Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych

Polskiej Akademii Nauk

90-363 Łódź, Sienkiewicza 112

Synteza fluorescencyjnych nośników leków przeciwnowotworowych dedykowanych optycznym metodom obrazowania molekularnego

AUTOREFERAT

do wniosku o przeprowadzenie procedury habilitacyjnej

dr inż. Beata Miksa

Załącznik 2a

Beata Miksa

Dziękuję

Panu Profesorowi dr hab. Markowi Potrzebowskiemu za możliwość rozwoju naukowego w jego zespole badawczym w Dziale Chemii Strukturalnej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN oraz za chęć dzielenia się swoją wiedzą i umiejętnościami z dziedziny spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego

Dziękuję

Panu dr Ryszardowi Jankowiakowi

pracującemu w Kansas State University (Distinguished Professor in Department of Chemistry) za inspiracje i wsparcie naukowe w trakcie odbywania stażu podoktorskiego w jego grupie badawczej.

Dziękuję

Panu dr Eugene Pinkassik

pracującemu obecnie na University of Connecticut (Department of Chemistry) na stanowisku Associate Professor za zainteresowanie mnie tematyką membran biomimetycznych i układów samoorganizujących się w supramolekularne struktury. Doświadczenie zdobyte podczas odbywanego stażu podoktorskiego w kierowanym przez niego zespole utworzonym wówczas na University of Memphis (Department of Chemistry) wykorzystałam w dalszej swojej pracy naukowej.

Spis treści

1. Dane osobowe....3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe....3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych....4
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm)....4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego....4
4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe....4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. publikacji i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania....9
4.3.1. Wskazanie celu naukowego....9
4.3.2. Wprowadzenie....10
4.4 Omówienie osiągniętych wyników....13
4.4.1. Metody stabilizacji liposomalnych nanostruktur....13
4.4.2. Synteza nanokapsułek polistyrenowych przeznaczonych do diagnostyki i obrazowania....15
4.4.3. Synteza światłoczułych kapsułek z odwracalnie sieciowaną powłoką z poli[metakrylanu 2-etyloheksylu-*co*-akrylamidu 7-(4-trifluorometylo)kumaryny]....21
4.4.4. Synteza nowej generacji koniugatu o właściwościach cytotoksycznych zawierającego chlorambucyl wyznakowany fluorescencyjną fenosafraniną....24
4.4.5. Synteza koniugatu złożonego z fenosafraniny związanej z klatką silseskwioksanu (POSS) spełniającego rolę markera i innowacyjnego interkalatora oddziaływującego z DNA komórek....27
4.5. Podsumowanie i wnioski....29
4.6. Literatura....31
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i wykaz innych (nie wchodzących w skład osiągnięcia) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych....36
5.1. Omówienie osiągnięć naukowo-badawczych uzyskanych po uzyskaniu stopnia doktora....36
5.2. Wykaz monografii opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego....38
5.3. Wykaz monografii opublikowanych przed uzyskaniem stopnia....39
5.4. Wskaźniki bibliometryczne....43
5.5 Kierowanie krajowymi projektami badawczymi....43
5.6. Informacja o komunikatach wygłoszonych na konferencjach tematycznych....43
5.7. Pobyty na stażach zagranicznych....44
5.8. Opieka nad studentami....44
5.9. Recenzowane publikacje w czasopismach międzynarodowych....44

AUTOREFERAT

do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego
Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego przedstawia cykl siedmiu publikacji naukowych wydanych po uzyskaniu stopnia doktora

1. Dane osobowe

Beata Miksa
nazwisko rodowe: Miksa
imiona rodziców: Edward, Jadwiga
adres: Cmentarna 1 m 23
91-068 Łódź
e-mail: miksa@cbmm.lodz.pl

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Stopnie naukowe:

doktor nauk chemicznych – 13.06.2005 r.	Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, praca doktorska pt.: „*Otrzymywanie i właściwości układów mikrosfer polimerowych*" pod kierunkiem Prof. dr hab. Stanisława Słomkowskiego
magister inż. chemii – 25.01.1989 r.	studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej na kierunku Chemia i Technologia Organiczna, w Instytucie Barwników, praca magisterska na temat: „*Synteza monoazowych laków barwnych pochodnych kwasu 3-hydroksy-2-naftoesowego*" pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Jana Kraski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Miejsce zatrudnienia	Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Sienkiewicza 112, Łódź 90-363
2017- do chwili obecnej	lider grupy utworzonej w Dziale Chemii Strukturalnej, CBMiM PAN
2010-2017	stanowisko badawczo-techniczne w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych CBMiM PAN
2009-2010	stanowisko techniczne w Pracowni Spektrometrii Mas funkcjonującej w strukturze Środowiskowego Laboratorium Badań Fizykochemicznych Związków Organicznych i Polimerów CBMiM PAN
1990-2006	chemik, następnie asystent w Zakładzie Chemii Polimerów CBMiM PAN

Staże w zagranicznych ośrodkach naukowych

2007-2008	**staż podoktorski**; The University of Memphis, Department of Chemistry, Memphis, TN, USA
2006-2007	**staż podoktorski**; Kansas State University, Department of Chemistry, Manhattan, KS, USA.

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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 zkresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rodzajem osiągnięcia naukowego jest monotematyczny cykl publikacji zatytułowany: **„Synteza fluorescencyjnych nośników leków przeciwnowotworowych dedykowanych optycznym metodom obrazowania molekularnego"**

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl siedmiu monotematycznych publikacji **H1-H7**.
Mój wkład w powstanie każdej pracy dokładnie opisałam w wykazie dorobku. W jednej z prac jestem drugim współautorem, ale mój wkład intelektualny jest bardzo znaczący i równorzędny z osobą, która wymieniona została jako pierwszy współautor.
W pozostałych publikacjach jestem autorem korespondencyjnym, a prace te powstały w wyniku realizowanego i kierowanego przeze mnie projektu uzyskanego z KBN (Komitetu Badań Naukowych MNiSW) w 2011 r. (nr. grantu: NN 209 762 440).
Opracowanie nie zawiera pełnego omówienia otrzymanych wyników a jedynie opis najważniejszych osiągnięć. Wszystkie szczegóły dotyczące danych spektroskopowych, metodologii i sposobu przeprowadzenia doświadczeń biologicznych zawarte są w załączonych publikacjach. Prace wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej oznaczyłam symbolami **H** przypisując im numery od **1** do **7**.

		Pkt. MNiSW	$IF_{5\text{-letni}}$	*N* cyt.
H1	S.A. Dergunov, B. Miksa, B. Ganus, E. Lindner, E. Pinkhassik ***Nanocapsules with invisible wall*** Chemical Communication Int. Ed. 46, 1485-1487, **2010**.	40	6.064	33
H2	M. Sierant, P. Paluch, M. Florczak, A. Rozanski, B. Miksa* ***Photosensitive nanocapsules for use in imaging from poly(styrene-co-divinylbenzene)cross-linked with coumarin derivatives*** Colloids and Surface B: Biointefaces 111, 571-578, **2013**.	35	4.294	7
H3	M. Sierant, S. Kazmierski, A. Rozanski, P. Paluch, U. Bienias, B.J. Miksa* ***Nanocapsules for 5-fluorouracil delivery decorated with a poly(2-ethylhexyl methacrylate-co-7-(4-trifluoromethyl)coumarin acrylamide)cross-linked wall*** New Journal of Chemistry 39, 1506-1516, **2015**.	30	3.181	7
H4	Beata Miksa ***Recent progressin designing shell cross-linked polymer capsules for drug delivery*** RSC Advances 5, 87781-87805, **2015**.	35	3.096	9
H5	Beata Miksa ***Fluorescent dyes used in polymer carriers as imaging agents in anticancer therapy*** Medicinal Chemistry(Los Angeles) 6, 611-639, **2016** (ISSN: 2161-0444)	0	0	4*
H6	B. Miksa*, M Sierant, E. Skorupska, A. Michalski, S. Kazmierski, U. Steinke, A. Rozanski, P. Uznanski ***Chlorambucil labelled with the phenosafranin scaffold as a new chemotherapeutic for imaging and cancer treatment*** Colloids and Surface B: Biointerfaces 159, 820-828, **2017**.	35	4.294	1
H7	K. Rozga-Wijas, M. Sierant, E. Wielgus, B.J. Miksa* ***Polyhedral octasilsesquioxanes labelled with the photosensitive cationic phenosafranin dye as a new nanocarrier for therapy and cellular imaging*** Dyes and Pigments 161, 261-266, **2019**.	40	3.572	0

ponieważ czasopismo nie jest zarejestrowane na stronie Web of Science, dlatego podaję cytowania dostępne na stronie ResearchGate

Sumaryczny IF dla siedmiu przedstawionych publikacji wynosi **24.501**, śr. z publikacji: 3.50.
Suma pkt. MNiSW 215, śr. z publikacji: 30.7

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Sergey A. Dergunov, **Beata Miksa**, Bill Ganus, Ern□ Lindner, Eugene Pinkhassik, **2010**, Nanocapsules with "invisible walls", **Chemical Communication Int. Ed.** *46*, 1485-1487. (**IF 6.064**, liczba cytowań 33, punkty MNiSW 40)

Mój udział w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu syntezy nanokapsułek polimerowych z enkapsulowanym błękitem bromofenolowym i pomiarach szybkości dyfuzji jonów (H+) przez utworzoną membranę syntetyczną stosując metodę stopped-flow. Wyniki moich badań są umieszczone na rys. 2 i 3. Wykonałam również pomiary wielkości średnic nanokapsułek metodą DLS. Obrazy mikroskopowe nanostruktur rejestrowałam techniką TEM. Brałam udział w interpretacji wyników badań. Mój wkład pracyw całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

Beata Miksa

2. M. Sierant, P. Paluch, M. Florczak, A. Rozanski, **B. Miksa***, **2013**, Photosensitive nanocapsules for use in imaging from poly(styrene-co-divinylbenzene)cross-linked with coumarin derivatives, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** *111*, 571-578. (**IF 4.294**, liczba cytowań 7, punkty MNiSW 35)

Mój wkład intelektualny w powstanie pracy polegał na pomyśle wprowadzenia cząsteczek kumaryny-6 do warstwy polimerowej nanokapsułek z sieciowaną powłoką polistyrenową, które nadały jej właściwości fluorescencyjne. Samodzielnie wykonałam wszystkie syntezy nanokapsułek wraz z pełną ich charakterystyką stosując metody: spektrofotometryczną UV-Vis, fluorometryczną, FTIR, DLS. Dobrałam enkapsulowane barwniki pod względem ich właściwości fizyko-chemicznych takich jak fotostabilność i budowa strukturalna. Samodzielnie zinterpretowałam eksperymenty, których wyniki umieszczone są na rys.: 3, 4, 5, 6, 7. Publikacja została przeze mnie napisana, zredagowana i edytowana, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane w niej wyniki badań. Projekt, w którym pełniłam rolę kierownika i wykonawcy finansowany był przez KBN: ***NN 209 762440****. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.*

Beata Miksa

3. M. Sierant, S. Kazmierski, A. Różański, P. Paluch, U. Bienias, **B. J. Miksa*, 2015,** Nanocapsules for 5-fluorouracil delivery decorated with a poly(2-ethylhexyl methacrylate-co-7-(4-trifluoromethyl)coumarin acrylamide)cross-linked wall, **New Journal of Chemistry** 39, 1506-1516. (**IF_{5letni} 3.181**, liczba cytowań 7, punkty MNiSW 30)

Mój wkład intelektualny w powstanie pracy polegał na doborze odpowiednich akrylanów tj. analogu kumaryny i akrylanu o niskiej temperaturze zeszklenia do syntezy polimerowych nanokapsułek. Zaplanowałam warunki przeprowadzanych eksperymentów i samodzielnie wykonałam wszystkie syntezy oraz pełną charakterystykę otrzymanych nanobiektów polimerowych stosując metody: UV-Vis, fluorometryczną, FTIR, NMR i DLS. Zbadałam proces enkapsulacji 5-fluorouracylu oraz jego uwalnianie w warunkach in vitro. Samodzielnie zinterpretowałam wyniki doświadczalne, które umieszczone są na rys. 2, 4, 7, 8. Publikacja została przeze mnie napisana i zredagowana, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane w niej wyniki badań. Projekt, w którym pełniłam rolę kierownika i wykonawcy finansowany był przez KBN: ***NN 209 762440****. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.*

Beata Miksa

4. Beata Miksa. 2015, Recent progress in designing shell cross-linked polymer capsules for drug delivery **RSC Advances** 5, 87781-87805. (**IF 3.096**, liczba cytowań 9, punkty MNiSW 35)

Publikacja jest wynikiem mojej w 100%-ach indywidualnej i samodzielnej pracy. Beata Miksa

5. Beata Miksa, 2016, Fluorescent dyes used in polymer carriers as imaging agents in anticancer therapy, **Medicinal Chemistry** (Los Angeles) 6, 611-639. DOI: 10. 4172/2161-0444.1000406

Publikacja jest wynikiem mojej w 100%-ach indywidualnej i samodzielnej pracy.

