

**Nanotechnologia w zastosowaniach biomedycznych: od nanokompozytów
typu metal-grafen do przedklinicznych badań hepatotoksyczności
i procesów nowotworowych**



Dr n. farm. Magdalena Bamburowicz-Klimkowska

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Toksykologii i Bromatologii
ul. Banacha 1
02-097 Warszawa

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych do wniosku
o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Warszawa 2024

Spis treści

1. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE	3
2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	3
3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA HABILITOWANEGO	4
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
3.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
3.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
3.3.1. Wprowadzenie.....	7
3.3.2 Cel naukowy badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	10
3.3.3 Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe.....	11
3.3.4. Podsumowanie.....	25
3.4. Bibliografia	27
4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	29
4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk.....	29
farmaceutycznych	29
4.2. Bibliografia	31
4.3. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych	32
4.4. Bibliografia	38
4.5. Analiza bibliometryczna	41
5. STAŻE I SZKOLENIA W KRAJOWYCH I ZAGRANICZNYCH OŚRODKACH NAUKOWYCH LUB AKADEMICKICH	42
5.1. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru	42
5.1.1 Staże	42
5.1.2. Szkolenia	42
5.2. Konferencje naukowe	43
6. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH	46
6.1. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.....	46
6.1.1. Zrealizowane	46
6.1.2. W trakcie realizacji.....	46
6.2. Informacje o współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami z kraju i zagranicy	47
7. RECENZOWANIE PRAC NAUKOWYCH.....	48
8. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE	49
9. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA	50

1. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Doktor nauk farmaceutycznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny Wydział Farmaceutyczny. 14.12.2011. Rozprawa doktorska pt.: "Wpływ chinidyny na kinetykę domperidonu w surowicy szczura przy zastosowaniu schematu wielokrotnego podania".

Promotor: prof. dr hab. Mirosław Szutowski

Recenzenci: prof. dr hab. Barbara Zielińska-Psuja

prof. dr hab. Helena Makulska-Nowak

Master of Business Administration (MBA)

Wyższa Szkoła Przedsiębiorczości i Zarządzania im. L. Koźmińskiego. Warszawa 1998 r. Projekt doradczy pt.: „Restrukturyzacja Działu Marketingu w Farma EMMG”.

Promotor: prof. A. Chrostowski

Magister farmacji

Akademia Medyczna w Warszawie. Wydział: Farmaceutyczny. Zakład Toksykologii. 18.07.1996. Rozprawa magisterska pt.: „Doświadczalne zatrucie podostre Reladormem: Opracowanie analityczne”.

Promotor: prof. dr hab. Jacek Brzeziński.

Recenzent: prof. dr hab. Ryszard Paruszewski

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

11.2002 - 09.2003	Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Warszawie, ASYSTENT
10.2003 - 01.2005	Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Warszawie, WYKŁADOWCA
02.2005 - 09.2017	Zakład Toksykologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ASYSTENT
10.2017 - 09.2018	Katedra i Zakład Toksykologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, P.O. KIEROWNIKA ZAKŁADU TOKSYKOLOGII
10.2018 - 09.2022	Katedra Toksykologii Stosowanej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ADIUNKT
od 10.2022	Zakład Toksykologii i Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ADIUNKT

3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA HABILITOWANEGO (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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)):

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Nanotechnologia w zastosowaniach biomedycznych: od nanokompozytów typu metal-grafen do przedklinicznych badań hepatotoksyczności i procesów nowotworowych

Podstawą ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego stanowi cykl sześciu publikacji oryginalnych (**HON-P1 – HON-P6**) oraz jedna publikacja przeglądowa (**HON-PP1**). Łączna wartość bibliometryczna cyklu publikacji zgłaszanych jako Osiągnięcie wynosi **660 punktów MEN** współczynnik **IF = 26,523**. Wszystkie czasopisma, w których opublikowane zostały wyniki badań wchodzących w skład Osiągnięcia znajdują się w wykazie czasopism naukowych dla dyscypliny nauki farmaceutycznej. Wszystkie badania *in vivo* wykonane w ramach Osiągnięcia posiadały zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Poniżej przedstawione zostały prace wchodzące w cykl publikacji wraz z określeniem indywidualnego wkładu habilitanta w ich powstawaniu.

Pełne teksty publikacji składających się na cykl habilitacyjny znajdują się w Załączniku 5.

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 6.

3.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. HON-PP1

Bamburowicz-Klimkowska M., Poplawska M., & Grudziński IP. (2019). Nanocomposites as biomolecules delivery agents in nanomedicine. Journal of Nanobiotechnology, 17(1), 48. doi:doi:10.1186/s12951-019-0479-x

IF=6,518; Punktacja MEN =140

(Szacunkowy wkład: 90%, - pomysłodawca przeglądu, analiza zebranych wyników, przygotowanie całego manuskryptu, autor korespondujący).

2. HON-P1

Grudzinski I. P., Bystrzejewski M., Bogorodzki, P., Cieszanowski A., Szeszkowski W., Poplawska M., & **Bamburowicz-Klimkowska, M.** (2020). Comprehensive magnetic resonance characteristics of carbon-encapsulated iron nanoparticles: a new frontier for the core-shell-type contrast agents. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(4). doi:10.1007/s11051-020-04795-w

IF= **2,253**; Punktacja MEN =**70**

(Szacunkowy wkład: 50%, - opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki przygotowania fantomów oraz ich przygotowanie do badań, koordynowanie badań fantomowych MRI, udział w zebraniu i analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptu).

3. HON-P2

Bamburowicz-Klimkowska M., Bystrzejewski M., Kasprzak A., Cieszanowski A., & Grudzinski I.P (2024) Monoclonal antibody-navigated carbon-encapsulated iron nanoparticles used for MRI-based tracking integrin receptors in murine melanoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 55,2024 doi.org/10.1016/j.nano.2023.102721

IF=**5,400**; Punktacja MEN =**140**

(Szacunkowy wkład: 75%, - opracowanie koncepcji badań, przygotowanie fantomów do badań wg wcześniej opracowanej przeze mnie metodyki, koordynowanie badań fantomowych MRI, zebranie i analiza wyników, przygotowanie całego manuskryptu, autor korespondujący).

4. HON-P3

Bamburowicz-Klimkowska M., Malecki M., Bystrzejewski M., Kasprzak A., & Grudzinski I. P. (2023). Graphene-encapsulated iron nanoparticles as a non-viral vector for gene delivery into melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 652, 84-87. doi:10.1016/j.bbrc.2023.02.042

IF=**3,100**; Punktacja MEN =**100**

(Szacunkowy wkład: 75%, - opracowanie koncepcji badań, opracowanie metodyki otrzymywania badanego nanowektora, koordynowanie badań, zebranie i analiza wyników, przygotowanie całego manuskryptu, autor korespondujący).

5. HON-P4

Bamburowicz-Klimkowska M., Kasprzak A., Bystrzejewski M., Poplawska M., Sobczak K., & Grudzinski I. P. (2021). Characteristics of glucose oxidase immobilized on carbon-encapsulated iron nanoparticles decorated with polyethyleneimine. *Polymer Bulletin*, 80,1565–1586. doi:10.1007/s00289-022-04125-1

IF= **3,200**; Punktacja MEN =**40**

(Szacunkowy wkład: 80%, - opracowanie koncepcji badań, przygotowanie materiału do badań, opracowanie metodyki oznaczania badanych substancji metodami chromatograficznymi, wykonanie analizy toksykokinetycznej, zebranie i analiza wyników, przygotowanie całego manuskryptu, autor korespondujący).

6. HON-P5

Grudzinski I.P., Ruzycka M., Cieszanowski A., Szeszkowski W., Badurek I., Malkowska A., **Bamburowicz-Klimkowska M.** (2019). MRI-based preclinical discovery of DILI: A lesson from paracetamol-induced hepatotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 108. doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104478

IF=**2,652**; Punktacja MEN=**70**

(Szacunkowy wkład: 50%, - opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzenie eksperymentu in vivo, zebranie materiału do badań (w tym tkanek i narządów), koordynowanie badań, udział w analizie otrzymanych wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu).

7. HON-P6

Bamburowicz-Klimkowska M., Ruzycka-Ayoush M., Cieszanowski A., Szeszkowski W., Bialek M., Malkowska A., & Grudzinski I. P. (2022). New insights into NAFLD based on preclinical MRI studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 244. doi:10.1016/j.chemphyslip.2022.105192

IF=**3,400**; Punktacja MEN= **100**

(Szacunkowy wkład: 65%, - opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzenie eksperymentu in vivo zebranie materiału do badań (w tym tkanek i narządów), koordynowanie badań MRI, udział w analizie zebranych danych, udział w przygotowaniu manuskryptu).

3.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

3.3.1. Wprowadzenie

Nanocząstki (NPs) to klastery atomowe o krystalicznej lub amorficznej strukturze, posiadające przynajmniej w jednym wymiarze osi kartezjańskiej wielkość poniżej 100 nm. Rozmiary nanomateriałów są zbliżone do wielkości wielu molekuł biologicznych, takich jak przeciwciała, receptory błonowe, kwasy nukleinowe czy białka. Powyższe cechy mimikryczne dotyczące rozmiaru oraz unikalne właściwości fizyczne i chemiczne, w tym wysoki stosunek powierzchni do objętości, czynią nanocząstki potężnym narzędziem diagnostycznym i teranostycznym. Rosnące zapotrzebowanie na aplikacje kliniczne oraz rozwój nanobiotechnologii znacznie wspiera strategie bioinżynieryjne w różnych obszarach zastosowań, takich jak obrazowanie molekularne, diagnostyka point-of-care oraz terapie ukierunkowane. Rozsądnym wydaje się zatem stwierdzenie, że wyjątkowe właściwości nanocząstek umożliwiają wręcz wykładniczy wzrost ich reaktywności zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Aby sprostać tym wyzwaniom, projektowanie wielofunkcyjnych nanocząstek i ich rozmaite zastosowania wnoszą ogromny wkład w już istniejącą wiedzę. Szybki postęp technologiczny doprowadził bowiem do wykorzystania szeregu zaawansowanych nanomateriałów w konstruowaniu tzw. „inteligentnych” wielofunkcyjnych nanosystemów do ukierunkowanej diagnostyki i terapii różnych chorób, w tym nowotworów. Wiele nanonośników zbudowanych na bazie nanomateriałów typu metal-grafen zostało użytych do poprawy kinetyki leków w organizmie, przełamania oporności na leki i zmniejszenia ich działań niepożądanych. Jednak interakcja nanomateriałów z konkretnymi systemami biologicznymi może wywoływać różne reakcje toksyczne [1]. Nanocząstki stosowane w medycynie zwykle charakteryzują się modyfikacją powierzchni, która stanowi warstwę ochronną zwiększającą ich biokompatybilność, zwłaszcza jeśli zawierają metal. Poza tym warstwa ta zapewnia stabilność nanocząstek, chroniąc przed agregacją oraz umożliwia funkcjonalizację powierzchni nanocząstki do celów teranostycznych. Modyfikacja powierzchni nanonośników biokompatybilnymi polimerami, takimi jak polietylenoglikol (PEG), może poprawić ich stabilność, zmniejszyć eliminację przez układ retikuloendotelialny i poprawić ich biokompatybilność. Dodatkowo, stosowanie ligandów, takich jak przeciwciała lub peptydy, może umożliwić ukierunkowane dostarczanie do określonych typów komórek lub tkanek, podczas gdy włączenie materiałów reagujących na bodźce fizyczne lub chemiczne

może umożliwić kontrolowane uwalnianie leku w odpowiedzi na określone sygnały środowiskowe. Funkcjonalizacja nanocząstek poprzez dodanie różnych grup chemicznych na ich powierzchni umożliwia dostosowanie ich właściwości do konkretnych zastosowań. Zastosowanie tego rodzaju nanocząstek umożliwia swoiste dostarczanie substancji aktywnych do konkretnych komórek lub obszarów organizmu, co jest istotne w diagnostyce i terapii [2]. Odpowiednio zaprojektowane nanocząstki mogą być biokompatybilne, co jest kluczowe dla ich zastosowań w medycynie. Aby wybrać odpowiednie nośniki nanotechnologiczne do stosowania w medycynie, ważne jest rozważenie ich właściwości fizykochemicznych, w tym rozmiaru, kształtu, ładunku powierzchniowego i hydrofobowości, a także ich biokompatybilności, stabilności i biodegradowalności. Wybór nośnika będzie zależał od konkretnej substancji, która ma być dostarczana, a także od drogi podania i zamierzonego efektu teranostycznego. Nanocząstki o określonym rozmiarze i funkcjonalizacji mają zdolność przenikania do komórek, co jest wykorzystywane w terapii genowej, celowanym dostarczaniu leków i celowanej diagnostyce [3].

Nanocząstki są wyjątkowym rodzajem nanomateriałów, które znajdują zastosowanie jako nośniki substancji kontrastujących w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (MRI). Tak więc, powierzchnia nanocząstki może być modyfikowana poprzez dodanie ligandów lub cząsteczek bioaktywnych, co opisałam w przeglądowej publikacji pod tytułem „Nanocomposites as biomolecules delivery agents in nanomedicine” (**HON-PP1**) [4]. To umożliwia specyficzną interakcję nanocząstek z określonymi komórkami lub strukturami w organizmie. Tak skonstruowane nanocząstki mogą selektywnie gromadzić się w obszarach zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych, takich jak nowotwory, dzięki zjawisku "wzmocnienia pasywnego". Wzmocnienie pasywne w MRI odnosi się do zjawiska, w którym nanocząstki, niezależnie od ich struktury, rozmiaru lub właściwości magnetycznych, gromadzą się w obszarach o zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń krwionośnych (EPR - Enhanced Permeability and Retention Effect). Jest to szczególnie ważne w kontekście terapii nowotworowej, gdzie naczyniowy charakter nowotworu sprzyja akumulacji nanocząstek. Nanocząstki, ze względu na swoje mikroskopijne rozmiary, mogą łatwiej przenikać przez naczynia krwionośne, zwłaszcza te charakterystyczne dla obszarów nowotworzenia. Wzmocnienie pasywne wykorzystuje efekt EPR, który jest związany z nieregularną strukturą naczyń krwionośnych nowotworu. Naczyń jest więcej, są bardziej przepuszczalne, co umożliwia nanocząstkom bardziej efektywne docieranie do obszarów guza. W obszarze guza nanocząstki mogą dłużej zatrzymywać się z powodu problemów z drenażem limfatycznym, co

prowadzi do ich retencji w miejscu docelowym. Wzmocnienie pasywne w MRI, wykorzystujące nanocząstki, jest zjawiskiem istotnym w diagnostyce obrazowej i terapii, pozwalającym na precyzyjne dostarczanie substancji aktywnych do konkretnych obszarów w organizmie. Poprzez funkcjonalizację powierzchni, możliwe jest uzyskanie nanocząstek o właściwościach celowania, które specyficznie docierają do określonych komórek lub struktur w organizmie, co zwiększa precyzję diagnostyki. Materiały, z którego wykonane są nanocząstki stosowane

w MRI zawierają metale, takie jak gadolin, żelazo lub mangan. Metaliczny rdzeń jest istotny dla właściwości magnetycznych nanocząstek. Nanocząstki wykorzystywane w procesie MRI są szeroko stosowane w diagnostyce nowotworów, gdzie jako kontrasty T1 i T2-zależne umożliwiają lepszą identyfikację i charakteryzację zmian nowotworowych. W badaniach naczyniowych nanocząstki mogą być stosowane w wizualizacji przepływu krwi oraz ocenie struktury naczyń krwionośnych. Nanocząstki mogą być używane do monitorowania efektów terapii, zwłaszcza w kontekście teranostyki, gdzie łączą zarówno funkcje diagnostyczne jak i terapeutyczne [5-8]. Nanomateriały jako kontrasty T1 i T2 zależne w MRI stanowią istotny element postępu w diagnostyce obrazowej, przyczyniając się m. in. do poprawy dokładności i precyzji wykonywanych badań. Nanomateriały wykorzystywane jako kontrasty w MRI mogą wpływać na czasy relaksacji T1 i T2, co ma kluczowe znaczenie dla uzyskiwania lepszej jakości obrazów magnetyczno-rezonansowych. Nanocząstki zawierające gadolin są powszechnie stosowane jako kontrasty T1 zależne. Gadolin jest metalem paramagnetycznym, który skraca czas relaksacji T1. Nanocząstki gadolinowe mają zdolność do generowania silnego sygnału w obecności zewnętrznego pola magnetycznego, co wpływa na poprawę kontrastu T1 i umożliwia lepszą wizualizację struktur na obrazach MRI. Nanocząstki zawierające substancje ferromagnetyczne, takie jak tlenek żelaza (Fe_3O_4), mogą pełnić rolę kontrastu T2. W technice obrazowania T2-zależnego (T2-weighted imaging), impulsy radiowe wpływają na magnetyzację spinów protonów, a obraz jest uzyskiwany w trakcie relaksacji poprzecznej (T2). W czasie relaksacji T2, protony w tkankach tracą energię magnetyczną, co jest rejestrowane podczas tworzenia obrazu. Woda w tkankach, zawierająca duże ilości protonów, wykazuje intensywny sygnał na obrazach T2. Struktury wodne, takie jak płyny, mięsz, obszary zapalne są dobrze widoczne. Obrazowanie T2-zależne jest wykorzystywane do identyfikacji obszarów o zwiększonej zawartości wody, co jest istotne w diagnostyce zmian zapalnych, torbieli czy guzów. Bardziej wyraźne zaznaczenie obszarów o różnej gęstości protonów umożliwia analizę tkanki nerwowej, co jest ważne m. in. w badaniach neurologicznych [9-11]. Istnieją również nanocząstki dwufazowe, które mogą jednocześnie wpływać na czas relaksacji T1 i T2. Te

zaawansowane nanokontrasty pozwalają na uzyskanie jeszcze bardziej zróżnicowanych obrazów magnetyczno-rezonansowych [12, 13]. Nanocząstki dwufazowe pozwalają na precyzyjną kontrolę parametrów kontrastu, co jest ważne dla dostosowania do konkretnych wymagań diagnostycznych. Zastosowanie nanomateriałów w obrazowaniu rezonansem magnetycznym nie tylko poprawia czułość i skuteczność diagnostyczną, ale także otwiera nowe możliwości w dziedzinie celowanej diagnostyki i terapii [12-14].

