Michlewska i wsp. Biomolecules 2019](#).

Cel głębszego zrozumienia specyfiki działania nowo zsyntetyzowanego związku był motywowany kluczowym odkryciem uzyskanym w trakcie moich badań doktoranckich, które sugerowało, że wyselekcjonowany dendrymer CRD13 wydawał się być wybiórczo toksyczny dla komórek nowotworowych. Dlatego też pierwszym etapem mojej pracy badawczej po złożeniu dokumentów doktorskich (po doktoracie) było zbadanie związku CRD13-FITC i porównanie jego cech z wcześniej wyselekcjonowanymi dendrymerami. W wyniku tych badań powstał pierwszy artykuł z cyklu prac stanowiących moje główne osiągnięcie pracy habilitacyjnej [\(1\) Michlewska S., Kubczak M., Maroto-Díaz M., Sanz del Olmo N., Ortega P., Shcharbin D., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Ionov M., Bryszewska M., Synthesis and Characterization of FITC Labelled Ruthenium Dendrimer as a Prospective Anticancer Drug, *Biomolecules* 2019 9\(9\), 411](#). Praca ta została poświęcona analizie biogodności i cytotoksyczności nowego dendrymeru znakowanego izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Określone zostały właściwości fizyko-chemiczne dendrymeru CRD13-FITC. Nowy dendrymer wykazywał większą cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych niż prawidłowych. Dodatkowo, znakowanie dendrymeru sondą fluorescencyjną umożliwiło śledzenie jego migracji w komórkach. Biorąc pod uwagę mechanizm działania badanego dendrymeru zawierającego atomy rutenu i znakowanego FITC, można uznać go za potencjalny czynnik przeciwnowotworowy. Zgodnie z wiedzą dotyczącą mechanizmu działania rutenu obecność metalu może potęgować efekt terapeutyczny przy jego przyszłych zastosowaniach, w terapii przeciwnowotworowej. Jednocześnie obecność znacznika

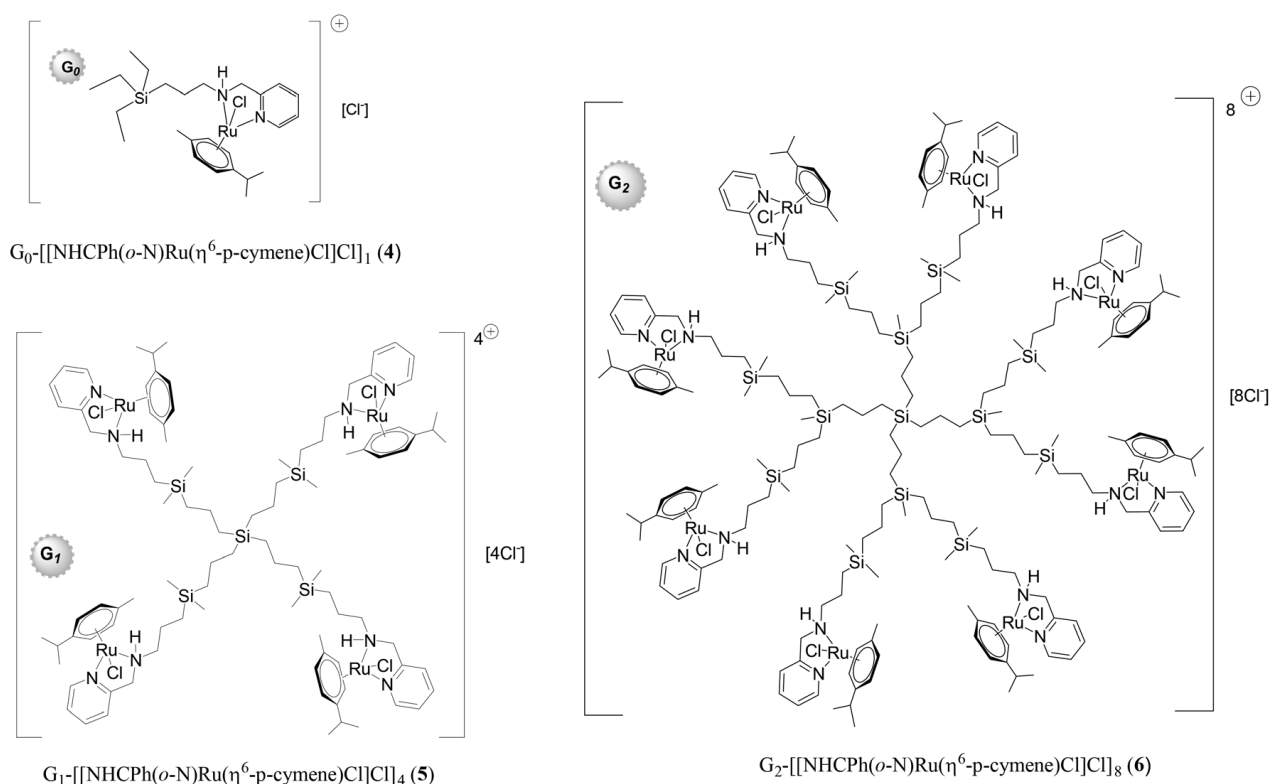
fluorescencyjnego sprawia, że może on być dobrym narzędziem dostosowanym do potrzeb diagnostyki obrazowej. Opublikowane dane potwierdziły hipotezę, że modyfikacja dendrymeru CRD13 poprzez przyłączenie FITC nie zmieniła jego właściwości przeciwnowotworowych. Dodatkowo zostało stworzone i scharakteryzowane nowe uniwersalne narzędzie łączące w sobie funkcję nanoosiłnika, jednocześnie pozwalające na diagnostykę obrazową. W tej pracy grupa hiszpańska opracowała syntezę związku, natomiast ja samodzielnie zaplanowałam i częściowo wykonałam eksperymenty dotyczące analizy biofizycznej określającej efekty działania opisywanego dendrymeru. Następnie opracowałam dane, przygotowałam materiał ilustracyjny, dokumentację techniczną i napisałam tekst publikacji. Pełniłam również rolę pierwszego autora i odpowiadałam na recenzje.

W następnej kolejności zainspirowana wspomnianym powyżej odkryciem dotyczącym dendrymeru CRD13 postanowiłam porównać jego działanie z analogicznym związkiem wyższej generacji w stosunku do komórek ludzkiej białaczki limfoblastycznej (1301). To wydaje się istotne w szerokim spojrzeniu na uniwersalność badanego związku do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej. Z uwagi na fakt, że powstała praca *Michlewska S., Ionov M., Szwed A., Rogalska A. Sanz del Olmo N., Ortega P., Denel M., Jacenik D., Shcharbin D., de la Mata F.J., Bryszewska M. Ruthenium dendrimers against human lymphoblastic leukemia 1301 cells, Int. J. Mol. Sci. 2020 21, 4119* nawiązuje do tematyki poruszanej w ramach mojej pracy doktorskiej, **postanowiłam nie włączać tej publikacji do cyklu prac stanowiących główne osiągnięcie.** Niemniej ze względu na istotność wyników zaprezentowanych w tym artykule w kontekście tematyki poruszanej w ramach mojego głównego osiągnięcia pracy habilitacyjnej postanowiłam omówić ją w tym paragrafie. W publikacji tej potwierdzono, że obecność rutenu w strukturze dendrymerów nadaje im nowe właściwości, które mogą być przydatne w leczeniu nowotworów. W pierwszym etapie aktywność dendrymerów 1 i 2 generacji wobec komórek ludzkiej białaczki limfoblastycznej zbadano za pomocą, techniki Real Time PCR, testu kometowego oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W wyniku działania obu dendrymerów obserwowano zmiany ekspresji pro- i anti-apoptotycznych białek, a także znaczną fragmentację DNA. Przebadane dendrymery z rutenem powodowały też zmiany w obrębie morfologii komórki, takie jak powstawanie ciałek apoptotycznych. Co więcej, analiza ultrastruktury badanych komórek wykazała zagęszczenie cytoplazmy, a także kondensację i marginalizację chromatyny, co jest charakterystyczne dla apoptozy.

Według danych literaturowych stres oksydacyjny wiąże się ze zmniejszonym potencjałem mitochondriów i może wskazywać na wczesny etap apoptozy. W związku z tym oznaczono poziom reaktywnych form tlenu (RFT) oraz określono zmiany wartości potencjału mitochondrialnego w badanych komórkach pod wpływem dendrymerów. W analizach oba metalodendrymery spowodowały zwiększenie poziomu RFT. Obserwowano też zmiany potencjału mitochondrialnego w komórkach 1301 w obecności dendrymeru CRD13.

Wyniki eksperymentów przedstawione w opisywanej publikacji sugerują potwierdzenie hipotezy zakładającej, że dzięki obecności rutenu w swojej strukturze dendrymery uszkodzają komórki 1301 kierując je na drogę apoptozy bądź nekroptozy. Byłam pomysłodawcą hipotezy badawczej tej pracy, samodzielnie zaplanowałam i wykonałam wszystkie eksperymenty, opracowałam dane, napisałam manuskrypt. Na liście autorów jestem autorem pierwszym i korespondencyjnym.

Według dostępnej literatury utworzenie nanosystemu bazującego na dendrytycznym szkielecie może wpływać na rozpuszczalność, biokompatybilność oraz biodostępność leków skoniugowanych z dendrymerem. Co więcej, znacznie wydłuża się wówczas czas działania leku w komórce nowotworowej w porównaniu do wolnego leku. Zatem w kolejnych badaniach postanowiłam ocenić możliwość zastosowania metalodendrymerów z rutenem, jako nośników leków przeciwnowotworowych. Na podstawie postawionej hipotezy powstał drugi artykuł z cyklu prac stanowiących moje główne osiągnięcie pracy habilitacyjnej (2) Michlewska S., Maroto M., Hołota M., Kubczak M., Sanz del Olmo N., Ortega P., Shcharbin D., de la Mata J.F., Bryszewska m., Ionov M. 2021 Combined therapy of ruthenium dendrimers and anti-cancer drugs against human leukemic cells, Dalton Trans. 2021 50(27):9500-9511. Razem z hiszpańską grupą Prof. Javiera de la Mata postanowiliśmy podjąć próbę modyfikacji dotychczas badanych związków. Zaletą tego nowatorskiego podejścia miało być ulepszenie właściwości metalodendrymerów dekorowanych rutenem. W konsekwencji opracowano nowe nanocząstki zaprezentowane na Rysunku 4.

