

Dr inż. Julita Kulbacka

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu



Załącznik 2a do wniosku
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

w języku polskim

Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia.....	4
<i>Wprowadzenie</i>	8
<i>Cele badawcze i omówienie najważniejszych wyników badań własnych</i>	10
<i>Główne cele badawcze</i>	11
<i>Terapia fotodynamiczna</i>	11
<i>Najważniejsze wyniki badań</i>	13
<i>Problem oporności na chemioterapię</i>	13
<i>Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych w cyklu prac habilitacyjnych</i>	22
<i>Literatura</i>	23
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	26
Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.....	26
Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	26
Badania spoza głównego nurtu badawczego.....	28
<i>Markery stresu oksydacyjnego w badaniach podstawowych</i>	28
<i>Badania z podmiotami klinicznymi</i>	29
<i>Naturalne i syntetyczne substancje przeciwnowotworowe</i>	30
<i>Nanonośniki w strategiach przeciwnowotworowych i bioobrazowaniu</i>	32
Aktualnie prowadzone badania i plany naukowe.....	34
<i>Elektroporacja w reakcji fotodynamicznej</i>	34
<i>Elektrochemioterapia – badania in vitro</i>	35
<i>Elektrochemioterapia – badania in vivo</i>	37
<i>Nanoimpulsy i mikrosondy</i>	37
<i>Sonoporacja</i>	39
6. Posumowanie dorobku naukowego.....	40

1. Dane osobowe.

Imię i nazwisko: Julita Kulbacka

Adres służbowy: Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich

ul. Chałubińskiego 10, 50-367 Wrocław

tel.: 071 784 13 87, fax.: 071 784 00 85

e-mail: julita.kulbacka@umed.wroc.pl

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

09.07.2001 r. magister inżynier w zakresie inżynierii biomedycznej – fizyki technicznej uzyskany na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Temat pracy: *“Wpływ bliskiej podczerwieni na oddziaływanie Czerwieni Kongo z fenyloalaniną – spektroskopia UV/Vis”*, promotor prof. dr hab. n. techn. Małgorzata Komorowska.

23.06.2006 r. doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskany na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych (LoVo i LoVoDX) poddanych terapii fotodynamicznej”*, promotor prof. dr hab. n. med. Teresa Banaś.

2012 – 2013 studia podyplomowe w Wyższej Szkole Ekonomii i Innowacji w Lublinie: *„Menedżer projektów badawczych”*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2001 – 2006	doktorant w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
01.10.2004 – 28.02.2007	asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
01.03.2007 – do chwili obecnej	adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Zastosowanie elektroporacji do wspomaganie efektu przeciwnowotworowego
wybranych fotouczulaczy i cytostatyków na modelu *in vitro***

b) publikacje składające się na osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Podstawę postępowania habilitacyjnego stanowi cykl dziewięciu pełnotekstowych, oryginalnych artykułów naukowych (4.1 – 4.9) opublikowanych w czasopismach z listy JRC w latach 2010 – 2016. Artykuły osiągnięcia naukowego zostały uszeregowane zgodnie z realizowanym w nich celem naukowym. Komentarz do cyklu publikacyjnego przedstawiony w autoreferacie stanowi podsumowanie najważniejszych naukowych osiągnięć własnych, będących podstawą przedstawionej rozprawy habilitacyjnej. Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor) czasopism, w których opublikowany został cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wynosi: IF=**25.152** (242 pkt MNiSW, według listy JRC, zgodnie z rokiem opublikowania).

4.1. Saczko J, Nowak M, Skołużcka N, **Kulbacka J**, Kotulska Mⁱ: *The effects of the electro-photodynamic in vitro treatment on human lung adenocarcinoma cells*, Bioelectrochemistry 2010 Vol.79 no.1; s.90-94 (IF: 3.520; Pkt. MNiSW/KBN: 32)

Mój udział procentowy, który szacuję na 50%, pracy polegał na aktywnym współtworzeniu koncepcji całej pracy i merytorycznej opiece nad prawidłową realizacją całości eksperymentów, optymalizacji części doświadczalnej dotyczącej zastosowania elektroporacji z reakcją fotodynamiczną, opracowaniu wyników, rysunków i redagowaniu pracy oraz opracowaniu odpowiedzi w korespondencji z edytorem.

4.2. **Kulbacka J**, Nowak M, Skołużcka N, Saczko J, Kotulska Mⁱ: *The influence of electroporation on in vitro photodynamic therapy of human breast carcinoma cells*, Folia Biol.(Praha) 2011 Vol.57 no.3; s.112-118 (IF: 1.151; Pkt. MNiSW/KBN: 20)

Mój udział procentowy, który szacuję na 60%, pracy polegał na aktywnym współtworzeniu koncepcji całej pracy i merytorycznej opiece nad prawidłową realizacją całości eksperymentów, optymalizacji części doświadczalnej dotyczącej zastosowania elektroporacji z reakcją fotodynamiczną, opracowaniu wyników, rysunków i redagowaniu pracy oraz opracowaniu odpowiedzi w korespondencji z edytorem.

4.3. Kotulska Mⁱ, **Kulbacka J**, Saczko J: *Advances in photodynamic therapy assisted by electroporation*, Curr. Drug Metab. 2013 Vol.14 no.3; s.309-318 (IF: 3.487; Pkt. MNiSW/KBN: 40)

Mój udział procentowy, który szacuję na 40%, polegał na aktywnym zaangażowaniu we współtworzeniu merytorycznej koncepcji całej pracy oraz na samodzielnym opracowaniu części dotyczącej substancji fotouczulających i mechanizmów terapii fotodynamicznej.

4.4. **Kulbacka J**ⁱ, Kotulska M, Rembiałkowska N, Choromańska A, Kamińska I, Garbiec A, Rossowska J, Daczewska M, Jachimska B, Saczko J: *Cellular stress induced by photodynamic reaction with CoTPPS and MnTMPyPCL₅ in combination with electroporation in human colon adenocarcinoma cell lines (LoVo and LoVoDX)*, Cell Stress Chaperones 2013 Vol.18 no.6; s.719-731 (IF: 2.537; Pkt. MNiSW/KBN: 20)

Mój udział procentowy pracy, który szacuję na 50%, polegał na tworzeniu koncepcji całej pracy, optymalizacji i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej zastosowania

ⁱ autor korespondencyjny

elektroporacji z nowymi związkami z grupy porfiryn, opracowaniu wyników, rysunków i napisaniu pracy oraz opracowaniu odpowiedzi w korespondencji z edytorem.

4.5. Kulbacka Jⁱⁱ, Daczewska M, Dubińska-Magiera M, Choromańska A, Rembiałkowska N, Surowiak P, Kulbacki M, Kotulska M, Saczko J: *Doxorubicin delivery enhanced by electroporation to gastrointestinal adenocarcinoma cells with P-gp overexpression*, Bioelectrochemistry 2014 Vol.100; s.96-104 (IF: 4.172; Pkt. MNiSW/KBN: 35)

Mój udział procentowy, który szacuję na 60% polegał na stworzeniu koncepcji całej pracy, optymalizacji i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej zastosowania elektroporacji z doksorubicyną, opracowaniu wyników, rysunków i napisaniu pracy oraz opracowaniu odpowiedzi w korespondencji z edytorem.

4.6. Zielichowska A, Saczko J, Garbiec A, Dubińska-Magiera M, Rossowska J, Surowiak P, Choromańska A, Daczewska M, **Kulbacka Jⁱⁱ**, Lage H: *The photodynamic effect of far-red range phthalocyanines (ALPc and Pc green) supported by electropermeabilization in human gastric adenocarcinoma cells of sensitive and resistant type*, Biomed. Pharmacother. 2015 Vol.69; s.145-152 (IF: 2.326; Pkt. MNiSW/KBN: 20)

Mój udział procentowy, który szacuję na 30% polegał na współtworzeniu koncepcji całej pracy, optymalizacji i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej zastosowania elektroporacji z fotouczulaczami z zakresu podczerwieni, opracowaniu wyników, rysunków i napisaniu pracy oraz opracowaniu odpowiedzi w korespondencji z edytorem.

4.7. Kulbacka Jⁱⁱ: *Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) impact and enhanced Photofrin II delivery in photodynamic reaction in cancer and normal cells*, Photodiagn. Photodyn. Ther. 2015 Vol.12 no.4; s.621-629 (IF: 2.412; Pkt. MNiSW/KBN: 20)

Mój 100% udział poległ na stworzeniu koncepcji całej pracy, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu wyników i napisaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z edytorem.

4.8. Kulbacka Jⁱⁱ, Pucek A, Kotulska M, Dubińska-Magiera M, Rossowska J, Rols M-P, Kazimiera Anna Wilk KA: *Electroporation and lipid nanoparticles with cyanine IR-780 and flavonoids as efficient vectors to enhanced drug delivery in colon cancer*, Bioelectrochemistry 2016 Vol.110; s.19-31 (IF: 3.556; Pkt. MNiSW/KBN: 35)

ⁱⁱ autor korespondencyjny

Mój udział procentowy, który szacuję na 65% polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, optymalizacji części badań dotyczącej elektroporacji komórek w obecności nanonośników, wykonaniu części dotyczącej badań biologicznych, opracowaniu wyników z części biologicznej, napisaniu manuskryptu, prowadzeniu korespondencji z edytorem.

4.9. Kulbacka Jⁱⁱⁱ, Pucek A, Wilk KA, Dubińska-Magiera M, Rossowska J, Kulbacki M, Kotulska M: *The Effect of Millisecond Pulsed Electric Fields (msPEF) on Intracellular Drug Transport with Negatively Charged Large Nanocarriers Made of Solid Lipid Nanoparticles (SLN): In Vitro Study.* J Membr Biol. 2016, 249(5): 645-661. (IF: 1.991; Pkt. MNiSW/KBN: 20)

Mój udział procentowy, który szacuję na 65% polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, optymalizacji części badań dotyczącej elektroporacji komórek w obecności nanonośników, wykonaniu części dotyczącej badań biologicznych, opracowaniu wyników z części biologicznej, napisaniu manuskryptu, prowadzeniu korespondencji z edytorem.

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna omawia monotematyczny materiał, obejmujący wyniki badań opublikowane w dziewięciu publikacjach na temat analizy zjawiska elektroporacji stosowanego do efektywnego dostarczania leku w formie wolnej i enkapsulowanej w warunkach *in vitro*. Proponowany cykl publikacji stanowi nowość naukową w zakresie eksperymentalnej biologii medycznej. Do realizacji badań wykorzystałam różnorodne techniki obrazowania komórek: klasyczną mikroskopię świetlną, mikroskopię fluorescencyjną, konfokalną oraz mikroskopię elektronową. W celu scharakteryzowania nanocząstek zastosowano mikroskopię sił atomowych (AFM, ang. *Atomic Force Microscopy*) oraz skaningową mikroskopię elektronową (SEM, ang. *Scanning Electron Microscopy*). Efekty oddziaływań leków i elektroporacji oceniałam testami proliferacyjnymi (MTT, test klonogenny, barwienia błękitem trypanu), metodami immunocytochemicznymi i immunofluorescencyjnymi oraz cytofluorometrią przepływową (FACS, ang. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Przedstawione prace mają interdyscyplinarny charakter badań i wymagały podjęcia współpracy ze specjalistami z różnych dziedzin.

Prace 4.8 i 4.9, w części dotyczącej syntez nanonośników i weryfikacji ich pod kątem dostarczania leku finansowane były przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ z zadania „Nanokapsulowanie farmaceutyków” realizowanego w ramach programu badawczego „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne – BioMed” (POIG 01.01.02-02-

ⁱⁱⁱ autor korespondencyjny

003/08-00), finansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 1.1.2), w którym byłam wykonawcą.

Prace 4.3, 4.5, 4.6 i 4.7 finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki (grant 2011/01/D/NZ4/01255, w którym byłam kierownikiem)

Prace 4.5 – 4.9 zrealizowano we współpracy w ramach w projekcie COST Action TD1104, w którym byłam zastępcą przedstawiciela z Polski (vice MC). Informacje popularyzujące publikacje umieszczono na stronie projektu www.electroporation.net.