Beata Miksa

6. Beata Miksa*, Malgorzata Sierant, Ewa Skorupska, Adam Michalski, Sławomir Kazmierski, Urszula Steinke, Artur Różański, Pawel Uznanski, **2017**, Chlorambucil labelled with the phenosafranin scaffold as a new chemotherapeutic for imaging and cancer treatment, **Colloid and surface B: Biointerfaces** *159*, 820-828. (**IF_{5letni} 4.294**, liczba cytowań 7, punkty MNiSW 35)

Mój wkład intelektualny w powstanie pracy polegał na zaprojektowaniu nowego aktywnego czynnika cytotoksycznego o właściwościach alkilujących i fluorescencyjnych. Wybranym przeze mnie barwnikiem była molekuła fenosafraniny obdarzona ładunkiem dodatnim, mająca cechy interkalatora DNA. Wykorzystałam ją do wyznakowania cząsteczki chlorambucylu stosowanego w terapii przeciwnowotworowej. Samodzielnie wykonałam syntezę tego koniugatu i scharakteryzowałam jego strukturę metodami: UV-Vis, fluorometryczną, FTIR, NMR. Dobrałam warunki enkapsulacji koniugatu w liposomach oraz przeprowadziłam pomiary szybkości jego uwalniania w warunkach in vitro, a wyniki tych badań są zamieszczone na rys.3. Wykorzystując metodę FTIR zanalizowałam strukturę otrzymanego koniugatu podając przypisania do poszczególnych sygnałów (na rys. 3) w tab. 1 i tab. 2. Publikacja została przeze mnie napisana i zredagowana, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane w niej wyniki badań. Projekt, w którym pełniłam rolę kierownika i wykonawcy finansowany był przez KBN: ***NN 209 762440****. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.*

Beata Miksa

7. K. Rozga-Wijas, M. Sierant, E. Wielgus, **B. J. Miksa***, **2019**, Polyhedral octasilsesquioxanes labelled with the photosensitive cationic phenosafranin dye as a new nanocarrier for therapy and cellular imaging, **Dyes and Pigments** *161*, 261-266. (**IF 3.572**, brak cytowań, punkty MNiSW 40)

Mój wkład intelektualny w powstanie pracy polegał na zaprojektowaniu nowego, biokompatybilnego markera o właściwościach fluorescencyjnych mającego cechy interkalatora DNA. Zinterpretowałam i opisałam wyniki analiz otrzymanego koniugatu silseskwioksanu wyznakowanego fenosafraniną metodami: UV-Vis, fluorometryczną, FTIR, NMR. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie pomiarów są zilustrowane na rys.1, 2, 4. Publikacja została przeze mnie napisana i zredagowana, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane w niej wyniki badań. Projekt, w którym pełniłam rolę kierownika i wykonawcy finansowany był przez KBN: ***NN 209 762440****. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.*

Beata Miksa

4.3. Omówienie celu naukowego ww. publikacji i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Celem pracy była synteza fluorescencyjnych nośników leków przeciwnowotworowych dedykowanych optycznym metodom obrazowania molekularnego. Zaprojektowanymi przeze mnie nośnikami są liposomalne kapsułki polimerowe (LKP) oraz funkcjonalizowane fenosafraniną leki i klatki silseskwioksanowe, które mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w terapii i diagnostyce medycznej.

Przedmiotem moich badań jest:

- wykorzystanie struktur liposomów do syntezy LKP z porowatą powłoką polimerową umożliwiającą kontrolowany proces dyfuzji jonów między wnętrzem kapsułek a ich otoczeniem i zdolnych do enkapsulacji indykatorów przeznaczonych do monitorowania zmian pH środowiska. (**H1**)

- synteza LKP zaopatrzonych w membranę polimerową spełniającą funkcję emitera fluorescencji w optycznym obrazowaniu molekularnym komórek. Kapsułki stanowią nowy rodzaj sondy przeznaczonej do enkapsulacji związków hydrofilowych (np.: leków), poszerzając możliwość ich detekcji metodą fluorometryczną oraz spektrofotometryczną w zakresie nadfioletu i światła widzialnego UV-Vis. Fluorescencyjne właściwości powłoki LKP pozwalają na precyzyjne monitorowanie ich kumulacji w komórkach metodą *in vitro* oraz *in vivo*. (**H2**)

- synteza LKP zaopatrzonych w odwracalnie sieciowaną, fotoczułą powłokę polimerową dzięki wprowadzonym cząsteczkom kumaryny. Są one zdolne do enkapsulacji leków przeciwnowotworowych (np.: 5-fluorouracylu) przeznaczonych do terapii fotodynamicznej. (**H3**)

- synteza nowego koniugatu cytotoksycznego o właściwościach fluorescencyjnych, złożonego z cząsteczki sensybilizatora - fenosafraniny związanej kowalencyjnie z chlorambucylem (lekiem przeciwnowotworowym stosowanym w leczeniu np.: białaczki), który spełnia wymagania współczesnej chemioterapii umożliwiając diagnostykę w zakresie podczerwieni oraz wzmocnienie efektu cytotoksycznego. (**H6**)

- synteza nowego typu nośnika fluorescencyjnego o wielkości kilku nanometrów zbudowanego z klatki silseskwioksanu (POSS) i fenosafraniny, który spełnia rolę innowacyjnego markera i interkalatora oddziaływującego z DNA komórek, mogącego znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej. (**H7**)

Na uwagę zasługują również dwie opublikowane przeze mnie prace przeglądowe **H4** i **H5**, w których szeroko omawiam problemy związane z syntezą polimerowych kapsułek oraz wyjaśniam idee nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej optyczne obrazowanie molekularne (*theranostic agents*).

4.3.2. Wprowadzenie

W ostatnich latach nauka o materiałach stała się dziedziną interdyscyplinarną, która łącząc chemię organiczną z chemią polimerów obejmuje m.in. główne składniki tworzące membrany biologiczne, do których należą lipidy (tj. fosfolipidy, glikolipidy, sfingolipidy). Przyroda dostarcza inspiracji w projektowaniu polimerowych struktur opartych na naturalnych formach biozwiązków, przyczyniając się do rozwoju funkcjonalnych materiałów syntetycznych spełniających wymagania "*zielonej chemii*". Polimerowe nanocząstki o różnorodnym składzie i budowie strukturalnej znajdują szerokie zastosowanie w medycynie, w tym również jako nośniki leków,[1a,b] jednak ich ograniczone przenikanie przez błony komórkowe zmniejsza efektywny transport zawartych w nich związków biologicznie czynnych.[1c,d] Polimerowe nanostruktury mogą występować także w formie nanoagregatów tworząc micele i liposomy. Syntetyczne liposomy wyposażone w membrany biomimetyczne naśladujące właściwości błon biologicznych służą jako uproszczone modele organelli komórkowych.[2] Modele błon biologicznych (płynny - mozaikowy Singera-Nicolsona z 1972 r. oraz rafowy Simons'a i Brown'a z 1997 r. oparty na separacji mikrodomen) opisują zmiany dynamiczne zachodzące w membranie w fazach zol-żel i ciekłokrystalicznej, które związane są z ruchem molekularnym lipidów (rotacyjnym prostopadłym do płaszczyzny, lateralnym-bocznym w płaszczyźnie oraz izomeryzacją *trans-gauche*).[3a] Na ostateczny kształt amfifilowych agregatów wpływa stosunek wielkości powierzchni wyznaczonej przez grupy polarne fosfolipidów do powierzchni utworzonej przez łańcuchy alkilowe i inne składniki (np.: sterole – głównie cholesterol).[3b] O morfologii agregatów[4a] decyduje więc równowaga między siłami wzajemnego oddziaływania hydrofobowych łańcuchów alkilowych i słabych oddziaływań van der Waals'a, a elektrostatycznym odpychaniem grup polarnych oraz redukcja stopnia swobody ruchów translacyjnych i rotacyjnych chiralnych lipidów. W wieloskładnikowej dwuwarstwie lipidowej organizacja mikrodomen wypływa na separację faz powodując deformację membrany i wyznacza kształt geometryczny formowanych nanoobiektów.[4b] W membranach w których występuje koegzystencja faz, naprężenie liniowe jest ważnym parametrem wyznaczającym rozkład, wielkość i kształt polidyspersyjnych mikrodomen określających teksturę membrany.[4c] Amfifilowość lipidów ułatwia ich samoorganizację w środowisku wodnym, jednak formowane nanoobiekty cechuje brak stabilności zarówno w podwyższonej temperaturze, jak i w zmiennych warunkach pH środowiska o dużej sile jonowej roztworu.[5] Integralność liposomów zależy więc od rodzaju lipidów oraz warunków otaczającego je środowiska. Liposomy tworzą wypełnione płynem nanoskopowe zbiorniczki, których powłoka (utworzona z dwuwarstwy lipidowej) ma zbliżone właściwości do naturalnych membran komórkowych.[6] Identyfikację heterogeniczności dwuwarstwy lipidowej (jej fazy ciekłokrystalicznej - uporządkowanej oraz fazy żelu - nieuporządkowanej) ułatwiło wprowadzenie do niej fluorescencyjnych markerów o zdefiniowanej hydrofilowo-hydrofobowej budowie, które mogą wyznaczyć rodzaj domen dzięki różnicy w ich przenikaniu i kumulacji. Trwałość membran oraz stabilność powstających z nich struktur przestrzennych (liposomów) może być badana w wyniku wprowadzenia chromoforów do domen utworzonych z różnych fosfolipidów, które są analizowane techniką mikroskopii fluorescencyjnej.[7]

Liposomy, ze względu na ich zdolność do efektywnej penetracji przestrzeni międzykomórkowej i binarny system enkapsulacji (hydrofobowo-hydrofilowy) spełniają wymagania stawiane nośnikom leków i są wykorzystywane w procesach pułapkowania substancji bioaktywnych w farmakologii.[8a,b,c,d] Ich użyteczność wynika z możliwości: (a) enkapsulacji hydrofilowych substancji w wodnej przestrzeni pęcherzyków, (b) inkluzji hydrofobowych związków do dwuwarstwy lipidowej oraz (c) przyłączania molekuł za pomocą oddziaływań elektrostatycznych do części polarnej lipidów (głowy).[9a] Badania błon naturalnych (dotyczące ich uporządkowania, homogeniczności oraz zachodzących procesów fizyko-chemicznych) przyczyniły się do rozwoju metod syntezy biomimetycznych nanokapsułek formowanych na chimerycznych strukturach liposomów.[9b,c] Ograniczenia wynikające z mechanicznej wrażliwości płynnej dwuwarstwy lipidowej zostały wyeliminowane przez wprowadzenie do niej monomerów, które poddane procesowi polimeryzacji *in situ* pod wpływem promieniowania UV utworzyły powłokę polimerową o grubości kilku nanometrów (od 4 do 10 nm).[10] Wytworzona inkluzyjna warstwa syntetyczna pozwoliła stworzyć nową generację hybrydowych polimerowych membran imitujących działanie ściany organelli komórkowych.[11] Ponadto, sieciowanie polimerowej powłoki nadaje trwałość sferycznym kapsułkom, które nie ulegają rozpadowi nawet poniżej krytycznego stężenia micelarnego lipidów.