3.3.2 Cel naukowy badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Celem opisanych badań była ocena potencjału zastosowania nanocząstek **HON-PP1**, w szczególności nanocząstek magnetycznych typu metal-grafen (CEINS) **HON-P1** oraz nanomateriałów funkcjonalizowanych przeciwciałami monoklonalnymi **HON-P2**, jako środków cieniujących w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI) w diagnostyce nowotworów oraz dwóch różnych stanów chorobowych związanych z wątrobą: polekowym uszkodzeniem wątroby (DILI) **HON-P5** oraz niealkoholową chorobą stłuszczeniową wątroby (NAFLD) **HON-P6**.

Szczegółowo badania miały na celu określenie właściwości magnetycznych i relaksometrycznych nanocząstek CEINS **HON-P1** w modelach fantomowych oraz modelach komórkowych i zwierzęcych czerniaka z nadekspresją podjednostki beta-3 w przezbłonowym receptorze integryny $\alpha\beta3$ **HON-P2**.

Celem badań było również opracowanie nowego, skutecznego i bezpiecznego wektora niewirusowego opartego na nanocząstkach typu metal-grafen funkcjonalizowanych polietylenoiminą (CEINS-PEI). Celowe było potwierdzenie skuteczności transfekcyjnej opracowanego nanokonstruktów **HON-P3**.

Ponadto, celem było rozszerzenie możliwości identyfikacji i charakteryzacji zmian w wątrobie oraz polepszenie właściwości nośnych i celujących w leczeniu i diagnostyce MRI poprzez badanie funkcjonalizowanych nanomateriałów typu metal-grafen **HON-P2**. Dodatkowo, badania skupiły się na dostarczaniu białek i peptydów przy użyciu nanocząstek, co znacząco poprawia ich stabilność i umożliwia ich wykorzystanie w celach biomedycznych, takich jak immobilizacja enzymów **HON-P4**.

W kontekście rozwoju diagnostyki obrazowej jako narzędzia diagnostycznego, celem badań było również wykorzystanie zaawansowanych technik obrazowania MRI do

precyzyjnego rozpoznawania różnych schorzeń, a także zbadanie możliwości wykorzystania rezonansu magnetycznego w diagnostyce polekowego uszkodzenia wątroby **HON-P5** oraz niealkoholowej choroby tłuszczowej wątroby **HON-P6**.

3.3.3 Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Charakterystyka rezonansowa nanocząstek żelaza typu metal-grafen

Nanocząstki w MRI stanowią ważny element diagnostyki obrazowej, przyczyniając się do uzyskania lepszej jakości obrazów oraz zwiększenia precyzji diagnostyki w różnych obszarach medycyny. Nanocząstki magnetyczne typu metal-grafen (CEINS – ang. Carbon Encapsulated Iron Nanoparticles) cieszą się dużym zainteresowaniem w wielu obszarach nanotechnologii nowotworów, począwszy od podstawowej biologii nowotworów po wczesne wykrywanie i leczenie. Aby sprostać tym wyzwaniom, podjęłam się określenia właściwości magnetycznych i relaksometrycznych nanocząstek CEINS stosowanych jako potencjalny środek kontrastujący w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego w przedklinicznych modelach fantomowych. Próbki CEINS (**HON-P1**) zostały syntezowane w plazmie łuku węglowego w Pracowni Fizykochemii Nanomateriałów Zakładu Fizyki Wydziału Chemii UW przez dra hab. Michała Bystrzejewskiego, a otrzymane nanocząstki zostały oczyszczone i funkcjonalizowane powierzchniowo grupami karboksylowymi w celu zmniejszenia potencjalnej cytotoksyczności przez dra hab. inż. Artura Kasprzaka z Wydziału Chemicznego PW. Obecność różnych faz metalicznych zawierających żelazo, odzwierciedlających właściwości magnetyczne CEINS, została scharakteryzowana za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej (XRD), termogravimetrii (TGA) oraz magnetometrii wibracyjnej. Cechy morfologiczne i chemiczne powierzchni zostały zbadane za pomocą mikroskopii elektronowej (mikroskopii transmisyjnej [TEM] i mikroskopii elektronowej skaningowej [SEM]), spektroskopii Ramanowskiej oraz spektroskopii podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Zostały również określone właściwości nanocząstek, obejmujące porowatość, gęstość ładunku powierzchniowego oraz potencjał zeta. Wartości potencjału zeta wodnych zawiesin CEINS mieszczą się w przedziale od $-24,7$ do $-25,4$ mV. Koordynowałam wszystkie badania mające na celu charakteryzację fizyczną oraz właściwości rezonansowe nanomateriałów typu CEINS. Różne próbki CEINS otrzymane w procesie syntezy zostały ostatecznie zbadane jako potencjalne kontrasty w diagnostyce MRI. Pomiarów dokonano na wykonanych przeze mnie

modelach fantomów opartych na żelatynie wołowej, używając skanera MRI o polu magnetycznym 1,5 T wyposażonego w standardową cewkę nadawczo-odbiorczą. W celu pozyskania danych, wykonano obrazowanie MR T1- i T2-zależne, używając odpowiednio sekwencji odwróconego odbicia spin-echo (SE) i protokołu SE z wieloma czasami echowania (TE). Charakteryzacja chemiczna wykazała podobieństwo w morfologii i właściwościach między nie oczyszczonymi CEINS (Fe@C/Fe), oczyszczonymi CEINS (Fe@C) a CEINS funkcjonalizowanymi grupami karboksylowymi (Fe@CCOOH). Nanocząstki stanowiły sferoidalne drobiny o średnicy poniżej 100 nm. Otrzymane CEINS miały istotnie większą zawartość żelaza i wykazywały żelazozależną wyższą magnetyzację. Analiza właściwości relaksometrycznych CEINS wykazała, że wszystkie próbki CEINS skracają czasy relaksacji T2 na obrazach T2-zależnych. Intensywność sygnału wyrażona w jednostkach arbitralnych dla różnych czasów echa przy wielkości pola 1,5 T gwałtownie malała wraz ze wzrostem stężenia CEINS, ale pozostawała mniej więcej niezmienną przy dwóch wyższych stężeniach (25 i 50 $\mu\text{g/ml}$), osiągając w ten sposób wartość minimalną w porównaniu z intensywnością tła. Ogólnie podobny profil intensywności sygnału obserwuje się zarówno w przypadku nagich (surowych i oczyszczonych CEINS), jak i cząstek funkcjonalizowanych powierzchniowo (Fe@C-COOH). To zachowanie zostało również potwierdzone w przypadku czasów relaksacji T2. Przy natężeniu pola magnetycznego wynoszącym 1,5 T zależność pomiędzy wartością współczynnika relaksacji ($1/T_2$) i zawartością Fe jest prawie liniowa dla wszystkich badanych nanocząstek typu metal-grafen, osiągając w ten sposób wartości R^2 wynoszące 0,9711 ($p < 0,05$), 0,9585 ($p < 0,05$) i 0,9539 ($p < 0,05$) odpowiednio dla Fe@C/Fe, Fe@C i Fe@C-COOH. Współczynnik relaksacji wykazywał pewne różnice między surowymi, oczyszczonymi i funkcjonalizowanymi CEINS zawierającymi powierzchniowe grupy karboksylowe. Zarówno surowe, jak i oczyszczone CEINS nieznacznie obniżały czasy relaksacji T1, co wyrażało się wzrostem współczynnika relaksacji ($1/T_1$). Niniejsze badanie potwierdziło, że CEINS mogą stanowić nowy typ ujemnego kontrastu typu "metal-grafen" do obrazowania rezonansem magnetycznym. Należy podkreślić, że wszystkie badane próbki CEINS posiadały akceptowalne poziomy relaksacyjności r_2 w polu magnetycznym o natężeniu 1,5 T, używanych w większości systemów MRI w radiologii klinicznej (**HON-P1**) [15].

Funkcjonalizowane przeciwciałem monoklonalnym anti-CD61 nanocząstki typu metal-grafen w celowanym docieraniu do receptora integrynowego $\alpha V\beta 3$ w mysim czerniaku

Nanomateriały funkcjonalizowane przeciwciałami mają znaczący potencjał w terapii nowotworów, oferując precyzyjne i ukierunkowane dostarczanie substancji terapeutycznych do komórek nowotworowych. Nanomateriały funkcjonalizowane przeciwciałami mogą być zaprojektowane tak, aby rozpoznawały specyficzne receptory obecne na powierzchni komórek nowotworowych. Przeciwciała, które są umieszczone na powierzchni nanocząstek, umożliwiają im ukierunkowane dostarczanie substancji terapeutycznych bezpośrednio do komórek nowotworowych. Integryna beta-3 jest komórkową cząsteczką adhezyjną, która pośredniczy w komunikacji komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa. Wykorzystując nanocząstki żelaza w otoczkach węglowych (grafenowych) funkcjonalizowanych przeciwciałami monoklonalnymi (Fe@C-CONH-anty-CD61 i Fe@C-(CH₂)₂-CONH-anty-CD61) zbadalam ich potencjał bezpośredniego celowania w podjednostkę β₃ (CD61) w przezłonowym receptorze integryny α_vβ₃, który to receptor ulega nadekspresji w różnych typach nowotworów. W przypadku moich badań (**HON-P2**) były to komórki czerniaka (B16F10) [16]. Właściwości magnetyczne trzech różnych nanocząstek, w tym niefunkcjonalizowanych (Fe@C) i funkcjonalizowanych przeciwciałami (Fe@C-CONH-anty-CD61 i Fe@C-(CH₂)₂-CONH-anty-CD61) zbadano przy użyciu MRI w modelach *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem modelu syngenicznego czerniaka u myszy C57BL/6. Relaksometrię dla nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałami monoklonalnymi zbadano w modelach fantomów żelatynowych. Zgodnie z danymi, fantomy żelatynowe zawierające nanocząstki Fe@C-CONH-anty-CD61 i Fe@C-(CH₂)₂-CONH-anty-CD61 zobrazowano przy użyciu różnych sekwencji i protokołów dla obrazowania T1-, T2-, T2*-zależnego. Wykonano również pomiary gęstości protonowej (PD) i obrazowanie dyfuzyjne (DWI – ang. Diffusion-Weighted Imaging). Obrazowanie dyfuzji jest istotnym narzędziem diagnostycznym w obrazowaniu guzów litych, pozwalającym na dokładną analizę mikrostruktury tkanki. Jego zastosowania w onkologii, neurologii oraz monitorowaniu skuteczności terapii sprawiają, że technika ta odgrywa istotną rolę w diagnostyce i leczeniu różnych schorzeń, w tym nowotworów. Obrazowanie dyfuzji to technika rezonansu magnetycznego, która umożliwia badanie ruchu cząsteczek wody w tkankach. Ta technika jest szczególnie użyteczna w diagnostyce nowotworów, ocenie stopnia ich złośliwości, monitorowaniu skuteczności terapii, a także w badaniach neurologicznych. W tkankach, cząsteczki wody podlegają ruchom Browna zwłaszcza w przestrzeniach międzykomórkowych. W obecności gradientów pola magnetycznego, te przypadkowe ruchy cząsteczek prowadzą do zmian w sygnale MRI, co jest mierzone podczas obrazowania dyfuzji. Podczas procedury DWI, stosuje się gradienty pola magnetycznego w trzech kierunkach przestrzennych. Czas trwania gradientów ma wpływ na

zdolność do wykrywania zjawiska dyfuzji. Intensywność sygnału w obrazie DWI jest proporcjonalna do dyfuzji protonów wody w danej tkance. Obszary z intensywnym sygnałem na obrazie DWI sugerują ograniczoną dyfuzję wody, co może świadczyć o obecności struktur komórkowych, guzów lub stanów zapalnych. DWI jest stosowane w diagnostyce guzów, gdzie zmiany w dyfuzji wody mogą dostarczyć informacji o gęstości komórek, stopniu złośliwości oraz inwazyjności nowotworu. W przypadku guzów złośliwych, obraz DWI często wykazuje intensywny sygnał, co wynika z ograniczonej dyfuzji wody spowodowanej obecnością komórek nowotworowych. Po rozpoczęciu leczenia nowotworów, DWI może być używane do monitorowania reakcji guza na terapię, ponieważ zmiany w dyfuzji wody mogą odzwierciedlać efektywność leczenia. W badaniach neurologicznych, DWI może dostarczyć informacji o zmianach w strukturach mózgu, takich jak udary, stwardnienie rozsiane czy guzy mózgu. DWI umożliwia wczesne wykrywanie obszarów niedokrwienia czy uszkodzenia nerwów. DWI jest również przydatne w diagnostyce stanów zapalnych i zakażeń, gdzie zmiany w dyfuzji wody mogą sygnalizować obecność procesów zapalnych [17-19]. Aby ocenić potencjalne zastosowanie badanych nanocząstek jako nowych środków kontrastowych, bezpośrednio ukierunkowanych na podjednostkę beta-3 (CD61) integryny $\alpha V\beta 3$ ulegającą nadekspresji w komórkach czerniaka, zmierzono ich wartości relaksacyjności w modelach *in vitro* oraz *in vivo*, które przygotowałam. Analiza wyników dla badanych *in vitro* funkcjonalizowanych ($\text{Fe}@CCONH\text{-anty-CD61}$ i $\text{Fe}@C\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CONH-anty-CD61}$) i niefunkcjonalizowanych nanocząstek ($\text{Fe}@C$) wykazała wpływ niefunkcjonalizowanego nanokontrastu na skrócenie czasu T1 tylko przy najwyższych stężeniach 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$. Takiego efektu nie zaobserwowano dla kontrastów funkcjonalizowanych powierzchniowo z przeciwciałem monoklonalnym anty-CD61 w całym zakresie badanych stężeń. Z drugiej strony zastosowany protokół MRI potwierdził selektywne obrazowanie receptorów integryn czerniaka B16F10 na obrazach T2-zależnych. Występuje wyraźne zaciemnienie obszaru frakcji komórkowych uzyskanych z przylegającej masy komórkowej dla obu nanokontrastów funkcjonalizowanych przeciwciałem przeciwko receptorom CD61. Wyższą relaksację T2 nanokontrastów funkcjonalizowanych przeciwciałem anty-CD61 można przypisać synergistycznemu magnetyzmowi atomów żelaza w tych nanocząstkach [20]. Według Tiwari i wsp., ze względu na wysoką zdolność cząsteczek wody do adsorbowania na niegładkiej powierzchni, nanocząstki z powłoką węglową wykazały większą redukcję czasów relaksacji T2 niż SPION [21]. Jednakże relaksacja T2 nanocząstek superparamagnetycznych zależy głównie od lokalnej heterogeniczności pola magnetycznego wokół cząstek wody oraz wielkości, kształtu i efektów powierzchniowych wynikających z czynników anizotropii magnetycznej [20]. Ze względu na