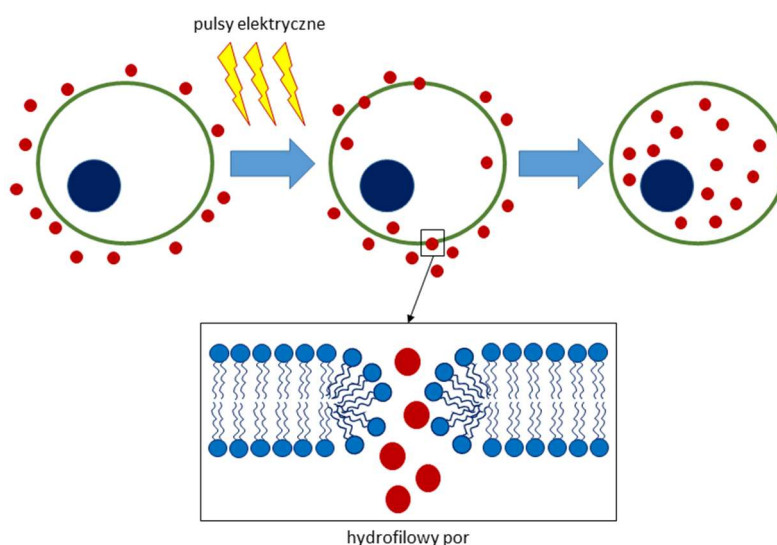
c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Pytanie czy istnieją skuteczne metody leczenia nowotworów, jest ciągłym wyzwaniem. Postęp nauki i dostęp do najnowszych technologii powoduje, że szanse wyleczenia chorób nowotworowych ciągle rosną. Wymaga to jednak przeprowadzania wielu badań w celu zrozumienia mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów oraz pomysłów na nowe rodzaje terapii. Istotnym problemem terapii przeciwnowotworowej jest kwestia skutecznego dostarczenia leku do wnętrza komórki tak, by osiągnąć jego cytotoksyczne stężenie przy minimalnych skutkach ubocznych. Mając to na uwadze, podjęłam tematykę zastosowania elektroporacji (EP) do wspomaganie terapii przeciwnowotworowych. Technika ta pozwala na przełamanie bariery przenikalności błony cytoplazmatycznej i wydaje się być obiecującą do efektywnego transportu wybranych fotouczulaczy i cytostatyków.

Błona komórkowa tworzy barierę, która oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnątrzkomórkowego. Ta naturalna bariera umożliwia kontrolowany transport cząsteczek i jest istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność terapii, które zakładają dostarczenie leku do wnętrza komórek. Krótkie impulsy elektryczne o wysokim natężeniu pola elektromagnetycznego mogą indukować tymczasową permeabilizację błony komórkowej, inaczej zwaną elektroporacją. Po raz pierwszy zjawisko to wykorzystał w praktyce do transportu DNA E. Neumann w 1972 roku [*Neumann i Rosenheck 1972; Neumann 1973*]. Efekt tymczasowej elektroporacji błony stał się podstawą rozwoju wielu nowoczesnych technik, m.in.: dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek, bezpośredniego transferu genów do różnych typów komórek i mikroorganizmów, elektrofuzji komórkowej lub nawet stymulacji wzrostu komórek i ich regeneracji. Zastosowanie impulsów elektrycznych w celu poprawy

transportu leków cytostatycznych nazywane jest elektrochemioterapią (ECT) [Mir i wsp. 1991; Domenge i wsp. 1996]. Teoretyczne zrozumienie mechanizmu elektroporacji jest kluczowe w przypadku planowania i projektowania protokołów dostarczania leków czy materiału genetycznego. W ostatnich czterech dekadach pojawiły się liczne doniesienia i propozycje opisu tego zjawiska. Zakładają one deformację lipidów błonowych, ich przejścia fazowe, rozpad interfaz pomiędzy domenami lipidowymi lub denaturację białek błonowych. Najbardziej rozpowszechnionym stanowiskiem jest założenie powstawania na skutek EP hydrofilowego pora o charakterze dynamicznym (**Rys.1**), przez który swobodnie mogą przedostawać się cząsteczki leku [Barnett i wsp. 1991; Weaver 1993; Casciola i wsp. 2016]. Są to jednak hipotezy, gdyż do tej pory nikomu nie udało się zwizualizować tego zjawiska.



Ryc. 1. Koncepcja zjawiska elektroporacji, formowanie hydrofilowego pora w błonie komórkowej [w oparciu o Weaver 1993].

Elektroporacja ma wiele zastosowań, w zależności od długości trwania impulsu oraz stosowanych wartości natężenia pola elektrycznego. Najbardziej rozpowszechnione jest zastosowanie elektroporacji, wykorzystującej milisekundowe impulsy i niższe wartości natężenia pola elektrycznego (do 500 V/cm), w celu wprowadzania materiału genetycznego do wnętrza komórek, wbudowywania białek w błony czy też fuzji komórek. Obecnie najintensywniej rozwija się metoda elektroporacji wykorzystująca impulsy mikrosekundowe i wyższe wartości natężenia pola elektrycznego (do 2kV/cm). Technologia ta z powodzeniem stosowana jest do wprowadzania leków do wnętrza komórek, tak jak w przypadku elektrochemioterapii (ECT). Do tej pory potwierdzono skuteczność niewielu leków (bleomycyna, cisplatyna), które mają zastosowanie w praktyce klinicznej. Ogromnym

powodzeniem cieszy się zastosowanie EP w przemyśle spożywczym do bezpiecznej konserwacji żywności oraz w dziedzinie kosmetyki estetycznej do efektywnego wprowadzania naturalnych substancji pod skórę [Kotnik i wsp. 2015; Skolucka i wsp. 2010]. Następnym stosowanym zakresem impulsów obejmuje ultrakrótkie impulsy (60–300 ns) z krótkim czasem wzrostu 4–30 ns przy wysokim natężeniu pola elektrycznego. Metoda ta zwana elektroporacją nanopulsową (nsPEF). nsPEF wywołuje szereg reakcji komórkowych, powoduje m.in. translokację fosfatydyloseryny (PS), permeabilizację błon komórkowych (w większym stopniu błon wewnętrznych) oraz utratę mitochondrialnego potencjału błonowego. Zauważono również, że nsPEF powoduje niewielkie efekty termiczne [Beebe i wsp. 2005; Beebe i wsp. 2002; Nuccitelli i wsp. 2010; Dai i wsp. 2017]. Metoda ta, podobnie jak elektroporacja wykorzystująca impulsy mikrosekundowe może być stosowana w skutecznej eliminacji komórek nowotworowych, a przy odpowiednio wysokim natężeniu pola elektrycznego, nawet bez konieczności stosowania leków cytostatycznych. Pierwszą próbę zastosowania metody nsPEF przeprowadzono u pacjenta, u którego zdiagnozowano raka podstawnokomórkowego, a po sześciu tygodniach po zabiegu, wykazano całkowitą remisję [Garon i wsp. 2007].

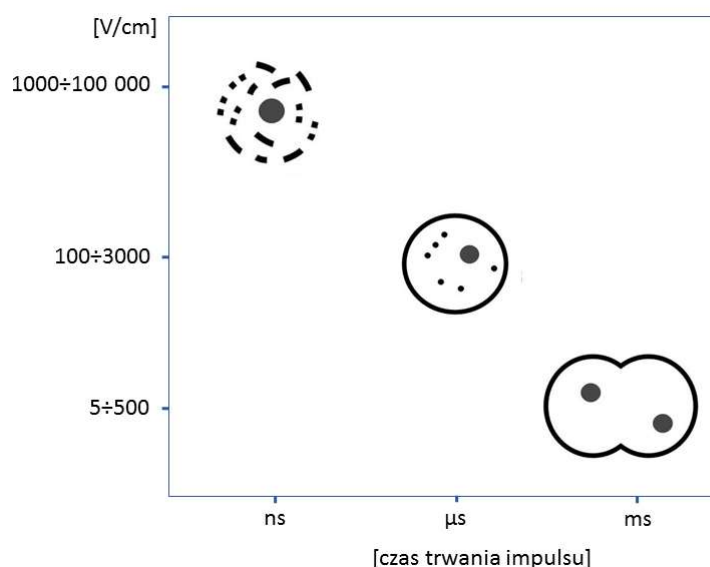
Elektroporacja ma ogromny potencjał. Pomimo tego mechanizmy działania samej elektroporacji oraz jej kombinacji z innymi lekami nie do końca są jeszcze wyjaśnione.

Cele badawcze i omówienie najważniejszych wyników badań własnych

Aktualnie stosowane metody przeciwnowotworowe takie jak chemioterapia i terapia fotodynamiczna charakteryzuje długa lista efektów ubocznych leczenia. Na pierwszym miejscu w przypadku stosowanych chemioterapeutyków, jest wysoka ogólna toksyczność, a w przypadku fotouczulaczy długotrwała nadmierna wrażliwość na światło [Wan i wsp. 2014]. Podjęta przeze mnie tematyka badawcza miała na celu skuteczne zredukowanie aktywnego stężenia stosowanej substancji przeciwnowotworowej w komórkach, poprzez zastosowanie tymczasowej permeabilizacji błon komórkowych indukowanej zewnętrznym impulsowym polem elektrycznym. Dlatego aby poznać i wyjaśnić mechanizm działania elektroporacji na komórki nowotworowe i prawidłowe, przeprowadziłam badania z zastosowaniem fotouczulaczy, cytostatyków, a także nanonośników z uwzględnieniem ich ładunku, rozmiaru i kompozycji.

Główne cele badawcze:

1. Wykorzystanie techniki elektroporacji mikrosekundowej do efektywnego dostarczenia leku (fotouczulaczy, cytostatyków) do komórek w szczególności do komórek opornych na chemioterapię (prace 4.1 - 4.6).
2. Zastosowanie elektroporacji nanosekundowej w reakcji fotodynamicznej w celu zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej fotouczulacza (praca 4.7).
3. Wykorzystanie elektroporacji milisekundowej w celu dostarczenia do komórek dużych nanocząsteczek lipidowych (prace 4.8 i 4.9).



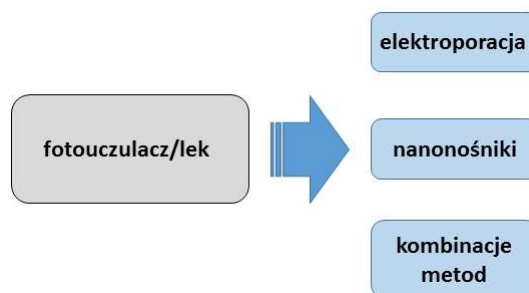
Ryc. 2. Zakres parametrów elektroporacji zastosowany w badaniach.

Terapia fotodynamiczna

Terapia fotodynamiczna (PDT, *ang. PhotoDynamic Therapy*) została odkryta ponad 100 lat temu. Metoda ta wykorzystuje działanie związku światłoczułego (fotouczulacza), zwykle nietoksycznego, w celu selektywnej eliminacji komórek nowotworowych. Fotouczulacz jest aktywowany światłem o odpowiedniej długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji związku. Zakłada się, że reakcja fotodynamiczna (PDR, *ang. PhotoDynamic Reaction*) może przebiegać według jednego z dwóch mechanizmów. Pierwszy zakłada niskie stężenie tlenu w środowisku reakcyjnym, gdzie zachodzą przemiany między wzbudzonym stanem trypletowym, światłoczułego leku a tkanką nowotworową. W efekcie prowadzi to do wytworzenia rodników i anionorodników, które reagują z tlenem w stanie trypletowym co prowadzi do wygenerowania reaktywnych form tlenu (RFT). Drugi mechanizm zakłada wysokie stężenie tlenu w środowisku reakcyjnym. Mechanizm ten jest dominujący ze względu

na zawartość tlenu w organizmie ludzkim. W tym przypadku fotouczulacz przechodzi do wzbudzonego stanu trypletowego i zachodzi przekazanie energii między fotouczulaczem a tlenem w podstawowym stanie trypletowym. Wówczas powstaje tlen w stanie wzbudzonym tzw. tlen singletowy o bardzo silnych własnościach utleniających. W obu przypadkach obecność tlenu wpływa na powstawanie RFT i wolnych rodników, które niszczą błony komórkowe i organelle, tym samym inicjując śmierć komórek nowotworowych. Podaje się również trzeci typ reakcji, który dotyczy bezpośredniego oddziaływania fotouczulacza w stanie wzbudzonym z białkami, lipidami czy węglowodanami, inicjując zniszczenie tych cząsteczek, modyfikacje ich struktury czy nawet rozpad substancji fotouczulającej. Do tej pory mechanizmy reakcji fotodynamicznej (PDR, *ang. PhotoDynamic Reaction*) zostały dość dobrze poznane i są stosowane zarówno w zmianach nowotworowych jak i nienowotworowych. Zaletą stosowanych klinicznie substancji fotouczulających jest ich selektywna akumulacja w tkankach nowotworowych, co również jest wykorzystywane jako diagnostyka fotodynamiczna (PDD, *ang. PhotoDynamic Diagnosis*). Większość stosowanych substancji to związki porfiryne. Najbardziej rozpowszechnionymi fotouczulaczami stosowanymi w PDT są: HPD (mieszanina hematoporfiryn), Photofrin[®] (mieszanina oligomerów zawierająca do ośmiu cząsteczek porfiryne), Levulan (5-ALA, kwas aminolewulinowy, prekursor syntezy porfiryne), Metvixia (aminolewulinian metylu), Cysview (heksaaminolewulinian), Visudyne (verteporfiryne), Foscan (meta-tetra(hydroksyfenylo)chloryna, *m*-THPC). Prowadzone są również badania nad fotouczulaczami nowej generacji z grupy cyjanin i ftalocyjanin, których maksima pochłaniania światła sięgają bliskiej podczerwieni, co umożliwia głębszą penetrację naświetlanych tkanek.