Tak więc, główna idea polegająca na odwzorowaniu morfologii liposomów utworzonych przez związki zdolne do samoorganizacji w roztworach wodnych (tj. lipidów i surfaktantów), a użytych jako szablony do przeprowadzenia reakcji polimeryzacji wewnątrz dwuwarstwy lipidowej, doprowadziła do otrzymania ich polimerowych replik. Powstałe analogiczne supramolekularne nanoskopowe struktury wykazywały większą stabilność chemiczną i mechaniczną.[12] Różnorodne monomery z aktywnymi grupami funkcyjnymi (np.: -COOH, $-NH_2$, -OH, -SH) stwarzają możliwość syntezy membran o pożądanych właściwościach fizyko-chemicznych. Są one wykorzystywane w strategii "inteligentnego" – aktywnego transportu leków (*smart drug delivery systems*, DDS). Aktywny transport czynników cytotoksycznych polega na zastosowaniu nośników wyposażonych w specyficzne przeciwciała monoklonalne oraz w inhibitory angiogenezy lub interkalatory DNA (inhibitory transkrypcji i translacji), które poprawiają ich wychwytywanie w komórkach, a więc zwiększają działanie leków wpływając na efektywność terapii.[13] Inteligentne - bo precyzyjne - dostarczanie leków przez nośnik może być regulowane działaniem bodźców zewnętrznych (np.: światłem) lub wewnętrznych (np.: zmianami -pH, temperatury) stymulujących ich dozowanie. Ze względu na różnice odczynu pH w tkankach zdrowych (pH = 7,4) i patologicznych (pH = 6.0 - 6,5) kontrolowane uwalnianie leków następuje pod wpływem hydrolizy nośnika w środowisku kwaśnym. Ponadto, znacznie podwyższony poziom glutationu (GSH) w komórkach nowotworowych (□100% do 500%) powoduje redukcję mostków disufidowych (-S-S-) obecnych w dostarczanych prolekach, a w konsekwencji uwalnianie związków cytotoksycznych w chorych miejscach tkanek. Terapia onkologiczna wymaga spełnienia dodatkowych warunków tj. kierowania i zwiększenia skuteczności pasywnego wnikania nośników leków do komórek patologicznych wskutek dyfuzji oraz przedłużonego uwalniania zgromadzonej substancji czynnej (*enhanced permeability and retention*, EPR efekt).[14a,b]

Cele te są realizowane przez zastosowanie nowoczesnej nanotechnologii, w której projektowane nośniki leków mają średnice od kilku do kilkunastu nanometrów (0,1-100 nm).[14c,d] Najważniejszym jednak warunkiem, który muszą spełniać nośniki polimerowe stosowane w badaniach klinicznych, jest brak toksyczności produktów ich rozkładu oraz metabolitów, a także biokompatybilność, definiowana jako obojętność układu immunologicznego wobec obcego materiału dostarczanego do organizmu. Strategia "inteligentnego" transportu i regulowanego dawkowania leków wymaga więc, aby nośniki polimerowe spełniały powyższe oczekiwania. Do polimerów stosowanych w badaniach klinicznych dopuszczonych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration (FDA, U.S)[15a] należą biodegradowalne poliestry alifatyczne (estry kwasów: glikolowego, mlekowego oraz ε-hydroksy kapronowego) wraz z ich kopolimerami (np.: polilaktyd-*co*-poliglikolid).[15b] Szeroko stosowane jest nietoksyczny, silnie hydrofilowy poliglikolid (PGA) oraz poli(tlenek etylenu) (PEG) o niskiej masie molowej (M_w = 2000) łatwo wydalany z organizmu.[16a] Ponadto, kopolimery kwasu akrylowego i metakrylowego z *N*-izopropyloakrylamidem (np.: NIPAAm-MAA) tworzące materiały o właściwościach termoczułych (kurczą się w podwyższonej temperaturze),[16b] także znajdują szerokie zainteresowanie w projektowaniu inteligentnych nośników leków.[16c] Hydrofilowe polimerowe bio-nano materiały związane z lekami stosowanymi w onkologii np.: kopolimery NIPAAm z doksorubicyną, kamptotecyną, paklitakselem oraz platyną zostały wprowadzone do terapii przeciwnowotworowej w 1990 r.[17a,b,c] Dodatkowo, modyfikacja proleków z wykorzystaniem poli(glikolu etylenowego) (tzw. PEGylacja) zwiększa czas cyrkulacji leków w krwiobiegu poprawiając wydajność ich wchłaniania (wzrost efektu EPR).[17d,e] PEGylację stosuje się również w celu stabilizacji liposomów i kapsułek polimerowych.[17f] Kontrolowaną dyfuzję leków umożliwiają nanopory wytworzone w powłoce polimerowej kapsułek, które pozwalają na transport molekularny między wnętrzem kapsułki, a jej otoczeniem. Sterowanie procesem dyfuzji[18] ułatwiają wprowadzone grupy funkcyjne wrażliwe na bodźce zewnętrzne[19] tj.: światło,[20] temperaturę,[21] zmiany pH środowiska.[22] Polimerowe kapsułki dzięki przedłużonej cyrkulacji *in vivo* w obwodowym systemie naczyń krwionośnych uwalniają całość zawartego w nich leku ograniczając jednocześnie jego gwałtowne wydzielanie oraz kardiotoksyczność, wynikającą z nadmiernego gromadzenia się wolnego leku w tkance mięśnia sercowego. Dodatkowym celem enkapsulacji jest zabezpieczenie postaci aktywnej leku przed niepożądanym rozkładem enzymatycznym i płynami ustrojowymi organizmu. Strategia nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej polega więc na wybiórczym kierowaniu skoncentrowanej dawki leku do komórek patologicznych w celu zwiększenia efektywności ich działania i minimalizacji efektów ubocznych w zdrowych tkankach. Znane w diagnostyce medycznej barwniki fluorescencyjne wykorzystywane jako ligandy do obrazowania komórek nowotworowych znajdują zastosowanie w projektowaniu prekursorów leków.[23] Sprzężenie funkcji terapeutycznej z diagnostyczną (określone terminem *theranostic*) pozwala w nowoczesnych prolekach monitorować ich dystrybucję wewnątrzkomórkową.[24] Ponadto, w terapii przeciwnowotworowej i diagnostyce fotodynamicznej stosowane są światłoczułe związki organiczne będące pochodnymi tetrapiroli cyklicznych (tj. porfiryn) lub błękitu metylenowego, które pod wpływem naświetlania wskutek absorpcji fotonów generują wysoce reaktywny tlen singletowy ($^1O_2$, O_2^-) niszczący tkanki zmienione chorobowo.[25]

Integracja fluorescencyjnych barwników z membraną (np.: pochodnych kumaryny,[26,27] spiropyranu,[28] azo-benzenu[29]) reagujących na światło i/lub pH, spełniających rolę molekularnych "foto-przełączników" w polimerowych nanokapsułkach, umożliwia regulację procesu dyfuzji enkapsulowanych leków w wyniku dynamicznych zmian wiązań kowalencyjnych zachodzących w ich strukturze.[30] Projektowanie nośników o regulowanej wielkości porów do kontrolowanego uwalniania leków jest jednym z podstawowych celów farmakoterapii. W niniejszym opracowaniu podsumowuję wyniki swoich badań dotyczących syntezy polimerowych nanokapsułek wykorzystujących strukturę liposomów do enkapsulacji związków cytotoksycznych (np.: 5-fluorouracylu), które mogą znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej. Cel jaki sobie postawiłam to opracowanie metod syntezy fluorescencyjnych nośników leków przeciwnowotworowych - biomimetycznych polimerowych nanokapsułek, które umożliwiają monitorowanie transportu czynnika aktywnego farmaceutycznie (*API*) w żywych komórkach, ułatwiając diagnostykę medyczną. Omawiam również nową koncepcję syntezy koniugatu przeciwnowotworowego, złożonego z fotoczułej molekuły fluorescencyjnej fenosafraniny z kowalencyjnie przyłączoną cząsteczką chlorambucylu (*API* o właściwościach alkilujących). Po raz pierwszy przedstawiam idee zastosowania innowacyjnego *API* łączącego właściwości interkalatora i czynnika alkilującego DNA, spełniającego wymagania stawiane przed nowoczesną terapią fotodynamiczną, wykazującego zarówno właściwości diagnostyczne jak i terapeutyczne (*theranostic agent*). Podkreślam również znaczenie klatek silseskwioksanów funkcjonalizowanych fenosafraniną, które ze względu na swoją nanometrową wielkość i łatwość przenikania przez błony komórkowe, mogą znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej. Szczegółowe opisy celów badawczych są przedstawione w dołączonych publikacjach. W swoim autoreferacie omawiam najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań.

4.4. Omówienie osiągniętych wyników

4.4.1. Metody stabilizacji liposomalnych nanostruktur (H4)

Elastyczna membrana liposomów utworzona z dwuwarstwy fosfolipidowej podlega dynamicznym zmianom, ułatwiając swobodne przechodzenie molekuł z wnętrza liposomów do ich otoczenia i *vice versa.* Strategia dostarczania związków cytotoksycznych do komórek patologicznych wymaga więc modyfikacji konwencjonalnych liposomów, które wykazują ograniczony do kilkudziesięciu minut (60 min.) połowiczny czas życia ($t_{1/2}$) w surowicy krwi i są usuwane z organizmu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy.[31] Dezintegracja liposomów następuje pod wpływem lipoprotein obecnych we krwi oraz procesów fagocytozy, dlatego wydłużenie czasu cyrkulacji liposomów w krwioobiegu jest podstawowym zagadnieniem. Stabilizację ich struktur można uzyskać w wyniku zastosowania następujących strategii:

a) wykorzystania środków powierzchniowo-czynnych zawierających wiązania winylowe ulegające procesowi polimeryzacji, czyli tzw. aktywnych surfaktantów spełniających rolę monomerów[32a] (tworzą one tzw. sztuczne membrany poli(lipidowe))

b) adsorpcję polimerów na powierzchni formowanych liposomów (*layer-by-layer* deposition, LbL)[33a] lub dyspersję polimerów do dwuwarstwy lipidowej (membrany inkluzyjne) [33b]

c) sieciowanie dwuwarstwy lipidowej pęcherzyków wskutek wprowadzenia do niej hydrofobowych monomerów poddanych następnie polimeryzacji.[34]

Ad. a) Stabilizację liposomów z poli(lipidową) membraną (np.: z poli(akrylanu oleinowego), poli(metakrylanu oleinowego)) otrzymano w wyniku polimeryzacji pod wpływem naświetlania promieniowaniem ultrafioletowym UV monomerów lipidowych zawierających w łańcuchu hydrofobowym lub w części hydrofilowej grupy reaktywne: winylowe, metakrylanowe, diacetylenowe lub styrenowe.[32b] Jednak bezpośrednia polimeryzacja związków amfifilowych hamuje ruchliwość ich łańcuchów, redukując proces samoorganizacji spolimeryzowanych lipidów, a tym samym utrudnia utworzenie liposomów.