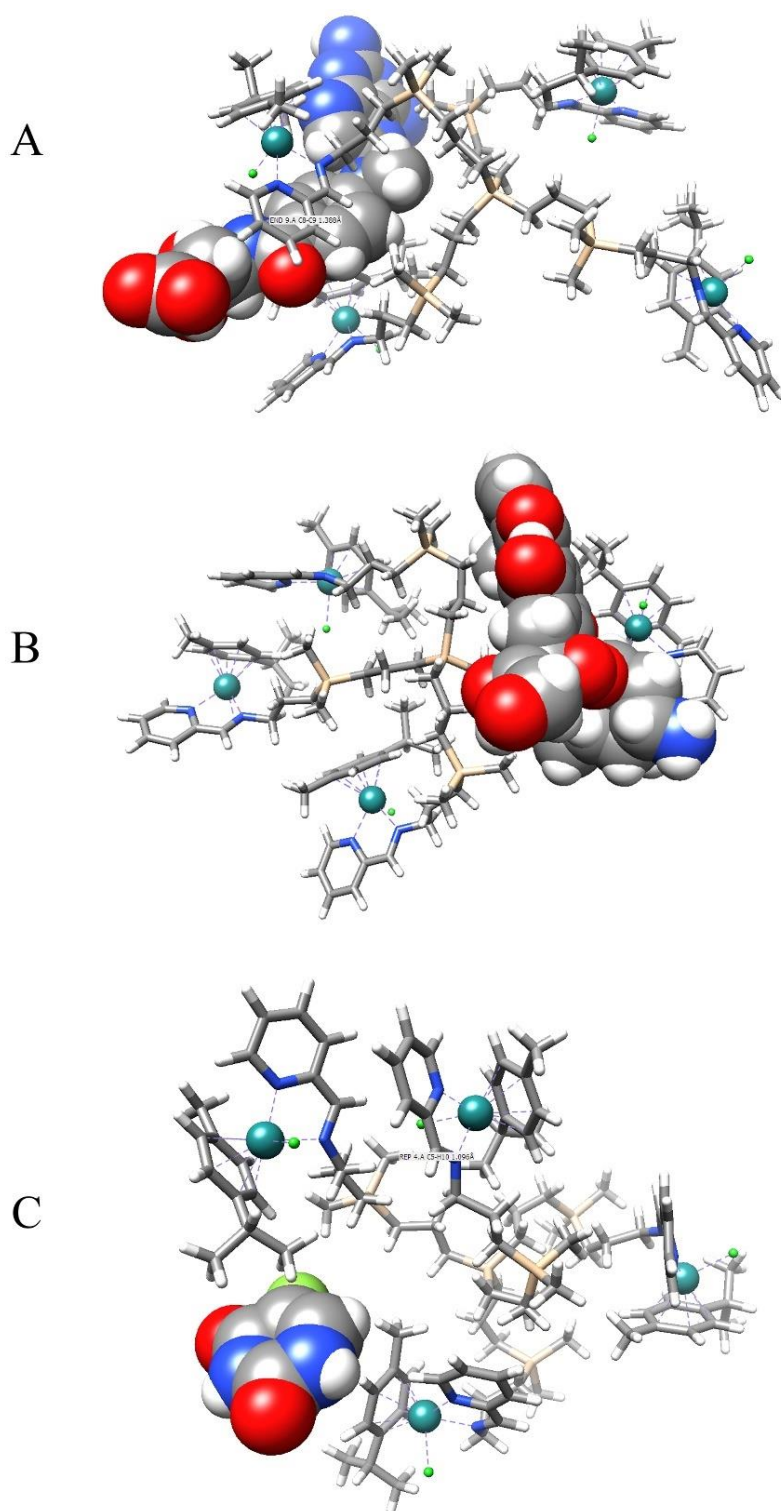


Rysunek 4. Struktura nowosyntetyzowanych Ru(II) metalodendrymerów z grupami aminopirydynowymi. Struktura dendrymerów oraz ich budowa została zaprojektowana przez zespół Prof. F.J. de la Maty z Uniwersytetu w Alcalá de Henares (Hiszpania) (Michlewska i wsp. *Dalton Transactions* 2021).

W ramach tej pracy rutenowe metalodendrymery z amino-pirydynowymi grupami funkcyjnymi zostały skompleksowane z konwencjonalnymi lekami przeciwnowotworowymi doksorubicyną (DOX), metotreksatem (MTX) i 5-fluorouracylem (5-Fu). Na wstępie grupa Prof. de la Mata opracowała i opisała syntezę nowych związków. Następnie przez nasz zespół określony został ładunek powierzchniowy i rozmiar dendrymerów. W tym celu wykorzystaliśmy techniki pomiaru potencjału i rozmiaru zeta. Dendrymery wykazywały dodatni ładunek. Kationowość nanocząstki jest jednym z kluczowych czynników, które pozwalają na elektrostatyczne oddziaływanie z ujemnie naładowanymi biomolekułami. Dzięki czemu istnieje możliwość ich kompleksowania np. z lekami. Jednakże dodatni ładunek może powodować cytotoksyczność, ze względu na silne oddziaływanie z błoną komórkową i prowadzić do powstawania mikrouszkodzeń w błonie, a w konsekwencji niszczyć prawidłowe komórki. Okazało się, że dzięki optymalizacji

procesu syntezy nowe dendrymery, mimo wyraźnego dodatniego ładunku, nie wykazywały cytotoksyczności w stosunku do komórek niezmienionych nowotworowo, co stanowi podstawę do bezpiecznego testowania związków. Ostatnim i kluczowym etapem badań w tym zakresie była ocena aktywności przeciwnowotworowej utworzonych kompleksów w stosunku do komórek ludzkiej białaczki limfoblastycznej (1301) i ostrej białaczki promielocytowej (HL-60). Uzyskane wyniki potwierdziły zakładaną hipotezę, że dendrymery z rutenem w połączeniu z doksorubicyną i metotreksatem znacznie zmniejszają żywotność komórek nowotworowych linii 1301 i HL-60. Mniejsza efektywność została zaobserwowana dla kompleksów z 5-fluorouracylem. Wyniki opublikowane w tej pracy potwierdziły hipotezę, że nowe ulepszone dendrymery z atomami rutenu tworzą kompleksy z lekami przeciwnowotworowymi (DOX, MTX i 5-Fu), a koniugaty Dendrymer/Lek hamują aktywność metaboliczną komórek nowotworowych. Jako pomysłodawca badań i wykonawca wszystkich analiz oraz osoba opracowująca wyniki, a także przygotowująca manuskrypt jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem publikacji.

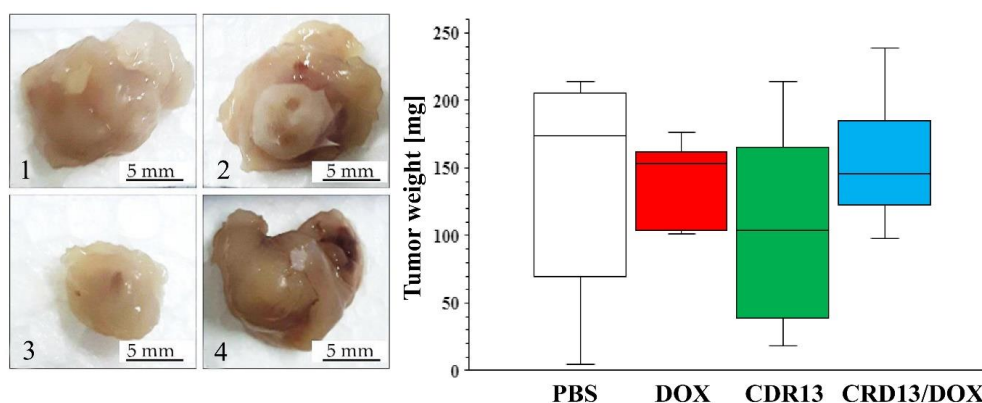
Uzyskanie obiecujących wyników w zakresie tworzenia koniugatów pomiędzy metalodendrymerami i lekami oraz wpływu przygotowanych (dendrymer/lek) na żywotność komórek nowotworowych *in vitro*, skłoniło mnie do podjęcia próby wykorzystania metalodendrymeru CRD13, jako nośnika leków przeciwnowotworowych na modelu mysim, w badaniach *in vivo*, co stanowi temat kolejnego manuskryptu stanowiącego część mojego głównego osiągnięcia **(3)** Michlewska S., Maly M., Wójkowska D., Karolczak K., Skiba E., Hołota M., Kubczak M., Ortega P., Watała C., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. Carbosilane ruthenium metallodendrimer as alternative anti-cancer drug carrier in triple negative breast cancer mouse model: a preliminary study, 2023 Int. J. Pharm. 2023;636:122784. W pierwszej kolejności zoptymalizowany został proces tworzenia kompleksów badanej nanocząstki z doksorubicyną (DOX), metotreksatem (MTX) i 5-fluorouracylem (5-Fu) z wykorzystaniem metod biofizycznych. Zastosowaliśmy metody pomiaru średnicy hydrodynamicznej utworzonych kompleksów.



Rysunek 5. Wyniki symulacji molekularnych układów CRD13/lek w wodzie. (A) - 1xCRD13+1xMTX, (B) - 1xCRD13+1xDOX, (C) – 1xCRD13+1x5-Fu. Kolory: C – szaro/czarny, O – czerwony, H – biały, Si – beżowy, N – niebieski, Ru – ciemny cyjan (kula), Cl i F – zielony. Atomy leków zaprezentowano w formie kulistej (Michlewska i wsp. *Int. J. Pharm.* 2023).

Dodatkowo, wyznaczono ich potencjał zeta. Następnie utworzone kompleksy zostały zbadane z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Dodatkowo dzięki współpracy z Prof. Markiem Mały z Uniwersytetu J.E. Purkyně z Republiki Czeskiej została wykonana symulacja komputerowa, ze szczegółową analizą i charakterystyką powstałych kompleksów dendrymer/lek, z uwzględnieniem ich stabilności (Rys. 5).

Następnie do przeprowadzenia badań *in vitro* na ludzkich liniach komórkowych: nienowotworowych fibroblastach oraz trzykrotnie negatywnym raku piersi (TNBC) wybrano nanosystem bazujący na dendrymerze CRD13 i doksorubicynie. Ten kompleks wykazywał znacznie większą cytotoksyczność w stosunku do komórek rakowych. Bazując na tych danych zdecydowaliśmy się na przeprowadzenie pilotażowego eksperymentu *in vivo*. W tym celu wykorzystaliśmy myszy model trzykrotnie negatywnego raka piersi. Okazało się, że nanokompleks dendrymer/lek podany dootrzewnowo spowodował redukcję tkanki guza w stosunku do samej doksorubicyny. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu metody ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) wykazaliśmy, że ruten obecny w strukturze dendrymeru kumulował się głównie w tkance nowotworu.



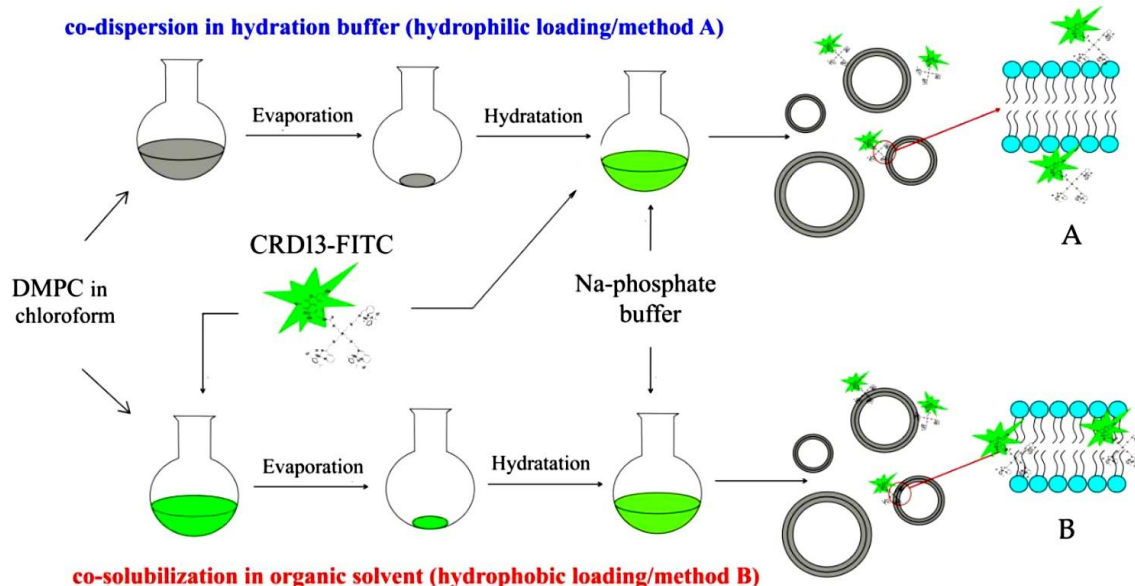
Rysunek 6. Wpływ dendrymeru CRD13 i jego kompleksu z DOX na redukcję rozwoju guza w mysim modelu trzykrotnie negatywnego raka piersi (1) - PBS, (2) – 10mg/kg DOX, (3) – 10 mg/kg CRD13, (4) - 10 mg/kg DOX+10 mg/kg CRD13. (Michlewska i wsp. *Int. J. Pharm.* 2023).

Jednak najskuteczniej działał nieskompleksowany dendrymer (Rys. 6). Z uwagi na fakt, że kompleks CRD13/DOX wykazywał wyższą cytotoksyczność w stosunku do komórek linii MDA-MB-231 niż nieskompleksowana DOX i wolny dendrymer, a jednak w badaniach *in vivo* efekt działania samego dendrymeru był zdecydowanie wyraźniejszy niż efekt kompleksu dendrymer/lek, dalsze analizy dotyczące dendrymeru CRD13 wydają się niezbędne.