Pomimo tak zaawansowanego poziomu wiedzy na temat PDT i obiecujących efektów terapeutycznych, ciągle poszukuje się nowych fotouczulaczy i lepszych metod ich dostarczenia. Modyfikacje PDT mają na celu zniwelowanie jej efektów ubocznych, takich jak np. przedłużona wrażliwość skóry i oczu na działanie światła (nawet do 6 tygodni po zakończeniu leczenia). PDT może powodować oparzenia, obrzęki, ból i blizny w miejscu leczenia i otaczających tkankach. PDT nie może być również stosowana u osób z porfiriami lub u osób uczulonych na porfiryny. Zwykle te niepożądane działania przemijają, ale wpływają na dyskomfort pacjenta. Aby uniknąć lub zmniejszyć obserwowane niekorzystne efekty, stosuje się próby zamknięcia fotouczulacza w nanonośniku (liposomy, micelle itp.). Zadaniem fotouczulacza w nanonośniku jest selektywne dostarczenie substancji do docelowego miejsca leczenia. Jednak absorpcja nośników przez komórki nie zawsze jest efektywna. Również tutaj elektroporacja może zostać zastosowana, zwiększając skuteczność dostarczenia leku do komórek nowotworowych (**Ryc.3**).



Ryc. 3. Metody wspomaganie terapii przeciwnowotworowych.

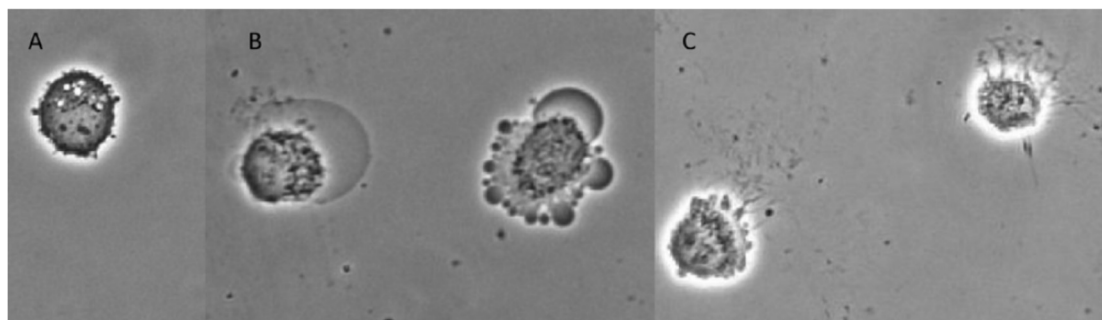
Najważniejsze wyniki badań

Stosując technikę elektroporacji w publikacji **4.1. i 4.2** wykazałam, że wcześniejsza ekspozycja komórek na impulsowe pole elektryczne znacząco podnosiła efektywność PDT z zastosowaniem hematoporfiryny (HpD) w ludzkich komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) oraz w ludzkich komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwych (MCF-7/WT) i opornych na dokсорubicynę (MCF-7/WT). W publikacji **4.1** stosując następujące warunki elektroporacji: 1000 V/cm, 5 impulsów 100 μ s z częstotliwością 1 Hz wobec komórek A549 uzyskałam 15-krotne zwiększenie efektywności fotodynamicznej HpD dla dawki 10 μ g/mL i 30-krotne dla stężenia 20 μ g/mL. Działanie pola elektromagnetycznego w połączeniu z metodą fotodynamiczną na komórkach zostało również ocenione i zweryfikowane za pomocą równania opartego na równaniu van't Hoff'a, zaproponowanego przez E. Neumann'a [Neumann 2000]. Teoria ta przewiduje określenie wielkości frakcji żywych komórek w odniesieniu do wartości natężenia pola elektrycznego. W przypadku komórek nowotworowych płuc i gruczołu sutkowego (**4.1. i 4.2**) wykazałam, że zastosowanie terapii elektro-fotodynamicznej z HpD jest bardziej efektywne niż aplikacja samej terapii fotodynamicznej.

Problem oporności na chemioterapię

Wspólną cechą leków przeciwnowotworowych jest ich hydrofobowość, dzięki czemu mogą się przemieszczać przez błonę komórkową w wyniku biernej dyfuzji. Jednak osiągnięcie odpowiedniego stężenia leku w docelowym miejscu wychwytu jest warunkowane wieloma czynnikami np. poziomem ekspresji i aktywności enzymów metabolizujących leki oraz białek błonowych odpowiedzialnych za ich transport. Wszelkie zaburzenia tych mechanizmów implikują zjawisko oporności na chemioterapię (MDR, *ang. Multidrug Resistance*) co stanowi problem w procedurach onkologicznych. Często mamy do czynienia z opornością pierwotną, ale większym problemem jest oporność nabyta w czasie leczenia chemioterapeutycznego.

Zwiększona ekspresja transporterów błonowych (np. P-gp, białka z rodziny ABC -*ATP-binding Cassette*) w opornych komórkach nowotworowych utrudnia transport leku do wnętrza komórki, ponieważ wiele ze stosowanych cytostatyków jest substratami dla tych białek. Zastosowanie metody elektroporacji umożliwi rozszczelnienie dwuwarstwy lipidowej i transport cząsteczek leku poprzez powstałe „nanopory”. W publikacji 4.2. wykazałam, że metoda elektroporacji może efektywnie wspomagać działanie reakcji fotodynamicznej w przypadku komórek wykazujących oporność na chemioterapię. Uzyskałam 4-krotny wzrost efektywności terapii elektro-fotodynamicznej przy 10 minutowej ekspozycji komórek na lek, w porównaniu do standardowych procedur PDT. Publikacja 4.2 po raz pierwszy prezentuje mikrofotografie komórek ulegających elektroporacji (Ryc.3), gdzie można zaobserwować rozszczelnienie błon komórkowych i wydostający się materiał komórkowy. Otrzymane wyniki są obiecujące wobec narastającego problemu oporności wielolekowej.



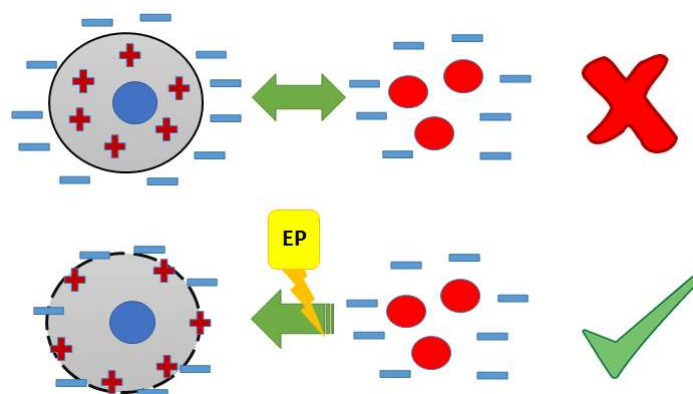
Ryc. 3. Mikrofotografie komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7/DOX). **A)** komórki kontrolne; **B)** komórki po elektroporacji przy 1000 V/cm – pęcherzyki w błonie wskazują na rozszczelnienie membrany; **C)** komórki po elektroporacji przy 1200 V/cm – wystrzelenie materiału wewnątrzkomórkowego przez pory [publikacja 4.2].

Zastosowanie mało inwazyjnych terapii przeciwnowotworowych jest ukierunkowane na ich selektywnie działanie na komórki nowotworowe. Moment wzbudzenia fotosensybilizatora w obecności tlenu w czasie reakcji fotodynamicznej skutkuje powstawaniem reaktywnych form tlenu (RFT), które powodują uszkodzenie tkanki nowotworowej. Efektywność leczenia zależy od skutecznego transportu fotosensybilizatora przez błonę i wewnątrzkomórkowej akumulacji leku. W zależności od warunków terapii oraz mechanizmu wychwytu fotouczulaczy, mogą one osiągać zróżnicowane stężenia wewnątrzkomórkowe oraz powodować różne efekty w komórkach. W publikacji 4.3 na podstawie danych literaturowych jednoznacznie wykazano skuteczność transportu poprzez zastosowanie zewnętrznych impulsów elektrycznych wobec komórek nowotworowych. Praca przeglądowa 4.3 opisuje oddziaływanie PDT oraz PDT łączonej z metodą elektroporacji (EP-PDT) na komórki nowotworowe i prawidłowe w badaniach *in vitro* i *in vivo*. W ramach

przeglądu literaturowego porównano działanie różnych fotouczulaczy, które dotychczas stosowano w połączeniu z elektroporacją. Jak się okazuje dość dobre rezultaty w badaniach *in vitro* uzyskuje się stosując elektroporację z fotouczulaczami porfirynewymi (HpD, PpIX, ALA) w przypadku nowotworów płuca (A549), chłoniaka (U-937), przewlekłej białaczki szpikowej (K-562) oraz ludzkiego gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7/WT i MCF-7/DX). Z kolei zastosowanie elektroporacji z fotouczulaczami z grupy ftalocyjanin (AlPcS₄, ZnPc, CuPcTs) pozwoliło uzyskać największą efektywność w mysich komórkach raka wątroby (MH-22A), chłoniaka (U-937) oraz przewlekłej białaczki szpikowej (K-562). Przeprowadzone badania *in vivo* wskazują na duży potencjał w stosowaniu EP-PDT z chloryną e₆ (Ce6) i ftalocyjaniną aluminiową (AlPcS₄) w raku wątroby. W przeglądzie opisano również aplikację fotouczulacza ALA na warstwie rogowej świni, gdzie wykazano, że elektroporacja wzmaga dostarczanie fotouczulacza nawet 150-krotnie przy niskich natężeniach pola elektrycznego (100 V/cm). W pracy 4.3 opisano również potencjalne zastosowanie elektroporacji do efektywnego dostarczania kropek kwantowych CdSe/ZnS w terapii fotodynamicznej oraz do znakowania komórek.

W publikacji 4.4. zastosowałam dwa nowe związki porfirynewe (CoTPPS i MnTMPyPCl₅), o różnych właściwościach elektrycznych w celu określenia ich potencjału przeciwnowotworowego w reakcji fotodynamicznej wspomaganej elektroporacją w ludzkich komórkach nowotworowych. Potencjał zeta porfiryny zawierającej kobalt wskazywał ujemny ładunek: -23,5mV. W związku z ujemnym ładunkiem na powierzchni błon komórkowych, zgodnie z gradientem elektrochemicznym, transport anionów do wnętrza komórki był utrudniony. Potencjał zeta porfiryny z manganem wskazywał dodatnie naładowanie związku (49,5 mV).

W przypadku cząsteczek naładowanych elektrycznie, należy uwzględnić różnicę potencjałów jaka występuje w poprzek błon komórkowych. Różnicę tę określa się jako potencjał transbłonowy wynikający z różnej koncentracji ładunków elektrycznych po obu stronach błony, który działa z określoną siłą na cząsteczkę obdarzoną ładunkiem elektrycznym. Otrzymane wyniki wskazują, że metoda elektroporacji znacznie ułatwia transport porfiryny kationowej i umożliwia transport porfiryny anionowej do wnętrza komórek nowotworowych (Rys.4).

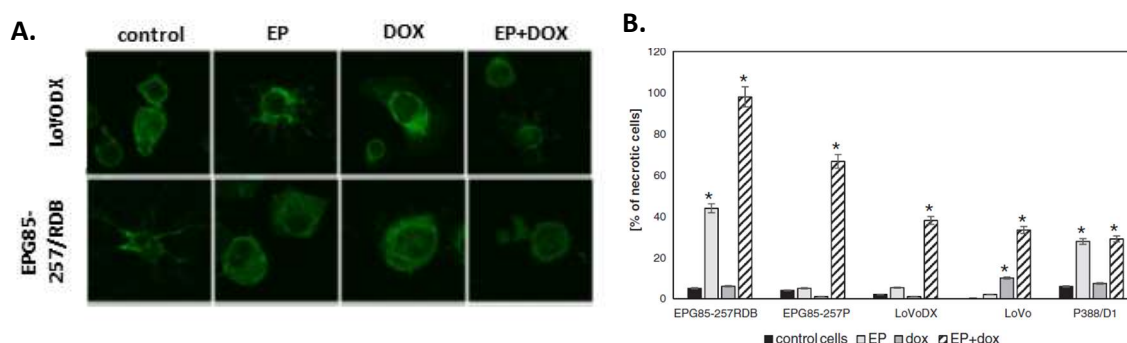


Ryc. 4. Zastosowanie elektroporacji do transportu cząsteczek anionowych.

Do badań wytypowano kilka linii komórkowych: wrażliwe (LoVo) i odporne na działanie dokсорubicyny (LoVoDX), ludzkie komórki gruczolaka gruczołu sutkowego wrażliwe (MCF-7/WT) i odporne na działanie dokсорubicyny (MCF-7/DOX) oraz ludzkiego czerniaka (Me45). Otrzymane wyniki wskazują na największy potencjał terapii foto-elektrodynamicznej wspomaganą elektroporacją w komórkach nowotworowych okrężnicy, zarówno wrażliwych jak i opornych lekowo.