Ad. b) W metodzie LbL przepuszczalność otrzymanej powłoki zależy od liczby naniesionych warstw polimerów będących polielektrolitami.[35a] Stosowane są np.: chlorowodorek poli(alliloaminy)/sól sodowa poli(sulfonianu styrenu)[35b] oraz chitozan/alginiany,[36] które osadzane kolejno w sposób przemienny w wyniku oddziaływań elektrostatycznych i kompleksowania jonowego (metodą sekwencyjnej adsorpcji polielektrolitów) wzmacniają membranę liposomów utrwalając ich kształt. Wzajemne interakcje zostają jednak osłabione przez sole obecne w środowisku, które wpływają na ich ekranowanie i dysocjację, a także wskutek splątania łańcuchów polimerowych powodujących obniżenie gęstości ładunku powierzchniowego.[37,38] Modyfikacja metody LbL polegająca na zastosowaniu karbodiimidu *N*-etylo-*N'*-(3-dimetyloaminopropylu) (EDC) do sieciowania warstwy utworzonej z kwasu poliakrylowego/poli(lizyny) doprowadziła do otrzymania stabilnych kapsułek czułych na zmiany pH środowiska.[39,40] Inna metoda tzw. inkluzyjna polegająca na pułapkowaniu w dwuwarstwie lipidowej liniowych polimerów o ładunku obojętnym powoduje defekty membrany i dezintegrację liposomów. Wprowadzanie do liposomów amfifilowych kopolimerów różniących się długością łańcuchów ma wady, ponieważ w tym procesie powstają różne formy multilamelarnych struktur zawierające adsorbowane oraz inkludowane kopolimery, a także oddzielne micele polimerowe. Liposomy modyfikowane kopolimerami pH- i termoczułymi w warunkach fizjologicznych[41] np.: poli(*N*-izopropyloakrylamid-*co*-akrylan pirolidyny), poli(*N*-izopropyloakrylamid-*co*-akrylan propylu) zostały wykorzystane do enkapsulacji leku przeciwnowotworowego (doksorubicyny).[42] Zmiany pH środowiska regulują wzrost lub zmniejszenie sił oddziaływań elektrostatycznych między cząsteczkami i powodują kurczenie lub rozprężenie łańcuchów kopolimeru wpływając na deformację i reorganizację konformacji dwuwarstwy lipidowej (zmieniając jej izomeryzację *trans/gauche*) indukując uwalnianie leku. Ponadto, wprowadzenie amfifilowego, termoczułego kopolimeru triblokowego zwanego poloksamerem złożonego z [politlenku etylenu-$(PEO)_{98}$-politlenku propylenu-$(PPO)_{67}$- politlenku etylenu-$(PEO)_{98}$] (tj. Pluronic F127, M_W. 12,600) z długimi łańcuchami modyfikującymi dwuwarstwę lipidową, zmniejsza wychwytywanie liposomów przez układ siateczkowo-śródbłonkowy organizmu.[43a]

Ze względu na silną hydratację struktur zawierających ugrupowania PEO następuje redukcja adhezji białek obecnych w krwioobiegu do powierzchni kapsułek, powodując wydłużenie czasu ich cyrkulacji w warunkach *in vivo*.[43b,c] Dodatkowo, w terapii przeciwnowotworowej dostarczanie leku dawkowanego w sposób termiczny redukuje ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek. Synteza biomimetycznych kapsułek o kontrolowanej wielkości i kształcie jest szczególnie trudna, dlatego bezpośrednie budowanie struktur w wyniku spontanicznej samoorganizacji związków amfifilowych, które następnie wzmacniane są blokami polimerów powiązanymi ze sobą kowalencyjnie jest bezcenną i niezawodną metodą projektowania stabilnych form nanoskopowych. Bezpośrednie pokrycie powierzchni liposomów kilkuwarstwową powłoką polimerową pozwala zmniejszyć szybkość uwalniania enkapsulowanych związków oraz ogranicza utlenianie lipidów. Ponadto, utworzone metodą LbL nanokapsułki posiadają asymetryczną powłokę złożoną z dwóch odrębnych części, z których wewnętrzna membrana lipidowa jest kompatybilna z enkapsulowanymi czynnikami aktywnymi farmaceutycznie (*API*) i biomolekułami.

Nanokapsułki syntezowane metodą inkluzyjną zawierające membranę polimerową otoczoną biokompatybilną warstwą fosfolipidów wykazują natomiast łatwą penetrację przez błony komórkowe. Przepuszczalność powłoki polimerowej kapsułek o nanometrowej grubości jest kluczowym zagadnieniem przy projektowaniu nośników leków, których uwalnianie determinowane jest wielkością porów wytworzonych w membranie. Nanopory działają jak sita molekularne i umożliwiają selektywne rozdzielenie związków na podstawie ich wielkości. Cząsteczki mniejsze od średnicy porów pokonując oporność ścianki polimerowej mogą być wychwytywane z otoczenia oraz uwalniane z kapsułek z szybkością dyfuzji.

Ad. c) Zagadnienia dotyczące polimeryzacji monomerów zgromadzonych w dwuwarstwie lipidowej liposomów w celu otrzymania LKP są tematem moich badań przedstawionych szczegółowo w autoreferacie.

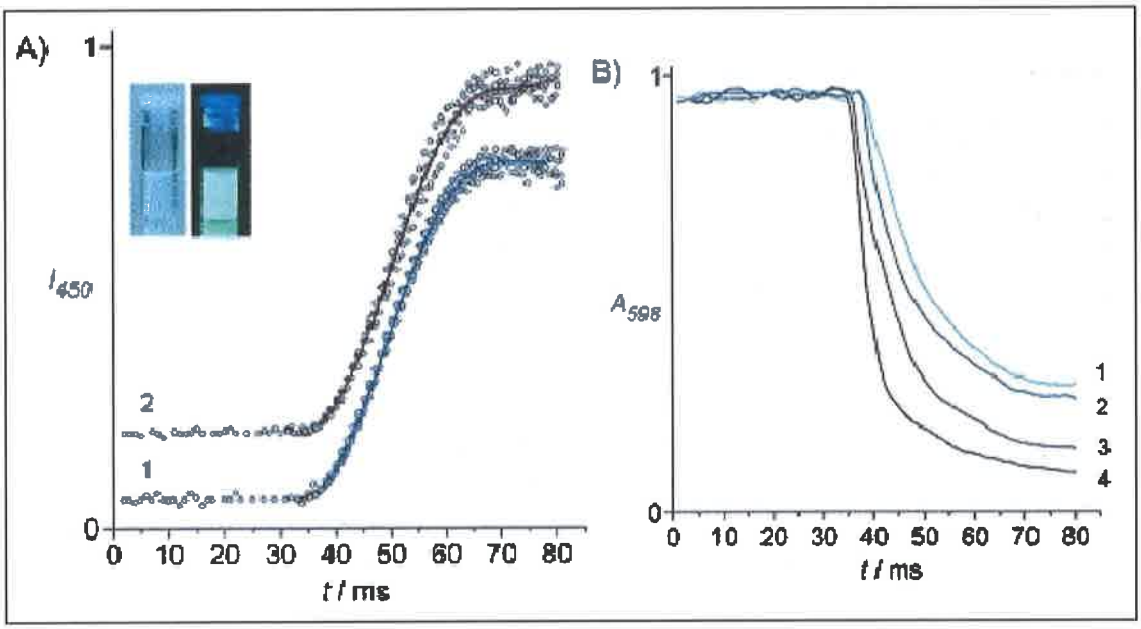
4.4.2. Synteza LKP z powłoką polistyrenową przeznaczonych do diagnostyki i obrazowania

Jak wspomniałam, lipidy oraz surfaktanty (mieszanina kationowych i anionowych środków powierzchniowo czynnych) o właściwościach amfifilowych ulegają spontanicznej samoorganizacji w środowisku wodnym tworząc agregaty[44a] wykorzystywane jako szablony do syntezy stabilnych polimerowych nanostruktur, które mogą przyjąć formę: nanokapsułek, nanodysków i nanorurek.[44b,45] W swojej pracy syntezowałam liposomalne nanokapsułki z sieciowaną powłoką z poli(4-*tert*-butylostyrenu-*co*-diwinylobenzenu), w której podstawnik *tert*-butylowy generujący zawadę przestrzenną indukował nanopory rozmieszczone statystycznie w warstwie polimerowej.[46a,b] Grubość wytworzonej warstwy polimerowej była porównywalna z grubością dwuwarstwy lipidowej (od 4 do 7 nm) będącej środowiskiem polimeryzacji dla zgromadzonych w niej hydrofobowych monomerów *tert*-butylostyrenu i diwinylobenzenu, a otrzymane LKP odwzorowywały sferyczną architekturę liposomów.

Proces polimeryzacji rodnikowej był indukowany promieniowaniem UV o długości fali λ = 254 nm, a otrzymane polistyrenowe LKP miały wąski rozrzut średnic w zakresie od 100 nm do 140 nm.[46c] Grubość warstwy polimerowej wpływa na jej trwałość ale ogranicza równocześnie jej przepuszczalność i jest parametrem krytycznym decydującym o właściwościach i strukturze LKP. Badania przeprowadzone metodą rozpraszania neutronowego pod małym kątem (*small-angle neutron scattering*, SANS) wykazały, że grubość sieciowanej warstwy polistyrenowej utworzonej pomiędzy listkami dwuwarstwy lipidowej wynosi od 1.0 do 2.0 nm ± 0.1 nm.[47] Tak więc monomery hydrofobowe wykazujące powinowactwo do łańcuchów alkilowych fosfolipidów migrują do granicy wyznaczonej przez listki dwuwarstwy lipidowej liposomów określającej topologię powstających agregatów, wykorzystanych jako tymczasowe szablony do przeprowadzenia reakcji polimeryzacji.[48] Sieciowanie na granicy separacji faz pomiędzy "listkami" surfaktantu nadaje LKP stabilność, a utworzona membrana polimerowa pozwala zachować kształt sferyczny (np.: podczas procesu suszenia). Ponadto, cienka i porowata polimerowa membrana wyznacza optymalną pojemność wewnętrzną liposomalnych kapsułek w stosunku do ich całkowitej objętości sprawiając, że mogą one znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach np.: w biosensorach przy wymianie jonów i ich transporcie przez nanopory na drodze dyfuzji[49] oraz w nanoreaktorach w procesie równoczesnej *co*-enkapsulacji kilku komponentów w celu przeprowadzenia syntezy.[50] Szybkość dyfuzji przez polimerową membranę jest odwrotnie proporcjonalna do jej grubości będącej parametrem krytycznym i decydującej o kinetyce transportu. Grubość powłoki polimerowej wpływa także na transparentność LKP i warunkuje ich zastosowanie do enkapsulacji barwników spełniających funkcję indykatorów pH-metrycznych oraz katalizatorów wykorzystywanych w sensorach optycznych i nanoreaktorach.[51] Selektywna przenikalność powłoki LKP może być kontrolowana przez nanopory o wielkości (0.8 ± 0,2 nm lub 1.3 ± 0.2 nm) wytworzone w wyniku pułapkowania hydrofobowych porogenów np.: cząsteczek analogów winylowych pentaoctanu lub pentabezoesanu glukozy[52] lub też modulowana jest doborem monomerów zawierających np.: metakrylan *tert*-butylu.[53] Wprowadzenie porogenów do dwuwarstwy lipidowej zwiększa zakres metod molekularnego drukowania (tzw. imprintingu) stosowanych do otrzymywania nanoporowatych powłok polimerowych. Transport przez nanopory o zdefiniowanych rozmiarach jest ograniczony wielkością molekuł, które selektywnie wnikają lub są uwalniane z LKP z szybkością dyfuzji.