możliwość nasycenia wiązania receptora integryny $\alpha V\beta 3$ w warunkach ekspozycji na badane nanokontrasty funkcjonalizowane przeciwciałem monoklonalnym, przeprowadzone zostały także eksperymenty mające na celu ocenę konkurencyjnej aktywacji podjednostki $\beta 3$ integryny $\alpha V\beta 3$ dostępnej na powierzchni komórki czerniaka B16-F10 w warunkach preinkubacji z użyciem przeciwciała monoklonalnego anty-CD61. W badaniu tym zobrazowano komórki czerniaka B16-F10, które w pierwszej kolejności preinkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD61, a po takiej inkubacji poddano działaniu nanomateriału funkcjonalizowanego tym przeciwciałem ($\text{Fe}@C(\text{CH}_2)_2\text{-CONH-anty-CD61}$). Wyniki wykazały, że 3-godzinna inkubacja komórek B16-F10 z przeciwciałem monoklonalnym anty-CD61 w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ doprowadziła do nasycenia miejsc wiązania podjednostką $\beta 3$ receptora integryny $\alpha V\beta 3$, co nie pozwoliło na przyłączenie funkcjonalizowanego CD61 nanokontrastu w dalszym czasie inkubacji. Przeprowadzono również *in vivo* analizę MRI zmieniających się czasów relaksacji T1 i T2 dla rosnącego guza oraz narządów, takich jak śledziona, wątroba, nerki, serce, płuca, mózg i mięśnie u myszy. Nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w czasie relaksacji T1 w tkance nowotworowej i innych badanych tkankach. Podobnie do wyników obrazowania MRI *in vitro*, po podaniu nanokontrastów zaobserwowano widoczne wzmocnienie w obrazach MRI obszaru guza na obrazach T2-zależnych. Sygnał T2-zależny nowotworów u myszy po podaniu nanokontrastu funkcjonalizowanego przeciwciałem anty-CD61 stopniowo zmniejszał się po 1 godzinie od wstrzyknięcia i powracał do normy 24 godziny po wstrzyknięciu, co wskazuje na szybką akumulację w miejscu guza. Nanokontrast $\text{Fe}@C(\text{CH}_2)_2\text{-CONH-anty-CD61}$ skracał czas relaksacji poprzecznej (T2) w obszarze nowotworów. Największe skrócenie czasów relaksacji T2 odnotowano 24 godziny po podaniu nanokontrastu z $98 \pm 5,6$ ms do 66 ± 7 ms dla czerniaka. W przypadku poszczególnych narządów wewnętrznych myszy (śledziona, nerka, serce, płuca, mózg i mięsień brzuchowaty łydki) z syngenicznym czerniakiem po podaniu nanokontrastu analiza czasów relaksacji T2 nie potwierdziła statystycznie istotnych różnic. Jednakże w wątrobie zaobserwowano istotną statystycznie przejściową redukcję czasu relaksacji T2 dla czerniaka z $54 \pm 4,8$ ms do 45 ± 6 ms po 12 godzinach. Należy zaznaczyć, że w badanych guzach nie stwierdzono wpływu czynników wzrostu na zmiany czasów relaksacji T1 i T2. Szczegółowa analiza obrazów MR przy użyciu skanera 7T wykazała obszary głębokiego zaciemnienia w miejscach, do których docierają nanocząstki żelaza funkcjonalizowane przeciwciałami monoklonalnymi. Ten typ obrazów potwierdzono w badaniach relaksometrii fantomowej i komórkowej wykonanych z użyciem nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałem. Technika MRI jest szeroko stosowana jako ważna diagnostyka obrazowa i metoda dostarczania informacji o anatomii

strukturalnej i funkcjonalnej całego ciała [22, 23]. Wartość diagnostyczną rezonansu magnetycznego można dodatkowo zwiększyć poprzez zastosowanie egzogennych środków kontrastowych, które poprawiają rozdzielczość tej techniki, umożliwiając lepszą interpretację uzyskanych obrazów. Zsyntetyzowane nanocząsteczki typu metal-grafen, funkcjonalizowane przeciwciałami monoklonalnymi CD61, z powodzeniem zastosowano jako nowy ukierunkowany środek kontrastowy w MRI identyfikujący komórki czerniaka, wykazujące ekspresję podjednostki $\beta 3$ receptora integryny $\alpha v\beta 3$. Dzięki takiemu podejściu można zwiększyć precyzyjność leczenia, minimalizując wpływ na zdrowe komórki. Nanocząstki funkcjonalizowane przeciwciałami mogą skoncentrować się na obszarach, gdzie przeciwciała są zdolne do wiązania się z białkami na powierzchni komórek nowotworowych. Nanomateriały mogą działać jako nośniki leków, przenosząc substancje terapeutyczne, takie jak leki przeciwnowotworowe czy inhibitory enzymów, bezpośrednio do komórek nowotworowych. To umożliwia zwiększenie skuteczności leczenia. Funkcjonalizacja nanomateriałów przeciwciałami może wspierać strategie immunoterapeutyczne. Nanocząstki mogą być wyposażone w przeciwciała, które nie tylko celują, ale także stymulują układ odpornościowy do reakcji przeciwko komórkom nowotworowym. Wreszcie ukierunkowane dostarczanie substancji terapeutycznych przy użyciu nanomateriałów funkcjonalizowanych przeciwciałami może pomóc w ograniczeniu efektów ubocznych, ponieważ substancje terapeutyczne są kierowane wyłącznie do komórek nowotworowych. Przeciwciała mogą być wybierane zgodnie z indywidualnym profilem molekularnym danego nowotworu, co pozwala na bardziej zindywidualizowane podejście do leczenia. Warto jednak podkreślić, że choć ta technologia ma ogromny potencjał, to także wymaga dalszych badań w celu zrozumienia jej bezpieczeństwa, skuteczności oraz zbadania długoterminowych skutków jej stosowania.

Nanocząsteczki żelaza typu metal-grafen jako nośniki genów i białek enzymatycznych

W celu zwiększenia możliwości identyfikacji i charakteryzacji zmian oraz polepszenia właściwości nośnych i celujących w leczeniu i diagnostyce MRI moje badania poszerzyłam o następne funkcjonalizowane nanomateriały typu metal-grafen. W badaniach przedklinicznych zastosowałam nanomateriały magnetyczne z otoczką grafenową sfunkcjonalizowane polietylenoiminą (**HON-P3 i HON-P4**) [24, 25]. Bezpieczne i skuteczne dostarczanie genów docelowych do określonego miejsca jest zasadniczo ważne dla skutecznej terapii genowej. Ogólnie rzecz biorąc, terapia genowa nowotworów polega na leczeniu raka poprzez

przywrócenie funkcji zmutowanego genu lub zastąpienie genu dysfunkcyjnego prawidłowym. Ze względu na ryzyko związane ze stosowaniem wektorów wirusowych naukowcy badają obecnie niewirusowe wektory genów. Spośród wszystkich rodzajów nośników genów, kationowe transportery polimerowe, w tym polietylenoimina, dendrymery poliamidoaminowe, polilizyna, chitosan i modyfikowane polimery kationowe, do dostarczania genu terapeutycznego cieszą się coraz większym zainteresowaniem ze względu na ich wysoką skuteczność transfekcji i akceptowany poziom bezpieczeństwa. Nanocząstki magnetyczne otoczone grafenem (GEMNS – ang. Graphene Encapsulated Magnetic Nanoparticles) są uznawane za nanomateriały węglowe nowej generacji w badaniach translacyjnych nad nowotworami. W badaniu GEMNS funkcjonalizowanego rozgałęzioną polietylenoiminą (PEI) wykorzystałam plazmid kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescence protein), aby uzyskać nowy transporter (GEMNS-PEI/pDNA) do dostarczania genów do komórek czerniaka (B16F10). Skuteczność transfekcji potwierdzona została za pomocą PCR i mikroskopii konfokalnej. Z przeprowadzonych badań wynika, że tak zaprojektowany konstrukt GEMNS-PEI z powodzeniem może być zastosowany do transfekcji pDNA do komórek czerniaka i należy go uważać za silny wektor niewirusowy do wprowadzania nagich kwasów nukleinowych do komórek eukariotycznych. Istnieje kilka istotnych zalet wektorów niewirusowych w porównaniu do wektorów wirusowych w przenoszeniu materiału genetycznego: (i) wektory niewirusowe są zazwyczaj mniej immunogenne niż wirusy, co minimalizuje ryzyko reakcji immunologicznych i działań niepożądanych u pacjenta, (ii) wektory niewirusowe nie są związane z żadnymi chorobami zakaźnymi, co eliminuje ryzyko związane z potencjalnymi infekcjami wirusowymi, (iii) proces produkcyjny wektorów niewirusowych jest często prostszy i tańszy niż produkcja wektorów wirusowych, co ułatwia skalowanie produkcji, (iv) wektory niewirusowe, takie jak liposomy czy kompleksy polimerowe, mogą nosić duże ilości materiału genetycznego, co jest korzystne w przypadku przekazywania wielu genów jednocześnie, (v) wektory niewirusowe mają zazwyczaj większą pojemność nośników, co pozwala na przenoszenie większych fragmentów materiału genetycznego niż niektóre wirusy, (vi) w przeciwieństwie do niektórych wektorów wirusowych, wektory niewirusowe często nie integrują się z genomem komórki gospodarza, co eliminuje ryzyko niekontrolowanego wprowadzenia obcych genów do genomu, (vii) wirusy mogą mutować, co wpływa na ich właściwości i skuteczność, (viii) wektory niewirusowe są bardziej stabilne genetycznie, co może być korzystne w celu utrzymania jednolitej i przewidywalnej efektywności, (ix) wektory niewirusowe są często lepiej akceptowane przez społeczeństwo i mają mniej ograniczeń etycznych w stosunku do wektorów wirusowych, co

może ułatwiać ich zastosowanie kliniczne. Nanowektory niewirusowe, jak skonstruowany przeze mnie nanowektor na bazie nanocząstek typu metal-grafen funkcjonalizowany PEI, mają zatem szereg cech, które czynią je atrakcyjnymi w przenoszeniu materiału genetycznego zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i w potencjalnych terapiach genowych (**HON-P3**) [24].

Badania dotyczące dostarczania białek lub peptydów przy użyciu nanocząstek w nanotechnologii nowotworów są wciąż początkowej fazie. Kapsułkowanie białek w nanocząsteczkach może znacznie poprawić właściwości białek, takie jak ich stabilność wobec procesów denaturacji i degradacji pod wpływem proteaz, a także umożliwić wykorzystanie naturalnych białek wyizolowanych z ich wewnętrznej lokalizacji w organizmach żywych do zastosowań biomedycznych. Różne typy nanonośników znalazły ważne potencjalne zastosowania w immobilizacji enzymów. Enzymy można łączyć z nanocząsteczkami poprzez absorpcję fizyczną lub wiązanie kowalencyjne. Dlatego następnym rodzajem GEMNS zbudowany z nanocząstek żelaza w kapsułkach węglowych (Fe@C), które funkcjonalizowano grupami karboksylowymi i rozgałęzioną polietylenoiminą (PEI), dodatkowo połączyłam elektrostatycznie z enzymem, oksydazą glukozową (GOX) (**HON-P4**). Oksydazę glukozową wykorzystałam tu do przekształcenia glukozy w kwas glukonowy i nadtlenek wodoru, który w wysokim stężeniu może indukować śmierć komórek nowotworowych poprzez zależną od nadtlenu wodoru aktywację apoptozy w komórkach nowotworowych. Oksydaza glukozowa to enzym biorący udział w procesie metabolizmu glukozy. Zazwyczaj jest to pozytywny proces, ponieważ glukoza jest jednym z głównych substratów energetycznych dla komórek, dostarczając im energii w postaci ATP. Jednakże, w kontekście nowotworów, rola oksydazy glukozowej i ogólnego metabolizmu glukozy są złożone i mogą zależeć od charakterystyki danego nowotworu. Wiele nowotworów charakteryzuje się zmienionym metabolizmem, znanych jako efekt Warburga. Jest to proces, w którym komórki nowotworowe często przechodzą do intensywnej glikolizy, nawet w obecności tlenu (fenomen aerobowej glikolizy). Oksydaza glukozowa odgrywa rolę w etapach glikolizy, co umożliwia komórkom nowotworowym uzyskiwanie energii z glukozy w szybki i efektywny sposób. Oksydaza glukozowa bierze udział nie tylko w glikolizie, ale także w szlaku pentozofosforanowym, gdzie przyczynia się do produkcji NADPH. NADPH jest kluczowym koenzymem, który może być wykorzystywany do neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS – ang. Reactive Oxygen Species), chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym. Niektóre komórki nowotworowe mogą wykorzystywać NADPH w procesach,

które sprzyjają ich przeżyciu i proliferacji. Badania nad terapiami przeciwnowotworowymi często obejmują zrozumienie metabolizmu komórek nowotworowych, w tym ich zależności od glukozy. W niektórych przypadkach, próby hamowania szlaków metabolizmu glukozy, takich jak glikoliza, są podejmowane w celu osłabienia komórek nowotworowych. Warto podkreślić, że badania nad metabolizmem komórkowym w kontekście nowotworów są obszarem intensywnych dociekań, a zrozumienie tych procesów może prowadzić do rozwinięcia bardziej skutecznych strategii terapeutycznych. Zjawisko głodzenia nowotworu ("tumor starvation") odnosi się do strategii terapeutycznej, której celem jest wyeliminowanie lub ograniczenie dostarczania substancji odżywczych do komórek nowotworowych, co może prowadzić do zahamowania ich wzrostu i rozmnażania. To podejście opiera się na zrozumieniu, że nowotwory, aby rosnąć i się rozwijać, potrzebują odpowiednich zasobów odżywczych, takich jak glukoza, aminokwasy i inne substancje. Nowotwory rozwijają się poprzez tworzenie nowych naczyń krwionośnych, proces ten nazywany jest angiogenezą. Nowe naczynia dostarczają komórkom nowotworowym niezbędnych substancji odżywczych. Wspomniane strategie typu "tumor starvation" często koncentrują się na hamowaniu angiogenezy, co utrudnia dostęp komórek nowotworowych do substancji odżywczych. Komórki nowotworowe często wykazują zwiększone zapotrzebowanie na glukozę. Zmniejszenie dostępu do glukozy, na przykład za pomocą ograniczenia spożycia węglowodanów lub stosowanie leków przeciwnowotworowych, może wpływać na ograniczenie wzrostu komórek nowotworowych. Podejście "tumor starvation" jest często stosowane jako uzupełnienie innych form leczenia nowotworów, takich jak chirurgia, chemioterapia czy radioterapia. Warto jednak zaznaczyć, że strategie te są wciąż intensywnie badane, a ich skuteczność i potencjalne skutki uboczne wymagają dalszych badań klinicznych. W zakresie moich badań (**HON-P4**) został zoptymalizowany proces elektrostatycznego przyłączania enzymu GOX do konstruktyw Fe@C-NH-PEI i Fe@C-(CH₂)₂CONHPEI, a także oszacowana została ilość enzymu przyłączonego do konstruktyw. Porównano kinetykę stanu stacjonarnego utleniania β-D-glukozy przez tlen cząsteczkowy, reakcji katalizowanej przez GOX, stosując natywny enzym GOX uzyskany z *Aspergillus niger* i GOX sprzężony z nanocząstkami. Konstrukty Fe@CNH-PEI-GOX i Fe@C-(CH₂)₂-CONH-PEI-GOX powstały w wyniku oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy dodatnio naładowanymi nanocząstkami Fe@C-NH-PEI i Fe@C-(CH₂)₂CONH-PEI i ujemnie naładowany GOX w środowisku wodnym o pH 6. Aktywność unieruchomionego na pochodnych Fe@C-NH-PEI-GOX i Fe@C-(CH₂)₂-CONH-PEI-GOX enzymu została zachowana, z wartościami Km wynoszącymi odpowiednio 3271 i 1605 μM. Wyniki badań sugerują, że PEI jest obiecującym polimerem kationowym o dużej pojemności

ładowania białka, a uzyskiwanie koniugatów PEI-GOX to wysoce wydajne podejście do stabilnej immobilizacji enzymu GOX na nanocząsteczkach typu metal-grafen. Tego typu nanomateriały wykazują potencjał w ochronie białek przed destrukcją w organizmie poprzez różne strategie, takie jak stabilizacja struktury białek, kontrolowane uwalnianie, czy zabezpieczanie przed działaniem enzymów proteolitycznych. Nanomateriały zaprojektowane przeze mnie, wydajnie stabilizowały strukturę białka enzymatycznego, tak by w warunkach *in vivo* mogły chronić je przed ekstremalnymi warunkami środowiska. W ten sposób nanomateriały mogą pomagać w utrzymaniu aktywności biologicznej białek poprzez zapobieganie ich denaturacji. Kolejnym krokiem w takim podejściu może być kontrolowane uwalnianie białek w określonych miejscach i czasie. To pozwala na ochronę białek przed szybkim rozpadem w organizmie. Nanocząstki mogą być nośnikami, które chronią białka przed działaniem enzymów proteolitycznych, prowadzących do ich degradacji i umożliwiają ich precyzyjne dostarczenie do określonych obszarów organizmu. Warto jednak podkreślić, że bezpieczeństwo i skuteczność nanomateriałów stosowanych w ochronie białek przed destrukcją wymagają szczegółowych badań i analizy ich oddziaływania z organizmem, aby uniknąć potencjalnych skutków ubocznych (**HON-P4**) [25].