Jednym z większych problemów jest pierwotne lub wtórne zjawisko oporności wielolekowej. Leki cytostatyczne, które stanowią substrat dla białka MRP1 (*ang. Multidrug Resistant-related Protein 1*) są sprzęgane głównie z glutationem i wówczas mogą być aktywnie usuwane z komórki [Kulbacka i wsp. 2008; Hu i wsp. 2016]. Dlatego do badań wybrano lek z grupy antracyklin dokсорubicynę. Dokсорubicyna jest silnym lekiem cytotoksycznym, który wbudowuje się w strukturę DNA, powodując jego rozerwanie oraz fragmentację. Mechanizm oporności komórek na dokсорubicynę wiąże się nie tylko z MRP1, ale również z innymi transporterami. Jako model badawczy wybrano ludzkie komórki raka jelita grubego wrażliwe i odporne na działanie dokсорubicynę. Ten typ gruczolaka jelita grubego charakteryzuje się zarówno dużą opornością immunologiczną jak i opornością wielolekową [Kulbacka i wsp. 2008]. Dlatego zastosowanie metody elektroporacji do wspomaganego dostarczania leku może wpływać na zmniejszenie efektywności usuwania leków z wnętrza komórki poprzez ominięcie transporterów lekowych, a ostatecznie na zmniejszenie dostarczanej, skutecznej dawki. W ramach publikacji 4.5 postanowiłam zweryfikować, czy rzeczywiście dokсорubicynę można efektywnie dostarczyć do wnętrza komórek gruczolaka jelita grubego (LoVo) i raka żołądka (EPG85-257/P), z uwzględnieniem oporności lekowej (LoVoDX i EPG85-257/RDB). Przeprowadziłam ocenę przeżywalności i ultrastruktury komórek poddanych elektrochemioterapii (ECT), ekspozycji na impulsowe pole elektryczne i samą dokсорubicynę.

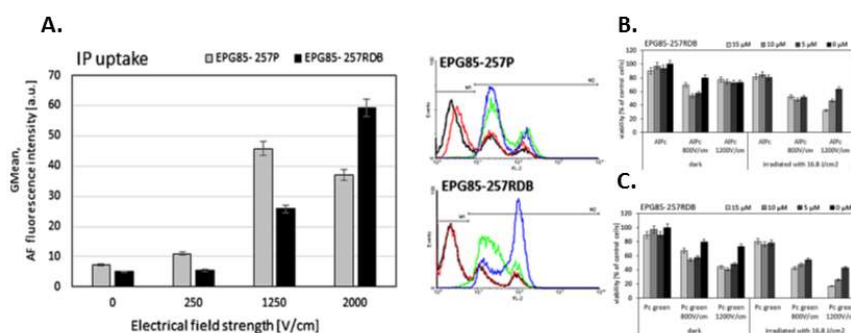
Oceeniłam również immunofluorescencyjnie obecność białka P-gp, którego ilość zmniejszała się po terapii kombinowanej – ECT, w szczególności w komórkach LoVoDX (**Ryc. 5**).



Ryc.5. Efektywność ECT w komórkach opornych lekowo: **A)** immunofluorescencyjna ocena białka P-gp w komórkach z opornością lekową poddanych elektrochemioterapii *in vitro*; **B)** ilościowa ocena komórek martwiczych po elektrochemioterapii w warunkach *in vitro* [publikacja 4.5]

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że elektrochemioterapia działa znacznie efektywniej niż sam cytostatyk i może stanowić doskonałe narzędzie w przypadku leczenia nowotworów z nabytą opornością na przeprowadzone wcześniej leczenie.

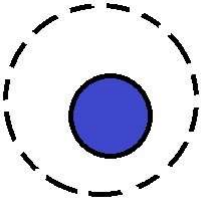
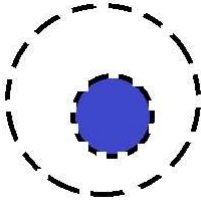
Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy w komórkach wykazujących oporność lekową elektroporacja okaże się równie efektywna w połączeniu z ftalocyjaninami z zakresu podczerwieni AlPc i Pc-green [publikacja 4.6]. Ocena stopnia permeabilizacji błon komórkowych wywołana elektroporacją i oceniana jodkiem propidyny metodą cytofluorymetryczną wskazuje, że efektywność dostarczania leku wzrasta proporcjonalnie do wartości natężenia pola elektrycznego (**Ryc. 6A**). Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały zwiększony efekt fotocytotoksyczny ftalocyjanin wprowadzanych metodą EP w obu liniach komórkowych raka żołądka, ale znacznie silniejszy w komórkach opornych lekowo – EPG85–257/RD (**Ryc. 6 B i C**).



Ryc.6. Efektywność ECT w komórkach raka żołądka: **A)** ocena stopnia permeabilizacji błon komórkowych jodkiem propidyny. **B)** efekt fotocytotoksyczny ftalocyjaniny AlPc wspomagany elektroporacją; **C)** efekt fotocytotoksyczny ftalocyjaniny Pc-green wspomagany elektroporacją [publikacja 4.6].

W przedstawionych do tej pory badaniach proponowałam włączenie do terapii przeciwnowotworowych mikrosekundowych impulsów elektrycznych o maksymalnym natężeniu pola elektrycznego do 2000 V/cm. Następnym etapem badań była ocena metody wykorzystującej impulsy trwające 10 ns oraz znacznie wyższe wartości natężenia pola elektrycznego od 5 do 100 kV/cm. W publikacji 4.7 zastosowałam elektroporację nanosekundową w reakcji fotodynamicznej w celu zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej fotouczulacza, poprzez jego lepsze rozmieszczenie w komórkach. Metoda nsEP wykorzystująca impulsy nanosekundowe powoduje rozszczelnianie błon komórkowych znajdujących się wewnątrz komórki, czyli m.in. błon mitochondrialnych i jądrowych. W **Tab. 1** przedstawiono proste porównanie obu metod.

Tabela 1. Porównanie metody mikro- i nanosekundowej elektroporacji.

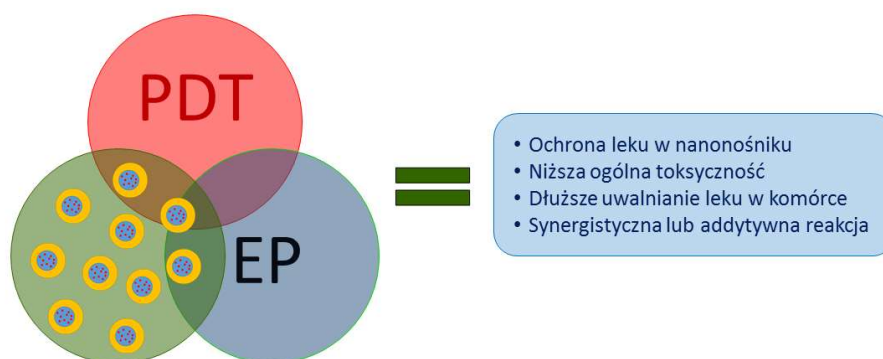
$\mu\text{s EP}$	ns EP
permeabilizacja zewnętrznej błony komórkowej	zwiększony stopień permeabilizacji wewnętrznych błon komórkowych
wartości natężenia pola elektrycznego < kilku kV/cm	wartości natężenia pola elektrycznego nawet do 300 kV/cm
	

W swoich badaniach opublikowanych w publikacji 4.7 założyłam, że poprzez oddziaływanie na wnętrze komórki uda się dotrzeć z lekiem do wewnętrznych struktur komórkowych. Przeprowadziłam badania własne na różnych typach komórek. Zbadałam linie pochodzące z raka żołądka: wrażliwe i odporne lekowo, ludzkiego czerniaka, raka skóry oraz linie prawidłowe. Moje wcześniejsze badania wykazały, że metoda nsEP w obecności ranelinianu strontu, efektywnie zwiększa cytotoksyczność leku stosowanego w leczeniu osteoporozy wobec komórek nowotworowych. Lek ten ma podwójne działanie – pobudza kościotworzenie oraz hamuje niszczenie kości, a w połączeniu z metodą nsEP, powoduje większą destrukcję komórek nowotworowych [Kulbacka i wsp. 2015]. Opierając się na tych rezultatach i znając już działanie elektroporacji nanosekundowej, w publikacji 4.7 zastosowałam tę metodę w celu zwiększenia efektywności reakcji fotodynamicznej

z zastosowaniem klinicznie stosowanego Photofrinu. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na wysoką selektywność nsEP w przypadku ludzkich komórek raka żołądka i komórek czerniaka pochodzących z przerzutu do węzłów chłonnych. Niewrażliwe na metodę okazały się komórki raka skóry oraz komórki prawidłowe. Komórki raka skóry (A431) zareagowały spowolnieniem proliferacji po zastosowanej procedurze dopiero po 12 dniach po terapii, na co wskazują wyniki testu klonogenego.

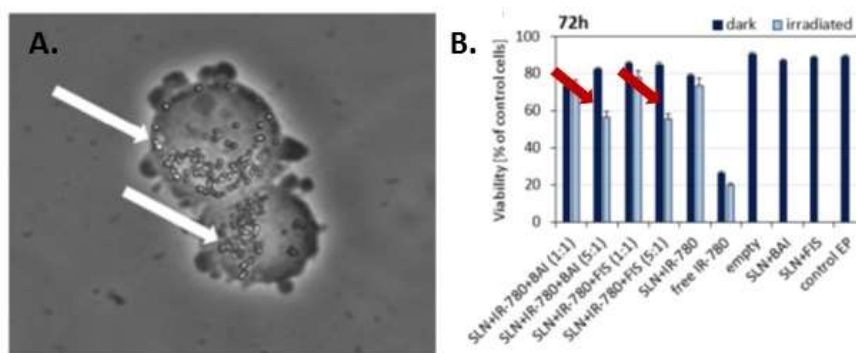
Następnym krokiem było wykorzystanie elektroporacji milisekundowej w celu dostarczenia do komórek stałych nanocząsteczek lipidowych (SLN, ang. *Solid Lipid Nanoparticles*) charakteryzujących się zróżnicowanym rozmiarem (ca. 200 nm [publikacja 4.8], a także około dwukrotnie większych [publikacja 4.9]) oraz anionowym ładunkiem powierzchniowym – wyrażanym przez potencjał zeta. Rozmiar i morfologię obu grup nośników SLN określono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *Dynamic Light Scattering*) oraz obrazowania za pomocą mikroskopii sił atomowej (AFM, ang. *Atomic Force Microscopy*). Obie grupy nośników SLN stanowiły populacje prawie monodispersyjne (współczynnik polidispersyjności PDI < 0,3) i o długoterminowej stabilności koloidalnej (min. 3 miesiące).

Zastosowanie nanonośników w medycynie jest coraz bardziej powszechne. Nanostruktury stosuje się, nie tylko w celu dostarczania cytostatyków, ale również materiału genetycznego oraz naturalnych substancji w kosmetologii. Idealny nanonośnik powinien spełniać konkretne wymagania, m.in. powinien charakteryzować się wysoką stabilnością chemiczną i koloidalną, dużą wydajnością enkapsulacji, dobrą biodystrybucją i biokompatybilnością, kontrolowanym uwalnianiem leku po podaniu do organizmu oraz dobrym wychwytem przez docelowe komórki [Gu i wsp. 2011]. Ponadto dobry nanonośnik powinien mieć określony i jednorodny rozmiar: 100–200 nm oraz odpowiedni ładunek. Badania innych autorów pokazują, że dodatnio naładowane cząstki są lepiej wchłaniane przez większość komórek [Morachis i wsp. 2012]. Na podstawie wcześniejszych badań z porfiryrami naładowanymi ujemnie [publikacja 4.4], postawiłam hipotezę, że elektroporacja może również wspomagać transport anionowych nanocząstek o średnicy ok. 200nm (**Ryc. 8A**) [publikacja 4.8]. W publikacji 4.8 połączyłam trzy różne techniki (**Ryc. 7**): enkapsulację aktywnego związku, reakcję fotodynamiczną z cyjaniną IR-780 oraz elektroporację. Dodatkowo, aby wspomóc efekt przeciwnowotworowy cyjaniny do aktywnego cargo dodałam dwa flawonoidy: baikaleinę i fisetynę. Zastosowałam również nanonośniki o zróżnicowanym składzie lipidowym ze zmiennym stosunkiem PH90G (Fosfolipon 90H – lecytyna, pozyskiwana z soi) do T80 (Tween 80 – surfaktant niejonowy).



Ryc. 7. Połączenie trzech metod w celu podniesienia efektu przeciwnowotworowego.

Otrzymane wyniki badań przeprowadzonych na komórkach gruczolakoraka jelita grubego (LoVo) oraz komórkach prawidłowych (CHO-K1), wskazują, że połączenie metody PDT, elektroporacji oraz nanonośników daje synergistyczne lub addytywne efekty. Ponadto, stosując flawonoidy uzyskałam wzmocniony efekt przeciwnowotworowy w komórkach LoVo (Ryc.8B). Zaobserwowałam, że połączenie trzech metod indukowało największe zaburzenia w strukturze cytoszkieletu i największe obniżenie zdolności proliferacyjnych komórek nowotworowych.



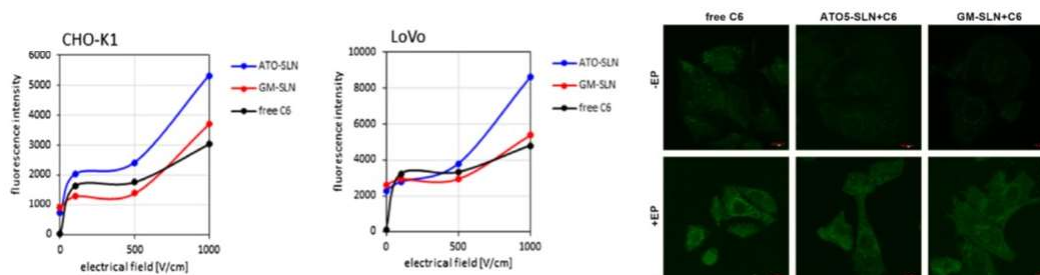
Ryc. 8. Terapia kombinowana w komórkach LoVo: A) dostarczanie nanonośników do wnętrza komórek; B) reakcja fotocytotoksyczna po 72h po naświetlaniu.