Szybkość procesu dyfuzji jonów przez syntetyczną membranę została przeze mnie zmierzona metodą stopped-flow aparatem (Aviv Model 410, CD spektometr) wyposażonym w detektor fluorescencji i absorpcji UV.[54] Enkapsulowane barwniki hydrofilowe tj.: czerwony procion MX (M_w = 615; $\lambda_{Ab.max}$ = 538 nm), piranina (M_w = 524; w środowisku kwaśnym $\lambda_{Ab.max}$ = 400 nm, w zasadowym $\lambda_{Ab.max}$ = 450 nm; $\lambda_{Em.max}$ = 510 nm), oraz błękit bromofenolowy (M_w = 670; $\lambda_{Ab.max}$ = 430 nm lub $\lambda_{Ab.max}$ = 598 nm, pK_a = 3.85-4.20) lokowały się w wodnej przestrzeni LKP nie wydostając się do otoczenia, a indykatory ulegały odwracalnej reakcji protonowania pod wpływem zmian pH środowiska zewnętrznego. Z nachylenia krzywej opisującej kinetykę reakcji deprotonacji piraniny natywnej w roztworze i enkapsulowanej w LKP wynikało, że są one tego samego rzędu, a czas potrzebny do całkowitej zmiany widma emisji był zbliżony (Rysunek 1A).

Podobna jest również szybkość konwersji cząsteczek błękitu bromofenolowego do formy protonowanej dla barwnika natywnego w wodnym roztworze HCl oraz enkapsulowanego (Rysunek 1B). Półprzepuszczalna, ultracienka "niewidzialna" powłoka polimerowa pozwala na transfer masy z szybkością dyfuzji i nie ogranicza kinetyki transportu jonów z otoczenia zewnętrznego do środka kapsułek, umożliwiając ich szybką partycypację w reakcjach ze związkami enkapsulowanymi. Tak więc, warstwa polimerowa o nanometrowej grubości zawierająca statystycznie rozmieszczone nanopory o dużej gęstości upakowania nie blokuje komunikacji chemicznej między zatrzymanym w LKP indykatorem a środowiskiem zewnętrznym oraz nie ogranicza szybkości wymiany jonów. Dzięki porowatości warstwy syntetycznej, która spełnia rolę selektywnej membrany o właściwościach separacyjnych, LKP z enkapsulowanymi barwnikami jonoselektywnymi są idealnymi nanoobiektami dla sensorów optycznych[55] i mogą być wykorzystane przy projektowaniu sensorów elektrochemicznych.

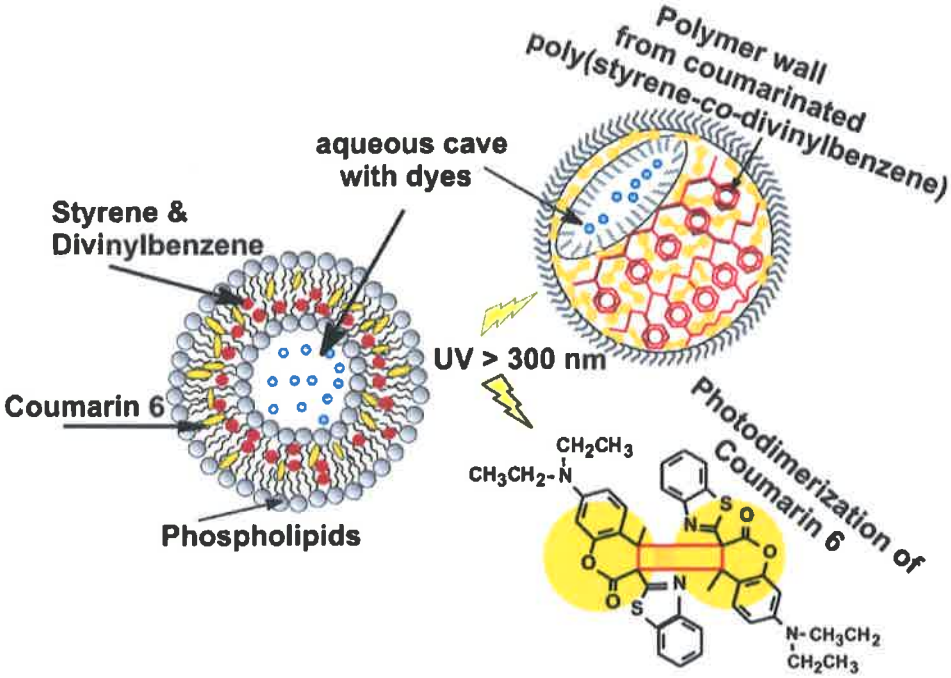


Rysunek 1. Zmiany intensywności fluorescencji (A) oraz absorpcji (B) w funkcji czasu w doświadczeniach stopped-flow przeprowadzonych z wolnymi i enkapsulowanymi barwnikami. (A) Wyniki otrzymane dla natywnej piraniny (1) i piraniny enkapsulowanej (2) w środowisku NaOH. Intensywność emisji (λ_{Em} = 450 nm) zawiesiny LKP z 0.2 % Tritonem X-100 była zmierzona przy wzbudzeniu światłem o długości λ_{EX} = 366 nm. (B) Wyniki otrzymane dla błękitu bromofenolowego w roztworze (2,4) i enkapsulowanego (1,3) z dodatkiem 1 mM (1,2) i 5 mM (3,4) HCl. [**H1**]

Różnorodne zastosowanie LKP służących jako np.: nanoreaktory,[56] nanosensory,[57] nośniki leków[58] oraz nanokontenery przeznaczone do obrazowania w diagnostyce medycznej sprawiają, że struktury te skupiają zainteresowanie wiodących grup badawczych na świecie.[59] Szczegółowe badania dotyczące omawianych zagadnień, w których aktywnie uczestniczyłam i wniosłam znaczący wkład intelektualny zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie. [**H1**]

Kierunek dalszych badań samodzielnie przeze mnie prowadzonych (przedstawionych w publikacji **H2**) jest silnie zorientowany na syntezę biokompatybilnych LKP spełniających rolę sond w optycznym obrazowaniu molekularnym komórek, które mogłyby znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej i terapii przeciwnowotworowej.[60] Nowatorstwo stabilnych makromolekularnych systemów przeznaczonych do obrazowania i wykorzystujących LKP z fluorescencyjną powłoką polimerową polega na zastosowaniu podwójnej detekcji optycznej (umożliwiającej przeprowadzenie pomiarów z użyciem fluorymetru oraz spektrofotometrycznie w zakresie promieniowania widzialnego Vis), która zwiększa precyzję analiz wykorzystujących metody spektralne.[61] W celu otrzymania LKP z silnie fluorescencyjną powłoką o neutralnym ładunku powierzchniowym zastosowałam cząsteczki hydrofobowej kumaryny-6 tj. 3-(2-benzotiazolyl)-7-(dietylamino)kumaryny, M_W = 350, λ_{Em} = 502 nm, $\lambda_{Ab.\ max}$ = 444 nm), która wyróżnia się bardzo dobrą fotostabilnością (długim czasem życia w stanie wzbudzonym). Molekuły hydrofobowej kumaryny-6 zostały pułapkowane w warstwie polistyrenu sieciowanego diwinylobenzenem.[62] W wodnej przestrzeni LKP enkapsulowałam cząsteczki barwników hydrofilowych (tj. żółty lucyfer (M_W = 521, λ_{Ex} = 428 nm, λ_{Em} = 540), czerwony procion-MX (M_W = 615, $\lambda_{Ab.max}$ = 538 nm) i błękitny porocion MX-R (M_W = 637, $\lambda_{Ab.max}$ = 630 nm), ale zasadniczą funkcję czynnika kontrastującego spełniała wytworzona fluorescencyjna kumarynowa powłoka polimerowa. Cząsteczki fotoczułej kumaryny-6 pod wpływem promieniowania UV o długości λ = 310 nm ulegają dimeryzacji w trakcie prowadzonego procesu polimeryzacji, tworząc hydrofobowe mikrodomeny w warstwie poli(styren-*co*-diwinylobenzen). Związek ten pułapkowany w matrycy polimeru o wysokim stopniu sieciowania nie traci swoich właściwości fluorescencyjnych zachowując neutralną formę cząsteczki. Molekuła kumaryny-6 zawierająca ugrupowanie benzotiazolu, który decyduje o jej silnej fluorescencji stosowana jest w okulistyce w leczeniu plamki żółtej.[63] Ponieważ proces fotodimeryzacji kumaryny-6 polega na wytworzeniu pierścienia cyklobutanu między dwiema molekułami kumaryny, dlatego nie wpływa on na zanik fluorescencji pochodzącej od wbudowanego w cząsteczkę benzotiazolu. Ponadto, fluorescencja chromoforu zależy silnie od lokalnego środowiska w którym on się znajduje. Molekuła kumaryny-6 w matrycy sieciowanego polimeru ma zahamowaną ruchliwość ze względu na wzrost lepkości lokalnej otoczenia. Widma fluorescencyjne nanokapsułek z kumarynową powłoką poli(styren-*co*-diwinylobenzen) wzbudzane przy różnej długości fali: λ_{Ex} = 330 nm, λ_{Ex} = 370 nm i λ_{Ex} = 400 nm wskazują maksimum emisji przy długości λ_{Em} = 502 nm, które jest o 10 nm przesunięte w kierunku fal dłuższych (efekt batochromowy) w stosunku do natywnej molekuły kumaryny-6. Przesunięciu towarzyszy również poszerzenie widma emisji, które sugeruje powstanie ekscymerów (utworzonych w wyniku zderzeń między molekułami barwnika w stanie wzbudzonym i podstawowym) wskutek kumulacji i wzrostu stężenia barwnika w lokalnych domenach matrycy polimerowej. Naświetlanie kapsułek promieniowaniem UV o długości λ = 250 nm nie spowodowało rozerwania mostków cyklobutanu wytworzonych w reakcji dimeryzacji molekuł kumaryny-6, ponieważ kumarynowa sonda została unieruchomiona w sieci polimerowej wytworzonej w wyniku sieciowania łańcuchów z poli(styrenu-*co*-dywinylobenzenu) mających ograniczoną ruchliwość.

Enkapsulowane barwniki hydrofilowe zachowały swoje optyczne właściwości nie ulegając degradacji (wyblaknięciu) w trakcie naświetlania promieniowaniem UV (λ = 310 nm) inicjującym proces polimeryzacji wolnorodnikowej.