W powstałej pracy byłam pierwszym i korespondencyjnym autorem oraz twórcą hipotezy badawczej. Wspólnie z doktorantami przeprowadziliśmy analizy biofizyczne. Następnie wraz członkami zespołu Prof. Watały z Kliniki Zaburzeń Hemostazy, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wykonałam wszystkie eksperymenty *in vivo*. Z pomocą Dr Skiby z Politechniki Łódzkiej wykonałyśmy oznaczenia zawartości rutenu we wcześniej pobranych tkankach, a w dalszej kolejności samodzielnie przeanalizowałam i opracowałam wyniki oraz przygotowałam część graficzną. Następnie napisałam manuskrypt, po czym wraz z Prof. M. Ionovem oraz Prof. C. Watałą dopracowaliśmy jego ostateczną wersję.

Na tym etapie badań można było stwierdzić, że stosowanie metalodendrymerów z rutenem wydaje się być stosunkowo bezpieczne i efektywne w stosunku do różnych typów nowotworów. Jednak idea zmniejszenia cytotoksyczności dendrymeru CRD13 i jednocześnie zwiększenia zdolności wnikania do komórek wydawała się niezwykle interesująca. W tym zakresie w celu udoskonalenia profilu transfekcji zaproponowano wzbogacenie kompleksu dendrymer/lek o system liposomalny o określonym składzie lipidowym. Na podstawie tego pomysłu został przygotowany projekt badawczy, pt.: „New Drug Delivery Nanosystem Combining Liposomal and Dendrimeric Technology (Liposomal Locked-In Dendrimers) for development of cytostatic drugs”, PPN/BIL/2018/1/00150/U/00001. Projekt został pozytywnie oceniony, zaakceptowany i sfinansowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. W tym grantie wykonywanym wraz z grupą partnerską ze Słowacji, pełniłam funkcję głównego wykonawcy. Głównym osiągnięciem tego projektu było opracowanie dwóch protokołów opisujących przygotowanie kompleksów zawierających dendrymery i liposomy w postaci jednego nanosystemu, którego zadaniem jest przenoszenie dokсорubicyny do komórek (Rys. 10). Powstałe systemy LLD (Liposomal Locked-In Dendrimers) uzyskane za pomocą metody hydrofilowej (pierwszy protokół) lepiej oddziaływały z błonami biologicznymi niż systemy przygotowane metodą hydrofobową (drugi protokół). Co więcej, miały niewielki rozmiar, obniżony ładunek powierzchniowy oraz stosunkowo niski wskaźnik PDI (*Polydispersity index*), a dodatkowo wykazywały zmniejszoną

hemotoksyczność i cytotoksyczność. Najważniejszą cechą tych nanokompleksów była zwiększona efektywność transfekcji, co pozwoliło na potwierdzenie wcześniej postawionej hipotezy. Skutkiem tego efektu było to, że system Dendrymer/Liposom/Dokсорubicyna były bardziej skuteczne w stosunku do komórek linii MCF-7 niż system Liposom/Dokсорubicyna.



Rysunek 7. Schematyczna reprezentacja protokołów przygotowania LLD systemów (Liposomal Locked-In Dendrimers). (A) – technika hydrofilowa; (B) – technika hydrofobowa. (Michlewska i wsp. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023).

Kluczowym efektem mojego udziału w projekcie PPN/BIL/2018/1/00150/U/00001 był artykuł opublikowany w czasopiśmie „Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”. Wspólnie z zespołem Słowackim, z zaangażowaniem doktorantów obu grup badawczych (PL i SK) wykonaliśmy wszystkie zaplanowane eksperymenty. Podczas mojego wyjazdu w ramach stażu badawczego w Uniwersytecie Komeńskiego w Bratysławie w roku 2022 wraz z Dr Zuzaną Garaiovą oraz Prof. Ivetą Waculikową wykonałyśmy część analiz i przeanalizowałyśmy uzyskane dane. Procedura otrzymywania zaprojektowanych systemów LLD została opracowana podczas mojej pracy w instytucji zagranicznej. Część eksperymentalna powstałej publikacji w znacznym stopniu została wykonana w Katedrze Fizyki Jądrowej na Uniwersytecie w Bratysławie. Pozostała część wyników była wykonana podczas pobytu słowackich partnerów w naszej Katedrze (UŁ).

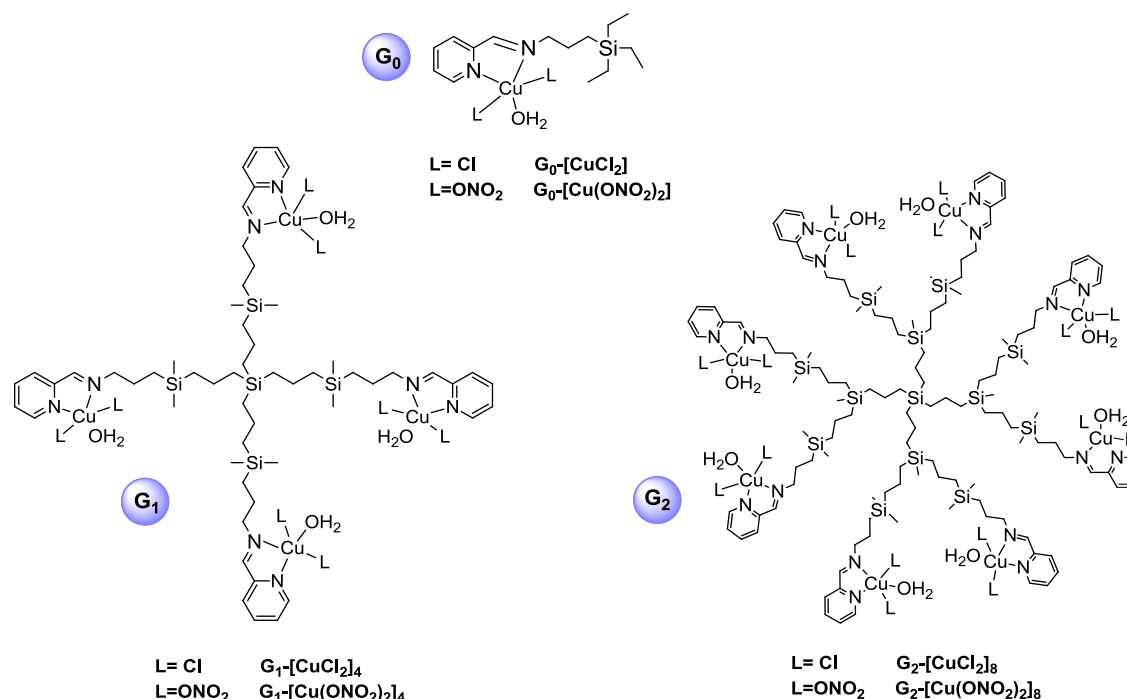
Następnie bazując na otrzymanych wynikach przygotowałam manuskrypt do publikacji, opracowałam materiał ilustracyjny i napisałam tekst pracy. Analizę statystyczną wykonałam wraz z partnerem zagranicznym Prof. Waczulikową podczas mojego pobytu w Bratysławie. **(4)** Michlewska S., Garaiova Z., Šubjakova V., Hołota M., Kubczak M., Grodzicka M., Okła E., Naziris N., Balcerzak Ł., Ortega P., de la Mata F.J., Hianik T., Waczulikova I., Bryszewska M., Ionov M. Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anti-cancer drug delivery: Introducing protocols Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 227 (2023) 113371.

4.3.3. Zastosowanie metalodendrymerów z miedzią jako nośników leków i siRNA

Na początku tego rozdziału pragnę zaznaczyć, że jedną z ważnych części mojej pracy jest szkolenie młodych naukowców m.in. w zakresie pracy laboratoryjnej, technik eksperymentalnych, pracy z literaturą, opracowywania danych oraz analizy statystycznej. Wyniki opisywane w tym rozdziale przyczyniły się do powstania pracy doktorskiej Mgr. Marcina Hołoty, którym się opiekuję, będąc jego promotorem pomocniczym. Wspólnie z doktorantem wykonaliśmy analizy i scharakteryzowaliśmy nowy typ metalodendrymerów zawierających atomy miedzi pod kątem ich ewentualnego wykorzystania, jako nośników proapoptotycznego siRNA, a także leków przeciwnowotworowych. Struktura tych dendrymerów została zaprezentowana na Rysunku 8.

W wyniku przeprowadzonych badań powstały trzy prace doświadczalne opublikowane w czasopiśmie z listy JCR, z których dwie zostały uwzględnione w obecnym dorobku mojego głównego osiągnięcia pracy habilitacyjnej. Z uwagi na fakt, że prace te zostały zaplanowane, jako publikacje stanowiące bazę doktoratu Mgr. M. Hołoty moje nazwisko nie znalazło się na istotnej pozycji na liście autorów. W pierwszej z prac, Hołota i wsp. *Biomolecules* 2019, 9, 155 [doi:10.3390/biom9040155](https://doi.org/10.3390/biom9040155), scharakteryzowaliśmy i dokładnie opisaliśmy dendrymery z miedzią, z ligandami chlorkowymi i azotanowymi (**ze uwagi na fakt, że mój udział w tej pracy nie był wiodący, nie została ona uwzględniona w cyklu prac stanowiących główne osiągnięcie mojej rozprawy habilitacyjnej**). W pracy wykonano pomiary średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta badanych dendrymerów, dodatkowo z wykorzystaniem techniki mikroskopii elektronowej została przeanalizowana ich morfologia.

Stosując metodę dichroizmu kołowego określono charakter oddziaływania dendrymerów z albuminą ludzką. Przeanalizowano również ich aktywność hemolityczną i cytotoksyczną. Wszystkie badane dendrymery CCD (Carbosilane Cooper Dendrimers) silnie oddziaływały z błonami biologicznymi, jednocześnie, co ważne wykazywały znacznie wyższą toksyczność wobec komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Ich cytotoksyczność była zależna od stężenia i generacji. Dendrymery z ligandem azotanowym okazały się bardziej toksyczne niż dendrymery chlorkowe.



Rysunek 8. Struktura dendrymerów karbochromowych zawierających atomy miedzi (G0) – generacja "0", (G1) – generacja pierwsza i (G2) – generacja druga (Sanz del Olmo i wsp. [Pharmaceutics 2020](#)).

Na podstawie wyników uzyskanych w ramach tej publikacji postawiliśmy hipotezę, że badane związki mogą stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych nanoosników. Na bazie tego założenia wykonaliśmy szereg eksperymentów stanowiących bazę kolejnej publikacji. W tej pracy dendrymery z miedzią zostały skompleksowane z terapeutycznym siRNA. Powstałe kompleksy zostały scharakteryzowane pod kątem ich właściwości biofizycznych oraz wykonaliśmy

eksperymenty *in vitro* oceniające efektywność transfekcji i cytotoksyczność kompleksów dendrymer CCD/siRNA. Do scharakteryzowania utworzonych kompleksów wykorzystaliśmy transmisyjną mikroskopię elektronową i metodę dynamicznego rozpraszania światła oraz oceniliśmy ich ładunek powierzchniowy. Za pomocą elektroforezy żelowej potwierdzony został optymalny stosunek molowy, w jakim tworzone są kompleksy dendrymer/siRNA, a także dzięki tej metodzie udało się dowiedzieć, że dendrymery generacji 1 i 2 chronią siRNA przed degradującym działaniem nukleaz. Następnie sprawdziliśmy cytotoksyczność utworzonych kompleksów wobec komórek raka piersi MCF-7 oraz ich zdolność do internalizacji. Okazało się, że po 3 godzinach inkubacji komórek z kompleksami dendrymer/siRNA są one intensywnie pobierane przez komórki, a dodatkowo po 72 godzinach obserwowaliśmy znaczny spadek żywotności. Zatem uzyskane wyniki umożliwiły weryfikację wcześniej postawionej hipotezy badawczej. Okazało się, że metalodendrymery CCD pierwszej i drugiej generacji tworzą kompleksy z proapoptycznym siRNA, chroniąc go przed degradacją w obecności nukleaz, a także wydają się być odpowiednimi nośnikami kwasu nukleinowego do komórek nowotworowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy: (5) Sanz del Olmo N., Holota M., Michlewska S., Gomez Ramirez R., Ortega P., Ionov M., de la Mata F.J., Bryszewska M. Copper (II) Metallodendrimers Combined with Pro-Apoptotic siRNAs as a Promising Strategy Against Breast Cancer Cells, *Pharmaceutics* 2020 12(8), 727. Ta publikacja była wykonana pod moją opieką, zaplanowałam eksperymenty, brałam również udział w ich wykonaniu, analizie i interpretacji, a także zajmowałam się napisaniem tekstu manuskryptu, nadzorem nad przygotowaniem rysunków i wykresów, ogólnym oszacowaniem manuskryptu, w którym rola pierwszego autora została podzielona pomiędzy doktorantem Marcinem Hołotą (grupa PL) i doktorantką Natalią Sanz del Olmo (grupa Hiszpańska).