Wykryłam zwiększoną ilość białka p53, które odgrywa ważną rolę podczas aktywacji programowanej śmierci komórki – apoptozy. Zauważyłam również stymulację intensywności reakcji immunocytochemicznej mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD). Jednak doniesienia literaturowe pokazują, że zwiększona aktywność MnSOD może prowadzić zarówno do uaktywnienia jak i hamowania apoptozy [Plymate SR i wsp. 2003] – proces ten nie jest do końca wyjaśniony. Natomiast zaletą „potrójnej” metody przeciwnowotworowej jest krótki czas jej wykonania. Najważniejszym elementem stosowanej metody, jest fakt, że tak znaczne zmiany w komórkach nowotworowych uzyskano po ekspozycji komórek tylko na

1 impuls, w dodatku przy niskiej wartości natężenia pola elektrycznego (500 V/cm), a sam protokół terapeutyczny trwał 10 min. Otrzymane wyniki wydają się być obiecujące wobec tradycyjnych metod przeciwnowotworowych, gdzie ludzki organizm często jest ekspozycyjnie na długotrwałą chemioterapię i hospitalizację.

Największy problem stanowią nanocząstki anionowe o dość dużych rozmiarach (powyżej 500 nm). Jednak zaletą dużych nanonośników jest możliwość „upakowania” w nich możliwe dużej ilości aktywnego cargo. W publikacji 4.9 podjęłam badania anionowych nanonośników lipidowych (SLN), o zwiększonym rozmiarze. Stałe nanocząstki lipidowe GM-SLN o rozmiarze 379,4 nm przygotowano na bazie monostearynianu glicerolu. Stałe nanocząstki lipidowe ATO5-SLN, o rozmiarze 547 nm przygotowano na bazie palmitylostearynianu glicerolu.

W celu zweryfikowania możliwości dostarczenia nanonośników do wnętrza komórek zastosowałam standardowy znacznik fluorescencyjny – kumarynę 6 (C6). Mając na uwadze stosunkowo duży rozmiar nanonośników, zastosowałam 5 impulsów oraz niskie wartości natężenia pola elektrycznego (100 i 500V/cm). Zarówno badania przeprowadzone metodą cytometrii przepływowej, jak i obserwacje w mikroskopie konfokalnym wskazują jednoznacznie, że badane nośniki są transportowane do komórek przy pomocy elektroporacji (Ryc.9).



Ryc. 8. Wpływ elektroporacji na transport nanonośników ATO-SLN i GM-SLN, badania metodą FACS i CLSM.

Co istotne, otrzymane rezultaty pokazują, że sama elektroporacja nie powodowała cytotoksyczności komórek. Również białka cytoszkieletu komórkowego (aktyna i tubulina) pozostały nieuszkodzone, podobnie morfologia badanych komórek nie wykazała zmian. Zatem można stwierdzić, że anionowe nanocząstki o zwiększonych rozmiarach można wprowadzać do docelowych komórek nowotworowych. Przeprowadzone przeze mnie badania umożliwiły również zaobserwowanie wpływu elektroporacji na duże nanonośniki. Stosując odpowiedni

protokół można uzyskać nie tylko efektywny transport do wnętrza komórki, ale również fuzję nośnika z błoną komórkową (**Tab.2**).

Tabela 2. Podsumowanie efektów oddziaływania elektroporacji na stałe nośniki lipidowe (SLN).

SLN dodane po EP	SLN dodane przed EP	SLN bez EP
wspomagany transport SLN do komórek	fuzja SLN i komórek	brak transportu SLN
rozszczelnienie tylko błon komórkowych	efekt elektroforetyczny anionowych nośników SLN	
	rozszczelnienie błon SLN i komórkowych oraz przedwczesne uwolnienie cargo	

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych w cyklu prac habilitacyjnych

W ramach cyklu prac habilitacyjnych [4.1 – 4.9] przedstawiłam kompleksowe wyniki badań dotyczące wpływu metody elektroporacji na efektywność dostarczania związków przeciwnowotworowych do wnętrza komórek. Opublikowane prace pozwalają na wyciągnięcie jasno sformułowanych wniosków:

- Elektroporacja efektywnie wspomaga transport fotouczulaczy i cytostatyków do komórek podnosząc ich aktywność przy jednoczesnej redukcji dawki.
- Metoda elektroporacji przyspiesza akumulację fotouczulaczy i cytostatyków w komórkach – nawet do 10 minut.
- Zarówno elektroporacja z zastosowaniem impulsów mikrosekundowych, jak i nanosekundowych zwiększa efektywność transportu fotouczulacza i reakcji fotodynamicznej.
- Elektroporacja wspomaga działanie leków przeciwnowotworowych w komórkach z opornością na chemioterapię.
- Elektroporacja milisekundowa umożliwia transport dużych (do 500 nm) i negatywnie naładowanych nanonośników lipidowych do wnętrza komórek.

Podsumowując, w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe wykazano, że elektroporacja znacznie wspomaga transport substancji przeciwnowotworowych oraz nanonośników do wnętrza komórek, w krótkim czasie, uzyskując tę samą lub większą aktywność leku przy jego mniejszym stężeniu. Powyższe wnioski mają znaczenie poznawcze, ponieważ pozwalają na zrozumienie wpływu zewnętrznego pola impulsowego na komórki prawidłowe i nowotworowe

oraz transport leku do ich wnętrza. Przeprowadzone badania mogą mieć również znaczenie aplikacyjne dla rozwoju elektroporacji oraz jej połączenia z terapią fotodynamiczną, chemioterapią, nanotechnologiami oraz innymi metodami wymagającymi efektywnego podawania leku.

Literatura

Barnett A and Weaver JC. Electroporation: A unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture. *Bioelectrochem Bioenerg* 1991, 25:163182.

Beebe SJ, Fox P, Rec LJ, Somers K, Stark RH, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: Apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2002, 30(1):286–292.

Beebe SJ, Schoenbach KH. Nanosecond Pulsed Electric Fields: A New Stimulus to Activate Intracellular Signaling. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2005, (4):297-300.

Casciola M, Kasimova MA, Rems L, Zullino S, Apollonio F, Tarek M. Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance. *Bioelectrochemistry*. 2016, 109:108-116.

Dai J, Wu S, Kong Y, Chi Z, Si L, Sheng X, Cui C, Fang J, Zhang J, Guo J. Nanosecond Pulsed Electric Fields Enhance the Anti-tumour Effects of the mTOR Inhibitor Everolimus against Melanoma. *Sci Rep*. 2017, 7:39597.

Domenge C, Orłowski S, Luboński B, De Baere T, Schwaab G, Belehradek J Jr, Mir LM. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. *Cancer*. 1996, 77(5):956-963.

Garon EB, Sawcer D, Vernier PT, Tang T, Sun Y, Marcu L, Gundersen MA, Koeffler HP. In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies. *Int J Cancer*. 2007, 121, 675–682.

Gu Z, Biswas A, Zhao M, Tang Y. Tailoring nanocarriers for intracellular, protein delivery. *Chem Soc Rev*. 2011, 40(7):3638-3655.

Hu T, Li Z, Gao C-Y, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*. 2016,22(30):6876-6889.

Kotnik T, Frey W, Sack M, Meglič SH, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology, *Trends Biotechnol.* 2015 33(8):480-8.

Kulbacka J, Jolanta Saczko, Agnieszka Chwiłkowska.: Rak jelita grubego - charakterystyka i oporność na leczenie, *Onkol. Prakt. Klin.* 2008 T.4 nr 4; s.135-140

Kulbacka, J., Saczko, J., Choromańska, A., Rembiałkowska, N., Dubińska-Magiera, M., Surowiak, P., Kotulska, M. Transmembrane transport and anticancer activity of strontium ranelate delivered with nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) into human cells in vitro. in: Igor Lacković, Darko Vasi (Eds.) 6th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering MBEC 2014. Springer International Publishing, 2015:581–585 ((IFMBE Proceedings; 45), ISBN 978-3-319-11127–8).

Mir LM, Orlowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer.* 1991;27(1):68-72.

Morachis JM, Mahmoud EA, Almutairi A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. Insel PA, ed. *Pharmacological Reviews.* 2012;64(3):505-519.

Neumann E and Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membrane Biol.* 1972, 10:279-290.

Neumann E. Digression on chemical electromagnetic field effects in membrane signal transduction—cooperativity paradigm of the acetylcholine receptor, *Bioelectrochem.* 2000, 52, 43–49.

Neumann E. Potential difference across vesicular membranes, *J. Membrane Biol.* 14:194-196 (1973)

Nuccitelli R, Tran K, Sheikh S, Athos B, Kreis M, Nuccitelli P. Optimized Nanosecond Pulsed Electric Field Therapy Can Cause Murine Malignant Melanomas to Self-Destruct with a Single Treatment. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2010,127(7):1727-1736.

Plymate SR, Haugk KH, Sprenger CC, Nelson PS, Tennant MK, Zhang Y, Oberley LW, Zhong W, Drivdahl R, Oberley TD. Increased manganese superoxide dismutase (SOD-2) is part of the mechanism for prostate tumor suppression by Mac25/insulinlike growth factor binding-protein-related protein-1. *Oncogene* 2003, 22: 1024-1034.

Skołucka N, Saczko J, Kotulska M, Kulbacka J, Choromańska A. Electroporation and its application. *Pol Merkur Lekarski*. 2010, 28(168):501-504.

Wan MT, Lin JY. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosm Invest Dermatol*. 2014, 7:145-163.

Weaver JC. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem*. 1993, 51(4):426-435

Zhen Gu, Anuradha Biswas, Muxun Zhaoab and Yi Tang, Tailoring nanocarriers for intracellular protein delivery, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 3638-3655.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Przed uzyskaniem stopnia doktora moje badania dotyczyły podstawowych mechanizmów reakcji fotodynamicznej, a w szczególności, jak zmiany polarności środowiska mogą wpływać na właściwości fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej (Photofrin i hyperycyna) (publikacja nr 2a, Załącznik 3a). Uczestniczyłam w badaniach dotyczących oceny peroksydacji lipidów w ludzkich komórkach raka niedrobnokomórkowego płuca (publikacja nr 4a, Załącznik 3a), oraz rodzaju śmierci w komórkach poddanych reakcji fotodynamicznej (publikacje nr 1a, 3a, 7a, 8a, Załącznik 3a). W czasie trwania studiów doktoranckich odbyłam 4-miesięczny staż w ramach programu ERASMUS na Wydziale Biologii w Katedrze CRIBI i Nauk Biologicznych, w Laboratorium Miologii Stosowanej Uniwersytetu w Padwie (Włochy). Opiekunami stażu byli profesor Fulvio Ursini oraz profesor Ugo Carraro. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły wpływu elektrostymulacji impulsowej na odnerwione ludzkie i szczurze mięśnie. Prowadzone w Laboratorium Miologii Stosowanej badania mają ogromne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej, w szczególności u osób po ciężkich wypadkach, gdzie odzyskanie dawnej sprawności wymaga czasu i skomplikowanej rehabilitacji. Uzyskane w trakcie stażu wyniki wskazywały, że elektrostymulacja powoduje regenerację tkanek mięśniowych, o czym świadczyła zwiększona ilość trzech izoform ciężkich łańcuchów miozyny (MHC) (publikacja nr 5a, Załącznik 3a).

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam działalność naukową w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej w zespole dr hab. Jolanty Saczko. Moja tematyka badawcza związana była głównie z badaniami nad efektywnością reakcji fotodynamicznej w warunkach *in vitro*, w szczególności nad oceną mechanizmów stresu oksydacyjnego i apoptozy przy zastosowaniu nowych fotouczulaczy z grupy cyjanin w odniesieniu do klinicznie stosowanych (Photofrin, HpD). Terapia fotodynamiczna (PDT, *ang. PhotoDynamic Therapy*) jest metodą stosowaną klinicznie na całym świecie, lecz ciągle poszukuje się fotouczulaczy o lepszych charakterystykach fizykochemicznych i większej wydajności w reakcji fotodynamicznej. Przeprowadzone w zespole dr hab. J. Saczko badania potwierdzają efektywność klinicznie stosowanego Photofrin'u i haematoporfiryny (HpD) w komórkach nowotworowych, a także tych opornych na chemioterapię. Otrzymane wyniki wskazują również na obiecujące zastosowanie cyjanin (1610 15A, RR340, UMK25A 15) jako fotouczulaczy w terapii

gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwego i opornego na dokсорubicynę (Załącznik **3a**, publikacje: **2b, 3b, 4b, 12b, 17b, 61b, 63b, 66b**).