Przedkliniczne badania MRI we wczesnej diagnostyce hepatotoksyczności

Współczesna diagnostyka medyczna ewoluowała wraz z postępem technologii, a jednym z kluczowych narzędzi, które odgrywają znaczącą rolę w precyzyjnym rozpoznawaniu schorzeń, nie tylko nowotworowych, jest rezonans magnetyczny. Badania obrazowe przy użyciu tej zaawansowanej techniki dostarczają nie tylko niezrównanej jakości obrazów, ale również pozwalają na dogłębne zrozumienie struktury i funkcji różnych narządów w organizmie pacjenta. Od momentu, gdy rezonans magnetyczny został wprowadzony do praktyki klinicznej, stał się nieodłącznym elementem diagnostyki obrazowej. Zdolność tej techniki do generowania obrazów o wysokiej rozdzielczości, bez stosowania promieniowania jonizującego, sprawia, że jest ona bezpieczna dla pacjenta i jednocześnie skuteczna w identyfikacji nawet najdrobniejszych zmian w strukturze tkanek. Dodatkowo rozwój nowych algorytmów analizy obrazów umożliwia automatyczną detekcję i klasyfikację zmian, co przyspiesza proces diagnostyczny. W tym kontekście wykorzystując wyżej opisane korzyści oraz nowoczesne podejście do wykorzystania tej technologii, moje badania poszły także w kierunku zastosowania rezonansu magnetycznego w diagnostyce dwóch różnych stanów

chorobowych związanych z wątrobą: polekowym uszkodzeniem wątroby (DILI – ang. Drug-induced Liver Injury) **(HON-P5)** [26] oraz niealkoholową chorobą stłuszczeniową wątroby (NAFLD – ang. Nonalcoholic Fatty Liver Disease) **(HON-P6)** [27].

Lekowe uszkodzenie wątroby (DILI) stanowi istotny problem medyczny, związany z toksycznym wpływem leków na strukturę i funkcję wątroby. Jest to zjawisko, które może prowadzić do poważnych powikłań, z niewydolnością wątroby włącznie, co z kolei może skutkować wycofywaniem leków, wprowadzaniem ostrzeżeń oraz ograniczaniem stosowania zarejestrowanych już leków. DILI stanowi jedną z głównych przyczyn uszkodzenia wątroby na świecie. Wpływa na miliony pacjentów rocznie, generując znaczne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. DILI może być spowodowane lekami dostępnymi także bez recepty. Objawy DILI mogą obejmować żółtaczkę, ból brzucha, nudności, wymioty i niewydolność wątroby. Niemniej jednak, częstość występowania i nasilenie objawów zależy od rodzaju stosowanego leku, dawkowania oraz predyspozycji genetycznych pacjenta. Diagnoza opiera się na analizie objawów klinicznych, historii leczenia oraz wyników badań laboratoryjnych. Diagnoza DILI jest często utrudniona ze względu na zróżnicowane objawy i czas trwania ich występowania. Dodatkowo, trudność może sprawiać diagnoza różnicowa DILI i innych chorób wątroby. Współcześnie istnieje konieczność poszukiwania nowych biomarkerów, które umożliwią wczesne wykrywanie DILI. Obecnie stosowane metody, takie jak oznaczanie poziomu enzymów wątrobowych, nie zawsze są wystarczająco czułe i swoiste. DILI może prowadzić do konieczności przerwania leczenia lekami, co w przypadku chorób przewlekłych może być poważnym problemem. Dlatego istnieje potrzeba zbalansowanego podejścia do zarządzania ryzykiem i korzyścią z terapii. Badania przedkliniczne, takie jak te oparte na rezonansie magnetycznym, stanowią obiecującą drogę do zrozumienia i monitorowania uszkodzenia wątroby związanego z lekami. Mogą one dostarczać cennych informacji na etapie badań nad bezpieczeństwem leków. Istniejące metody oceny DILI są niewystarczające, co skłoniło Europejską Agencję Leków (EMA) i Amerykańską Administrację ds. Żywności i Leków (FDA) do ostrzeżenia przed koniecznością ponownego przeanalizowania biomarkerów toksyczności wątroby. Rezonans magnetyczny wydaje się być odpowiednim narzędziem do badania skutków DILI zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych, umożliwiając doskonałą wizualizację stanu patologicznego wątroby. W moich badaniach ostre przedawkowanie paracetamolu zastosowano jako model hepatotoksyczności u szczurów rasy Wistar. Po przeprowadzeniu eksperymentu wykonane zostały standardowe wg RUCAM (the Roussel Uclaf Causality Assessment Method) badania histopatologiczne (H&E) oraz

oznaczenia aminotransferaz (ALT/AST). Przeprowadzono badania 1.5 T (63MHz) MRI z zastosowaniem obrazowania T2-zależnego, obrazowania dyfuzji (DWI) oraz obrazowania techniką Dixona. Obrazowanie techniką Dixona w rezonansie magnetycznym umożliwia jednocześnie uzyskanie dwóch obrazów z różnymi fazami sygnału, zwanych obrazami "In-phase" (IP) i "Out-of-phase" (OOP). Technika ta opiera się na obrazowaniu różnic w czasie relaksacji spinów protonów znajdujących się w różnych środowiskach magnetycznych, co umożliwia wykrycie różnic w zawartości tłuszczu i wody w badanym obszarze. W fazie IP, spiny protonów tłuszczu i wody są zsynchronizowane, co oznacza, że znajdują się w jednej fazie magnetyzacji, co wyrażane jest silniejszym sygnałem. Obraz IP dostarcza informacji na temat sumy sygnałów pochodzących od protonów tłuszczu i wody. W fazie OOP, spiny protonów tłuszczu i wody znajdują się w przeciwnych fazach magnetyzacji, co prowadzi do wzajemnego tłumienia sygnałów. Obraz OOP dostarcza informacji o różnicy między sygnałami pochodzącymi od protonów tłuszczu i wody. Technika obrazowania Dixona jest cennym narzędziem w diagnostyce wielu schorzeń, szczególnie tych związanych ze zmianami w zawartości tłuszczu i wody w badanych strukturach anatomicznych [28]. Wyniki analizy obrazów T2-zależnych nie ujawniły żadnych konkretnych zmian jakościowych w parenchymie wątroby u szczurów traktowanych paracetamolem. Niemniej jednak, analiza statystyczna czasów relaksacji T2 wykazała istotne różnice między grupą kontrolną a szczurami narażonymi na paracetamol (1 g/kg i 1.5 g/kg masy ciała). Ten rodzaj zmian hipointensywnych został potwierdzony przez histopatologiczną analizę tkanek wątroby szczura po wybarwieniu i hematoksyliną i eozyną. Zarówno paracetamol w dawce 1 g/kg, jak i 1.5 g/kg m.c. spowodował niewielką hiperplazję przewodów żółciowych, skąpą infiltrację jednojądrzastych komórek zapalnych oraz zmiany w jądrach i utratę cholangiocytołów. Obrazowanie dyfuzji (DWI) ujawniło natomiast ograniczoną dyfuzję wody w przestrzeni pozakomórkowej parenchymy wątroby u szczurów narażonych na paracetamol w porównaniu z zwierzętami kontrolnymi. Analiza ilościowa map parametrycznych wykazała obniżone wartości pozornego współczynnika dyfuzji (ADC – ang. Apparent Diffusion Coefficient) parenchymy wątroby u szczurów po paracetamolu. Zjawisko to obserwowano jako ciemniejszy obraz wątroby w pomiarowych obszarach zainteresowania (ROI – ang. Region of Interest). Obrazy Dixona nie ujawniły żadnych różnic jakościowych w badanej wątrobie w trybach IP i OOP zarówno u szczurów kontrolnych, jak i traktowanych paracetamolem. Jednakże wykazały one różnice ilościowe w składzie tłuszczu w parenchymie wątroby u zwierząt z grupy narażanej na paracetamol. Zaobserwowano wzrost intensywności sygnału (IS – ang. Signal Intensity) u zwierząt po narażeniu w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Należy zauważyć, że

zwiększona degeneracja tłuszczowa była również obserwowana w analizie histopatologicznej. W dotkniętych cholangiocytach zaobserwowano obrzmienie jąder komórkowych i marginację chromatyny. W parenchymie wątroby zmiany były słabo wyrażone, głównie w postaci drobnokropelkowej degeneracji tłuszczowej i pojedynczych komórek objętych martwicą. Wszystkie te zmiany nie były obserwowane u szczurów kontrolnych. Co interesujące, aktywność ALT i AST nie wykazała istotnych statystycznie różnic ($P < 0,05$) między grupą kontrolną a badaną. Jakościowe wyniki badania MRI nie wykazały żadnych poważnych zmian ogniskowych w obrazach T2-zależnych, co prawdopodobnie wynika z krótkiego czasu pomiędzy podaniem paracetamolu a badaniem MRI wykonanym 24 godziny po nim. Jednakże zaobserwowaliśmy pewne statystycznie istotne różnice w mięszu wątroby szczurów kontrolnych i szczurów narażonych na paracetamol pod względem ilościowych parametrów MRI, takich jak czasy relaksacji T2, wartości ADC i wartości wskaźnika SI. Należy zauważyć, że pierwsze dwa parametry (czasy relaksacji T2 i wartości ADC) wyraźnie odzwierciedlają uszkodzenia o charakterze zapalnym w mięszu wątroby po narażeniu ostrym na paracetamol. Spadek wartości ADC u szczurów po paracetamolu wskazuje na ograniczoną dyfuzję cząsteczek wody w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i może być powiązany z wczesną martwicą hepatocytów, naciekiem niektórych komórek zapalnych i zmianami w cholangiocytach. Te wyniki MRI potwierdzono badaniem histopatologicznym wycinków wątroby. Patologie wątroby, takie jak marskość, stłuszczenie i hemochromatoza, również wykazały niższe wartości ADC po przedawkowaniu paracetamolu [18], co pokazuje, że technika DWI jest przydatna w diagnostyce zdarzeń niepożądanych związanych z wątrobą. Ponadto przypuszczano, że wzrost wartości wskaźnika SI u szczurów leczonych paracetamolem odzwierciedla pewne zwyrodnienia tłuszczowe hepatocytów; wynik ten był zgodny z naszymi wynikami histopatologicznymi (**HON-P5**) [26].

Niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby (NAFLD) to schorzenie, które charakteryzuje się gromadzeniem nadmiaru tłuszczu w komórkach wątroby u osób, które nie spożywają nadmiernych ilości alkoholu. Jest to jedno z najczęstszych schorzeń wątroby na świecie, a precyzyjna diagnoza i ocena stanu choroby mają kluczowe znaczenie prognostyczne. NAFLD stanowi poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego ze względu na jej rosnącą częstość występowania i potencjalne powikłania. W diagnostyce i monitorowaniu NAFLD techniki obrazowania, a zwłaszcza rezonans magnetyczny, pełnią kluczową rolę. Biomarkery w MRI umożliwiają dokładną ocenę stopnia stłuszczenia wątroby oraz ewaluację powiązanych zmian morfologicznych oraz są kluczowe w monitorowaniu postępu choroby i ocenie

skuteczności terapii w przypadku NAFLD. Ich zastosowanie pozwala na nieinwazyjne i dokładne ocenianie zmian w strukturze i funkcji wątroby, co ma istotne znaczenie w skutecznym zarządzaniu chorobą. W miarę postępu technologii obrazowania, rozwijane są coraz bardziej zaawansowane metody oceny NAFLD przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego. W kolejnej pracy zaproponowałam zastosowanie wieloparametrycznego MRI w obrazowaniu całego ciała w celu diagnozowania otyłości i NAFLD, co oparte było na badaniach przedklinicznych wykonanych z udziałem szczurów karmionych wysokokaloryczną dietą (HFD – ang. High Fat Diet). W badaniach zastosowano różne techniki MRI, takie jak obrazowanie T2-zależne, technika Dixona oraz obrazowanie dyfuzji (DWI). Wyniki badań obejmowały analizę jakościową i ilościową, a dodatkowo przeprowadzono badania histopatologiczne i analizę składu kwasów tłuszczowych w wątrobie. Jakościowa i ilościowa analiza obrazów DWI i Dixona ujawniła nieprawidłowości w wątrobie szczurów otrzymujących dietę wysokotłuszczową przez 12 tygodni. Analiza jakościowa DWI wykazała zmniejszenie dyfuzji cząsteczek wody w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową w porównaniu z grupą kontrolną. Potwierdziła to analiza wartości pozornego współczynnika dyfuzji (ADC) mierzonych w wątrobie, gdyż wykazano istotne statystycznie różnice ($p = 0,001$) pomiędzy grupą kontrolną a grupą stosującą dietę wysokotłuszczową. Zmiany w rozmieszczeniu tłuszczu w miększu wątroby spowodowane dietą wysokotłuszczową wykryto również za pomocą obrazowania Dixona. Analiza intensywności sygnału (SI) ujawniła znaczny wzrost ($p = 0,001$) sygnałów tłuszczu wraz ze znacznym spadkiem ($p = 0,005$) intensywności sygnałów pochodzących od cząsteczek wody w miększu wątroby szczurów HFD w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza ilościowa sekwencji Dixona pozwoliła także oszacować pewne zmiany w profilu tkanki tłuszczowej całego ciała. W celu oszacowania objętości tkanki tłuszczowej pomiary przeprowadzono dla pięciu wartości odcięcia intensywności sygnału (SI 100, 150, 200, 300). Statystycznie istotny wzrost całkowitego tłuszczu ($p < 0,0005$) u szczurów żywionych dietą wysokotłuszczową wyrażono jako liczbę wokseli tłuszczu i całkowitą objętość tłuszczu. Zmiany w metabolizmie lipidów szczurów HFD znalazły również odzwierciedlenie w statystycznie istotnym wzroście ($p = 0,005$) stężeń trójglicerydów w surowicy. Analiza histologiczna wycinków wątroby potwierdziła zmiany w kierunku stłuszczenia wątroby, co wykazano w badaniach MRI. Obrazy histologiczne H&E ujawniły głównie wielokropelkowe zwyrodnienia tłuszczowe, cechy łagodnego obrzęku miększu. Stwierdzono także wzmożony naciek miększu przez pojedyncze komórki, głównie limfocyty i makrofagi. Szczury karmione standardową karmą laboratoryjną wykazywały prawidłową histologię wątroby. Profilowanie kwasów tłuszczowych w tkankach

wątroby szczurów ujawniło również znaczny wzrost ($p < 0,0001$) całkowitego poziomu kwasów tłuszczowych (FA) z powodu diety wysokotłuszczowej. Na podstawie profilowania lipidomicznego wykryto co najmniej 70 FA, z czego 65 różniło się znacząco stężeniem w grupach. Co najmniej 24 z nich istotnie ($p < 0,05$) wzrosło, 23 istotnie ($p < 0,05$) zmalało, a pozostałych 19 FA pojawiło się w tkance wątroby szczura po raz pierwszy w wyniku zastosowania diety wysokotłuszczowej. Analiza wyników potwierdza zmiany w profilu tłuszczowym wątroby, a MRI dostarcza zarówno danych jakościowych, jak i ilościowych na temat rozkładu tłuszczu w organizmach szczurów. Badania sugerują, że techniki MRI, takie jak DWI i metoda Dixona, mogą dostarczać kompleksowych danych dotyczących rozkładu tłuszczu w całym ciele i wątrobie, co czyni MRI obiecującą i nieinwazyjną oraz umożliwia określenie translacyjnych biomarkerów w diagnostyce NAFLD (**HON-P6**) [27].