Jako, że metalodendrymery dekorowane rutenem okazały się obiecujące, jako nośniki leków przeciwnowotworowych, postanowiłam zweryfikować hipotezę, że dendrymery z miedzią mogą być również interesujące w tym zakresie. Dlatego też postanowiliśmy zbadać zdolność tworzenia kompleksów przez Cu(II) metalodendrymery z lekami przeciwnowotworowymi, doksorubicyną (DOX), metotreksatem (MTX) i 5-fluorouracylem (5-FU), a także wyjaśnić mechanizm działania powstałych kompleksów i ich skuteczność. W ten sposób powstała publikacja (6) Hołota M., Michlewska S., Garcia-Gallego S., Sanz del Olmo N., Ortega P., Bryszewska M., de la Mata F.J., Ionov M. Combination of copper metallodendrimers with

conventional antitumor drugs to combat cancer in in vitro models, Int. J. Mol. Sci. 2023 24(4), 4076. Wspólnie z doktorantem Mgr. Hołotą wykonaliśmy wszystkie eksperymenty, następnie przeanalizowaliśmy otrzymane wyniki. Opracowałam dane oraz przygotowałam część graficzną. Następnie napisaliśmy manuskrypt, po czym dopracowywaliśmy jego ostateczną wersję. Na liście autorów jestem autorem drugim i korespondencyjnym. Z wykorzystaniem technik DLS (z *ang. Dynamic light scattering*) oraz pomiaru ładunku powierzchniowego określiliśmy możliwość tworzenia kompleksów pomiędzy dendrymerami, a lekami DOX, MTX i 5-Fu. Okazało się, że metalodendrymery z miedzią tworzą koniugaty z lekami przeciwnowotworowymi. Następnie w celu wyjaśnienia istnienia efektu synergii dendrymerów i leków przeprowadzono badania *in vitro*. Powstałe nanosystemy testowano w stosunku do komórek nowotworowych linii MCF-7 (ludzki rak piersi) i linii HepG2 (ludzki rak wątroby). Uzyskane wyniki potwierdziły, że wszystkie testowane leki były bardziej skuteczne wobec komórek nowotworowych, gdy były skoniugowane z dendrymerami z miedzią. Pod wpływem kompleksów dendrymer/lek znacznie zmniejszyła się żywotność komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami traktowanymi nieskompleksowanymi lekami lub dendrymerami. Inkubacja komórek z kompleksami dendrymer/lek spowodowała wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) i depolaryzację błon mitochondrialnych. Wydaje się, że jony miedzi obecne w strukturach dendrymeru wzmocniły właściwości przeciwnowotworowe całego nanosystemu i poprawiły działanie leków, indukując zarówno apoptozę, jak i martwicę komórek nowotworowych MCF-7 i HepG2 zależnie od rodzaju i generacji zastosowanego dendrymeru.

Podsumowując moją rolę w powstaniu dwóch ostatnich prac pragnę zaznaczyć, że brałam udział w wykonaniu analiz oraz w opracowaniu koncepcji badań, których wynikiem było powstanie publikacji.

Dodatkowo efektem tego kierunku prac badawczych był przygotowany przeze mnie grant w ramach konkursu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB). Granty IDUB są finansowane w ramach zwiększonej o 2% subwencji Uczelni Badawczej (Uniwersytetu Łódzkiego). Wymieniony projekt pod tytułem „Metalodendrymery zawierające atomy miedzi jako potencjalne nanonośniki terapeutycznego siRNA w leczeniu nowotworu wątroby” został pozytywnie oceniony i otrzymał finansowanie. W tym projekcie zaplanowałam przeanalizowanie wpływu nanokompleksów (Cu)dendrymer/siRNA na komórki nowotworowe HepG2 (rak wątroby), a także poznanie mechanizmu działania otrzymanych nanosystemów.

4.3.4. Podsumowanie

Głównym wynikiem mojej rozprawy habilitacyjnej jest odpowiedź na pytanie czy karbokrzemowe dendrymery zawierające atomy rutenu lub miedzi mogą być rozpatrywane jako ewentualne nośniki substancji leczniczych w terapiach przeciwnowotworowych. Dodatkowym efektem pracy było zweryfikowanie postawionej hipotezy zakładającej, że badane metalodendrymery z uwagi na obecność w ich strukturze atomów rutenu i miedzi wykazują aktywność przeciwnowotworową oraz są zdolne do tworzenia stabilnych kompleksów z lekami przeciwnowotworowymi takimi jak doksorubicyną, metotreksatem, 5-florouracylem i proapoptotycznym siRNA.

W przedstawionej pracy udowodniłam, że nowo zsyntetyzowane metalodendrymery zawierające atomy rutenu i miedzi tworzą kompleksy ze wspomnianymi lekami i siRNA a także wykazują aktywność przeciwnowotworową w formie nieskompleksowanej. Dodatkowo zostały opracowane i zoptymalizowane protokoły zamykania dendrymerów w liposomach, co pozwoliło udoskonalić ich efekty transfekcji dla leku przeciwnowotworowego DOX. Z wykorzystaniem zastosowanych modeli *in vitro* i *in vivo* udało się udowodnić że badane metalodendrymery mogą stanowić efektywne narzędzia do przenoszenia materiałów leczniczych do komórek nowotworowych w terapii potrójnie negatywnego raka piersi. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie nowego dendrymeru z atomami rutenu wzbogaconego o znacznik fluorescencyjny CRD13-FITC. Związek ten może być rozpatrywany w kontekście nośnika terapeutycznych biomolekuł z jednoczesnym potencjałem przeciwnowotworowym dostosowanym do potrzeb diagnostyki obrazowej.

4.3.5. Opis pozostałych osiągnięć naukowych lub artystycznych, niewymienionych w pkt. 4.

Do moich pozostałych osiągnięć naukowych należy zaliczyć wyniki, które można podzielić na kilka kolejnych rozdziałów. Pierwszy z nich dotyczy zastosowania polimerów polietylenoiminowych (PEI) liniowych i rozgałęzionych, modyfikowanych i niemodyfikowanych tyrozyną w terapii przeciwnowotworowej. Wątek ten jest obecnie realizowany w ramach projektu NCN. UMO-2018/31/F/NZ5/03454. BEETHOVEN LIFE 1 [NP-HALE] „Nowe polimerowe nanocząstki do przenoszenia kwasów nukleinowych w leczeniu chorób płuc - synteza, analiza toksykologiczna i ocena biologiczno-terapeutyczna”, w którym pełnię funkcję wykonawcy.

W wyniku realizacji tematu powstała przeglądowa praca Kubczak M., Michlewska S., Bryszewska M., Aigner A., Ionov M. Nanoparticles for local delivery of siRNA in lung therapy, Adv. Drug Deliv. Rev. 2021 179:114038.

W publikacji przedstawiono i omówiono zastosowania naturalnych oraz syntetycznych, niewirusowych wektorów do dostarczania oligonukleotydów do komórek płuc, ze szczególnym uwzględnieniem raka płuc. Ze względu na specyficzną budowę i naturalne bariery dróg oddechowych, podawanie leków (zwłaszcza opartych na kwasach nukleinowych) stanowi szczególne wyzwanie. Wśród szeroko przebadanych niewirusowych nośników leków i oligonukleotydów obiecujące wydają się być polimery syntetyczne, a ich unikalne właściwości dają szerokie spektrum możliwości ich projektowania i modyfikacji. Daje to nadzieję, że ostatecznie powstaną optymalne nanocząstki, o idealnych właściwościach nośnika kwasu nukleinowego

do terapii raka płuc. Wspólnie z Mgr Małgorzatą Kubczak przygotowaliśmy wstępną wersję manuskryptu. Dodatkowo brałam udział w opracowaniu części graficznej publikacji.

W kolejnej z prac skupiających się na tematyce polimerów PEI: Kubczak M., Michlewska S., Karimov M., Ewe A., Noske S., Aigner A., Bryszewska M., Ionov M. Unmodified and tyrosine-modified polyethylenimines as potential carriers for siRNA: Biophysical characterization and toxicity, Int. J. Pharm. 2022 614(3):121468, oceniliśmy możliwości ich wykorzystania, jako niewirusowych nanonośników kwasów nukleinowych. W celu eliminacji ograniczeń dotyczących skuteczności i biokompatybilności PEI, wprowadzono modyfikacje struktury chemicznej liniowych i rozgałęzionych PEI, poprzez dołączenie do nich tyrozyny. Porównano liniowe i rozgałęzione PEI z pochodnymi modyfikowanymi tyrozyną. Modyfikacja tyrozyną doprowadziła do znacznego zmniejszenia toksyczności, przy jednoczesnym zwiększeniu interakcji z błonami komórkowymi. Wszystkie efekty były zależne od masy cząsteczkowej i struktury PEI (tj. liniowej vs. rozgałęzionej). Zwłaszcza w przypadku liniowych PEI, ulepszona interakcja z błoną przełożyła się na nieznacznie zwiększoną hemolizę, podczas gdy ich genotoksyczność została zmniejszona. Ze względu na poprawę właściwości koniecznych dla skuteczności i biokompatybilności nanowektorów, opracowane dane pokazały, że PEI modyfikowane tyrozyną są bardzo obiecującymi i bezpiecznymi nanonośnikami do dostarczania małych RNA, takich jak siRNA i miRNA. W przypadku tej pracy brałam udział w wykonaniu części eksperymentów i w przygotowaniu wstępnej wersji publikacji.

Z uwagi na obiecujące wyniki, w kolejnej pracy Kubczak M., Michlewska S., Karimov M., Eve A., Aighner A., Bryszewska M., Ionov M. Comparison of tyrosine-modified low molecular weight branched and linear polyethylenimines for siRNA delivery, *Nanotoxicology* 2023 16 (9–10) 867–882 przeanalizowano liniowe i rozgałęzione PEI o niskiej masie cząsteczkowej modyfikowane tyroziną, jako efektywne nośniki siRNA. Oceniono skuteczność kompleksowania i właściwości biofizyczne utworzonego kompleksu za pomocą pomiarów potencjału zeta, dynamicznego rozpraszania światła i dichroizmu kołowego, a także elektroforezy żelowej. Knockdown badano w hodowli komórkowej 2D i 3D. Wyniki pokazały, że siRNA były zdolne do tworzenia stabilnych kompleksów ze wszystkimi testowanymi polimerami. Kompleksowanie było w stanie chronić siRNA przed degradacją przez RNazę i pośredniczyć w knockdown genu docelowego, co zostało określone na poziomie mRNA oraz w komórkach reporterowych wyrażających PC3-Luc3/EGFP i HCT116-Luc3/EGFP na poziomie białka, przy użyciu cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej. Bezpośrednie porównanie badanych polimerów ujawniło różnice w ich skuteczności biologicznej. Ponadto PEI modyfikowane tyroziną wykazywały wysoką biokompatybilność, co określono na podstawie uwalniania LDH i integralności mitochondriów (test agregatów J), jak również kaspazy 3/7 (apoptoza) i poziomów reaktywnych form tlenu (RFT). W badaniach *ex vivo* najskuteczniejsze okazały się kompleksy oparte na LP10Y, łączące penetrację tkanek ze skutecznym obniżeniem ekspresji genów. Część wyników zamieszczonych w tej publikacji została uzyskana w zespole kierowanym przez Prof. Aignera z Lipska, w Niemczech. Podobnie jak w przypadku poprzedniej publikacji wykonałam część eksperymentów i brałam udział w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Podanie nanocząstek (NP) najczęściej związane jest z ich kontaktem ze składnikami krwi. Białka obecne w surowicy natychmiast pokrywają nanocząstki, co może prowadzić do zmian farmakokinetyki, biodystrybucji i metabolizmu. Spośród wszystkich białek krwi albuminy stanowią najliczniejszą grupę. Zatem głównym celem kolejnej pracy Kubczak M., Grodzicka M., Michlewska S., Karimov M., Ewe A., Aigner A., Bryszewska M., Ionov M. The effect of novel tyrosine-modified polyethyleneimines on human albumin structure – thermodynamic and spectroscopic study, *Colloids Surf. B.* 2023 227:113359, było zbadanie interakcji między liniowymi i rozgałęzionymi polietylenoiminami (PEI), modyfikowanymi tyroziną, o różnej masie cząsteczkowej z albuminą ludzką (*human serum albumin – HSA*). Oddziaływanie z hydrofobowymi częściami białka badano za pomocą kwasu 1-nilinoftaleno-8-sulfonowego (ANS). Oceniono też zmiany w strukturze drugorzędowej HSA z wykorzystaniem metody