W 2007 r. rozpoczęłam współpracę z dr hab. Małgorzatą Kotulską z Katedry Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej. Od tego czasu prowadzimy badania dotyczące zastosowania elektroporacji (EP) jako małoinwazyjnej metody dostarczania leków do wnętrza komórek. Metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, ang. *Transmission Electron Microscopy*) sprawdziliśmy jak EP wpływa na morfologię komórek prawidłowych i nowotworowych. Zauważyliśmy zwiększoną wrażliwość bezpośrednio po elektroporacji w przypadku ludzkich fibroblastów z hodowli pierwotnej, natomiast w obu przypadkach efekt był odwracalny (Załącznik **3a**, publikacja **16b**). W dalszym etapie sprawdziliśmy jak zastosowanie impulsowego pola elektrycznego oddziałuje na kardiomiocyty (H9C2). Zjawisko to jest wykorzystywane przy defibrylacji mięśnia sercowego. Badania przeżywalności komórkowej miocytów wykazały cytotoksyczność parametrów EP powyżej 375 V/cm (Załącznik **3a**, publikacja **24b**). Zatem, jeżeli stosowane przy defibrylacji potencjały transbłonowe wywołają duży wstrząs, to może to powodować zniszczenie tkanek, zaburzać rytm serca lub nawet indukować zatrzymanie akcji serca. Ponadto, ocena morfologii komórek, cytotoksyczności i ilości komórek apoptotycznych wykazała, że elektroporacja indukuje zmiany w błonach komórkowych oraz powstanie niewielkiej liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych (załącznik **3a**, publikacja **24b**).

Jednym z moich kierunków badawczych jest również ocena potencjału reakcji fotodynamicznej wobec ludzkich komórek czerniaka. Otrzymane wyniki wskazują na większy potencjał fotocytotoksyczny z udziałem Photofrin'u w pierwotnych komórkach czerniaka (MeWo) niż tych pochodzących z przerzutu do węzłów chłonnych (Me45) (załącznik **3a**, publikacja **22b, 28b i 4c**). W dalszym etapie prac zespołu sprawdziliśmy czy elektroporacja może wspomagać reakcję fotodynamiczną z zastosowaniem Photofrin'u w komórkach ludzkiego czerniaka. Czerniaki wykazują znaczną heterogeniczność i oporność na fototerapię, dlatego zastosowanie metod intensyfikujących PDT wydaje się zasadne. Nasze badania uwzględniają komórki zawierające melaninę (MeWo), komórki amelanocytarne (C32) oraz prawidłowe keratynocyty. Wyniki przeprowadzonej dystrybucji fotouczulacza, testu klonogenego i kometowego, oceny białek apoptotycznych oraz poziomu melaniny wskazują, że terapia fotodynamiczna w połączeniu z elektroporacją skutecznie indukuje w obu typach komórek czerniaka śmierć na drodze apoptozy (załącznik **3a**, publikacja **46b**).

Przeprowadziliśmy także badania mające na celu podniesienie efektywności reakcji fotodynamicznej wobec jasnokomórkowego raka jajnika (OvBH-1) oraz komórek ludzkiego gruczolaka gruczołu sutkowego (MCF-7). Rak jajnika jest jednym z najbardziej śmiertelnych nowotworów u kobiet. Skuteczność jego leczenia zależy w dużej mierze od efektywności stosowanych leków, dlatego stosuje się leczenie łączone. W badaniach zespołu uwzględniliśmy połączenie Photofrin'u z 2-metoksyestradiolem (2-Me). Potencjał przeciwnowotworowy 2-Me nie jest zależny od receptorów estrogenowych, ponieważ ich powinowactwo do 2-Me jest bardzo słabe. 2-Me uszkodza cytoszkielet komórkowy, oraz jest inhibitorem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). W naszych badaniach oceniliśmy immunocytochemicznie obecność białka HSP70 i iNOS. Metodą immunoblottingu oceniono zawartość białka HSP27 i HSP70, a metodą immunofluorescencyjną białek cytoszkieletu. Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowaną odpowiedź komórek OvBH-1 i komórek MCF-7. Zaobserwowano wyższą ekspresję białka HSP70 w komórkach MCF-7, natomiast w obu przypadkach widoczna była reorganizacja białek cytoszkieletu i zmiany w morfologii jądra komórkowego. Można stwierdzić, że 2-Me wspomaga aktywność terapii fotodynamicznej w obu typach komórek, jednak mechanizm działania jest odmienny (załącznik 3a, publikacja 42b). Badania te są kontynuowane na liniach komórkowych jajnika SKOV-3 (opornych na cisplatynę) i komórkach gruczolaka gruczołu sutkowego MDA MB-231 z zastosowaniem cyjaniny IR-775 jako fotouczulacza, w połączeniu z 2-Me. Rezultaty wskazują, że cyjanina IR-775 ma wysoki potencjał fotodynamiczny w badanych liniach komórkowych, w szczególności w komórkach MDA MB-231. Podobnie jak w poprzednich badaniach wykazano silniejszy efekt fotodynamiczny po zastosowaniu 2-Me (załącznik 3a, streszczenie 84; pozostałe wyniki w przygotowaniu do publikacji).

Badania spoza głównego nurtu badawczego

Markery stresu oksydacyjnego w badaniach podstawowych

Współpraca interdyscyplinarna z innymi instytucjami zaowocowała rozszerzeniem mojej tematyki naukowej. Obejmuje ona również badania nad mechanizmami stresu oksydacyjnego i śmierci komórkowej. Uczestniczyłam w badaniach prof. Piotra Dzięgiela i prof. Marzenny Podhorskiej-Okolów z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, oceniając peroksydację lipidów, aktywność SOD i CT (dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy) w tkankach pochodzących od szczurów, które wcześniej poddawano 8-tygodniowym ćwiczeniom fizycznym (załącznik 3a, publikacja 1b).

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących wewnątrzkomórkowej dystrybucji beta-enolazy – enzymu ze szlaku glikolitycznego, w prawidłowych (H9C2) i patologicznych (RD) komórkach mięśniowych (załącznik **3a**, publikacja **6b**). Wykazaliśmy, że enzym ten obok funkcji glikolitycznych pełni również funkcję receptorową. Dalsze badania miały na celu sprawdzenie dystrybucji enolazy w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7). Otrzymane wyniki dowodzą, że enolaza jest obecna na powierzchni komórek MCF-7 oraz we frakcjach okołojądrowych. Ponadto zbadano, że białko obecne na powierzchni komórek utrzymywało aktywność katalityczną, co sugeruje, że jego lokalizacja w błonie nie zmienia centrum aktywnego enzymu (załącznik **3a**, publikacja **9b**).

W ramach działania statutowego Katedry i Zakładu Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, podjęłam badania dotyczące oceny połączonego działania markainy (środek znieczulenia miejscowego z grupy amidów) z lekoptinem (inhibitor kanałów wapniowych) na szczurze komórki mięśnia sercowego H9C2. Z przeprowadzonych badań wynika, że markaina indukowała stres oksydacyjny w szczurzych kardiomiocytach. Badania wykazały wzrost peroksydacji lipidów, podwyższenie ekspresji iNOS (indukowalnej syntazy tlenu azotu), wzrost liczby komórek apoptotycznych oraz jądrową lokalizację GSTpi (peroksydazy glutationowej). Zastosowanie lekoptinu powodowało niwelowanie tych efektów, co świadczy o jego protekcyjnej roli. Wyniki przedstawiono w publikacji **7b** (załącznik **3a**) oraz w ramach doniesień konferencyjnych.

Badania z podmiotami klinicznymi

Biorę udział w badaniach w ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Serca Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Ocenialiśmy markery stresu oksydacyjnego i apoptozy we fragmentach tkanek pochodzących z przedsionka sercowego pacjentów poddawanych zabiegom chirurgicznym, rewaskularyzacji z użyciem kardioplegii krwistej (załącznik **3a**, publikacja **14b** i **25b**). Dalej kontynuujemy badania na hodowlach komórkowych, linii szczurzych i ludzkich kardiomiocytów. Część wyników była prezentowana na konferencjach i jest aktualnie przygotowywana do publikacji.

W ramach współpracy z prof. Marzeną Dominiak z Wydziału Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, uczestniczyłam w badaniach związanych z wyprowadzaniem hodowli pierwotnych fibroblastów z tkanek dziąsła pochodzących od pacjentów. Otrzymywane hodowle stosowane były do augmentacji dziąsła (załącznik **3a**, publikacja **5b**). Posłużyły również do przeprowadzenia szeregu badań związanych z oceną

preparatów do retrakcji skóry. Obecnie stosowane preparaty wykazują wysoką toksyczność wobec zdrowych tkanek skóry brzożnej, zatem pojawia się konieczność opracowania nowego, bezpiecznego preparatu o właściwościach retrakcyjnych. Prowadzone badania we współpracy z dr hab. Danutą Nowakowską z Zakładu Materiałoznawstwa, Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu były podstawą zgłoszenia patentowego P 397 505, publikacji naukowych (załącznik **3a**, publikacja **13b**, **23b**, **33b**, **37b**, **52b** i **53b**) oraz kilku doniesień konferencyjnych.

Naturalne i syntetyczne substancje przeciwnowotworowe

Uczestniczę w badaniach prowadzonych we współpracy z prof. Marcinem Drajem z Politechniki Wrocławskiej oraz dr Małgorzatą Draj-Zalesińską z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania związane są z oceną przeciwnowotworowych właściwości nowych estrów betuliny i kwasu betulinowego modyfikowanych aminokwasami. Otrzymane przez nas wyniki dowodzą, że otrzymane związki mają nie tylko lepsze właściwości chemiczne jak np. rozpuszczalność w wodzie i stabilność, ale również wykazują się dużą selektywnością wobec badanych komórek. Największą aktywność obserwowano w przypadku pochodnych Betulina-Lys-NH₂, Betulina-Dab-NH₂, Betulina-Orn-NH₂. Ich aktywność cytotoksyczna i proapoptotyczna ujawniła się tylko wobec komórek nowotworowych raka żołądka i trzustki, wrażliwych i opornych lekowo (załącznik **3a**, publikacja **8b**). Dalsze badania wykazały dużą aktywność przeciwnowotworową wobec komórek raka kolczystokomórkowego A431 w porównaniu z prawidłowymi keratynocytami HaCaT (załącznik **3a**, publikacja **43b**). Wykazaliśmy znaczny wzrost liczby jąder apoptotycznych metodą TUNEL i testem kometowym oraz aktywację kaspazy 3 i białka PARP-1 w komórkach nowotworowych. Nowe związki nie wpływały jednak znacząco na indukcję uszkodzeń DNA w komórkach prawidłowych linii HaCaT, które okazały się niewrażliwe. W dalszym etapie badań badaliśmy również aktywność nowych pochodnych betulinowych wobec komórek czerniaka (Me45). Otrzymane wyniki badań wskazują na wysoką aktywność proapoptotyczną nowych estrów betuliny oraz znaczące zahamowanie zdolności proliferacyjnej komórek czerniaka, w odniesieniu do standardowo dostępnej betuliny i kwasu betulinowego (załącznik **3a**, publikacja **56b**). Badane przez nas związki o działaniu antynowotworowym i wykazujące działanie proapoptotyczne na komórki ludzkiego raka kolczystokomórkowego mogą mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu stanów przednowotworowych skóry o charakterze rogowacenia słonecznego. Ponadto atutem tych pochodnych betuliny jest ich bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie. Kontynuacja badań wykazała także regeneracyjne właściwości

obserwowane w ludzkich fibroblastach pochodzących z hodowli pierwotnej co zostało ujęte w autorskim zgłoszeniu patentowym (**P 413 038**).

Oceniałam efektywność nowych mimetycznych inhibitorów ludzkiej neutrofilowej elastazy wobec komórek ludzkiego raka niedrobnokomórkowego płuca (A549). Otrzymane wyniki wskazują, na wysoką selektywność badanych inhibitorów wobec proteaz serynowych oraz ich hamujący wpływ na proliferację badanych komórek (załącznik **3a**, publikacja **18b**). Prowadziłam także badania dotyczące ewaluacji modulatorów oporności wielolekowej w ludzkich komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwych (MCF-7/WT) i opornych na działanie doksorubicyny (MCF-7/DX). W badaniach oceniany był potencjał promazyny i trifluopromazyny w hamowaniu oporności lekowej. Ocena cytotoksyczności związków w połączeniu z modulatorami oraz immunocytochemiczna ocena białka P-gp potwierdziły działanie hamujące mechanizm oporności lekowej (załącznik **3a**, publikacja **20b**). Uczestniczyłam w badaniach mających na celu ocenę cytotoksyczności związków o charakterze przeciwnowotworowym (kompleksów jodku miedzi, pochodnych cisplatyny) wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych (załącznik **3a**, publikacja **21b**). Otrzymane rezultaty pokazują, że wszystkie badane kompleksy posiadają silną aktywność przeciwnowotworową wobec komórek raka jajnika (MDAH-2774) oraz komórek raka jajnika opornych na cisplatynę (SKOV-3).