3.3.4. Podsumowanie

W ramach osiągnięcia habilitacyjnego przeprowadziłam badania nad zastosowaniem nanocząstek, w szczególności nanocząstek magnetycznych typu metal-grafen (CEINS) oraz nanomateriałów funkcjonalizowanych przeciwciałami, w celu poprawy diagnostyki obrazowej w medycynie, zwłaszcza w kontekście nowotworów i schorzeń wątroby. W efekcie prowadzonych przez mnie badań można zauważyć:

1. Wykorzystanie nanocząstek jako substancji kontrastujących w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (MRI). Jest to nowatorskie podejście do poprawy jakości obrazów i precyzji diagnostyki w różnych obszarach medycyny.
2. Określenie właściwości magnetycznych i relaksometrycznych nanocząstek typu metal-grafen (CEINS), co jest istotne w ich potencjalnym wykorzystaniu jako środków kontrastujących w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego. Jest to nowatorskie podejście w kontekście rozwoju nanotechnologii w diagnostyce onkologicznej.
3. Skuteczną funkcjonalizację nanocząstek grafenowych przeciwciałami monoklonalnymi w celu ukierunkowanego dostarczania substancji terapeutycznych do komórek nowotworowych. To nowe podejście pozwala na precyzyjne celowanie w komórki nowotworowe, co może znacząco zwiększyć skuteczność terapii.
4. Możliwość kapsułkowania białek w nanocząsteczkach w celu poprawy ich stabilności i wykorzystania w biomedycynie. Takie podejście może znacząco wpłynąć na rozwój terapii

opartej na dostarczaniu białek (w tym enzymatycznych), także w terapii celowanej nowotworów.

5. Wykorzystanie nanocząstek magnetycznych otoczonych grafenem (GEMNS) jako nośników genów do celów terapeutycznych. Wykorzystanie takich nanowektorów w terapii genowej stanowi nowatorskie podejście, które może być bezpieczne i skuteczne.

6. Zastosowanie rezonansu magnetycznego w diagnostyce dwóch różnych stanów chorobowych związanych z wątrobą: polekowym uszkodzeniem wątroby (DILI) i niealkoholową chorobą tłuszczową wątroby (NAFLD). Jest to nowe zastosowanie zaawansowanej techniki obrazowania w diagnostyce tych schorzeń, co może poprawić ich wczesne wykrywanie i leczenie.

Wkład wyżej opisanego osiągnięcia habilitacyjnego w rozwój dyscypliny jest widoczny poprzez przeprowadzenie nowatorskich badań nad zastosowaniem zaawansowanych technologii, takich jak nanotechnologia i obrazowanie rezonansem magnetycznym, w celu poprawy diagnostyki i terapii chorób, szczególnie nowotworów i schorzeń wątroby. Ponadto badania nad zastosowaniem nanomateriałów typu metal-grafen sfunkcjonalizowanych PEI jako wektora do przenoszenia materiału genetycznego przyczyniają się do lepszego zrozumienia i rozwoju terapii genowej poprzez opracowanie nowego, efektywnego i bezpiecznego nośnika genów, który może mieć zastosowanie zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i potencjalnych terapiach genowych dla pacjentów z nowotworami. Postępy w nanotechnologii znacząco przyczyniły się do rozwoju dziedziny biomedycyny, oferując nowatorskie rozwiązania w zakresie diagnostyki, dostarczania leków i obrazowania celowanego. Wyniki prowadzonych przez mnie badań przedklinicznych podkreślają potencjał przełożenia tych technologii na praktyczne zastosowania kliniczne, zwiastując nową erę medycyny spersonalizowanej i poprawę wyników leczenia pacjentów. Osiągnięcia te podkreślają transformacyjny wpływ zaawansowanych technik obrazowania i terapii wykorzystujących nanocząsteczki do usprawnienia oceny uszkodzenia wątroby po ukierunkowane dostarczanie leków i innowacyjne środki kontrastowe do MRI, od chorób wątroby po badania nad rakiem – innowacje te torują drogę do bardziej precyzyjnych, nieinwazyjnych i ukierunkowanych interwencji medycznych, wyznaczając znaczące kamienie milowe w dziedzinie nauk medycznych. Postępy te zwiastują nową erę w opiece zdrowotnej, obiecując bardziej precyzyjne i skuteczne interwencje w najbliższej przyszłości. Przedstawione badania poszerzają wiedzę na temat potencjalnych zastosowań nanomateriałów w medycynie oraz przyczyniają się do rozwoju skuteczniejszych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Badania, w których biorę udział wskazują, że nanotechnologia wsparta nowoczesną techniką MRI może stanowić obiecujące narzędzie do poprawy skuteczności diagnozowania oraz leczenia różnych stanów patologicznych, jednocześnie minimalizując toksyczność nowych środków stosowanych w diagnostyce i leczeniu.

3.4. Bibliografia

1. Kumar, N., Chamoli, P., Misra, M., Manoj, M. K., Sharma, A., Advanced metal and carbon nanostructures for medical, drug delivery and bio-imaging applications. *Nanoscale*, 2022. 14(11): p. 3987-4017.
2. Mauro, N., Utzeri, M. A., Varvarà, P., Cavallaro, G., Functionalization of Metal and Carbon Nanoparticles with Potential in Cancer Theranostics. *Molecules*, 2021. 26(11).
3. Giri, P.M., A. Banerjee, and B. Layek, A Recent Review on Cancer Nanomedicine. *Cancers*, 2023. 15(8).
4. **HON-PP1 - Bamburowicz-Klimkowska M.**, Poplawska M., Grudzinski I.P. Nanocomposites as biomolecules delivery agents in nanomedicine. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17(1):48.
5. Tashima T. Delivery of Drugs into Cancer Cells Using Antibody-Drug Conjugates Based on Receptor-Mediated Endocytosis and the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Antibodies*. 2022;11(4).
6. Ejigah V, Owoseni O, Bataille-Backer P, Ogundipe OD, Fisusi FA, Adesina SK. Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Polymers*. 2022;14(13).
7. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(8).
8. Huang D, Sun LN, Huang L, Chen YZ. Nanodrug Delivery Systems Modulate Tumor Vessels to Increase the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(2).
9. Anani T, Rahmati S, Sultana N, David AE. MRI-traceable theranostic nanoparticles for targeted cancer treatment. *Theranostics*. 2021;11(2):579-601.
10. Chen BD, Liu LH, Yue RY, Dong Z, Lu C, Zhang C, et al. Stimuli-responsive switchable MRI nanoprobe for tumor theranostics. *Nano Today*. 2023;51.
11. Liu MH, Yuan J, Wang GZ, Ni NY, Lv Q, Liu SQ, et al. Shape programmable T1-T2 dual-mode MRI nanoprobe for cancer theranostics. *Nanoscale*. 2023;15(10):4694-724.
12. Borse K, Shende P. Advances of nanoworms in diagnosis, treatment, and theranostics. *Materials Advances*. 2023;4(18):4041-53.
13. Wang YX, Li SM, Ren XL, Yu SP, Meng XW. Nano-engineering nanomedicines with customized functions for tumor treatment applications. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023;21(1).
14. Ren XQ, Chen HW, Yang V, Sun DX. Iron oxide nanoparticle-based theranostics for cancer imaging and therapy. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2014;8(3):253-64.
15. **HON-P1 - Grudzinski I.P.**, Bystrzejewski M., Bogorodzki P., Cieszanowski A., Szeszkowski W., Poplawska M., **Bamburowicz-Klimkowska M.** Comprehensive magnetic

resonance characteristics of carbon-encapsulated iron nanoparticles: a new frontier for the core-shell-type contrast agents. *Journal of Nanoparticle Research*. 2020;22(4).

HON-P2 - 16. Bamburowicz-Klimkowska M., Bystrzejewski M., Kasprzak A., Cieszanowski A., Grudzinski I.P. Monoclonal antibody-navigated carbon-encapsulated iron nanoparticles used for MRI-based tracking integrin receptors in murine melanoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2024;55:1-8.

17. Polzehl J, Tabelow K. *Diffusion-Weighted Imaging. Magnetic Resonance Brain Imaging: Modeling and Data Analysis Using R*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 81-146.

18. Bharwani N, Koh DM. Diffusion-weighted imaging of the liver: an update. *Cancer Imaging*. 2013;13(2):171-85.

19. Messina C, Bignone R, Bruno A, Bruno A, Bruno F, Calandri M, et al. Diffusion-Weighted Imaging in Oncology: An Update. *Cancers*. 2020;12(6).

20. Han CP, Zhang AW, Kong Y, Yu NN, Xie T, Dou BR, et al. Multifunctional iron oxide-carbon hybrid nanoparticles for targeted fluorescent/MR dual-modal imaging and detection of breast cancer cells. *Analytica Chimica Acta*. 2019;1067:115-28.

21. Tiwari A, Verma NC, Turkkan S, Debnath A, Singh A, Draeger G, et al. Graphitic Carbon Coated Magnetite Nanoparticles for Dual Mode Imaging and Hyperthermia. *Acs Applied Nano Materials*. 2020;3(1):896-904.

22. Fatima H, Kim KS. Iron-based magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Advanced Powder Technology*. 2018;29(11):2678-85.

23. Gao ZY, Ma TC, Zhao EY, Docter D, Yang WS, Stauber RH, et al. Small is Smarter: Nano MRI Contrast Agents - Advantages and Recent Achievements. *Small*. 2016;12(5):556-76.

HON-P3 - 24. Bamburowicz-Klimkowska M., Malecki M., Bystrzejewski M., Kasprzak A., Grudzinski I.P. Graphene-encapsulated iron nanoparticles as a non-viral vector for gene delivery into melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023;652:84-7.

HON-P4 - 25. Bamburowicz-Klimkowska M., Kasprzak A., Bystrzejewski M, Poplawska M, Sobczak K, Grudzinski IP. Characteristics of glucose oxidase immobilized on carbon-encapsulated iron nanoparticles decorated with polyethyleneimine. *Polymer Bulletin*. 2021; 80:1565–1586

HON-P5 - 26. Grudzinski I.P., Ruzycka M., Cieszanowski A., Szeszkowski W., Badurek I., Malkowska M, **Bamburowicz-Klimkowska M.** MRI-based preclinical discovery of DILI: A lesson from paracetamol-induced hepatotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019;108.

HON-P6 - 27. Bamburowicz-Klimkowska M., Ruzycka-Ayoush M, Cieszanowski A, Szeszkowski W, Bialek M, Malkowska A, et al. New insights into NAFLD based on preclinical MRI studies. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2022;244.

28. Ma JF. Dixon techniques for water and fat imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2008;28(3):543-58.

4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Prace naukowo-badawcze nie wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego przedstawiam w podziale na dwie części: przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych (podrozdział 4.1) oraz po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych (podrozdział 4.3). Lista publikacji, która dotyczy tych okresów mojej działalności badawczej jest przedstawiona jako **A1 – A10** oraz **B1 – B22** i zamieszczona odpowiednio w podrozdziałach 4.2 i 4.4.

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Moja praca w Zakładzie Toksykologii (obecnie Zakład Toksykologii i Bromatologii) wynikała z zainteresowania już w trakcie studiów na wydziale farmaceutycznym dziedziną nauki poświęconą badaniom nad wpływem substancji chemicznych na organizmy biologiczne oraz identyfikacją i zrozumieniem mechanizmów występowania efektów toksycznych [29]. Badania toksykologiczne, które prowadziłam od początku mojej kariery, przyniosły szereg nowych odkryć i innowacyjnych podejść, które istotnie wpłynęły na rozwój tej dziedziny nauki.

1. **Nowe podejścia w analizie toksykologicznej** – Rozpoczęłam od identyfikacji substancji chemicznych, które mogą wywierać działanie toksyczne. Nowością było skoncentrowanie się nie tylko na tradycyjnych toksynach, ale również na nowych, takich jak nanomateriały. Badania te obejmowały również ocenę dawkowania i czasu ekspozycji, co pozwoliło na lepsze zrozumienie reakcji organizmu na różne poziomy narażenia i ich wpływ na zdrowie. Wielkie znaczenie analizy toksykologicznej skłoniło mnie do opracowania materiałów dla studentów programu Erasmus w formie skryptu pod tytułem „Analytical toxicology” **A1**[30].
2. **Innowacyjne podejście do separacji i oznaczania neuroprzekaźników** – Moje badania skupiły się na zastosowaniu polimerów imprintowanych (MIP) do selektywnej separacji i oznaczania neuroprzekaźników, takich jak hydrochlorowoderek dopaminy i tryptaminy. Opracowane przeze mnie protokoły ekstrakcji na bazie MIP umożliwiły skuteczną izolację i oznaczanie tych związków nawet w obecności innych substancji, co stanowi istotny postęp w analizie toksykologicznej.
Opracowane i zwalidowane przeze mnie procesy izolacji analitów na MIP potwierdzały wyniki analizy chromatograficznej pokazujące, że MIP skutecznie zatrzymuje

hydrochlorowoderek dopaminy, umożliwiając jego selektywne oddzielenie. MIP wykazał zdolność izolacji dopaminy w procedurze ekstrakcji na fazie stałej, a jego wydajność została porównana z polimerem nieimprintowanym (NIP), potwierdzając wyższą selektywność MIP dla dopaminy **A2-A3** [31, 32]. Zastosowanie opracowanych przez mnie protokołów pozwoliło na uzyskanie niskich limitów detekcji i oznaczalności dla dopaminy, a także skutecznie zidentyfikowanie i oznaczanie dopaminy w rzeczywistych próbkach moczu **A4** [33]. Opracowałam także skuteczną strategię oznaczania tryptaminy w obecności konkurencyjnych związków po izolacji za pomocą sorbentu MIP, którego zdolność do selektywnej ekstrakcji tryptaminy następnie została zweryfikowana z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Metoda ta pozwoliła na precyzyjne ilościowe oznaczanie tryptaminy w ludzkim płynie mózgowo-rdzeniowym, nawet w obecności innych związków, jak tryptofan czy serotonina **A5** [34].