dichroizmu kołowego. Do analizy powstawania kompleksów zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową i metodę dynamicznego rozpraszania światła. W pracy wykazano, że PEI modyfikowane tyrozyną są zdolne do wiązania ludzkiej albuminy. Analiza struktur drugorzędowych wykazała, że w obecności polimerów zmniejszała się zawartość α -helisy, jednocześnie zwiększając poziomy struktur losowo pofałdowanych. Tworzenie kompleksu zostało potwierdzone technikami TEM i DLS. Odkrycia te mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia interakcji polimer-białko oraz właściwości nanocząstek. Podobnie jak w przypadku poprzednich prac uczestniczyłam w przygotowaniu części eksperymentalnej i brałam udział w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Kolejny wątek badań, który prowadzę wspólnie z Mgr Marią Grodzicką, której jestem promotorem pomocniczym ma na celu charakterystykę polifenolowych dendrymerów z dołączoną resztą kwasu kawowego, powszechnie znanego przeciwutleniacza. W pierwszej z prac w tym cyklu badań: Grodzicka M., E.Pena-Gonzalez C., Ortega P., Michlewska S., Lozano R., Bryszewska M., de la Mata F.J., Ionov M. Heterofunctionalized polyphenolic dendrimers decorated with caffeic acid: Synthesis, characterization and antioxidant activity, SM&TSustain. Mater. Techno. 2022 33 e00497 oceniliśmy antyoksydacyjne właściwości tych dendrymerów. W pracy opisano syntezę i scharakteryzowano dwa typy dendrymerów. Pierwszy typ został udekorowany grupami amonowymi, co zwiększyło ich rozpuszczalność w wodzie. Drugi typ, oprócz wspomnianej funkcjonalności, posiada w strukturze jeden lub dwa łańcuchy glikolu polietylenowego (PEG), którego obecność prowadzi do zwiększenia biokompatybilności dendrymeru i zmniejsza jego cytotoksyczność. Wszystkie badane dendrymery chroniły erytrocyty przed hemolizą oksydacyjną. Co więcej, powodowały zmniejszenie indukowanej przez AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride) produkcji RFT w ludzkich fibroblastach. Najlepsze właściwości przeciwutleniające wykazano dla dendrymeru z dwiema resztami kwasu kawowego i dołączonym PEG.

W pracy wykonałam część eksperymentów, a także uczestniczyłam w opracowaniu koncepcji badawczej. Przeanalizowałam wyniki oraz wspólnie z Mgr Grodzicką przygotowałyśmy wstępną wersję manuskryptu. Następnie wraz z Prof. Ionvem dopracowaliśmy publikację. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

W kolejnej pracy Grodzicka M., Michlewska S., Buczkowski A., Sekowski S., Pena-Gonzalez C.E., Ortega P., de la Mata F.J., Bryszewska M., Ionov M. Polyphenolic 1 dendrimers bind human serum albumin (wysłana do czasopisma „Chemico-Biological Interactions”) zbadano oddziaływanie

polifenolowych dendrymerów z albuminą surowicy. Wyniki pokazały, że dendrymery wchodzą w interakcję z HSA, ale nie wpływają na drugorzędową strukturę białka. W pracy pełnię rolę autora korespondencyjnego. Obecnie wraz z Mgr Grodzicką przygotowujemy kolejne dwie prace. W pierwszej z tych prac zostaną opisane wyniki dotyczące interakcji polifenolowych dendrymerów z błonami biologicznymi. W drugiej pracy oceniona zostanie zdolność badanych nanocząstek, do przenoszenia kwasów nukleinowych. Planowane są również kolejne analizy podejmujące temat tych związków, jako transporterów pakliteksalu w terapii lekoopornego raka płuc.

W ramach tego tematu przygotowałam projekt, pt. „Polifenolowe dendrymery nowej generacji, jako nośniki paklitakselu w terapii lekoopornego drobnocząsteczkowego raka płuc”, do konkursu Narodowego Centrum Nauki „MINIATURA 7”. Projekt został oceniony pozytywnie, w maju 2023 otrzymałam finansowanie i obecnie jestem w trakcie realizacji zaplanowanych w projekcie zadań.

W ramach niezwykle ciekawego nurtu badań, jaki pojawił się w okresie mojej kariery naukowej po otrzymaniu tytułu doktora w wyniku współpracy z zespołem kierowanym przez dr. hab. Macieja Chałubińskiego, profesora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, powstał cykl publikacji opisujących wpływ HRV16 i IL-33 na aktywność zapalną śródbłonna naczyniowego w płucach człowieka. Praca w zespole profesora Chałubińskiego była dla mnie bardzo interesująca i ważna, dzięki niej mogłam wgłębić się w tematykę immunologiczną, a w szczególności zaznajomić się z kwestiami teoretycznymi dotyczącymi metod stosowanych przy pracy laboratoryjnej z wirusami. Ten nurt badań bez wątpienia jest istotnym rozdziałem mojego rozwoju naukowego. Pierwsza z 4 publikacji Gawrysiak M., Gajewski A., Szewczyk R., Likońska A., Michlewska S., Chmiela M., Kowalski M.L. Chałubiński M. Human rhinovirus HRV16 impairs barrier functions and regeneration of human lung vascular endothelium, *Allergy* 2021 76(6):1872-1875, dotyczyła analizy działania ludzkiego rinowirusa HRV16 na śródbłonek naczyń płucnych człowieka prowadzącego do upośledzenia funkcji barierowych i regeneracyjnych. Uzyskane wyniki sugerują, że śródbłonek naczyniowy zakażony rinowirusem może być silnym źródłem zapalnych cytokin i interferonów. Co więcej, w wyniku obecności wirusa może następować upośledzenie bariery śródbłonna i funkcji regeneracyjnych, czego konsekwencją może być niekontrolowany wysięk bogatego w białko płynu pozanaczyniowego, prowadzący do obrzęku tkanki dróg oddechowych i rekrutacji leukocytów z krwioobiegu do pozanaczyniowej tkanki płuc. Wyniki zaprezentowane w pracy są niezwykle istotne w kwestii zrozumienia wpływu

wirusów oddechowych na generowanie zapalnych i wrodzonych odpowiedzi przeciwwirusowych podczas infekcji wirusowych dróg oddechowych. W kolejnej pracy Gajewski A., Gawrysiak M., Szewczyk R., Gulbas I., Likońska A., Michlewska S., Kowalski M.L., Chałubiński M. IL-33 augments the effect of rhinovirus HRV16 on inflammatory activity of human airway vascular endothelium - possible implications for rhinoviral asthma exacerbations, Allergy 2021 76(7):2282-2285 zbadany został wpływ IL-33, cytokiny pochodzenia nabłonkowego na śródbłonek naczyń płucnych człowieka. Biorąc pod uwagę fakt, że osoby cierpiące na astmę wykazują większą ekspresję IL-33 w drogach oddechowych niż zdrowe osoby bez astmy, postulowano, że ciężkie zaostrzenia astmy wywołane przez rinowirusa mogą być spowodowane obecnością IL-33 w drogach oddechowych. Wyniki badań zaprezentowane w tej publikacji mogą otworzyć nowe pole badań nad interakcjami między nabłonkiem dróg oddechowych, a śródbłonkiem naczyń płucnych w patofizjologii wirusowych infekcji dróg oddechowych i zaostrzeń astmy oraz ogólnej immunopatologii astmy. W następnej pracy Gulbas I., Gajewski A., Gawrysiak M., Szewczyk R., Likońska A., Michlewska S., Kowalski M.L., Chalubinski M. IL-33 prevents the enhancement of AP-N, DPP4, and ACE2 expression induced by rhinovirus HRV16 in the human lung endothelium – potential implications for coronaviral airway infections, Allergy 2022 77(5):1610-1613, kontynuowany był temat wpływu IL-33 jako czynnika zapobiegającego nasilonej ekspresji AP-N, DPP4 i ACE2 indukowanej przez rinowirus HRV16 w śródbłonku płuc człowieka. Śródbłonek naczyń płuca jest półprzepuszczalną barierą, będącą źródłem mediatorów stanu zapalnego. Odgrywa on kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy płuc i napędzaniu odpowiedzi immunologicznej. Dane prezentowane w niniejszej pracy wskazują, że rinowirus może zwiększać ekspresję ACE2, DPP4 i AP-N na śródbłonku naczyń płucnych, prowadząc w ten sposób do zwiększonej podatności na zakażenia ludzkimi koronawirusami. Co ciekawe, IL-33 może zapobiegać indukcji ekspresji receptorów wejścia koronawirusa przez HRV na śródbłonku. Zatem funkcja ochronna IL-33 może leżeć u podstaw rzadszego występowania zaostrzeń astmy związanych z koronawirusem w porównaniu z zaostrzeniami astmy związanymi z rinowirusem. W pracy Likońska A., Gawrysiak M., Gajewski A., Klimczak K., Michlewska S., Szewczyk R., Gulbas I., Chałubiński M. Human lung vascular endothelium may limit viral replication and recover in time upon the infection with rhinovirus HRV16, APMIS 2022 130(11):678-685 zbadano odpowiedź śródbłonka naczyń płucnych na zakażenie ludzkim rinowirusem (HRV) i jego zdolność do ograniczania replikacji wirusa, a także zdolności do regeneracji. Uzyskane wyniki wskazują, że długoterminowo śródbłonek naczyń płuca może skutecznie ograniczyć replikację HRV poprzez

aktywację IFN-zależnej syntetazy OASL1. Prowadzi to do przywrócenia integralności, któremu towarzyszy regulacja połączeń, wzrost aktywności metabolicznej i tempa proliferacji. Po drugie, komórki zakażone HRV16 wykazują opóźniony i przejściowy wzrost ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), czynnika wzrostu fibroblastów, angiopoetyny 1 i 2 oraz neuropiliny-1, jak również receptorów VEGF. Zakażony wirusem HRV śródbłonek naczyniowy płuc może ograniczyć infekcję, z czasem wyzdrowieć, odzyskać właściwości barierowe i funkcje metaboliczne, prowadząc w ten sposób do odbudowy zintegrowanej tkanki barierowej. Moja rola w opisanych publikacjach polegała na wykonaniu eksperymentów wizualizacyjnych i przeanalizowaniu wyników dotyczących tej części publikacji.