W naszym zespole w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego prowadzimy badania dotyczące oceny naturalnych substancji o aktywności przeciwnowotworowej. Ocenialiśmy m.in. cytotoksyczność ekstraktów z *Thymus serpyllum* (ExTs), *Thymus vulgaris* (ExTv), *Majorana hortensis* (ExMh) i *Mentha piperita* (ExMp), oraz związków fenolowych kwasu kofeinowego (CA), kwasu rozmarynowego (RA), kwasu litospermowego (LA), luteoliny-7-O-glukuronidu (LGR), luteoliny-7-O-rutynozydu (Lr), eriodiltiolu-7-O-rutynozydu (ER) i arbutyny (AB) wobec komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7/Adr i MCF-7/WT. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że badane związki fenolowe wykazywały najlepsze właściwości przeciwnowotworowe wówczas gdy były stosowane w postaci ekstraktów zawierających ich mieszaniny (załącznik **3a**, publikacja **30b**). Dalsze badania prowadziliśmy nad działaniem długo- i krótko-cząsteczkowego beta-glukanu z owsa wobec komórek raka skóry i czerniaka w porównaniu z prawidłowymi keratynocytami i linią makrofagową (załącznik **3a**, publikacja **43b**, **57b**, **69b**). Immunocytochemiczna ocena kaspazy-12 wykazała silną barwną reakcję w komórkach nowotworowych po zastosowaniu obu typów beta-glukanu. Natomiast ocena potencjału

cytotoksycznego wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe beta-glukanu o niskiej masie cząsteczkowej. Prowadzone są dalsze badania w tym zakresie.

Nanonośniki w strategiach przeciwnowotworowych i bioobrazowaniu

W czasie realizacji projektu „*Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne*” BioMed w ramach EITplus zapoznałam się z technologiami projektowania i wytwarzania nanonośników ukierunkowanych na terapie celowane. W tym samym czasie rozpoczęłam współpracę z prof. Kazimierą A. Wilk i jej zespołem z Zakładu Technologii Organicznej i Farmaceutycznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej. Profesor K. A. Wilk jest ekspertem w dziedzinie chemii koloidów i nanomateriałów (synteza, charakterystyka fizykochemiczna, stabilność fizyczna i koloidalna). Wspólna realizacja projektu finansowanego z funduszy unijnych umożliwiła opracowanie i optymalizację nanosystemów do transportu leków na poziomie nanoskopowym, otrzymywanych w procesie polimeryzacji lub precypitacji międzyfazowej. Nanoenkapsułowanie fotouczulaczy z grupy cyjanin umożliwiło znaczne podniesienie efektywności reakcji fotodynamicznej w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego. Badane nanonośniki charakteryzują się wysoką stabilnością oraz znakomitą biokompatybilnością (załącznik **3a**, publikacja **11b**). Opracowaliśmy także doskonały nanoukład w oparciu o micelle polimerowe, zawierający kliniczny fotouczulacz – Photofrin (załącznik **3a**, publikacja **39b**) lub ftalocyjaninę cynkową (ZnPc) (załącznik **3a**, publikacja **49b** i **55b**). Opublikowane wyniki wskazują, że otrzymane przez nas nanokonstrukty są odpowiednie do docelowego transportu hydrofobowych farmaceutyków. W warunkach *in vitro* na komórkach nowotworowych (raka jajnika, gruczołu sutkowego i czerniaka) i prawidłowych oceniliśmy efektywność reakcji fotodynamicznej testami cytotoksyczności oraz pomiarem peroksydacji lipidów i uszkodzenia grup tiolowych białek. Ponadto nasze badania dowodzą, że leki dostarczane w opracowanych przez nas nanonośnikach indukują śmierć komórek na drodze apoptozy, o czym świadczy aktywacja kaspazy-3, kaspazy-7, PARP1, PARP6 oraz obserwowane liczne komórki apoptotyczne po barwieniu metodą TUNEL.

W dalszych badaniach zastosowaliśmy kropki kwantowe CdSe/ZnS typu „rdzeń – powłoka”, które enkapsułowano w nanonośnikach otrzymanych techniką emulsyjno-dyfuzyjną (ang. *emulsification/solvent-evaporation method*). Zastosowano układy z różnym rdzeniem olejowym (olej silikonowy, olej mineralny i kwas oleinowy) stabilizowano surfaktantem niejonowym tj. Cremophorem EL oraz polimerem trójblokowym - Poloxamerem 403. Nanonośniki te okazały się efektywne jako nośniki kropek kwantowych (QD) do

bioobrazowania w dwufotonowej metodzie fluorescencyjnej (współpraca z prof. K.A. Wilk i prof. M. Samociem – ekspertem z optyki nieliniowej Politechniki Wrocławskiej). Opracowane przez nas nanoukłady wykazywały dobre właściwości luminescencyjne zarówno dla fluorescencji jedno- jak i dwufotonowej. Badane kropki kwantowe CdSe/ZnS wykazały silną indukowaną dwufotonowo luminescencję po wzbudzeniu w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Zaobserwowano bardzo dobry poziom dystrybucji wewnątrzkomórkowej co wskazuje na dobry potencjał QD do obrazowania fluorescencyjnego jako markery w obrazowaniu wewnątrzkomórkowej lokalizacji struktur komórkowych (załącznik **3a**, publikacja **38b**). W kolejnej publikacji **48b** (załącznik **3a**) prezentujemy wyniki badań dotyczące opracowania nowego typu nanonośników tzw. układu teranostycznego, czyli łączącego w sobie zastosowanie w diagnostyce, terapii, a przy tych charakteryzującego się wysoką stabilnością. Jako teranostyczne cargo wykorzystaliśmy kolchicynę i kumarynę-6. Układy te stabilizowano kationowymi surfaktantami typu: „single head – double tail” („jedna głowa – dwa ogony”). Badane nanoukłady zostały opracowane metodą nanopericytacji międzyfazowej i adsorpcji następczej polielektrolitów (LbL). Szczegółowe pomiary i charakterystyka nośników potwierdziły wielkość nanocząstek poniżej 200 nm. Metodą AFM sprawdzono morfologię i kształt nanoukładów. Spektroskopia UV-Vis pozwoliła określić wydajność profilu uwalniania leku (ok. 90%). Badaniami cytotoxyczności zweryfikowaliśmy potencjał nośników z kolchicyną i kumaryną 6 jako znacznikiem fluorescencyjnym, co umożliwiło ocenę wewnątrzkomórkowej lokalizacji układów teranostycznych w komórkach MCF-7/WT, A549 i MeWo. W dalszych badaniach podjęliśmy próbę enkapsulowania upkonwertujących nanokryształów domieszkowanych pierwiastkami ziem rzadkich (NaYF₄:Tm³⁺, Yb³⁺). Nanokryształy zostały enkapsulowane w wielofunkcyjnych nanonośnikach typu „rdzeń – powłoka” (ang. *core shell*). Układy te wytworzono za pomocą selektywnej adsorpcji polielektrolitów (ang. *layer-by-layer*, LbL) na stałych matrycach z ciekłym rdzeniem olejowym stabilizowanych kationowymi surfaktantami dwufunkcyjnymi (ang. *dicephalic*). Otrzymane nanokapsuły polimerowe zawierające nanokryształy (NaYF₄:Tm³⁺, Yb³⁺) okazały się efektywne w obrazowaniu fluorescencyjnym w badaniach *in vitro*. Uzyskaliśmy ostatecznie bezpieczne biologicznie nanosystemy o wielkości 150nm, które pozwalają na efektywne obrazowanie w bliskiej podczerwieni w komórkach (Załącznik **3a**, publikacja **54b** i **3c**).

Prowadząc badania wykorzystujące techniki mikroskopowe w hodowlach komórkowych uzyskuję wiele danych, które umożliwiają prowadzenie analiz komputerowych uzyskanych mikrografii (Załącznik **3a**, publikacja **6c** i **9c**). W swoich badaniach podjęłam

zagadnienie analizy wybarwionych w komórkach struktur komórkowych m.in. jąder komórkowych. Taka analiza jest niezbędna w prawidłowej ocenie obrazów zarówno immunofluorescencyjnych ale również immunocytochemicznych. Określenie cech morfologicznych jądra prawidłowego i nieprawidłowego daje możliwość wykonania żmudnych analiz w krótszym czasie, a dodatkowo pozwala uniknąć błędów, jakie wprowadza „zmęczone oko” po długich obserwacjach mikroskopowych. Opracowana metodyka z zastosowaniem gotowych i własnych rozwiązań, zachęca do odejścia od tradycyjnych metod opracowywania wyników immunocytochemicznych i immunofluorescencyjnych.

Aktualnie prowadzone badania i plany naukowe

Elektroporacja w reakcji fotodynamicznej

Nieustannie w tematyce moich bieżących zainteresowań naukowych leży metoda elektroporacji, poznawanie mechanizmów jej działania w różnych typach komórek, optymalizacja parametrów EP oraz poszukiwanie nowych substancji, które okażą się wysoce skuteczne w synergicznym działaniu z impulsowym polem elektrycznym.

Dalszym celem badań związanych z terapią fotodynamiczną było sprawdzenie wpływu elektroporacji na poprawę skuteczności działania fotouczulaczy na komórki z wykształconą opornością wielolekową. Jako model badawczy posłużyły ludzkie linie komórek nowotworowych gruczolaka gruczołu sutkowego MCF-7/WT i MCF-7/DX (linia oporna na doksorubicynę). Technika elektroporacji wykorzystana została do wspomaganie reakcji fotodynamicznej z zastosowaniem Photofrin'u oraz cyjaniny IR-775. Ta tematyka badawcza została podjęta w rozprawie doktorskiej dr inż. J. Weźgowiec, w której pełniłam rolę promotora pomocniczego. Odpowiedź komórek nowotworowych po ekspozycji na elektroporację i działanie badanych związków oceniana była na poziomie zmian integralności błony komórkowej (pomiar zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej), aktywności enzymów związanych z metabolizmem (test MTT), funkcjonowania lizosomów (test NR) oraz zdolności do syntezy białek (test SRB). W celu określenia śmierci komórkowej wykorzystano metodę barwienia z błękitem trypanu. Zastosowane metody terapeutyczne okazały się skuteczne zarówno w komórkach wrażliwych (MCF 7/WT), jak i opornych (MCF-7/DX) na standardową terapię. Ponadto połączenie reakcji fotodynamicznej z elektroporacją skutkowało wzrostem ekspresji GST – enzymu związanego z detoksykacją ksenobiotyków (Załącznik 3a, publikacja 31b i 32b; rozprawa doktorska J. Weźgowiec 2016).

Elektrochemioterapia – badania in vitro

Kolejnym nurtem badawczym jest ocena efektywności chemioterapeutyków przy zastosowaniu impulsowego pola elektrycznego. W naszych badaniach oceniana była m.in. efektywność 5-fluorouracylu (5-FU) w reakcji elektrochemicznej w odniesieniu do stosowanej już w tej metodzie cisplatyny. Do badań zostały wybrane komórki raka jajnika z opornością lekową (SKOV-3), linia komórkowa raka jajnika jasnokomórkowego z cichą mutacją genu p53 (OvBH-1) oraz linia prawidłowa fibroblastów izolowana od pacjentki. Obie linie nowotworowe reprezentują trudne do wyleczenia typy nowotworów ze szczególną opornością na cisplatynę. Otrzymane rezultaty wskazują, że bardziej wrażliwa na EP okazała się linia komórkowa SKOV-3. Natomiast w obu przypadkach otrzymano synergistyczny efekt EP z 5-FU. W przypadku cisplatyny efektywne stężenie było kilkukrotnie większe niż dla 5-FU, ale w połączeniu z EP, cisplatyna działała znacznie bardziej cytotoksycznie niż bez ekspozycji na impulsowe pole elektryczne (Załącznik 3a, publikacja 35b). W kolejnych badaniach również wybrano te same linie komórkowe raka jajnika (SKOV-3 i OvBH-1). Celem było przeprowadzenie standardowej reakcji elektrochemioterapeutycznej z zastosowaniem bleomycyny, która jest standardowym lekiem w metodzie ECT wobec czerniaka i raka gruczołu sutkowego. Nasze badania, metodami oceny cytotoxyczności, potwierdzają również skuteczność tej metody z bleomycyną w obu typach komórek raka jajnika. Również widoczne zmniejszenie ekspresji małego białka szoku cieplnego HSP27 w komórkach jasnokomórkowego raka jajnika świadczy o zmniejszającej się oporności na śmierć apoptotyczną po zastosowanej EP z bleomycyną (Załącznik 3a, publikacja 50b).