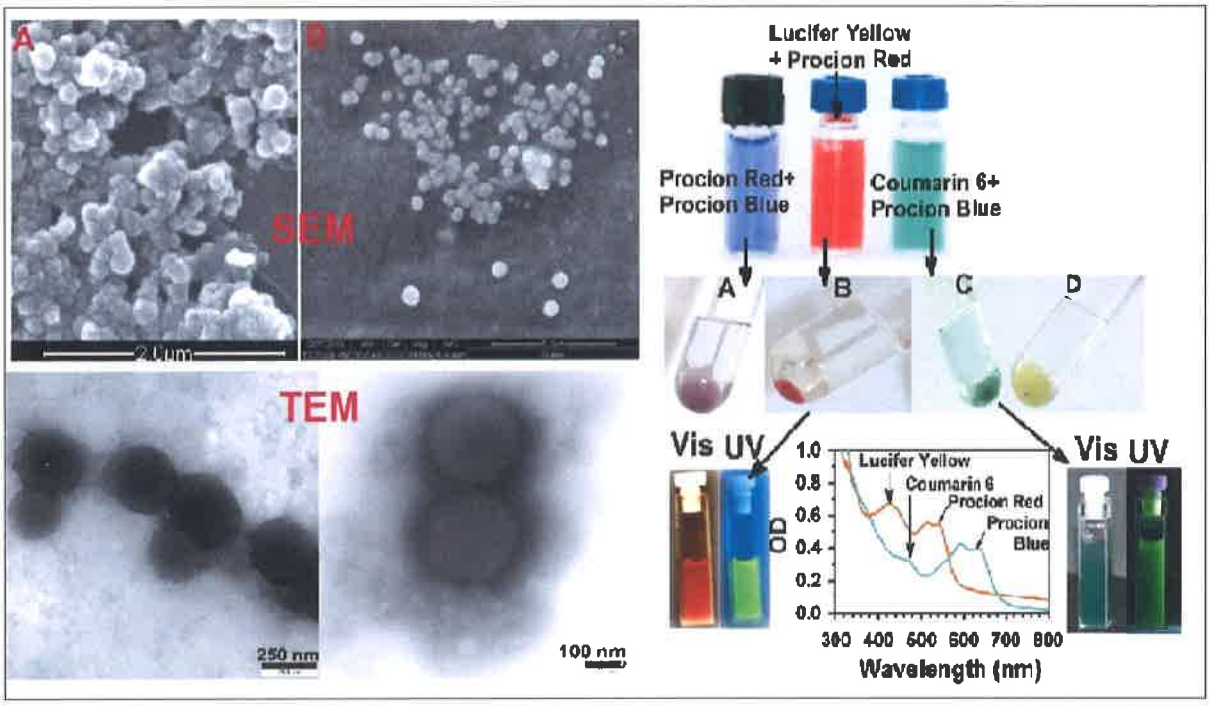


Rysunek 2. Ilustracja procesu syntezy LKP otrzymanych w wyniku polimeryzacji monomerów styrenu i diwinylobenzenu wraz z dimeryzacją molekuł kumaryny-6 pod wpływem promieniowania UV (310 nm), Monomery zgromadzone są w dwuwarstwie lipidowej liposomów. [**H2**]

Wybrane barwniki (o zbliżonych masach molowych ale różniące się zakresem absorpcji światła) zostały w sposób trwały zatrzymane w LKP. Po raz pierwszy cząsteczka kumaryny-6 została zastosowana w procesie polimeryzacji rodnikowej monomerów styrenu i diwinylobenzenu w celu wytworzenia sieciowanej warstwy polimerowej o silnie fluorescencyjnych właściwościach. Kumaryna-6 nie uległa destrukcji w trakcie syntezy LKP dlatego otrzymane kumarynowe nanokapsułki mogą służyć jako optycznie trwałe sondy molekularne stosowane w badaniach biologicznych. Przykładowe obrazy LKP wykonane metodami skaningowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej: (*scanning electron microscopy*, SEM; *transmission electron microscopy*, TEM) z kumarynową warstwą poli(styren-*co*-diwinylobenzenu) przedstawiam na Rysunku 3.

Przeprowadzone eksperymenty *in vitro* wykonane na linii komórkowej HeLa wykazały skuteczność LKP w obrazowaniu molekularnym. Doświadczenia wykonane z użyciem cytometrii przepływowej potwierdziły niską cytotoksyczność LKP. Komórki HeLa inkubowane z LKP w zakresie stężeń (1-100 mg/L) po upływie 48 godzin wykazały przeżywalność na poziomie 80%.

Wynik ten potwierdza dobrą biokompatybilność LKP udowodnioną także przez inne zespoły badawcze, które sprawdziły działanie polistyrenowych nanokapsułek na trzech ludzkich liniach komórkowych: nerek (HEK293), płuc (A549) i T limfocytów (Jurkat) nie powodując apoptozy.[64] Ponieważ zewnętrzna powierzchnia LKP wyposażona jest w fosfolipidy ułatwiające penetrację błon biologicznych, dlatego syntezowane nanokapsułki stanowią nową ofertę hybrydowych nanomateriałów polimerowych, które mogą spełniać funkcje czynników diagnostycznych w badaniach medycznych. Ich przydatność polega na fluorescencyjnym znakowaniu membran biologicznych i monitorowaniu biodystrybucji makromolekuł w organellach komórkowych. [**H2**]



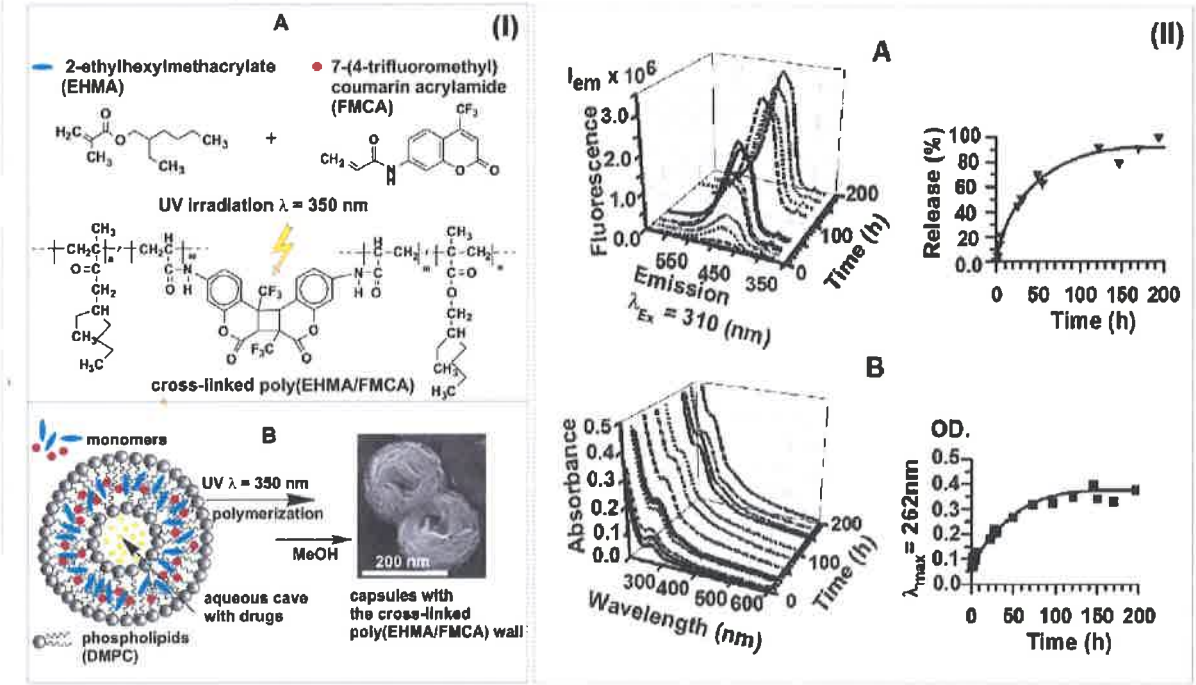
Rysunek 3. Fotografie LKP z kumarynową warstwą poli(styren-*co*-diwinylobenzenu) wykonane metodami SEM i TEM: (A) LKP wytrącone z metanolu po usunięciu otoczki fosfolipidowej, (B) LKP zawieszone w wodzie. Panel z prawej strony ilustruje wodną zawiesinę kapsułek oraz kapsułki po wytrąceniu metanolem z enkapsulowaną mieszaniną barwników: (A) procion czerwony i błękitny, (B) czerwony procion i żółty lucyfer, (C) błękitny procion z kumaryną-6 pułapkowaną w powłoce, (D) kumarynowe polistyrenowe kapsułki. Poniżej przedstawione są widma absorpcyjne kapsułek B i C wykazujących silną fluorescencję pod wpływem UV (330 nm). [**H2**]

4.4.3. Synteza światłoczułych kapsułek z odwracalnie sieciowaną powłoką z poli[metakrylanu 2-etyloheksylu-*co*-akrylamidu 7-(4-trifluorometylo)kumaryny]

W projektowaniu stabilnych nanokapsułek spełniających rolę nośników leków (*drug delivery system, DDS*) należy uwzględnić uplastycznienie oraz przepuszczalność powłoki polimerowej. Elastyczna powłoka ułatwia dopasowanie kształtu w trakcie przepływu przez naczynia włosowate układu krwionośnego i przeciwdziała gwałtownemu pękaniu kapsułek pod wpływem ciśnienia fizjologicznego, hamując nadmierne uwalnianie zbyt dużej dawki enkapsulowanego leku. Poulain opisała syntezę kapsułek z anionowego środka powierzchniowo czynnego tj. fosforanu sodu bis(2-etyloheksylu) i akrylanu izodecylu ($H_2C{=}CHCO_2(CH_2)_7(CH_3)_2$), które zostały przeprowadzona na drodze polimeryzacji wolnorodnikowej inicjowanej nadsiarczanem potasu ($K_2S_2O_8$) lub azoizobisbutyronitrylem (AIBN) w temperaturze 60 °C.[65a] Polimeryzacja akrylanu izodecylu prowadzi do otrzymania elastomeru (T_g < 10 °C). W strukturze molekularnej obu wymienionych związków (surfaktantu i monomeru) występują rozgałęzione łańcuchy alkilowe ułatwiające wzajemne ich dopasowanie. Ograniczenie środowiska polimeryzacji do części lipofilowej pęcherzyków pozwoliło na homogeniczny rozkład poli(akrylanu izodecylu) w domenach hydrofobowych dwuwarstwy pęcherzyków i utworzenie kapsułek będących ich repliką o średnicy □ 50 nm.[65b] Zastosowanie perfluorowanych fosfolipidów (np.: perfluoroalkilowej fosfatydylocholiny) prowadzi do otrzymania liposomów o większym stopniu uporządkowania - wynikającym ze ścisłego upakowania dwuwarstwy lipidowej, które wymuszone jest silnymi oddziaływaniami lipofilowymi między łańcuchami bogatymi w atomy fluoru.[66] Działają one jak "linaktanty" (*line active molecules*) redukując naprężenie liniowe między nanodomenami węglowodorowymi i fluorowęglowodorowymi w warstwie tworzącej polimerową membranę.[67] Właściwości fluoru wykorzystywane są również przy projektowaniu leków przeciwnowotworowych, ponieważ jego obecność wzmacnia działanie farmakologiczne. Powszechnie stosowanymi w selektywnej terapii przeciwnowotworowej[68,69] są np.: 5-fluorouracyl, fludarabina i klofarabina. Występowanie fluoru w postaci tylko jednego izotopu ^{19}F ułatwia pomiary techniką magnetycznego rezonasu jadrowego NMR *(nuclear magnetic resonace)* oraz umożliwia obrazowanie techniką MRI (*magnetic resonance image*) a związki znakowane promieniotwórczym izotopem ^{18}F (np.: fludeoksyglukoza ^{18}F-FDG) stosowane są w pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej (PET). Tak więc obecność atomów fluoru w cząsteczkach leków zwiększa ich aktywność bilogiczną oraz pozwala na wygodne "skanowanie" i monitorowanie dostarczanych fluorowanych *API*.[70] Uwzględniając właściwości fluoru, po raz pierwszy opracowałam syntezę nanokapsułek polimerowych z monomerów metakrylanu 2-etyloheksylu (EHMA) oraz fluorowanego analogu kumaryny zawierającego ugrupowanie akrylamidowe tj. akrylamidu 7-(4-trifluorometylo)kumaryny (FMCA) spełniającego funkcję czynnika sieciującego. Obecność atomów fluoru ^{19}F (pochodzących od podstawników $-CF_3$ kumaryny) ułatwia pomiar i wizualizację nanostruktur będących czynnikami kontrastującymi tzw. "hotspots" w komórkach organizmów żywych.[71]