Na osobne omówienie zasługuje kolejny nowatorski kierunek badań w którym brałam udział w ramach współpracy z zespołem Prof. dr. hab. Przemysława Lewkowicza z UMED w Łodzi. Te badania dotyczyły wyjaśnienia charakteru interakcji pomiędzy mielino-specyficznymi limfocytami CD49d⁺CD154⁺, a prekursorami oligodendrocytów, jako kluczowych procesów odpowiedzialnych za zakłócanie prawidłowej remielinizacji w stwardnieniu rozsianym. Celem badań pierwszej pracy w tym zakresie z moim udziałem, Piątek P, Namiecińska M., Domowicz M., Przygodzka P., Wieczorek M., Michlewska S., Lewkowicz N., Tarkowski M., Lewkowicz P. MS CD49d+ CD154+ Lymphocytes Reprogram Oligodendrocytes into Immune Reactive Cells Affecting CNS Regeneration, Cells 2019 8:12 było wskazanie mechanizmu odpowiedzialnego za postępującą degenerację ośrodkowego układu nerwowego w stwardnieniu rozsianym. Jeden z kluczowych problemów związanych z postępem stwardnienia rozsianego to niedostateczna regeneracja ośrodkowego układu nerwowego, spowodowana niedoborem syntezy mieliny przez nowo powstające oligodendrocyty. Otrzymane wyniki wskazywały na to, że limfocyty CD49d⁺CD154⁺, które są specyficzne dla mieliny, wpływają na dojrzewanie komórek prekursorowych oligodendrocytów, prowadząc do tworzenia dojrzałych oligodendrocytów z tendencją do wywoływania reakcji immunologicznej. Nowo powstałe oligodendrocyty charakteryzują się nieprawidłową produkcją białek strukturalnych mieliny, takich jak białko zasadowe mieliny (MBP) i proteolipidowe białko mieliny (PLP) oraz syntezą chemokin i cytokin o działaniu prozapalnym. Analiza szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za przekształcanie oligodendrocytów wykazała, że limfocyty CD49d⁺CD154⁺ wpływają na proces syntezy mikroRNA (miRNA) poprzez zaburzenia aktywności polimerazy II. miR-665 i ELL3 okazały się głównymi celami dla limfocytów specyficznych dla mieliny w kontekście stwardnienia rozsianego. Neutralizacja wysokich poziomów miR-665 wewnątrz komórki przywróciła syntezę miRNA oraz

produkcję MBP/PLP. Ogólnie rzecz biorąc, te dane wskazują na nowe cele terapeutyczne, które mogą wspomagać remielinizację w ośrodkowym układzie nerwowym.

Rola autoreaktywnych limfocytów w demielinizacji ośrodkowego układu nerwowego jest szeroko opisana w literaturze, podczas gdy bardzo mało wiadomo na temat ich roli w remielinizacji podczas remisji stwardnienia rozsianego. Kolejna publikacja Piątek P., Namiecińska M., Domowicz M., Wieczorek M., Michlewska S., Lewkowicz N., Tarkowski M., Lewkowicz P., Matysiak M., Lewkowicz N., Tarkowski M., Lewkowicz P. Multiple Sclerosis CD49d+CD154+ As Myelin-Specific Lymphocytes Induced During Remyelination, Cells 2020 9:1 identyfikuje nową subpopulację limfocytów CD49d+CD154+ specyficznych dla mieliny, obecnych we krwi obwodowej pacjentów ze stwardnieniem rozsianym w czasie remisji, które proliferowały *in vitro* w odpowiedzi na peptydy mielinowe. Te limfocyty wykazywały unikalną zdolność migracji w kierunku dojrzewających komórek prekursorowych oligodendrocytów oraz syntezę prozapalnych chemokin i cytokin. Współkultura dojrzewających prekursorowych oligodendrocytów z limfocytami CD49d+CD154+ specyficznymi dla mieliny charakteryzowała się wzrostem wydzielania prozapalnych chemokin/cytokin. Ponadto, dojrzewające prekursorowe oligodendrocyty eksponowane na zewnątrz na peptydy mielinowe potrafiły indukować proliferację limfocytów CD49d+CD154+ zależną od CD40-CD154. Potwierdzono obecność komórek CD49d+CD154+ blisko dojrzewających prekursorowych oligodendrocytów i miejsc remielinizacji w trakcie remisji choroby w mysim modelu stwardnienia rozsianego (mikroglej C57Bl/6 immunizowane MOG35-55). Zaprezentowane dane sugerują, że limfocyty CD49d+CD154+ specyficzne dla mieliny obecne w mózgu mogą zakłócać remielinizację, w której pośredniczą oligodendrocyty, prawdopodobnie poprzez tworzenie prozapalnego środowiska.

W następnej publikacji, będącej wynikiem mojej współpracy z Prof. Lewkowiczem, Piątek P., Tarkowski M., Namiecińska M., Riva A., Wieczorek M., Michlewska S., Dulcka J., Domowicz M., Kulińska-Michalska M., Lewkowicz N., Lewkowicz P. H3K4me3 Histone ChIP-Seq Analysis Reveals Molecular Mechanisms Responsible for Neutrophil Dysfunction in HIV-Infected Individuals, Front. Immunol. 2021 15;12:682094, przeanalizowano hipotezę zakładającą, że obwodowe neutrofile u osób zakażonych wirusem HIV charakteryzują się upośledzeniem chemotaksji, fagocytozy, aktywności bakteriobójczej i zdolności do wybuchu oksydacyjnego, niezależnie od tego, czy pacjenci otrzymują terapię przeciwretrowirusową, czy nie. Dysfunkcja neutrofilii prowadzi nie tylko do zwiększonej podatności na infekcje oportunistyczne, ale także do uszkodzenia tkanek

poprzez uwalnianie reaktywnych form tlenu (RFT), proteaz i innych potencjalnie szkodliwych cząsteczek efektorowych przyczyniających się do progresji AIDS. Wyniki tej publikacji wykazały wysoki poziom trimetylowanej formy histonu H3 lizyny K4 (H3K4me3) i rozregulowanie transkrypcji DNA w krążących neutrofilach osób zakażonych wirusem HIV. Badanie całego genomu H3K4me3 dostarczyło dowodów na to, że modyfikacje chromatyny prowadzą do upośledzenia kanonicznego szlaku aktywacji komórek NF- κ B, powodując dysfunkcję neutrofilii obserwowaną u osób zakażonych wirusem HIV.

W kolejnej pracy, Piatek P., Namiecinska M., Lewkowicz N., Kulińska-Michalska M., Jabłonowski Z., Matysiak M., Dulcka J., Michlewska S., Wieczorek M., Lewkowicz P. Changes within H3K4me3-marked histone reveal molecular background of neutrophil functional plasticity, Front. Immunol. 2022 10;13:906311 zaobserwowano zmiany stanu neutrofilii po stymulacji lipopolisacharydem (LPS), preaktywującym stężeniem TNF- α lub IL-10. Neutrofile są heterogenną populacją zdolną zarówno do pełnienia funkcji przeciwdrobnoustrojowych, jak i supresorowych, jednak nie zidentyfikowano żadnego konkretnego wzorca czynników transkrypcyjnych kontrolujących tę plastyczność. Uzyskane dane pozwoliły przypisać określonym genom docelowym, reprezentowanym przez histon znakowany H3K4me3 inny wzór ekspresji genów związanych ze szlakami NF- κ B, apoptozą i specyficznym profilem cytokin/chemokin/czynników wzrostu realizowanych przez neutrofile stymulowane przez LPS, IL -10 lub TNF- α . Apoptotyczne neutrofile indukowane przez IL-10 są komórkami aktywnymi transkrypcyjnie, zdolnymi do zmiany profilu cytokin/chemokin/czynników wzrostu pożądanym w usuwaniu stanu zapalnego poprzez niekanoniczny szlak NF- κ B z jednoczesnym hamowaniem kanonicznego szlaku NF- κ B. Jako, że apoptotyczne/supresyjne neutrofile indukowane przez IL-10 poprzez geny pozycjonujące w histonie oznaczonym H3K4me3 były transkrypcyjnie aktywne, nowo opisane miejsca wiązania DNA można uznać za potencjalne cele dla ich immunoterapii.

W ostatniej publikacji w tym rozdziale został poddany szczegółowej analizie wpływ naturalnych olejków na barierę krew-mózg (BBB) kontrolującej mikrośrodowisko ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W pracy Piatek P., Lewkowicz N., Michlewska S., Wieczorek M., Bonikowski R., Parchem K., Lewkowicz P., Namiecinska M. Natural fish oil improves the differentiation and maturation of oligodendrocyte precursor cells to oligodendrocytes in vitro after interaction with the blood-brain barrier, Front. Immunol. 2022 22;13:932383 użyto modelu bariery krew-mózg w celu przetestowania wpływu mieszanki naturalnego oleju rybiego

w porównaniu z olejem z ogórecznika. Wykazano, że olej rybi, w przeciwieństwie do oleju z ogórecznika, wpływa na funkcję komórek prekursorowych oligodendrocytów podczas ich dojrzewania. Spowodowało to modyfikację syntezy zasadowego białka mieliny (MBP), oligodendrocytów mieliny (MOG), białka proteolipidowego (PLP) i kwasu nerwonowego (NA) w dojrzałych oligodendrocytach. Unikalna formuła oleju rybiego, charakteryzująca się znacznie bardziej zróżnicowanymi składnikami w porównaniu z tymi zawartymi w oleju z ogórecznika, poprawiła również wzmocnienie ścisłego połączenia poprzez zwiększenie ekspresji kładyny-5 i VE-kadheryny w komórkach śródbłonna. Uzyskane dane uzasadniają uwzględnienie spożycia naturalnego oleju rybiego w diecie człowieka, jako wpływającego na proces remielinizacji. Praca ta została uznana za **najlepszą pracę międzyuczelnianą** w ramach współpracy UM w Łodzi z Politechnika Łódzka w roku 2022 (<https://p.lodz.pl/uczelnia/aktualnosc/laureat-nagrody-za-najlepsza-miedzyuczelniana-publicacje-naukowa-w-2022-roku>).

Jako dodatkowe osiągnięcie w tym rozdziale chciałabym potraktować otrzymanie w 2021 r. wraz z członkami zespołu Katedry Biofizyki Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska kierowanej przez Prof. dr hab. Marię Bryszewską nagrody zespołowej Rektora Uniwersytetu Łódzkiego pierwszego stopnia za cykl publikacji „Właściwości i zastosowania substancji aktywnych biologicznie” Cykl składa się z 42 publikacji monotematycznych.

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

5.1. Po doktoracie

Na wstępie tego rozdziału pragnę podkreślić, że wszystkie publikacje, wchodzące w skład mojego głównego osiągnięcia naukowego są wynikiem wieloletniej współpracy zespołu Prof. Ionova, w którym pracuję naukowo, z zespołem Prof. de la Maty z Uniwersytetu w Alcalá de Henares, z Hiszpanii. Od wielu lat pracownicy obu grup badawczych regularnie odbywają spotkania i wizyty, mające na celu prowadzenie wspólnych doświadczeń, a także pozyskiwanie międzynarodowych grantów, czego wynikiem jest m.in. 21 prac z moim udziałem opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR (dokładna lista prac została zaprezentowana w załączniku nr. 3 „Lista osiągnięć”). Dodatkowo zgodnie z tym, co zostało opisane w punkcie 4.3.2. „Opis pozostałych osiągnięć naukowych” obecnego autoreferatu aktywnie uczestniczę

w badaniach wykonywanych w ramach współpracy z zespołem badawczym z Lipska w Niemczech kierowanym przez Prof. Achima Aignera, który jest doświadczonym badaczem klasy światowej, z imponującym dorobkiem naukowym, od wielu lat zajmującym się nanocząstkami polimerowymi oraz badaniami ukierunkowanymi na wyjaśnienie możliwości ich zastosowania w biomedycynie.

W pierwszym okresie po zakończeniu doktoratu ze względu na pandemię wszelkie wyjazdy były utrudnione, a czasem wręcz niemożliwe do zrealizowania. W związku z tym znaczna część spotkań w tym okresie odbywała się w formie online. Niemniej w grudniu 2021 roku wraz z dwiema doktorantkami Mgr Elżbietą Okłą oraz Mgr Mariką Grodzicką odbyłam staż naukowy w Katedrze Jądrowej Fizyki, Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. Wyjazd zrealizowałam w ramach bilateralnego projektu pt.: „New Drug Delivery Nanosystem Combining Liposomal and Dendrimeric Technology (Liposomal Locked-In Dendrimers) for development of cytostatic drugs” PPN/BIL/2018/1/00150/U/00001 finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej, w którym pełniłam rolę głównego wykonawcy. W trakcie pobytu w Bratysławie wraz z doktorantkami oraz Dr Garaiovą wykonałyśmy część analiz dotyczących wykorzystania systemów Dendrymer-CRD/Liposom/Doksorubicyna w stosunku do komórek nowotworowych MCF-7. Dodatkowo razem z Prof. Waczulikovą wykonałam analizę statystyczną otrzymanych wyników opublikowanych w czasopiśmie „Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”.