Najnowsze doniesienia wskazują na możliwość użycia jonów wapnia w połączeniu z EP do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych. Regulacja homeostazy wapniowej jest niezwykle ważna w cyklu komórkowym, indukowaniu śmierci komórkowej, proliferacji, transkrypcji oraz wtórnym przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Ostatnie badania prof. Julie Gehl z Danii dowodzą również, że niezwykle skuteczne w połączeniu z elektroporacją są jony wapnia, które przy odpowiednio dobranym stężeniu i parametrach pola elektrycznego, mają zdolność indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych bez efektów ubocznych dla zdrowych tkanek. Wobec tak obiecujących wyników z zastosowaniem CaCl_2 , postanowiliśmy potwierdzić ten efekt w komórkach MCF-7/WT i MCF-7/DX. Zagadnienie stało się również tematem z sukcesem przeprowadzonej pracy inżynierskiej (inż. M. Fullen, 2013). Otrzymane wyniki wskazywały, przeciwnowotworowe zachowanie się CaCl_2 już w stężeniu 1mM wobec badanych komórek (praca inżynierska M. Fullen 2013 oraz

Załącznik **3a**, Streszczenia na zjazdach po doktoracie, poz. **43**). Kontynuując ten nurt badawczy, zaproponowałam tematykę indukowania apoptozy, metodą elektroporacji w obecności jonów wapnia w komórkach mięsaka w odniesieniu do prawidłowych komórek szkieletowych. Zagadnienie to stało się tematem rozprawy doktorskiej mgr Anny Szewczyk z Uniwersytetu Wrocławskiego, w której jestem promotorem pomocniczym a głównym promotorem jest dr hab. M. Daczewska prof. nadzw. Celem naszych badań jest taka optymalizacja parametrów terapii łączonej: EP+Ca²⁺, która pozwoli na eliminację komórek nowotworowych przy jednoczesnej możliwości stymulacji komórek prawidłowych. Modelem badawczym są mięśniowe linie komórkowe: C2C12 (mysie prawidłowe komórki mięśni szkieletowych), L6 (prawidłowe, szczurze komórki mięśniowe), linia RD (komórki nowotworowe, *lac. Rhabdomyosarcoma*) oraz linia komórkowa WEHI-164 (mysie komórki nowotworowe, *lac. Fibrosarcoma*). Otrzymane do tej pory wyniki zostały już częściowo opublikowane (Załącznik **3a**, publikacja **46b** i **8c**). Zastosowana metoda indukowała znaczny wzrost procentu komórek nowotworowych wchodzących na drogę apoptozy (metoda TUNEL i aneksyna V/jodek propidyny) oraz zahamowanie ekspresji prozapalnego enzymu - wydzielniczej fosfolipazy A2 (sPLA2) z grupy II. Ponadto nawiązałam współpracę z prof. Julie Gehl ze Centrum Leków Eksperymentalnych i Elektrotransferu w Klinice Onkologii Szpitala Herlev Uniwersytetu w Kopenhadze (Dania), a doktorantka mgr A. Szewczyk mogła kontynuować swoje badania pod opieką specjalisty w tej dziedzinie w warunkach *in vivo* na mysim modelu w czasie stażu ERASMUS. Otrzymane przez nas oraz w ramach nawiązanej współpracy wyniki wskazują, że jest możliwe dobranie warunków terapeutycznych tak aby, indukować śmierć komórek nowotworowych (*in vitro* i *in vivo*) przy jednoczesnej stymulacji komórek prawidłowych do zwiększonej proliferacji.

Od 2015 r. prowadzę również współpracę z dr-em Adamem Rzechonkiem z Katedry i Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Celem naszych badań jest opracowanie optymalnej metody hodowli i odpowiedniego wzrostu komórek izolowanych z guzów nowotworowych płuc w hodowli pierwotnej. Obecnie prowadzimy testy cytowrażliwości tych komórek na wybrane cytostatyki, dodatkowo łącząc je z elektroporacją. W pierwszej fazie stosowane są standardowe cytostatyki jak cisplatyna, doksorubicyna, i kamptotekan. Otrzymane do tej pory wyniki były prezentowane na konferencjach i obecnie są przygotowywane do publikacji (Załącznik **3a**, Streszczenia na zjazdach krajowych po doktoracie poz. **69** i **70**; Streszczenia na zjazdach międzynarodowych po doktoracie, poz. **85**, **86**, **87**, **88**). Zastosowanie skojarzonej terapii celowanej może okazać się alternatywną i obiecującą metodą w leczeniu nowotworów płuc w porównaniu do tradycyjnej chemioterapii.

Elektrochemioterapia – badania in vivo

Mając już doświadczenie w ocenie efektywności i optymalizacji elektrochemioterapii w badaniach *in vitro*, podjęłam współpracę z zespołem prof. Zdzisława Kiełbowicza z Katedry i Kliniki Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wprowadziliśmy wspólnie zabiegi elektrochemioterapii dla małych zwierząt jako terapię pierwszego wyboru, w określonych przypadkach. W szczególności naszym celem stały się guzy nowotworowe znajdujące się w obrębie jamy ustnej u psów i kotów. Ten typ nowotworów stanowi duży problem terapeutyczny. W obrębie jamy ustnej, często diagnozowane są zmiany, które mają charakter złośliwy np. włókniakomięsaki, raki płaskonabłonkowe czy czerniaki. Takie zmiany cechują się dużą złośliwością biologiczną i w standardowym leczeniu wymagają resekcji chirurgicznej z dużym marginesem usuwanych tkanek, co dla zwierzęcia jest znaczną uciążliwością. Bardzo często guzy są późno diagnozowane i w momencie rozpoznania na ogół mają już duże rozmiary co dodatkowo utrudnia lub wręcz uniemożliwia postępowanie chirurgiczne. Jak się okazuje efekt kosmetyczny zabiegu w obrębie głowy w przypadku zwierząt towarzyszących, stanowi istotny czynnik wpływający na decyzję właściciela odnośnie metody i zakresu leczenia. Dlatego dodatkowo poza postępowaniem chirurgicznym stosuje się również radioterapię lub chemioterapię. Alternatywę dla obecnie stosowanych radykalnych metod stanowi elektrochemioterapia, na którą właściciele co raz częściej się decydują. W zespole z dr Joanną Pacuską Katedry i Kliniki Chirurgii przeprowadzam zabiegi u małych zwierząt towarzyszących. Nasze badania stały się podstawą do zorganizowania konferencji naukowej: „*Elektrochemioterapia w weterynarii i onkologii*”, (Wrocław 13-14.-7.2016). W ramach tego spotkania zapoznaliśmy uczestników z metodą elektroporacji i jej zastosowaniem w leczeniu zwierząt i ludzi. Nasze obserwacje wskazują, że metoda ta doskonale się sprawdza przy zmianach czerniakowych, fibrosarkomach i mastocytomach (Załącznik 3a, Streszczenia konferencyjne na zjazdach międzynarodowych, poz. 68; Streszczenia konferencyjne na zjazdach krajowych, poz. 66).

Nanoimpulsy i mikrosondy

Od kilku lat w ścisłym kręgu moich zainteresowań naukowych leży technologia wykorzystująca nanosekundowe impulsowe pole elektryczne (nsPEF). NsPEF w dziedzinie bioelektryczności jest metodą ciągle rozwijającą się i ma ogromny potencjał w zastosowaniu terapii przeciwnowotworowych. NsPEF może znaleźć zastosowanie jako „czysto elektryczna”

terapia raka, która nie wymaga aplikacji dodatkowych środków farmakologicznych. Do głównych czynników indukujących permanentne uszkodzenie komórek nowotworowych zaliczamy ultrakrótkie impulsy o wysokim natężeniu pola elektrycznego (do kilkuset kV/cm). Dotychczasowe dane wskazują, że metoda nsPEF indukuje większy stopień permeabilizacji wewnętrznych niż zewnętrznych błon komórkowych. Aplikacja nanopulsów o wysokich wartościach natężenia pola elektrycznego powoduje wzrost poziomu jonów wapnia w cytozolu oraz translokację fosfatydyloseryny co prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych do aktywacji apoptozy i zmian aktywności proteasomalnej za pośrednictwem indukcji stresu oksydacyjnego. W ramach swoich badań oceniam wpływ nanosekundowego impulsowego pola elektrycznego (nsPEF) na mechanizmy komórkowe ludzkich i mysich komórek nowotworowych (również wrażliwych i opornych na chemioterapię) w odniesieniu do komórek prawidłowych. Dodatkowo sprawdziłam czy obecność leku potęguje działanie nanopulsów. W badaniach wykorzystałam fizjologiczne roztwory jonów wapnia, kwasu betulinowego a także ranelinianu strontu (Załącznik 3a, publikacja 7c; Streszczenia konferencyjne na zjazdach międzynarodowych, poz. 45, 54, 60, 80). Moje badania własne wskazują, że kombinacja nanopulsów z lekiem powoduje addytywny lub synergiczny efekt przeciwnowotworowy.

Od 2014 r. współpracuję z prof. Ryszardem Buczyńskim z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie. Prof. R. Buczyński opracował sondy do precyzyjnej mikroelektroporacji, których efektywność była testowana po raz pierwszy w laboratorium Katedry i Zakładu Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Mając na względzie makroskopowe rozmiary dostępnych narzędzi do elektroporacji, są one obecnie ograniczone do dość dużych obszarów ciała, zwierząt czy hodowli komórkowych. W Zakładzie Szkieł prof. R. Buczyńskiego opracowano sondę do elektroporacji komórek w skali mikro. Dzięki takiej sondzie możliwe będzie rozszerzenie obszaru zastosowań metody elektroporacji do precyzyjnego leczenia miejsc zmienionych chorobowo w bezpośredniej bliskości zdrowych tkanek bez ryzyka ich uszkodzenia. Takim przykładem może być leczenie glejaków – trudno dostępnych nowotworów mózgu. Badane przeze mnie sondy do elektroporacji zostały zgłoszone do ochrony patentowej (P.409831 i Ep15183159), zdobyły także srebrny medal na wystawie wynalazków IWIS 2015. Do tej pory otrzymaliśmy wstępne wyniki, które udowadniają skuteczność mikrosond (Załącznik 3a; Streszczenia konferencyjne na zjazdach międzynarodowych nr 59; Streszczenia na zjazdach krajowych nr 67) i stały się podstawą projektu TANGO 2 „*Mikrosondy włókniste do elektroporacji narządów wewnętrznych oraz*

pojedynczych komórek” (akronim projektu: FIMELIO, aplikowany w ramach NCBiR i NCN), w którym jestem wykonawcą.

Sonoporacja

Od 2015 roku podjęłam współpracę z zespołem prof. Sauliusa Šatkauskas’a z Uniwersytetu im. Witolda Wielkiego w Kownie na Litwie. Moja współpraca z placówką naukową w Kownie była podstawą do zawarcia w 2016 r. umowy w ramach programu ERASMUS dotyczącej mobilności pracowników naukowych. Zespół prof. S. Šatkauskas’a zajmuje się badaniem efektywności reakcji fotodynamicznej, elektroporacją oraz zjawiskiem sonoporacji i reakcji sonodynamicznej. Zjawisko sonoporacji komórek następuje podczas ich ekspozycji na ultradźwięki. Kiedy sonoporacja ma miejsce w pobliżu żyjącej komórki, jej błona komórkowa doznaje wstrząsu, staje się bardziej porowata i dochodzi do rozszczelnienia błon komórkowych, podobnie jak w procesie elektroporacji. Sonoporacja sprawia, że błona komórkowa jest bardziej przepuszczalna dla molekuł leku. Technika ta może być stosowana w biologii molekularnej do terapii genowej w celu umożliwienia absorpcji dużych cząsteczek, oraz w procesie transfekcji lub transformacji. W 2016 r. nadzorowałam staż docenta Mindaugasa Tamošiūnas’a z zespołu prof. S. Šatkauskas’a, w trakcie którego badaliśmy zastosowanie chloryny Ce6 w sonoporacji i reakcji sonodynamicznej. W procesie sonoporacji wykorzystaliśmy komercyjne mikrobańki (ang. *microbubbles*) wypełnione gazem w celu zwiększenia absorpcji dawki fotouczulacza przez komórki czerniaka (Me45). Wypełnione gazem mikrobańki pękają w reakcji na ciśnienie wywołane impulsem ultradźwiękowym i znacznie wspomagają efekt sonoporacji. Świadczy o tym zwiększona dystrybucja Ce6 w komórkach czerniaka. Uzyskane wyniki wskazują, że metoda sonoporacji z Ce6 indukuje w komórkach czerniaka śmierć na drodze apoptozy. Ten proces może okazać się niezwykle pożyteczny w zmniejszaniu niezbędnych dawek podczas podawania leku w sposób konwencjonalny. Prowadzone w trakcie stażu badania wykazały, że chloryna Ce6 jest również efektywnym sonosensybilizatorem czyli związkami, który ulega wzbudzeniu po ekspozycji na ultradźwięki. Chloryna Ce6 jest efektywniejszym „sonouczulaczem” niż fotouczulaczem, o czym świadczą wyniki fotocytotoksyczności komórkowej. Dodatkowo fale ultradźwiękowe mają znacznie większą możliwość penetracji tkanek guza niż promieniowanie czerwone. Otrzymane wyniki zaprezentowano na konferencji PARNAS w 2016r. (Załącznik 3a, Streszczenia konferencyjne na zjazdach międzynarodowych nr 79). W styczniu 2017 r. zakończyliśmy badania wstępne, przygotowujemy publikacje i będą one podstawą kontynuowania współpracy i opracowywania dalszych projektów.

6. Posumowanie całkowitego dorobku naukowego.

	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	5	58	63
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	3	15	18
Całkowita liczba publikacji	8	73	81
Sumaryczny IF - zgodnie z rokiem opublikowania	1.418	121.87 *	123.288
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	45	1519 **	1564
Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem autocytowań	6	362	368
Indeks Hirscha	1	12	12
Uzyskane patenty/zgłoszenia patentowe	0	5	5
Rozdziały w monografiach	0	6	6
Prace opublikowane w materiałach konferencyjnych	0	9	9
Udział w konferencjach krajowych	7	95	102
Udział w konferencjach zagranicznych	7	92	99
Kierownictwo projektów badawczych	0	5	5
Udział w projektach badawczych	0	9	9

* w tym dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 25.152

** w tym dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 242

Zubochwa