- 3. Badania interakcji leków i mechanizmów MDR** - Kolejnym obszarem badań było zrozumienie interakcji między lekami oraz mechanizmów oporności wielolekowej (MDR). Moje badania wykazały istotne zmiany w farmakokinetyce leków w zależności od podawanych substancji oraz ich wpływ na skuteczność terapii [35]. Interakcje między lekami mogą prowadzić do zmian w metabolizmie lub eliminacji leku, co z kolei zwiększa ryzyko wystąpienia działań niepożądanych i toksyczności [36]. Interakcje między lekami mogą różnić się w zależności od cech indywidualnych, co podkreśla konieczność spersonalizowanego podejścia do leczenia [37]. Badania oparłam na modelu interakcji między chinidyną (QD) i ekstraktem z grejpfruta (GFJ), inhibitorami glikoproteiny P (Pgp), a stężeniem domperidonu (DOM) w osoczu szczura. DOM, będący antagonistą receptorów dopaminergicznych D, jednocześnie pełni rolę substratu dla glikoproteiny P. Moje badania wykazały, że podawanie DOM po GFJ lub QD znacząco zwiększa jego stężenie, co potencjalnie wpływa na bioaktywność leku **A6** [38]. Zrozumienie funkcji różnych subrodzin transporterów ABC stanowi kluczowy element oceny dostępności biologicznej leków i potencjalnych interakcji między nimi. W oparciu o powyższą wiedzę badałam złożone interakcje między DOM a QD z niestandardowym podawaniem leku w modelu zwierzęcym **A7-A8** [39, 40].

Ponadto, identyfikacja roli transporterów ATP-zależnych, zwłaszcza glikoproteiny P, w procesach wchłaniania i eliminacji leków stanowiła istotny wkład w rozwój strategii leczenia nowotworów. W tej kwestii, kluczowym mechanizmem MDR są transportery zależne od ATP, w tym szczególnie glikoproteina P, oraz inne transportery z rodziny

ABC (ang. ATP-Binding Cassette) **A9** [41]. Badania prowadzone przez mnie znacznie poszerzyły wiedzę na temat wpływu interakcji między lekami na farmakokinetykę, rolę transporterów ATP-zależnych oraz zwróciły moją uwagę w kierunku zwalczania zjawiska oporności wielolekowej (MDR) oraz na potencjalne zastosowania nanotechnologii w terapii przeciwnowotworowej **A10** [42]. Zrozumienie mechanizmów MDR, szczególnie związanych z transporterami zależnymi od ATP, jest kluczowe dla opracowania skutecznych strategii leczenia nowotworów. Praca nad inhibicją tych transporterów oraz innowacyjnymi terapiami pozwala na przełamanie bariery oporności wielolekowej, otwierając nowe perspektywy w dziedzinie onkologii [43, 44].

Prowadzone przez mnie badania nie tylko przyniosły nowe spojrzenie na mechanizmy działania substancji chemicznych oraz interakcje między lekami, ale również przyczyniła się do rozwoju technik analitycznych. Wyżej opisane wykonane przeze mnie badania wniosły istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk medycznych, szczególnie w obszarze farmacji, poprzez nowatorskie podejścia badawcze oraz odkrycia, które mają potencjał przynieść korzyści zarówno dla nauki, jak i praktyki klinicznej.

4.2. Bibliografia

29. Flanagan, R., et al., *Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic*, in *Fundamentals of Analytical Toxicology*. 2020, John Wiley & Sons, Ltd. p. i-xlvi.

A1 - 30. **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, *Analytical Toxicology*. 2020: Medical University of Warsaw.

A2 - 31. Luliński, P., Maciejewska, D., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szutowski, M., Dopamine-Imprinted Polymers: Template-Monomer Interactions, Analysis of Template Removal and Application to Solid Phase Extraction. *Molecules*, 2007. 12(11): p. 2434-2449.

A3 - 32. Lulinski, P., Maciejewska, D., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szutowski, M., Preliminary Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer Synthesized with Dopamine Hydrochloride as a Template in 9th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. *ECSOC-9*. 2005.

A4 - 33. Lulinski, P., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Dana, M., Szutowski, M., Maciejewska, D., Efficient strategy for the selective determination of dopamine in human urine by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, 2016. 39(5): p. 895-903.

A5 - 34. Lulinski, P., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Dana, M., Maciejewska, D., Development of a validated strategy for the determination of tryptamine in human cerebrospinal fluid in the presence of competitors using molecularly imprinted polymers. *Journal of Separation Science*, 2017. 40(8): p. 1824-1833.

35. Gupta, P., Principles and basic concepts of toxicokinetics, in *Fundamentals of Toxicology*. 2016, Elsevier Inc. All. p. 87-107.

36. Yasuda, K., et al., A comprehensive *in vitro* and *in silico* analysis of antibiotics that activate pregnane X receptor and induce CYP3A4 in liver and intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, 2008. 36(8): p. 1689-1697.
37. Evans, W.E. and M.V. Relling, Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999. 286(5439): p. 487-491.
- A6 - 38. Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Potentas, A., Zywiec, K., Szutowski, M., Impact of the changes in P-glycoprotein activity on domperidone pharmacokinetics in rat plasma. *Pharmacological Reports*, 2007. 59 p. 752-756.
- A7 - 39. Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szost, T., Malkowska, A., Szutowski, M., Quinidine and domperidone interactions in the rat Experimental model of repeated administration. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 2016. 73(4): p. 1057-1066.
- A8 - 40. Bamburowicz-Klimkowska, M.**, T. Szost, and M. Szutowski, Wpływ chinidyny na farmakokinetykę domperidonu u szczura przy zastosowaniu modelu wielokrotnego podawania, *Toksykologia w ocenie bezpieczeństwa chemicznego ludności*. 2011, BEL Studio Sp. z o.o.
- A9 - 41. Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Bogucka, U., Szutowski, M., Functions Of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 2011. 3: p. 34-40.
- A10 - 42. Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szutowski, M., Strategies To Combat Multidrug Resistance Of Cancer. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 2012. 1: p. 1 - 8.
43. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2002. 2(1): p. 48-58.
44. Nakanishi, T. and D.D. Ross, Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer*, 2012. 31(2): p. 73-99.

4.3. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Kluczowymi aspektami moich badań wynikającymi z zainteresowania nanomateriałami, są obecność i charakterystyka nanomateriałów oraz ich oddziaływanie z komórkami. Nanotechnologia otwiera nowe możliwości w wykrywaniu i leczeniu chorób, a moje badania skupiły się na wykorzystaniu nanocząstek do celów terapeutycznych oraz diagnostycznych. Moja działalność badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych dotyczyła niżej opisanych obszarów:

1. Cytoksyczość nanocząstek typu metal-grafen (CEINs)

- przedstawiono nowatorskie podejście do badania cytotoxyczości nanocząstek typu CEINs.

- wykazano istotność charakteryzacji fizykochemicznej CEINs w interakcjach z komórkami śródbłónka.
- opisano zależność między dawką CEINs a ich cytotoksycznością.

Badania nad cytotoksycznością nanocząstek typu metal-grafen (CEINs) stanowią istotny wkład w zrozumienie interakcji między nanomateriałami a komórkami organizmu, co ma kluczowe znaczenie w opracowywaniu nowych terapii przeciwnowotworowych **B1** [45].

2. Zastosowanie polietylenoiminy (PEI) w nanotechnologii i biotechnologii

W kontekście hybrydowych nanomateriałów, PEI jest często wykorzystywane jako składnik funkcjonalizujący powierzchnię nanocząstek. Polietylenoimina (PEI) to poliaminowy związek chemiczny o wysokim stopniu rozgałęzienia, składający się z powtarzających się jednostek etylenoiminowych. PEI jest polimerem o dużej masie cząsteczkowej, charakteryzującym się zdolnością do tworzenia kompleksów z różnymi cząstkami i jonami dzięki obecności licznych grup aminowych naładowanych dodatnio w jego strukturze [46, 47].

- wykazano skuteczność dystrybucji PEI w tkankach embrionów *Danio rerio* **B2** [48].
- opracowano nanotransportery wykorzystujące PEI z kwasem foliowym jako potencjalne narzędzie w terapii przeciwnowotworowej **B3** [49]. Moja praca w zespole prowadzącym powyższe badania została doceniona przez Magnificencję Rektora WUM nagrodą naukową trzeciego stopnia.

Funkcjonalizacja nanomateriałów, takich jak polietylenoimina (PEI), celem dostarczania leków, reprezentuje nowatorskie podejście do terapii celowanej w leczeniu nowotworów.

3. Rola biosensorów w diagnostyce nowotworów

Niemniej ważną rolę w dziedzinie nanomedycyny pełni diagnostyka. Biosensory odgrywają kluczową rolę w dzisiejszej diagnostyce nowotworów, zapewniając nowoczesne i precyzyjne narzędzia do wykrywania biomarkerów związanych z tą chorobą. Ich rola jest kluczowa ze względu na kilka aspektów: (i) biosensory umożliwiają wczesną identyfikację specyficznych biomarkerów nowotworowych, co pozwala na rozpoznanie choroby we wczesnych stadiach rozwoju, zwiększając szanse na skuteczne leczenie, (ii) dzięki zaawansowanym technologiom detekcyjnym biosensory oferują wysoką precyzję i specyficzność, eliminując możliwość fałszywych wyników i zwiększając pewność diagnostyczną, (iii) biosensory umożliwiają monitorowanie skuteczności terapii nowotworowej

poprzez śledzenie zmian poziomu biomarkerów w odpowiedzi na leczenie, co pozwala dostosować strategię terapeutyczną, (iv) dzięki adaptacyjnym platformom, biosensory mogą być dostosowywane do wykrywania niestandardowych biomarkerów, co jest istotne w przypadku różnych typów nowotworów, (v) procesy detekcji za pomocą biosensorów są często szybkie i efektywne, co przyspiesza proces diagnostyczny i pozwala na natychmiastowe podejmowanie decyzji klinicznych oraz (vi) niektóre biosensory, zwłaszcza te wykorzystujące technologie nanotechnologiczne, mogą być stosowane w badaniach diagnostycznych z minimalnymi efektami ubocznymi, co zwiększa akceptację pacjentów. Biosensory stanowią więc kluczowe narzędzie w diagnostyce nowotworów, umożliwiając szybką, precyzyjną i efektywną analizę biomarkerów. Ponadto biosensory stanowią kluczowe narzędzie w wczesnym wykrywaniu i monitorowaniu nowotworów. Moje zainteresowanie biosensorymi skutkowało współautorstwem rozdziału w wydawnictwie PWN pod tytułem „Sensory chemiczne i biosensory” **B4** [50]. MMP to rodzina enzymów proteolitycznych, które odgrywają kluczową rolę w wielu procesach związanych z nowotworami. Ich funkcje obejmują kontrolę mikrośrodowiska komórkowego, procesy migracji komórkowej, angiogenezę, inwazję komórek nowotworowych oraz remodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej. Metaloproteinazy są zdolne do rozkładania składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takich jak kolagen, fibronektyna czy laminina [51]. Z uwagi na swoje istotne role w procesach inwazji i rozwoju nowotworów, metaloproteinazy są przedmiotem badań w kontekście diagnostyki oraz terapii przeciwnowotworowej [52]. W badaniach biosensorów, które prowadziłam w ramach stażu na Uniwersytecie Warszawskim oraz jako koordynator grantu NCN Opus18 (UMO-2019/35/B/ST4/02497) z ramienia WUM, zajmowałam się głównie charakteryzacją GC/MS receptorów użytych do ich konstrukcji oraz detekcją aktywnych form metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-1, MMP-2, MMP-9) w drobno (SCLC – small-cell lung cancer) i niedrobnokomórkowym (NSCLC – non-small cell lung cancer) raku płuca metodami ELISA. W tej dziedzinie:

- odkryto nowatorskie podejście do jednoczesnego wykrywania metaloproteinaz macierzy jako biomarkerów raka płuca **B5-B8** [53-56].

- zaproponowano innowacyjne immunosensory umożliwiające jednoczesne precyzyjne wykrywanie wielu typów MMPs jako biomarkerów różnych stadiów raka płuca **B9-B10** [57, 58]. Równoczesne wykrywanie wielu biomarkerów może zmniejszyć koszty diagnostyki medycznej, co przekłada się na poprawę precyzji i skuteczności diagnozy oraz prognozy chorób. Po raz pierwszy zaprezentowaliśmy niskokosztową, prostą

i szybką metodę jednoczesnego wykrywania trzech metaloproteinaz macierzy (MMP-1, MMP-2 i MMP-9), które odgrywają istotną rolę w postępowaniu teranostycznym w raku płuca.

- opracowano innowacyjne immunosensory, umożliwiające szybkie, proste i czułe oznaczanie stężenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs – ang. Extracellular Vesicles) izolowanych z komórek nowotworowych płuc, wykorzystując tetraspaniny jako biomarkery **B11** [59].

Badania nad biosensorami, umożliwiającymi szybką i precyzyjną analizę biomarkerów, mają kluczowe znaczenie dla wczesnego wykrywania oraz monitorowania postępów choroby. Opracowane immunosensory cechują się dużą stabilnością, szerokim zakresem analitycznym oraz niskim limitem detekcji. Wykorzystanie nanotechnologii w konstrukcji tych biosensorów podkreśla znaczenie interdyscyplinarnego podejścia w dziedzinie nauk medycznych.

4. Wykorzystanie hipertermii w terapii nowotworów

Hipertermia w terapii nowotworów to metoda leczenia, która polega na celowym podgrzewaniu tkanek do podwyższonej temperatury, zazwyczaj w zakresie 40–43°C. Hipertermia wywiera kilka korzystnych efektów w kontekście leczenia nowotworów. Podwyższona temperatura może zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące (radioterapię) oraz na działanie leków cytostatycznych (chemioterapię). To zjawisko jest szczególnie istotne, ponieważ niektóre typy komórek nowotworowych są mniej wrażliwe na standardowe metody leczenia. Pod wpływem hipertermii dochodzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych, co zwiększa przepływ krwi w obszarze guza. To może z kolei zwiększać dostępność leków cytostatycznych do komórek nowotworowych. Wysoka temperatura może stymulować proces apoptozy, czyli naturalnej śmierci komórkowej, w komórkach nowotworowych. Hipertermia może wpływać na mikrośrodowisko guza, modyfikując odpowiedź immunologiczną, co z kolei może wspierać zwalczanie komórek nowotworowych przez układ odpornościowy [60, 61]. To narzędzie terapeutyczne stanowi ciekawy obszar rozwoju technologii wspomagających walkę z nowotworami. Moja praca dotyczy badań z zastosowaniem hipertermii wywołanej podaniem do guza *in vivo* nanomateriału ferromagnetycznego.

- wykazano obiecujące właściwości ferromagnetyczne nanocząstek tlenku żelaza(III) domieszkowanych magnezem w hipertermii **B12** [62].

Swoje umiejętności analityczne oraz znajomość farmako-/toksykokinetyki wykorzystałam także biorąc udział w badaniach nad etyloglukuronidem (EtG) jako markerem spożyciem alkoholu etylowego, badaniach nad grzybami oraz badaniach nad wpływem wodnego ekstraktu z owoców przepękli ogórkowatej i oleju z nasion granatowca właściwego na profil lipidowy u szczurów, a także zafałszowaniami nielegalnego alkoholu oraz wpływu rozpuszczalników na biodostępność substancji chemicznych.

5. Etyloglukuronid jako biomarker spożycia alkoholu

EtG, jako bezpośredni produkt przemiany etanolu, stanowi użyteczny biomarker spożycia alkoholu. Badania nad etyloglukuronidem stanowią istotny wkład w ocenę spożycia alkoholu, szczególnie we krwi i włosach.

- wskazano, że różne ilości spożytego etanolu prowadzą do zróżnicowanych stężeń EtG we krwi i moczu **B13** [63]
- wykazano wpływ kofeiny na poziomy EtG, co może mieć znaczenie w praktyce klinicznej **B14** [64].

Badania nad etyloglukuronidem stanowią istotny wkład w analizę niedawnego spożycia alkoholu, rzucając nowe światło na związki między ilościami alkoholu a poziomami EtG w moczu i sierści szczurów. Osiągnięcia te mają potencjalne implikacje dla badań laboratoryjnych związanych nadużywaniem alkoholu. Wyniki tych badań wpływają na poprawę zrozumienia procesów metabolicznych związanych z EtG, co może mieć istotne znaczenie dla badań nad nadużywaniem alkoholu oraz oceny spożycia alkoholu na podstawie analizy moczu i włosów.