Efektom moich badań w zagranicznym ośrodku naukowym na Słowacji oraz wieloletniej współpracy pomiędzy zespołem słowackim reprezentowanym przez Prof. Tibora Hianika, Prof. Waczulikovą oraz Dr Zuzanę Garaovą, a naszym zespołem polskim są 3 publikacje z moim udziałem, w tym 1 wchodząca w skład mojego głównego osiągnięcia naukowego. Dodatkowo od roku 2018 współpracuję z Prof. Markiem Małym z Uniwersytetu w Ústí nad Labem J.E. Purkynie w zakresie wykonywania symulacji komputerowej tworzenia kompleksów nanocząstka/lek lub nanocząstka/siRNA. Wynikiem tej współpracy są 2 publikacje z listy JCR.

Moja praca naukowa na Uniwersytecie w Rydze (Łotwa) przyczyniła się do nabycia umiejętności pisania projektów naukowych, co w przyszłości skutkowało opracowaniem kilku projektów badawczych, z których dwa otrzymały finansowanie (projekty krajowe). Dodatkowo w bieżącym roku 2023 zrealizowałam pobyt w Łotewskim Centrum Badań i Studiów Biomedycznych w Rydze na Łotwie mający na celu wykonanie części zaplanowanych eksperymentów i omówienie z Dr Jurisem Jansonem wyników wcześniej uzyskanych w trakcie realizacji projektu „VACTRAIN” H2020-TWINN-2015, nr. CSA-692293 i przygotowanie wstępnego

szkicu manuskryptu bazującego się na wspólnie otrzymanych danych. Wykonaliśmy również eksperymenty z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych dotyczące tematyki obecnie realizowanego przeze mnie grantu IDUB.

Dodatkowo moja aktywność naukowa związana jest z prowadzeniem badań w ramach współpracy z zespołami Dr. hab. Macieja Chałubińskiego kierownika Kliniki Immunologii i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Prof. dr. hab. Przemysława Lewkowicza kierownika Zakładu Immunogenetyki, Kliniki Neurologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Moja współpraca z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi z zespołem Dr. hab. Macieja Chałubińskiego zaowocowała 4 publikacjami. Z kolei w wyniku współpracy z zespołem Prof. dr. hab. Przemysława Lewkowicza (UMED, Łódź) opublikowanych zostało 5 prac. Prowadzenie przeze mnie eksperymentów na Politechnice Łódzkiej w zespole Dr Elżbiety Skiby skutkowało 3 wspólnymi publikacjami (dokładna lista w załączniku „Lista osiągnięć”). Jedna z nich została włączona do cyklu stanowiącego moje główne osiągnięcie naukowe rozprawy habilitacyjnej. Kolejna praca została opracowana w postaci manuskryptu i wysłana do czasopisma „Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine” i jest obecnie w trybie recenzji. Obie wyżej wymienione prace są również wynikiem prowadzenia przeze mnie badań w Katedrze Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w zespole Prof. dr. hab. Cezarego Watały. Wszystkie opisane współpracy ze ośrodkami krajowymi i zagranicznymi są obecnie aktywnie kontynuowane, zarówno w kwestii aktualnie prowadzonych badań, jak i pozyskiwania środków finansowania badań ze źródeł zewnętrznych.

5.2. Przed doktoratem

W trakcie wykonywania pracy doktorskiej odbyłam 4 zagraniczne staże naukowe i 3 wyjazdy szkoleniowe realizowane w ramach programu ERASMUS+. Pierwszy ze staży odbyłam w 2016 roku, jako wykonawca międzynarodowego projektu “Nanomaterials - Driven Anti-Cancer Gene Therapy”, Horizon 2020 Call: FP7-PEOPLE-2012-IRSES “NANOGENE” PIRSES-GA-2012–316730, w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk, w Mińsku. W trakcie pobytu w Mińsku wykonałam badania z zastosowaniem technik spektrofotometrycznych. Poznałam też metodę elektroforezy żelowej. Wykonałam też eksperymenty in vitro dotyczące cytotoksyczności kompleksów dendrymer/siRNA na zawieszinowych, nowotworowych liniach komórkowych. Głównym efektem tego stażu była publikacja: Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Loznikova S., Shcharbin D., Maly M., Gomez Ramirez R., de la Mata, F.J., Bryszewska M., Ruthenium

dendrimers as carriers for anticancer siRNA, 2018 J. Inorg. Biochem. 181: 18-27. Kolejny staż naukowy w Katedrze Jądrowej Fizyki, Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja w 2016 roku związany był z wykonaniem specjalnego, bilateralnego Polsko-Słowackiego projektu badawczego SK-PL-2015-0021 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt. „Nanocząstki złota, jako nośniki peptydów HIV. Charakterystyka biofizyczna”. W trakcie tego stażu wykonałam część badań, które zostały wykorzystane w pracy Garaiova Z., Melikishvili S., Michlewska S., Ionov M., Pędziwiatr-Werbicka E., Waczulikova I., Hianik T., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M. Dendronized Gold Nanoparticles as Carriers for gp160 (HIV-1) Peptides: Biophysical Insight into Complex Formation, 2021 Langmuir 2:37(4):1542-1550. Do moich zadań należało wykonać analizy z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz elektroforezy żelowej. Dwa kolejne zagraniczne staże naukowe w okresie przed doktoratem odbyłam w ramach międzynarodowego projektu Horizon 2020 (Polska-Szwecja-Ukraina-Łotwa) H2020-TWINN-2015/CSA-692293 “VACTRAIN” pt., “Twinning on DNA-based cancer vaccines”, w którym pełniłam funkcję wykonawcy. Oba staże odbyłam w Rydze na Łotwie w 2017 i 2018 roku. Podczas wizyt w Rydze miałam okazję wykonywać eksperymenty *in vitro* dotyczące optymalizacji dostarczania genów do immunizacji DNA, porównanie skuteczności dostarczania DNA i odpowiedzi immunologicznej na immunogen reporterowy dostarczany w przez nośnik dendrymerowy z lipofektaminą oraz elektroporacją. W ramach tego miałam okazję pracować z różnymi protokołami dotyczącymi oznaczania aktywności metabolicznej komórek, mikroskopii fluorescencyjnej, konfokalnej a także cytometrii przepływowej.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

6.1. Działalność popularyzująca naukę

- 2017 Prowadziłam warsztaty edukacyjne dla uczniów liceów w ramach całorocznego programu współpracy Uniwersytetu Łódzkiego ze szkołami „Uniwersytet Zawsze Otwarty” w tematyce: „Wykorzystanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej w badaniach biologicznych”.
- 2017 Prowadziłam warsztaty „Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych, biotechnologicznych, mykologicznych i parazytologicznych”

- organizowane przez: Katedrę Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii (KMPiB), Zakład Immunoparazytologii (ZIP) oraz Pracownię Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych (POMiSTB) Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.
- 2018 Prowadziłam warsztaty edukacyjne dla uczniów liceów w ramach całorocznego programu współpracy Uniwersytetu Łódzkiego ze szkołami „Uniwersytet Zawsze Otwarty” „Transmisyjna mikroskopia elektronowa w badaniach biologicznych”.
- 2018 Brałam udział, jako lektor, w comiesięcznych warsztatach edukacyjnych przeprowadzanych dla uczniów szkół średnich zainteresowanych biologią w ramach programu IKB – Instytut kreatywnej Biologii „Dziedziczenie na przykładzie muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*)”.
- 2023 Wygłosiłam wykład w ramach ogólnopolskiej akcji „Noc biologów” prowadzonej przez Uniwersytet Łódzki w nawiązaniu do hasła Europejskiej Agencji Środowiska, "Woda - źródło życia - teraźniejszość i przyszłość". Naukowa impreza dla dzieci i młodzieży o charakterze edukacyjnym.
- 2023 Wygłosiłam wykład dla doktorantów pt. „Mikroskopia bez tajemnic” w ramach VIII Ogólnopolskiej Konferencji Nauk o Życiu BIOOPEN – Wykład rozpoczynający sesję „Metody *in vitro* i *in silico* w analizie makromolekuł”. Gość specjalny.
- 2023 Wygłosiłam wykład dla członków Studenckiego Towarzystwa Naukowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pt. „Dendrymery – nadzieja w terapii przeciwnowotworowej”, w ramach SKN Let's Talk Science Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Gość specjalny.

6.2. Działalność dydaktyczna

W chwili obecnej sprawuję opiekę merytoryczną nad dwoma pracami doktorskimi, jako promotor pomocniczy w Katedrze Biofizyki Ogólnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego. Moja rola promotora pomocniczego polega na wprowadzeniu młodych badaczy do pracy laboratoryjnej, wyjaśnianiu teorii zjawisk biofizycznych oraz metodyk i technik badawczych. Pomagam im też w opracowaniu wyników oraz przygotowywaniu manuskryptów do publikacji.

Pierwszy z doktorantów Mgr Marcin Hołota obecnie kończy realizację pracy „Karbokrzemowe dendrymery z atomami miedzi, jako nośniki leków i materiału genetycznego w terapii przeciwnowotworowej”. W wyniku badań prowadzonych wspólnie z doktorantem powstały 3 publikacje opublikowane w czasopismach z listy JCR. Dodatkowo doktorant jest współautorem 5 publikacji niewchodzących do spinki jego pracy doktorskiej z łącznym IF wszystkich prac 41.57, punkty MEiN 890. Obecnie praca doktorska jest złożona do recenzji, a obrona została zaplanowana na listopad 2023 r.

Druga doktorantka, którą się opiekuję, Mgr Marika Grodzicka realizuje pracę pt., „Zastosowanie nanocząstek i nanomateriałów w biomedycynie” w ramach Szkoły Doktorskiej BioMedChem UŁ i Instytutów PAN w Łodzi, w Katedrze Biofizyki Ogólnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego. Główny nurt zainteresowań doktorantki stanowią polifenolowe dendrymery z resztami kwasu kawowego. Pierwsze wyniki badań prowadzonych wraz z doktorantką zostały opublikowane w czasopiśmie „Sustainable Materials and Technologies” (IF, 10,681). Obecnie, kolejna praca została wysłana do czasopisma „Chemico-Biological Interactions” (IF, 5,186) i jest w trybie recenzji. Kolejne dwie prace są w trakcie przygotowywania. Wspólnie z Mgr Grodzicką realizujemy również badania będące tematem grantu „MINIATURA 7”, który udało mi się pozyskać w bieżącym roku, a także grantu IDUB (Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza) pozyskanego w 2022 roku. Obrona pracy doktorskiej Mgr Grodzickiej została zaplanowana na październik 2024 r.

W trakcie mojej pracy naukowej brałam udział również w opiece nad pracą magisterską Jakuba Magiery w 2019 r. (opieka nieudokumentowana) pt. „Biofizyczna charakterystyka dendrymerów zawierających atomy miedzi”.

Podczas pobytu młodej kadry naukowej z partnerskich ośrodków badawczych brałam aktywny udział w organizowaniu w swoim laboratorium pracy eksperymentalnej, wliczając w to opiekę laboratoryjną, pomoc techniczną i merytoryczną dla gości Katedry. Ponadto planowałam realizować zagraniczne wyjazdy badawcze do instytucji partnerskich oraz opiekowałam się doktorantami z UŁ podczas naszych wspólnych wyjazdów do laboratoriów partnerskich.

6.3. Działalność organizacyjna

W 2020 r. pełniłam funkcję członku Komitetu Organizacyjnego ogólnopolskiego wydarzenia „Noc Biologów” - Impreza naukowa dla dzieci i młodzieży o charakterze edukacyjnym w szerokiej tematyce organizowaną przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, „Globalne zmiany środowiska”.