Oba monomery wraz z inicjatorem (2,2-dimetoksy-2-fenyloacetofenonem) zostały wprowadzone do dwuwarstwy lipidowej na etapie formowania liposomów utworzonych z DPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholiny). Zastosowane przeze mnie monomery akrylowe (FMCA oraz EHMA) były tak dobrane aby warunki polimeryzacji akrylanów[72] pod wpływem promieniowania UV o długości fali λ = 350 nm uwzględniały dimeryzację monomerów kumaryny, która odgrywa decydującą rolę w procesie sieciowania warstwy polimerowej LKP. Obecność jednostek kumaryny, która w sposób odwracalny ulega dimeryzacji wytwarzając pierścień cyklobutanu wskutek [2 + 2] cykloaddycji[73] umożliwiła *in situ* sieciowanie wytworzonych łańcuchów kopolimeru poli(EHMA-*co*-FMCA) tworzących elastyczną membranę polimerową. Cząsteczka EHMA ma rozgałęzioną strukturę złożoną z dwóch łańcuchów alkilowych, a otrzymany homopolimer poli(EHMA) charakteryzuje się niską temperaturą zeszklenia (T_g ~ -10 °C).[74] Oznacza to, że powyżej T_g polimer przestaje być materiałem sztywnym - szklistym, zmieniając się w miękki i rozciągliwy wskutek pojawienia się ruchów segmentowych w łańcuchach polimeru (tzw. *micro Brownian movements*). Wprowadzone do polimeru molekuły FMCA wyposażone w sztywny i większy objętościowo podstawnik kumaryny uczestniczący aktywnie w procesie sieciowania, wzmacniają termomechaniczne właściwości kopolimeru, ponieważ następuje wzrost energii aktywacji ruchów segmentowych w jego łańcuchach oraz podwyższenie temperatury T_g. Fotodimeryzacja pochodnych kumaryny w kopoliakrylanach o niskiej temperaturze T_g przebiega szybciej w obrębie tego samego łańcucha (intermolekularnie) w przeciwieństwie do polimerów mających wyższą temperaturę T_g, w których intramolekularna dimeryzacja jednostek kumaryny między różnymi łańcuchami kopolimeru jest bardziej efektywna.[75-77] Właściwości fizyczne kopoliestru (EHMA-*co*-FMCA) są również modyfikowane w wyniku oddziaływań niekowalencyjnych - wielokrotnych wiązań wodorowych pochodzących od analogów amidowych kumaryny (FMCA) i grup estrowych (EHMA).[78-80] Tak więc, molekuły kumaryny mają fundamentalne znaczenie w tworzeniu sferycznych polimerowych kapsułek. Sieciowana warstwa polimerowa o nanometrowej grubości reguluje wymianę molekularną między środowiskiem wewnętrznym, a otoczeniem LKP, spełniając istotną rolę w kontrolowanym uwalnianiu enkapsulowanych leków w procesie powolnej dyfuzji. Zastosowanie promieniowania o długości fali λ = 254 nm powoduje rozerwanie pierścieni cyklobutanu wytworzonych między dimerami kumaryny, które prowadzi do gwałtownego uwolnienia enkapsulowanych związków aktywnych farmaceutycznie. Innowacyjność opracowanej przeze mnie metody syntezy LKP polega na otrzymaniu fluorescencyjnych nanopęcherzyków z odwracalnie sieciowaną porowatą powłoką polimerową, służących do kontrolowanego uwalniania enkapsulowanych związków cytotoksycznych (np.: fluorouracylu) [**H3**]. Obrazy mikroskopowe syntezowanych przeze mnie LKP o wielkości od 200 do 250 nm z warstwą poli(EHMA/FMCA) przedstawiam poniżej na Rysunku 4.[81] Wybranym przeze mnie lekiem przeciwnowotworowym poddanym enkapsulacji był 5-fluorouracyl stosowany powszechnie w leczeniu nowotworów: jelita grubego, żołądka, raka piersi, prostaty, jajnika i innych zmian chorobowych.[82] W badaniach *in vitro* przeprowadzonych w wodzie (pH = 6.0) porowata powłoka LKP umożliwiła powolny transfer 5-fluorouracylu z kapsułek do ich środowiska zewnętrznego na drodze dyfuzji, a wyznaczony czas połowicznego uwalniania leku wynosił $t_{1/2}$ = 40 godzin.

Wielkość nanoporów optymalna dla molekuł 5-fluorouracylu o promieniu Stokes'a równym 3.72 Å pozwoliła na dyfuzję leku, blokując uwalnianie cząsteczek *co*-enkapsulowanej hydrofilowej fenosafraniny – fluorescencyjnego barwnika wykazującego tendencję do agregacji.[83] Selektywność nanoporów polegała więc na separacji cząsteczek różniących się wielkością, a LKP z warstwą poli(EHMA/FMCA) mogą spełniać rolę nośników leków oraz molekularnych narzędzi fluorescencyjnych służących do obrazowania komórek (tzw. kontrastów). Nowa koncepcja nośników leków przeznaczonych do obrazowania (*theranostic*) oparta jest na syntezie fluorescencyjnych LKP z sieciowaną membraną polimerową zwierającą selektywne nanopory - spełniające rolę sit molekularnych, które regulują proces dyfuzji enkapsulowanych cząsteczek w sposób wybiórczy uwzględniając ich wielkość. Naświetlanie kapsułek z poli(EHMA-*co*-FMCA) powłoką promieniowaniem UV o długości λ = 254 nm powoduje pękanie LKP i gwałtowne uwalnianie enkapsulowanych składników.



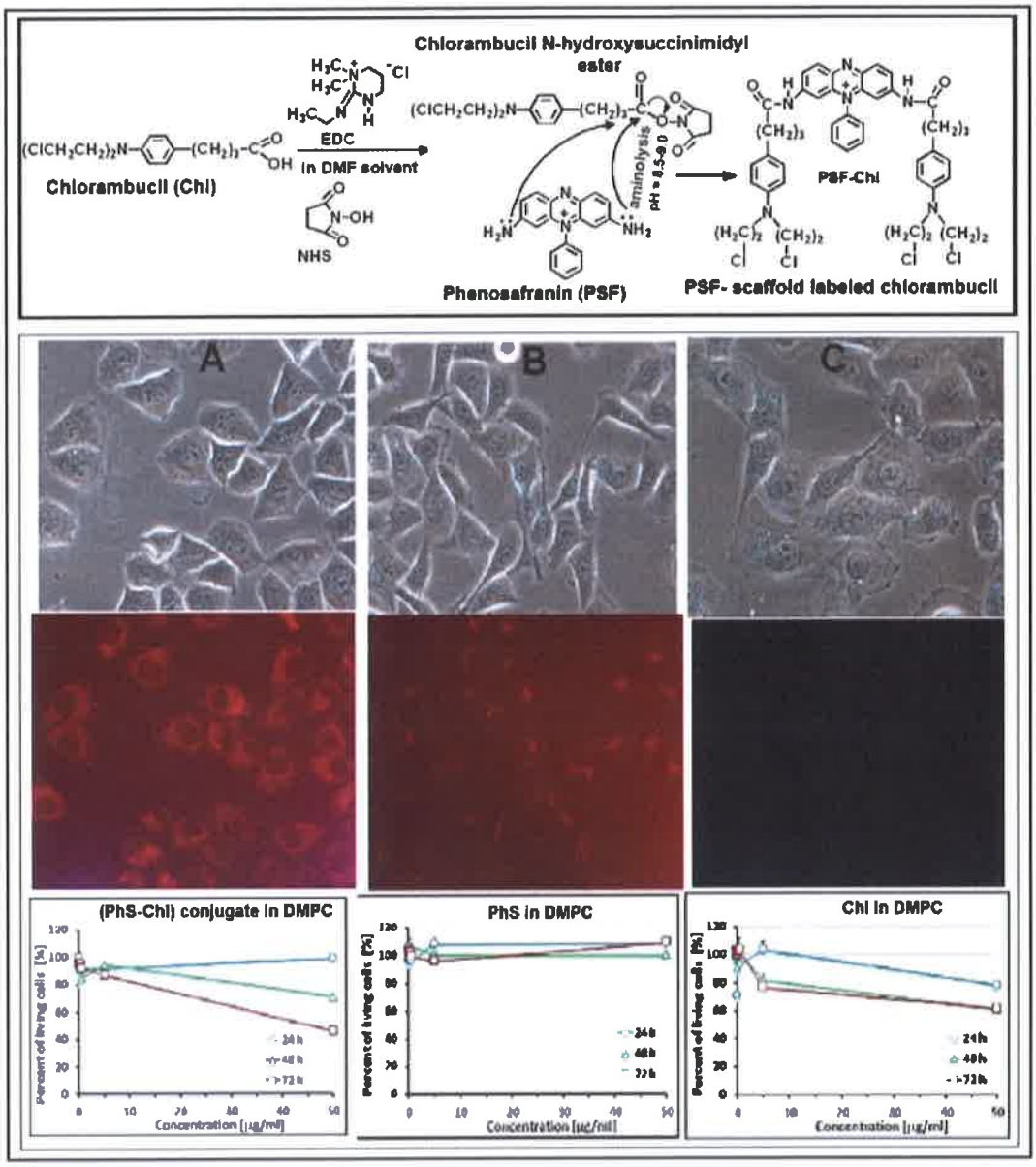
Rysunek 4. Panel (I) ilustruje: (I-A) schemat kopolimeryzacji monomerów: FMCA i EHMA. Naświetlanie molekuł kumaryny promieniowaniem o długości λ = 350 nm prowadzi do ich fotochemicznej dimeryzacji z utworzeniem pierścienia cyklobutanu i w rezultacie usieciowania kopolimeru poli(EHMA-*co*-FMCA), oraz (I-B) schemat ideowy liposomów z hydrofobowymi monomerami zgromadzonymi w środowisku dwuwarstwy lipidowej, które poddane polimeryzacji utworzyły LKP. Panel (II) przedstawia szybkość uwalniania 5-fluorouracylu z LKP zmierzoną metodami: fluorescencyjną (II-A) oraz spektrometryczną w zakresie UV-vis (II-B) a wyznaczony czas połowicznego uwalniania leku wynosił $t_{1/2}$ = 40 godzin. [**H3**]

Opracowałam więc innowacyjny model nośnika (DDS, *drug deliver systems*) w postaci LKP służący do enkapsulacji leków przeciwnowotworowych, z których proces uwalniania może być sterowany impulsami światła w zakresie promieniowania UV. Chcę podkreślić, że zarówno 5-fluorouracyl jak i fenosafranina są odporne na promieniowanie UV-Vis[84] i nie ulegają deaktywacji w trakcie procesu syntezy LKP, zachowując swoje właściwości fizyko-chemiczne oraz aktywność biologiczną. Dzięki silnej fluorescencji fenosafraniny (barwnika o wysokiej wydajności kwantowej) otrzymane LKP z enkapsulowanym sensybilizatorem i 5-fluorouracylem mogą służyć do optycznego obrazowania molekularnego i monitorowania efektów prowadzonej terapii. Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* wykonane na liniach komórkowych ssaków: HeLa oraz Neuro2a (*mouse, brain neuroblastoma*) wykazały po 96 godzinnej inkubacji niską (10-20%) cytotoksyczność pustych nanokapsułek z poli(EHMA/FMCA) powłoką. Cytotoksyczność LKP zawierających 5-fluorouracyl sprawdzona na tych samych liniach komórkowych była najwyższa po 24 godzinnej inkubacji i wynosiła 50%, ponieważ w tym czasie nastąpiło całkowite uwolnienie leku. Ponadto, sieciowana warstwa polimerowa zapewniła hybrydowym LKP integralność strukturalną, a molekuły enkapsulowanej fenosafraniny funkcję emitera fluorescencji w pomiarach obrazowania komórek. [**H3**]

4.4.4. Synteza nowej generacji koniugatu o właściwościach cytotoksycznych zawierającego chlorambucyl wyznakowany fluorescencyjną fenosafraniną