6. Analiza grzybów, kwasów tłuszczowych, alkoholu nielegalnego pochodzenia oraz innych substancji o potencjalnym znaczeniu w dziedzinie zdrowia publicznego oraz kontroli jakości spożywanych substancji

Badania nad truflami burgundzkimi (*Tuber aestivum* VITTAD.) i gromadzeniem selenu w grzybach stanowią znaczący wkład w dziedzinę nauk przyrodniczych, eksplorując wpływ środowiska na jakość trufli oraz mechanizmy akumulacji selenu w grzybach.

- opracowałam i wykonałam kompleksową analizę GC/MS składu chemicznego trufli zebranych z różnych regionów geograficznych, dzięki czemu wykazałam istotne różnice w zawartości wielu związków między truflami zebranymi w Polsce, na Słowacji i we Włoszech **B15** [65].

- wykonałam z zastosowaniem metody GC/MS ocenę efektywności gromadzenia selenu w grzybni po zastosowaniu różnych źródeł selenu **B16** [66].

Badania grzybów, w których brałam udział, poszerzają zrozumienie wpływu środowiska na skład chemiczny trufli oraz rzucają nowe światło na optymalne źródła selenu w hodowli grzybów. Te informacje mają potencjalne znaczenie dla produkcji żywności i przemysłowych zastosowań, podkreślając rolę nauk przyrodniczych w doskonaleniu procesów uprawy i jakości produktów spożywczych.

Badania nad kwasami tłuszczowymi w wodnym ekstrakcie z owoców przepękli ogórkowatej i oleju z nasion granatowca właściwego mają istotne znaczenie dla zrozumienia ich wpływu na zdrowie i profil lipidowy krwi. Rośliny te są powszechnie stosowane w tradycyjnej medycynie, zwłaszcza w Azji, w leczeniu chorób, takich jak cukrzyca i miażdżyca.

- wykazano, że diety uzupełnione wodnym ekstraktem z owoców przepękli ogórkowatej i olejem z nasion granatowca mogą mieć wpływ na poziomy glukozy, cholesterolu i tri glicerydów – suplementacja olejem z nasion granatowca może chronić przed wzrostem poziomu cholesterolu związanego z wiekiem **B17-B18** [67, 68].

- opracowałam metodę identyfikacji związków lotnych z zastosowaniem techniki GC/MS wg której przeanalizowano 200 próbek alkoholu pochodzenia nielegalnego oraz wykazano, że może on być zanieczyszczony różnymi substancjami, w tym toksycznymi ilościami metanolu, glikolu etylenowego i chloroformu **B19** [69].

Badania *in vivo* na modelu zwierzęcym sugerują, że stosowanie metanolu jako rozpuszczalnika może wpływać na biodostępność leków, takich jak fenacetyna czy chlorzoksazon.

- wykazano że, zastosowanie różnych rozpuszczalników może modyfikować kinetykę i biodostępność substancji, co ma znaczenie dla oceny efektów leczniczych **B20-B21** [70, 71].

- w badaniach na mikrosomach wątrobowych krów wykazano, że związki takie jak flawonoidy i saponiny mogą intensyfikować metabolizm albendazolu i fenbendazolu. Modyfikacje metabolizmu tych substancji przez metabolity roślinne mogą wpływać na skuteczność leczenia zwierząt **B22** [72].

Badania dotyczące kwasów tłuszczowych, alkoholu pochodzenia nielegalnego oraz wpływu rozpuszczalników na biodostępność substancji chemicznych w organizmach zwierząt mają szerokie znaczenie i implikacje w dziedzinie zdrowia publicznego oraz kontroli jakości spożywanych substancji. Podsumowując, badania, w których wykorzystałam głównie swoje umiejętności analityczne i znajomość chromatografii oraz metodyki pracy ze zwierzętami *in vivo* przyczyniają się do zrozumienia wpływu różnych substancji na zdrowie, biodostępność leków i jakość spożywanych substancji, co ma potencjalne implikacje dla zdrowia publicznego, badań nad lekami i kontroli jakości produktów spożywczych.

Podsumowując, badania, w których brałam udział stanowią istotny wkład w rozwój nauk medycznych i farmacji, zarówno pod względem nowatorskich osiągnięć, jak i praktycznych zastosowań. Jej badania przyczyniają się do postępu w diagnostyce i terapii nowotworów, a także mają znaczenie dla zdrowia publicznego i rolnictwa. Dzięki jej pracy, nauka medyczna i farmaceutyczna zdobywa nowe narzędzia i metody, które mogą poprawić jakość życia ludzi i przyczynić się do walki z chorobami.

4.4. Bibliografia

- B1** - 45. Cywinska, M.A., Bystrzejewski, M., Popławska, M., Kosmider, A., Zdanowski, R., Lewicki, S., Fijalek, Z., Ostrowska, A., **Bamburowicz, M.**, Cieszanowski, A., Grudziński, I.P., Internalization and cytotoxicity effects of carbon-encapsulated iron nanoparticles in murine endothelial cells: Studies on internal dosages due to loaded mass agglomerates. *Toxicology in vitro* : an international journal published in association with BIBRA, 2016. 34: p. 229-36.
46. Wang, C.F., et al., Emerging non-viral vectors for gene delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023. 21(1).
47. Zhao, C. and B.Q. Zhou, Polyethyleneimine-Based Drug Delivery Systems for Cancer Theranostics. *Journal of Functional Biomaterials*, 2023. 14(1).
- B2** - 48. Chmielewska, R., Gawlak, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Popławska, M., Grudziński, I.P., Distribution of polyethylenimine in zebrafish embryos. *Rocz Panstw Zakł Hig*, 2018. 69(3): p. 315-318.
- B3** - 49. Kasprzak, A., Grudziński, I.P., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Parzonko, A., Gawlak, M., Popławska, M., New Insight into the Synthesis and Biological Activity of the Polymeric Materials Consisting of Folic Acid and beta-Cyclodextrin. *Macromol Biosci*, 2017.
- B4** - 50. Brzózka, Z., E. Malinowska, and W. Wróblewski, **Sensory chemiczne i biosensory 2022**: Wydawnictwo Naukowe PWN.
51. Gonzalez-Avila, G., et al., Nanotechnology and Matrix Metalloproteinases in Cancer Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022. 9.
52. Piperigkou, Z., et al., Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer, in *Proteases and Cancer: Methods and Protocols*, S. Cal and A.J. Obaya, Editors. 2018. p. 325-348.

- B5 - 53.** Nisiewicz, M.K., Kowalczyk, A., Gajda, A., Kasprzak, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Grudzinski, I.P, Nowicka A.M., Enzymatic cleavage of specific dipeptide conjugated with ferrocene as a flexible ultra-sensitive and fast voltammetric assay of matrix metalloproteinase-9 considered a prognostic cancer biomarker in plasma samples. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022. 195.
- B6 - 54.** Nisiewicz, M.K., Gajda, A., Kowalczyk, A., Cupriak, A., Kasprzak, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Grudzinski, I.P, Nowicka A.M., Novel electrogravimetric biosensors for the ultrasensitive detection of plasma matrix metalloproteinase-2 considered a potential tumor biomarker. *Analytica Chimica Acta*, 2022. 1191.
- B7 - 55.** Kowalczyk, A., Nisiewicz, M.K., Kasprzak, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Nowicka A.M., A rapid, selective, and ultrasensitive voltammetric and gravimetric protocol for MMP-1 active form detection. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022. 10(42): p. 8696-8709.
- B8 - 56.** Nisiewicz, M.K., Kowalczyk, A., Sikorska, M., Kasprzak, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Koszytkowska-Stawinska M., Nowicka A.M., Poly(amidoamine) dendrimer immunosensor for ultrasensitive gravimetric and electrochemical detection of matrix metalloproteinase-9. *Talanta*, 2022. 247.
- B9 - 57.** Kowalczyk, A., Nisiewicz, M.K., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Kasprzak, A., Ruzycka-Ayoush M., Koszytkowska-Stawinska M., Nowicka A.M., Effective voltammetric tool for simultaneous detection of MMP-1, MMP-2, and MMP-9; important non-small cell lung cancer biomarkers. *Biosensors & bioelectronics*, 2023. 229.
- B10 - 58.** Winkler, K., Kowalczyk, A., Bereza, P., Regulska, K., Kasprzak, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Nowicka, A.M., Levels of active forms of MMP-1, MMP-2, and MMP-9 as independent prognostic factors for differentiating the stage and type of lung cancer (SCLC and NSCLC). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.135421>
- B11 - 59.** Kowalczyk, A., Gajda-Walczak, A., Ruzycka-Ayoush, M., Targonska, A., Mosieniak, G., Glogowski, M., Szumera-Cieckiewicz, A., Prochorec-Sobieszek, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Nowicka, A.M., Grudzinski I.P., Parallel SPR and QCM-D Quantitative Analysis of CD9, CD63, and CD81 Tetraspanins: A Simple and Sensitive Way to Determine the Concentration of Extracellular Vesicles Isolated from Human Lung Cancer Cells. *Analytical Chemistry*, 2023.
60. Comanescu, C., *Magnetic Nanoparticles: Current Advances in Nanomedicine, Drug Delivery and MRI*. *Chemistry-Switzerland*, 2022. 4(3): p. 872-930.
61. Lei, S., et al., *Magnetic Particle Imaging-Guided Hyperthermia for Precise Treatment of Cancer: Review, Challenges, and Prospects*. *Molecular Imaging and Biology*, 2023.
- B12 - 62.** Nowicka, A.M., Ruzycka-Ayoush, M., Kasprzak, A., Kowalczyk, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Sikorska, M., Sobczak, K., Donten, M., Ruszczynska, A., Nowakowska J., Grudzinski I.P., , Application of biocompatible and ultrastable superparamagnetic iron(iii) oxide nanoparticles doped with magnesium for efficient magnetic fluid hyperthermia in lung cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023.
- B13 - 63.** Malkowska, A., Szutowski, M., Dyr, W., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Excretion of ethyl glucuronide in the urine of Warsaw high preferring rats depends on the

concentration of ingested ethanol. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 2016. 73(4): p. 1067-1072.

B14 - 64. Malkowska, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Lukasik, M., Grucza, K., Szutowski, M., Kwiatkowska, D., The influence of caffeine on ethyl glucuronide levels in rat serum and in rat hair. *Pharmacological Reports*, 2018. 70(5): p. 831-836.

B15 - 65. Hilszczanska, D., Siebyla, M., Horak, J., Krol, M., Podsadni, P., Steckiewicz, P., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szutowski, M., Turlo, J., Comparison of Chemical Composition in *Tuber aestivum* VITTAD. of Different Geographical Origin. *Chemistry & Biodiversity*, 2016. 13(12): p. 1617-1629.

B16 - 66. Savic, M., Klimaszewska, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Suchocki, P., Niksic, M., Szutowski, M., Wroczynski, P., Turlo, J., A Search for the Optimum Selenium Source to Obtain Mushroom-Derived Chemopreventive Preparations. 2016. 18(4): p. 279-289.

B17 - 67. Bialek, A., Jelinska, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Tokarz, A., Wpływ wodnego ekstraktu z owoców przepękli ogórkowatej i oleju z nasion granatowca właściwego na profil lipidowy u szczurów - badania wstępne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2014. 47(3): p. 270-276.

B18 - 68. Bialek, A., Jelinska, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Tokarz, A., Effect of Bitter Melon Aqueous Extract and Pomegranate Oil on Glucose Concentration and Lipid Profile in Blood of Rats – Preliminary Study. *International Journal of Cardiology and Lipidology Research*, 2014. 1(1): p. 1-7.

B19 - 69. Szutowski, M., Szost, T., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Profil zanieczyszczeń występujący w alkoholach nielegalnego pochodzenia i ryzyko zdrowotne związane z ich konsumpcją. *PRZEMYSŁ FERMENTACYJNY I OWOCOWO-WARZYWNY*, 2015. 5: p. 18-19.

B20 - 70. Lukasik, M., Malkowska, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Szutowski, M.M., The Effect Of Vehiculum And Age On Serum Chlorzoxazone Concentration In The Rat. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2018. 75(1): p. 189-196.

B21 - 71. Lukasik, M., Malkowska, A., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Polak, P., Szutowski, M.M., The Effect Of Methanol Used As Vehiculum On Serum Phenacetin Concentration In The Rat. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016. 73(5): p. 1129-1137.

B22 - 72. Karlik, W., Chłopecka, M., **Bamburowicz-Klimkowska, M.**, Mendel, M., Modulations of bovine hepatic microsomal metabolism of benzimidazoles by secondary plant metabolites. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2018: p. 1-8.

4.5. Analiza bibliometryczna

Pełna analiza bibliometryczna mojego dorobku naukowego wykonana przez Bibliotekę Główną WUM znajduje się w Załączniku nr 4.

Poza zgłaszanym jako osiągnięcie cyklem prac, jestem autorem lub współautorem:

- 36 oryginalnych publikacji naukowych (w tym 9 jako pierwszy autor lub autor korespondujący i 4 jako ostatni autor)
- 2 prac poglądowych (jako pierwszy autor i autor korespondujący)
- 1 skryptu
- 2 rozdziałów w podręcznikach lub monografiach

Łączna wartość dorobku naukowego poza wchodzącymi w skład Osiągnięcia wynosi **1668 punktów MEN** oraz posiada współczynnik **IF = 90,891**

Całkowity dorobek naukowy ma wartość **2328 punktów MEN** oraz posiada współczynnik **IF = 117,414**

Z czego przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych zgromadziłam dorobek o wartości **40 punktów MEN** ze współczynnikiem **IF = 3,230** oraz po uzyskaniu stopnia dra nauk farmaceutycznych wartość dorobku naukowego to **2288 punktów MEN** oraz współczynnik **IF = 114,184**

Całkowita liczba cytowań moich prac wynosi **222** (212 bez autocytowań) według źródła Web of Science Core Collection, **245** (235 bez autocytowań) według źródła Scopus oraz **300** cytowań wg Google Scholar

Indeks Hirscha wynosi **8** według źródła Web of Science Core Collection, **8** według źródła Scopus oraz **9** wg Google Scholar.

5. STAŻE I SZKOLENIA W KRAJOWYCH I ZAGRANICZNYCH OŚRODKACH NAUKOWYCH LUB AKADEMICKICH

5.1. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru

5.1.1 Staże

1. Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, 01.2021 – 06.2023

NCN Opus18 (UMO-2019/35/B/ST4/02497) „Wykorzystanie woltamperometrii i grawimetrii do jednoczesnego wykrywania metaloproteinaz macierzy -1, -2 i -9 w ludzkim raku płuca” (opinia opiekuna prof. dr hab. Anny Nowickiej znajduje się w Załączniku nr 7)

przygotowanie wniosku do Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, uzyskanie zgody Komisji, przeprowadzenie doświadczenia in vivo, zebranie materiału do badań, przeprowadzenie analizy zawartości MMPs w materiale pobranym od zwierząt za pomocą biochemicznych metod referencyjnych, opieka nad magistrantami

2. Copharma, Warszawa, od 2021

Przygotowanie danych służących do opracowania ekspertyz toksykologicznych w celu określenia limitów PDE, wykonanych zgodnie z dokumentem: EMA/CHMP/ CVMP/ SWP/169430/2012

3. Verdant Nature LLC, Warszawa, 2020-2021

Opracowanie monograficzne wyników 2-letnich badań przedklinicznych ekstraktu roślinnego.

4. Przedsiębiorstwem Farmaceutycznym Jelfa SA, Jelenia Góra – 2016-2018

Przygotowanie danych służących do opracowania ekspertyz toksykologicznych w celu określenia limitów PDE, wykonanych zgodnie z dokumentem: EMA/CHMP/ CVMP/ SWP/169430/2012 „Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities”.

5. Zakłady Farmaceutyczne UNIA Spółdzielnia Pracy, Warszawa, 2016

Przygotowanie danych do opracowania ekspertyz toksykologicznych w celu określenia limitów PDE, wykonanych zgodnie z dokumentem EMA/CHMP/ CVMP/ SWP/169430/2012.