7. Plany badawcze

Głównym założeniem moich planów badawczych jest kontynuacja współpracy z zespołem Prof. Javiera de la Maty, Prof. Rafaela Gomeza oraz Prof. Pauli Ortegi z Uniwersytetu w Alcala de Henares w Hiszpanii. Planuję dalej rozwijać tematykę „dendrymerową” biorąc pod uwagę fakt, że te nanocząstki posiadają bardzo obiecujące cechy fizykochemiczne w kontekście ich zastosowania jako nośników terapeutycznych biomolekuł. Równolegle planuję kontynuację bieżących badań z zespołami Prof. Ivety Waczulikovej z Bratysławy na Słowacji i Dr. Nikosa Nazirisa z Uniwersytetu w Atenach w Grecji dotyczących zastosowania systemów lipidowych w biomedycynie.

Wyniki otrzymane w ramach aktualnie realizowanych przeze mnie projektów badawczych będą stanowiły bazę do złożenia kolejnych projektów finansowanych przez agencje krajowe, Narodowy Centrum Nauki (NCN), Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) lub międzynarodowe z głównym naciskiem na fundacje europejskie. W tym miejscu pragnę dodać, że obecnie czekam na decyzję dotyczącą finansowania złożonego projektu NCBiR, w którym mam pełnić rolę wykonawcy - Kierownik i wnioskodawca projektu, Prof. Lewkowicz z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Planuje też kontynuację bardzo owocnej współpracy z zespołem Dr. hab. Chałubińskiego, profesora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Dr Skibą z Politechniki Łódzkiej. Należy dodać, że w bieżącym roku rozpoczął współpracę z Dr Wójkowską z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, współpraca ta dotyczy doświadczeń *in vivo*.

Wszystkie planowane przeze mnie działania, które przyczynią się do wzbogacenia mojej wiedzy w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych posłużą mojemu dalszemu rozwojowi naukowemu oraz kształceniu młodych naukowców, którymi się opiekuję. Poszukiwanie nowych możliwości do rozwoju dyscypliny nauki biologicznej, szczególnie w zakresie nanotechnologii i biomedycyny jest moim celem, którego realizację pragnę związać z obecnym miejscem zatrudnienia na Uniwersytecie Łódzkim.

8. Bibliometryczne podsumowanie dorobku publikacyjnego

W okresie „po doktoracie” opublikowałam, jako współautor łącznie **46** prac naukowych w recenzowanych czasopismach z listy JCR, a dodatkowo **6** prac zostało wysłanych do redakcji czasopism. Byłam współautorem **19** doniesień konferencyjnych.

„Przed doktoratem” (maj 2019 r.), jako współautor opublikowałam łącznie **13** publikacji z listy JCR, byłam współautorem **20** doniesień konferencyjnych.

Przez cały okres mojej kariery naukowej (2012-2023), zgodnie z danymi widniejącymi się w bazie Web of Science, jako współautor opublikowałam łącznie **59** prac, i byłam współautorem ponad **39** doniesień konferencyjnych. Mój Indeks Hirscha według bazy Web of Science obecnie wynosi **12**. Publikacje były cytowane **363** razy (z autocytowaniami **465**).

Web of Science:

<https://www.webofscience.com/wos/woscc/citation-report/e784eb1b-ae27-41e4-a7af-3dcb59a3de85-8f1af639>

W celu potwierdzenia uwzględnionej w tym autoreferacie informacji o mojej aktywności naukowej i współpracy z innymi uczelniami, zarówno krajowymi, tak i zagranicznymi załączam listy wspierające od współpracowników z instytucji partnerskich (załącznik 7).

9. Piśmiennictwo

1. Apelgot, S., Coppey, J., Grisvard, J., Guillé, E., Sissoëff, I., 1981. Distribution of copper-64 in control mice and in mice bearing ascitic Krebs tumor cells. *Cancer Res.* 41, 1502–1507.
2. Białkowska, K., Miłowska, K., Michlewska, S., Sokołowska, P., Komorowski, P., Lozano-Cruz, T., Gomez-Ramirez, R., de la Mata, F.J., Bryszewska, M., 2021. Interaction of cationic carbosilane dendrimers and their siRNA complexes with MCF-7 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22137097>
3. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D.M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 1310–1316.
4. Creixell, M., Peppas, N.A., 2012. Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today* 7, 367–379. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.06.013>
5. Del Olmo, N.S., Holota, M., Michlewska, S., Gómez, R., Ortega, P., Ionov, M., de la Mata, F.J., Bryszewska, M., 2020. Copper (II) metallodendrimers combined with pro-apoptotic sirnas as a promising strategy against breast cancer cells. *Pharmaceutics* 12, 1–14.
6. Dzmirut, V., Szulc, A., Shcharbin, D., Janaszewska, A., Shcharbina, N., Lazniewska, J., Novopashina, D., Buyanova, M., Ionov, M., Klajnert-Maculewicz, B., Gómez-Ramirez, R., Mignani, S., Majoral, J.P., Muñoz-Fernández, M.A., Bryszewska, M., 2015. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. *Int. J. Pharm.* 485, 288–294. 4

7. Ferenc, M., Pedziwiatr-Werbicka, E., Nowak, K.E., Klajnert, B., Majoral, J.P., Bryszewska, M., 2013. Phosphorus dendrimers as carriers of siRNA-characterisation of dendriplexes. *Molecules* 18, 4451–4466. <https://doi.org/10.3390/molecules18044451>
8. Gan, Q., Zhang, C.-L., Wang, B.-F., Xiong, Y.-H., Fu, Y.-L., Mao, Z.-W., Le, X.-Y., 2016. Two new mixed copper(ii)–dipeptide complexes of N,N-donor heterocycle ligands: studies on their non-covalent DNA binding, chemical nuclease, antioxidant and anticancer activities. *RSC Adv.* 6, 35952–35965.
9. Golbaghi, G., Castonguay, A., 2020. Rationally designed ruthenium complexes for breast cancer therapy. *Molecules* 25.
10. Hołota, M., Magiera, J., Michlewska, S., Kubczak, M., Olmo, N.S.D., García-Gallego, S., Ortega, P., De La Mata, F.J., Ionov, M., Bryszewska, M., 2019. In vitro anticancer properties of copper metallodendrimers. *Biomolecules* 9.
11. Hołota, M., Michlewska, S., Garcia-gallego, S., Sanz, N., Ortega, P., Bryszewska, M., Javier, F., Mata, D., Ionov, M., 2023. Combination of Copper Metallodendrimers with Conventional Antitumor Drugs to Combat Cancer in In Vitro Models.
12. Ionov, M., Lazniewska, J., Dzmitruk, V., Halets, I., Loznikova, S., Novopashina, D., Apartsin, E., Krasheninina, O., Venyaminova, A., Milowska, K., Nowacka, O., Gomez-Ramirez, R., De La Mata, F.J., Majoral, J.P., Shcharbin, D., Bryszewska, M., 2015. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. *Int. J. Pharm.* 485, 261–269.
13. Kesharwani, P., Jain, K., Jain, N.K., 2014a. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 39, 268–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>
14. Kesharwani, P., Tekade, R.K., Jain, N.K., 2014b. Generation dependent cancer targeting potential of poly(propyleneimine) dendrimer. *Biomaterials* 35, 5539–5548.
15. Maroto-Díaz, M., Elie, B.T., Gómez-Sal, P., Pérez-Serrano, J., Gómez, R., Contel, M., Javier De La Mata, F., 2016. Synthesis and anticancer activity of carbosilane metallodendrimers based on arene ruthenium(ii) complexes. *Dalt. Trans.* 45, 7049–7066. <https://doi.org/10.1039/c6dt00465b>
16. Michlewska, S., Ionov, M., Maroto-Díaz, M., Szwed, A., Ihnatsyeu-Kachan, A., Abashkin, V., Dzmitruk, V., Rogalska, A., Denel, M., Gapinska, M., Shcharbin, D., Gomez Ramirez, R., De La Mata, F.J., Bryszewska, M., 2019. Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukemia: In vitro studies on HL-60 cells. *Future Med. Chem.* 11.
17. Michlewska, S., Ionov, M., Maroto-Díaz, M., Szwed, A., Ihnatsyeu-Kachan, A., Loznikova, S., Shcharbin, D., Maly, M., Ramirez, R.G., de la Mata, F.J., Bryszewska, M., 2018. Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *J. Inorg. Biochem.* 181.
18. Michlewska, Sylwia, Ionov, M., Shcharbin, D., Maroto-Díaz, M., Gomez Ramirez, R., Javier de la Mata, F., Bryszewska, M., 2017. Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60). *Eur. Polym. J.* 87, 39–47.
19. Michlewska, S., Ionov, M., Shcharbin, D., Maroto-Díaz, M., Gomez Ramirez, R., Javier de la Mata, F., Bryszewska, M., 2017. Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60). *Eur. Polym. J.* 87.
20. Michlewska, S., Ionov, M., Szwed, A., Rogalska, A., Olmo, N.S. Del, Ortega, P., Denel, M., Jacenik, D., Shcharbin, D., de la Mata, F.J., Bryszewska, M., 2020. Ruthenium dendrimers against human lymphoblastic leukemia 1301 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21114119>
21. Michlewska, S., Maly, M., Wójkowska, D., Karolczak, K., Skiba, E., Hołota, M., Kubczak, M., Ortega, P., Watala, C., Javier de la Mata, F., Bryszewska, M., Ionov, M., 2023a. Carbosilane ruthenium metallodendrimer as alternative anti-cancer drug carrier in triple negative breast cancer mouse model: a preliminary study. *Int. J. Pharm.* 122784.
22. Michlewska, S., Maly, M., Wójkowska, D., Karolczak, K., Skiba, E., Hołota, M., Kubczak, M., Ortega, P., Watala, C., Javier de la Mata, F., Bryszewska, M., Ionov, M., 2023b. Carbosilane ruthenium metallodendrimer as alternative anti-cancer drug carrier in triple negative breast cancer mouse model: A preliminary study. *Int. J. Pharm.* 636, 122784.
23. Michlewska, S., Maroto, M., Hołota, M., Kubczak, M., Sanz Del Olmo, N., Ortega, P., Shcharbin, D., De la Mata, F.J., Bryszewska, M., Ionov, M., 2021. Combined therapy of ruthenium dendrimers and anti-cancer drugs against human leukemic cells. *Dalt. Trans.* 50, 9500–9511.

24. Noriega-Luna, B., Godínez, L.A., Rodríguez, F.J., Rodríguez, A., Zaldívar-Lelo De Larrea, G., Sosa-Ferreira, C.F., Mercado-Curiel, R.F., Manríquez, J., Bustos, E., 2014. Applications of dendrimers in drug delivery agents, diagnosis, therapy, and detection. *J. Nanomater.* 2014.
25. Pedziwiatr-Werbicka, E., Milowska, K., Dzitruk, V., Ionov, M., Shcharbin, D., Bryszewska, M., 2019. Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications. *Eur. Polym. J.* 119, 61–73.
26. Peña, Q., Lorenzo, J., Sciortino, G., Rodríguez-Calado, S., Maréchal, J.D., Bayón, P., Simaan, A.J., Irazo, O., Capdevila, M., Palacios, Ò., 2019. Studying the reactivity of “old” Cu(II) complexes for “novel” anticancer purposes. *J. Inorg. Biochem.* 195, 51–60.
27. Rodríguez-Prieto, T., Michlewska, S., Hołota, M., Ionov, M., de la Mata, F.J., Cano, J., Bryszewska, M., Gómez, R., 2021. Organometallic dendrimers based on Ruthenium(II) N-heterocyclic carbenes and their implication as delivery systems of anticancer small interfering RNA. *J. Inorg. Biochem.* 223, 111540.
28. Wan, D., Tang, B., Wang, Y.-J., Guo, B.-H., Yin, H., Yi, Q.-Y., Liu, Y.-J., 2017. Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 180–190.
29. Zhang, C., Pan, D., Luo, K., Li, N., Guo, C., Zheng, X., Gu, Z., 2014. Dendrimer-doxorubicin conjugate as enzyme-sensitive and polymeric nanoscale drug delivery vehicle for ovarian cancer therapy. *Polym. Chem.* 5, 5227–5235.
30. Zhang, N., Li, S., Hua, H., Liu, D., Song, L., Sun, P., Huang, W., Tang, Y., Zhao, Y., 2016. Low density lipoprotein receptor targeted doxorubicin/DNA-Gold Nanorods as a chemo- and thermo-dual therapy for prostate cancer. *Int. J. Pharm.* 513, 376–386.



Podpis wnioskodawcy