5.1.2. Szkolenia

1. „Badania kliniczne oraz monitorowanie niepożądanych działań produktu leczniczego: Wpływ legislacji europejskiej” Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa 2004

2. „Analiza Toksykologiczna Materiału Biologicznego”, Instytut Ekspertyz Sądowych, Kraków, 28.05-6.06.2007
3. „Statystyka podstawowa”, StatSoft Polska, Kraków, 11-12.04.2010
4. „Analiza Wariancji”, StatSoft Polska, Kraków, 25-26.10.2010
5. „Analizy chemometryczne w STATISTICA – kurs podstawowy”, StatSoft Polska, Kraków, 26-27.06.2017

5.2. Konferencje naukowe

Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Doniesienia w formie plakatów

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

1. VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Interakcje ksenobiotyków, Polskie Towarzystwo Toksykologiczne, Poznań 2004
Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Mirosław Szutowski, Marcin Koterka, Magdalena Dąbrowska, Iwona Miętus, Katarzyna Kosińska, Agata Twarowska: „Wpływ jednorazowego zatrucia chlorkiem kadmu na poziom β -galaktozydazy w strukturach mózgu szczura”
2. 9th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. ECSOC-9, 2005
Piotr Luliński, Dorota Maciejewska, **Magdalena Bamburowicz-Klimkowska** and Mirosław Szutowski: “Preliminary Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer Synthesized with Dopamine Hydrochloride as a Template”
3. XVI International Congress of the Polish Pharmacological Society, Wrocław 2007
Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Katarzyna Żywiec, Agata Potentas, Mirosław Szutowski: “Impact of the changes in P-glycoprotein activity on domperidone pharmacokinetics in rat plasma”
4. IX Krajowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Szczyrk 2008
Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Urszula Bogucka, Edyta Młynarska, Mirosław Szutowski: „Wpływ zmian aktywności glikoproteiny P na farmakokinetykę domperidonu w surowicy szczura po podaniu chinidyny”
5. Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego “Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata 2011
Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Tadeusz Szost, Mirosław M. Szutowski: “Wpływ chinidyny na farmakokinetykę domperidonu u szczura przy zastosowaniu modelu wielokrotnego podawania”

6. Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata 2011
Tadeusz Szost, Joanna Zubik, Milena Milewska, **Magdalena Bamburowicz-Klimkowska**, Mirosław M. Szutowski: „Poszukiwanie metabolitów pochodnych Irydo[1,2c]pirymidyny”

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

7. 14 Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Warsaw - Poland 2013
A. Małkowska, A. Topolewska, **M. Bamburowicz-Klimkowska**, H. Matsumoto, M. Szutowski, M. Wojnar: „Analysis of fatty acid ethyl esters in meconium as possible markers of prenatal alcohol exposure”
8. European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology (ESMRBM) Congress, Toulouse - France 2013
IP Grudzinski, W. Szeszkowski, P. Bogorodzki, A. Cieszanowski, M. Pisklak, J. Orzeł, M. Cywińska, **M. Bamburowicz**: „Comparatives metabolomics profiles of murine melanoma”
9. XXIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne – Bromatologia dla społeczeństwa XXI wieku, Kraków - Polska 2014
A. Białek, M. Jelińska, **M. Bamburowicz-Klimkowska**, A. Tokarz: „Wpływ wodnego ekstraktu z owoców Przepękli ogórkowatej i oleju z nasion Granatowca właściwego na profil lipidowy u szczurów - badania wstępne”
10. Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Człowiek, żywność, środowisko – Problemy współczesnej toksykologii”, Olsztyn –Polska 2014
M. Bamburowicz-Klimkowska, J. Turło, M. Szutowski: „Zastosowanie mikroekstrakcji na fazie stałej (NTME) do identyfikacji związków lotnych w grzybach”
11. Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Człowiek, żywność, środowisko – Problemy współczesnej toksykologii”, Olsztyn –Polska 2014
A. Małkowska, A. Topolewska-Wochowska, **M. Bamburowicz-Klimkowska**, H. Matsumoto, M. Szutowski, M. Wojnar: „Obecność estrów etylowych kwasów tłuszczowych w smółce noworodków”
12. II International Congress “Food Technology, Quality and Safety”, Novi Sad 2014
M. Savić, P. Podsadni, **M. Bamburowicz-Klimkowska**, M. Klimaszewska, M. Szutowski, V. Nedović, J. Turlo, M. Nikšić: „Selenized yeast in production of selenium enriched pleurotus ostreatus mushroom with good flavor”
13. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017

- Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Martyna Wosik, Justyna Białas, Adrianna Dąbrowska, Grudziński Ireneusz: „Badania potencjału hemolitycznego nanotlenku tytanu, tlenku grafenu oraz nanomateriału hybrydowego typu żelazo-grafen”
14. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017
Róża Chmielewska, **Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Kamil Ziaja, Grudziński Ireneusz: „Badania cytotoxycznosci interakcyjnej produktow stresu oksydacyjnego i nanomaterialow hybrydowych typu zelazo-grafen”
 15. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017
Róża Chmielewska, **Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Magdalena Popławska, Michał Bystrzejewski, Artur Kasprzak, Grudziński Ireneusz: „Badania biodystrybucji nanomaterialow hybrydowych typu zelazo-grafen oraz polietylenoiminy (PEI) w embrionach modelu Danio rerio”
 16. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017
Małkowska Anna, **Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Łukasik Marcin, Szutowski Mirosław, Krzysztof Gruzca, Dorota Kwiatkowska: „Wplyw kofeiny na stężenie etylogukuronidu w surowicy i sierści szczurów”
 17. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017
Rużycka Monika, **Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Magdalena Kałwak, Małgorzata Florczak, Grudziński Ireneusz: „Mikroobrazowanie rezonansem magnetycznym (mikro-MRI) nanomaterialow funkcjonalnych w modelu Danio rerio”
 18. „Różne oblicza toksykologii” Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Puławy 2017
Szost Tadeusz, Szutowski Mirosław, **Bamburowicz-Klimkowska Magdalena**, Przemysław Wyderski, Filip Szulecki: „Analiza ilościowa octanu etylu i izopropanolu w różnych stężeniach etanolu”
 19. 3rd Central European Biomedical Congress, Kraków 2018
Bamburowicz Klimkowska M, Bystrzejewski M, Popławska M, Kasprzak A and Grudzinski IP “ A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Capable of Detecting Intracellular Hydrogen Peroxide in Human Lung Cancer Cells”
 20. 20th International Congress of the Polish Pharmacological Society, Lublin 2019
Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Maciej Małecki, Michał Bystrzejewski, Magdalena Popławska, Artur Kasprzak and Ireneusz P. Grudzinski “Next generation

graphene-encapsulated magnetic nanoparticles as a new gene delivery system in Lewis lung carcinoma and murine melanoma”

6. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

6.1. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

6.1.1. Zrealizowane

NN518 381737 NCN

Nowe nanostrukturalne superparamagnetyki w molekularnym obrazowaniu nowotworów metodą rezonansu magnetycznego

kierownik grantu – prof. dr hab I.P. Grudziński, WUM

wykonawca – **M. Bamburowicz-Klimkowska**

08/09/10/ EuroNanoMed/2015 NCBR

GEMNS project (057) granted in the European Union’s Seventh Framework Program under the ERA-NET EuroNanoMed II (European Innovative Research and Technological Development Projects in Nanomedicine)

GEMNS - Self-navigated integrin receptors seeking “thermally-smart” multifunctional few-layer graphene-encapsulated magnetic nanoparticles

kierownik grantu – prof. dr hab. I.P. Grudziński, WUM

główny wykonawca części wykonywanej na WUM – **M. Bamburowicz-Klimkowska**

2019/35/B/ST4/02497 NCBR

Simultaneous voltammetric and gravimetric detection of matrix metalloproteinases -1, -2 and -9 in human lung cancer

kierownik grantu – prof. dr hab A.M Nowicka, Uniwersytet Warszawski

główny wykonawca oraz koordynator części wykonywanej na WUM – **M. Bamburowicz-Klimkowska**

6.1.2. W trakcie realizacji

NOR/POLNOR/TEPCAN/0057/ 201900 NCBR

TEPCAN project funded by the Program “Applied research” under the Norwegian Financial Mechanisms 2014e2021/ POLNOR 2019 (EEA and Norway Grants), Thematic areas: Welfare, health and care

Theranostic Exosomes in Personalized Cancer Nanomedicine [TEPCAN]

kierownik grantu – prof. dr hab. I.P. Grudziński, WUM

główny wykonawca części wykonywanej na WUM – **M. Bamburowicz-Klimkowska**

6.2. Informacje o współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami z kraju i zagranicy

1. Zakład Chemii Organicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny (prof. dr, hab. Dorota Maciejewska, dr hab. Piotr Luliński) – wspólne publikacje **A2-A5** [31-34], doniesienie na 9th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. ECSOC-9, 2005
2. Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny (prof. dr hab. Jadwiga Turło) – wspólne publikacje **B15-B16** [65, 66]
3. Zakład Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny (prof. dr hab. Andrzej Tokarz, dr hab. Agnieszka Białek) – wspólne publikacje **B17-B18** [67, 68]
4. Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny (dr Maciej Gawlak) – wspólne publikacje **B2-B3** [48, 49]
5. Zakład Farmacji Stosowanej, Pracownia Terapii Genowej, Warszawski Uniwersytet Medyczny (prof. dr hab. Maciej Małecki) – wspólna publikacja **HON-P3** [24]
6. II Zakład Radiologii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny (prof. dr hab. Andrzej Cieszanowski) – wspólne publikacje **B1** [15, 16, 27, 45, 73], w tym **HON-P1, HON-P2, HON-P5 i HON-P6**
7. Zakład Radiologii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny (mgr Wojciech Szeszkowski) – wspólne publikacje [15, 16, 24, 26, 27], w tym **HON-P1, HON-P5 i HON-P6**
8. Instytut Radioelektroniki, Politechnika Warszawska (prof. Piotr Bogorodzki) – wspólne publikacje [15, 16, 24], w tym **HON-P1**
9. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Kielanowskiego PAN, Jabłonna (dr hab. Małgorzata Białek) – wspólna publikacja **HON-P6** [27]
10. Klinika Psychiatrii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (dr Halina Matsumoto) – doniesienie na 14 Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Warsaw, Poland 2013
11. Zakład Badań Antydopingowych, Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa (dr hab. Dorota Kwiatkowska, dr Krzysztof Grucza) – wspólna publikacja **B14** [64]
12. Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa (prof. dr hab. Anna Nowicka, dr hab. Agata Kowalczyk) – wspólne publikacje **B4, B5-B12** [50, 53-59, 62]

13. Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa (dr hab. Michał Bystrzejewski) – wspólne publikacje **B1** [15, 16, 24, 25, 45], w tym **HON-P1, HON-P2, HON-P3 i HON-P4**
14. Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa (prof. dr hab. Magdalena Popławska, dr hab. inż. Artur Kasprzak) – wspólne publikacje **B2-B3, B5-B10, B12** [4, 16, 24, 25, 49, 53-58, 62, 74], w tym **HON-PP1, HON-P1, HON-P2 i HON-P3, HON-P4**
15. Zakład Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, Warszawa (dr hab., profesor SGGW Marta Mendel, dr hab., profesor SGGW Magdalena Chłopecka, dr Wojciech Karlik) – wspólna publikacja **B22** [72]
16. Centrum Nauk Biologicznych i Chemicznych, Uniwersytet Warszawski, Warszawa (dr Kamil Sobczak) – wspólne publikacje **B12** [25, 62], w tym **HON-P4**
17. Department of Food and Industrial Microbiology, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Serbia (dr Milena Savić) – wspólna publikacja **B16** [66], doniesienie na II International Congress “Food Technology, Quality and Safety”, Novi Sad 2014

7. RECENZOWANIE PRAC NAUKOWYCH

Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

W latach 2013-2023 wykonałam 14 recenzji w standardzie peer review (na podstawie zestawiania zweryfikowanego i opublikowanego przez Clarivate):

1. Journal of Nanoparticle Research, IF= 2.5, 6 recenzji
2. Toxicology and Applied Pharmacology, IF=3.8, 4 recenzje
3. International Journal of Nanomedicine, IF=8.0, 1 recenzja
4. Therapeutic Delivery, IF=4.2, 1 recenzja
5. Frontiers in Bioscience-Landmark, IF=3.1, 1 recenzja
6. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, IF=3.1, 1 recenzja

oraz innych czasopism z poza bazy Clarivate, m. in. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej oraz Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego.

8. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

Od 2002 roku zajmuję się dydaktyką akademicką w zakresie toksykologii narządowej, analizy toksykologicznej oraz oceny toksykologicznej ksenobiotyków.

- I. Prowadzę/prowadziłam wykłady, seminaria i ćwiczenia laboratoryjne dla studentów:
 1. I rok, kierunek Toksykologia z Elementami Kryminalistyki, WUM – Toksykologia doświadczalna mechanistyczna i opisowa, Analiza Toksykologiczna I, Toksykologia Szczegółowa I, Toksykologia Przemysłowa
 2. II rok, kierunek Toksykologia z Elementami Kryminalistyki, WUM – Analiza Toksykologiczna II, Toksykologia Narządowa i Toksykopatologia, Toksykologia Szczegółowa II
 3. II rok, Ochrona Środowiska, Wyższa Szkoła Ekologii i Zarządzania (umowa WUM) – analiza toksykologiczna,
 4. IV rok, kierunek Farmacja, WUM – toksykologia,
 5. IV rok, kierunek Analityka Medyczna, WUM – toksykologia
 6. IV rok, kierunek Farmacja, Fakultatywny Blok Programowy Farmacja Kliniczna, WUM – toksykologia narządowa,
 7. IV rok, kierunek Analityka Medyczna, Diagnostyka toksykologiczna, WUM – toksykologia, analiza toksykologiczna
 8. V rok, kierunek Farmacja, Fakultatywny Blok Programowy Toksykologia Farmaceutyczna i Środowiskowa, WUM – analiza toksykologiczna i ocena toksykologiczna,
 9. V rok, kierunek Farmacja, Fakultatywnego Bloku Programowego Farmacja Analityczna, WUM – analiza toksykologiczna,
 10. programu Erasmus, WUM – analiza toksykologiczna (zajęcia prowadzone w języku angielskim).
- II. Byłam opiekunem ponad 30 prac magisterskich w latach 2003-2017 i promotorem trzech prac magisterskich w roku akademickim 2021/2022 oraz 2022/2023.
- III. Od roku 2015 wykonałam łącznie 17 recenzji prac magisterskich złożonych na Wydziale Farmaceutycznym WUM.
- IV. W latach 2017-2019 pełniłam też funkcję opiekuna koła naukowego przy Zakładzie Toksykologii.

- V. Dwukrotnie byłam laureatką Zespołowej Nagrody Dydaktycznej III stopnia za współautorstwo skryptów akademickich, w tym skryptu dla studentów WF WUM „Analiza Toksykologiczna”.
- VI. W roku 2021 zostałam wyróżniona przez Rektora WUM indywidualną nagrodą drugiego stopnia za przygotowanie skryptu „Analytical Toxicology” dla studentów programu Erasmus i English Division.
- VII. Brałam aktywny udział w tworzeniu dokumentacji, organizacji, przygotowywaniu i prowadzeniu zajęć na nowo tworzonym kierunku Toksykologia z Elementami Kryminalistyki otwieranym w ramach grantu WUM AID Akademia Innowacyjnej Dydaktyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2018-2022. POWER 2014-2020 - Knowledge, Education and Development through the WUM AID project called “Academy of Innovative Didactic of the Medical University of Warsaw” granted under the European Social Fund (NCBR Funding No POWR.03.05.00-00-Z088/17-00).

9. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

1. Jestem członkiem: Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego (2010-obecnie)
Od 2017 roku pełnię funkcję Sekretarza Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego.
2. W roku akademickim 2017/18 pełniłam obowiązki Kierownika Zakładu Toksykologii
3. W roku akademickim 2017/18 oraz w latach 2020-2023 byłam członkiem Rady Wydziału Farmaceutycznego WUM
4. Jestem elektorem WUM (kadencja 2020-24).
5. Jestem członkiem Wydziałowego Zespołu ds. Zapewniania Jakości Kształcenia (2020-obecnie).
6. Jestem członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Farmaceutycznego (2020-2023).
7. Jestem Członkiem Rady Programowej Kierunku Farmacja (od 02. 2024)