Rozwój współczesnej medycyny wymaga prowadzenia badań w kierunku terapii spersonalizowanej tj. zindywidualizowanej terapii przeciwnowotworowej o wysokiej skuteczności.[85] Terapia spersonalizowana polega na zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych do rozpoznania zmian nowotworowych w wyniku silnych oddziaływań typu antygen-przeciwciało występujących w miejscach patologicznych tkanek. W przypadku pozytywnej odpowiedzi przeciwciała te mogą zostać wprowadzone do organizmu, ale już w formie koniugatów związanych z lekiem przeciwnowotworowym i znacznikiem ułatwiającym monitorowanie skutków zastosowanej metody leczenia. Czynnik aktywny farmaceutycznie (*API*) powinien działać jak *"theranostic agent"* wyposażony w element diagnostyczny spełniający funkcję sondy (w emisyjnej tomografii pozytonowej-PET i radioizotopowej oraz w obrazowaniu metodą MRI i fluorescencyjną) a także zawierać część terapeutyczną (np.: wektor terapii genowej, radioizotopy, cytotoksyczny lub światłoczuły lek). W badaniach obrazowania *in vivo* stosowane są światłoczułe związki fluoryzujące (np.: zieleń indocyjaninowa) spełniające funkcję sondy molekularnej, których emisja fluorescencyjna występuje w zakresie bliskiej podczerwieni. Ponadto, czynnik kontrastowy może mieć właściwości fotosensybilizatora (fotouczulacza jak np.: analogi porfiryn, psolaren) spełniające wymagania stawiane współczesnej terapii fotodynamicznej.[86]

Obrazowanie optyczne umożliwia detekcję leku oraz jego lokalizację w komórkach patologicznych, ułatwiając wizualizację skutków zastosowanej terapii w celu dobrania optymalnych warunków leczenia. Fotouczulacze są gromadzone w komórkach nowotworowych w większym stężeniu w porównaniu z komórkami prawidłowymi ze względu na zwiększone unaczynienie i przenikalność guzów. Z tego względu intensywność fluorescencji emitowanej przez komórki nowotworowe wyznakowane światłoczułym związkiem jest większa i w trakcie postępu leczenia zanika po zniszczeniu chorych komórek. Terapia fotodynamiczna jest bezinwazyjną metodą leczenia nowotworów skórnych, wykorzystującą właściwości związków światłoczułych generujących reaktywne molekuły tlenu w stanie singletowym ($^1O_2$), które indukują w komórkach kaskadę reakcji chemicznych i powodują lokalne zniszczenie tkanek (apoptozę i nekrozę). Toksyczne działanie fotosensybilizatora jest ograniczone do miejsca i czasu naświetlania, dlatego terapia fotodynamiczna jest metodę mniej szkodliwą w porównaniu z chemioterapią i radioterapią. Terapia fotodynamiczna jest dobrze tolerowana przez pacjentów ponieważ daje minimalne efekty uboczne i można ją wielokrotnie powtarzać. Barwniki fenazynowe i ich strukturalne analogi (np.: błękit metylenowy, safranina O, fenosafranina) pod wpływem naświetlania przechodzą w stan elektronowego wzbudzenia, który charakteryzuje długi czas życia (10^{-8} – 10^{-9} s.) dlatego mogą być stosowane w terapii fotodynamicznej.[87] W mojej pracy wykorzystałam fenosafraninę (chlorek 3,7-diamino-5-fenylofenazynowy) z dwiema wolnymi grupami aminowymi zdolnymi do dalszej funkcjonalizacji. Molekuła barwnika zbudowana na szkielecie fenazyny ma płaska strukturę i zdelokalizowany ładunek dodatni (Rysunek 5). Właściwości te ułatwiają interkalację molekuł fenosafraniny z kwasami nukleinowymi (DNA i RNA) komórek.[88] Barwnik ten wykazuje silną absorpcję (λ_{Ab} = 503 - 530 nm) i fluorescencję (λ_{Ex} = 520 nm, λ_{Em} = 570 nm). Przyłączony kowalencyjnie za pomocą wiązania amidowego do cząsteczki chlorambucylu (leku przeciwnowotorowego stosowanego w leczeniu białaczki) pozwala monitorować lek w komórkach. Widmo UV-Vis czystego chlorambucylu (Chl) w wodzie charakteryzują dwa maksima absorpcji (λ_{Ab} = 258 nm oraz λ_{Ab} = 303 nm), które występują w zakresie autofluorescencji komórek. Wprowadzenie hydrofilowej cząsteczki fenosafraniny obdarzonej ładunkiem dodatnim poprawia penetrację koniugatu PSF-Chl w komórkach oraz umożliwia jego obrazowanie redukując zjawisko interferencji wywołane tłem z autofluorescencji komórek. Metodę tę można zastosować także dla szerszej gamy leków przeciwnowotworowych o właściwościach alkilujących (np.: melfalanu) (Rysunek 5) [**H6**]. Większość hydrofobowych leków cytotoksycznych (oraz fotosensibilizatorów) ze względu na ich ograniczoną rozpuszczalność i niepożądane efekty uboczne wymaga enkapsulacji w dopasowanym nośniku. Jak dotąd, najczęściej stosowana jest metoda formulacji liposomalnej zatwierdzona przez U.S. FDA.[89] Otrzymany koniugat PSF-Chl enkapsulowany w liposomach (utworzonych z fosfolipidów DMPC) został wprowadzony (w zakresie stężeń 50-500 μM) do komórek HeLa poddanych 72 godzinnej inkubacji. Badania wykazały, że śmiertelność połowy komórek (IC_{50} – *lethal concentration*) nastąpiła dla IC_{50} = 52.3 ± 3 μM. Trudno przenikający przez błony biologiczne Chl został przekształcony w koniugat fluorescencyjny mający cechy markera.



Rysunek 5. Górny panel ilustruje schemat reakcji syntezy koniugatu fenosafraniny (PSF) z chlorambucylem (Chl). Poniżej, przedstawione są obrazy mikroskopowe komórek HeLa inkubowanych ze związkami enkapsulowanymi w fosfolipidach (DMPC): (A) koniugat (PSF-Chl), (B) barwnik PSF, (C) związek cytotoksyczny Chl. Fluorescencja komórek została zarejestrowan w warunkach: (λ_{Ex} = 540/25, λ_{Em} = 605/55) typowych dla barwnika. Cytotoksyczność związków inkubowanych z komórkami wyznaczona metodą kolorymetryczną MTT była najwyższa dla koniugatu PSF-Chl, dla którego wartość IC_{50} zmierzona po 72 godzinach wynosiła 52,3 ± 3 μM. [**H6**]

Wyjaśnienie mechanizmu internalizacji czynnika cytotoksycznego na drodze endocytozy oraz monitorowanie kolejnych etapów szlaku sygnałowego w cytoplazmie i jego dystrybucji w różnych organellach komórkowych, stało się więc możliwe dzięki jego fluorescencyjnym właściwościom.

Fotostabilny koniugat może działać w komórkach jak emiter fluorescencji umożliwiając monitorowanie aktywności cytotoksycznej Chl w chorych tkankach. Zaprojektowany przeze mnie innowacyjny koniugat PSF-Chl o właściwościach cytotoksycznych zawierający cząsteczki chlorambucylu związane z diagnostyczną molekułą fenosafraniny spełnia wymagania nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej i może być stosowany jako innowacyjna postać leku opisywana w literaturze jako "*theranostic agent*". [**H5, H6**]

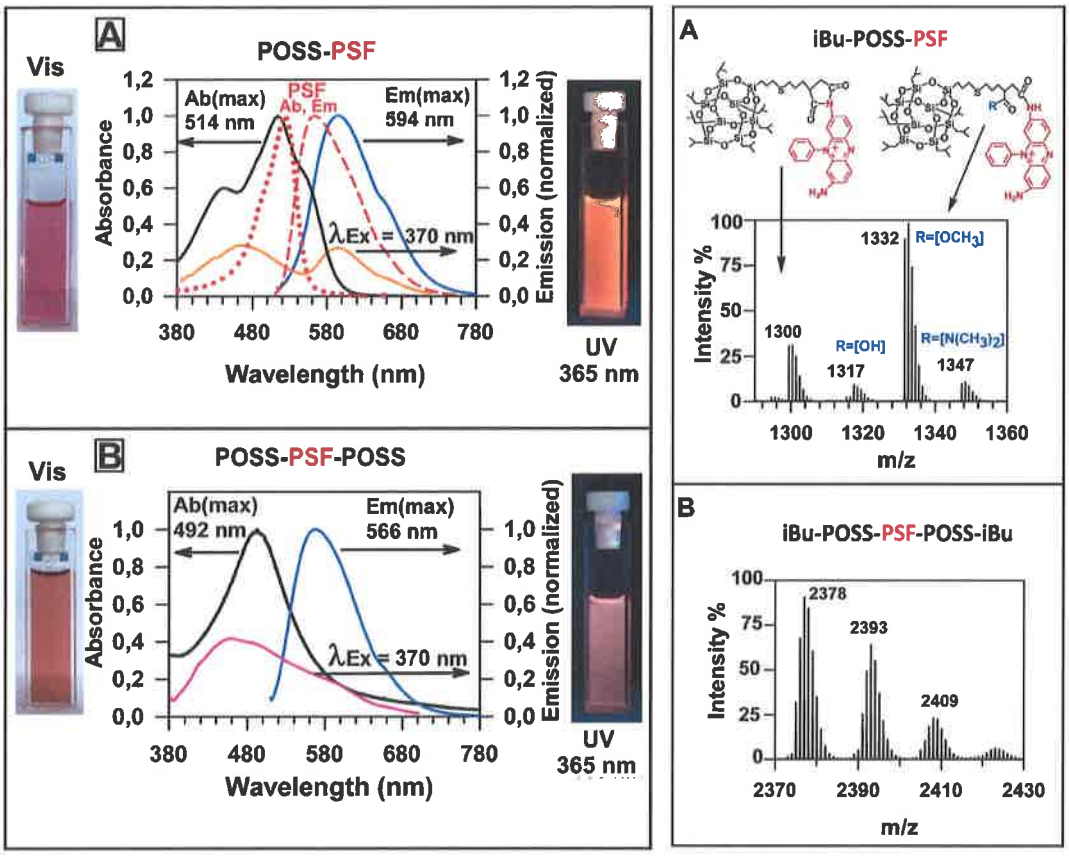
Po raz pierwszy został zsyntezowany fluorescencyjny koniugat zawierający chlorambucyl związany kowalencyjnie z matrycą fenosafraniny (PSF-Chl). Innowacyjność otrzymanego przeze mnie nowego środka o właściwościach cytotoksycznych spełniającego wymagania nowoczesnej terapii (przeznaczonego do leczenia z jednoczesną diagnostyką) polega na połączeniu właściwości alkilujących chlorambucylu ze zdolnościami fenosafraniny do interkalacji DNA komórek. Przeprowadzone badania *in vitro* na linii komórkowej HeLa udowodniły zwiększony efekt cytotoksyczny koniugatu PSF-Chl w porównaniu z chlorambucylem natywnym. Cząsteczka Chl wzbogacona właściwościami interkalacyjnymi dodatnio naładowanej molekuły PSF wykazywała w badaniach *in vitro* wyższą cytotoksyczność.

4.4.5. Synteza koniugatu fenosafraniny związanej kowalencyjnie z klatką silseskwioksanu (POSS) spełniającego rolę markera i innowacyjnego interkalatora oddziaływującego z DNA komórek

Poliedryczne oligosilseskwioksany (POSS-y) o regularnej budowie symetrycznej klatki są materiałami hybrydowymi tj. organiczno-nieorganicznymi. Najczęściej stosowany jest oktaedryczny silseskwioksan (T_8) zbudowany z ośmiu trójfunkcyjnych jednostek (T = [R-Si(O-)$_3$], w których R oznacza grupę organiczną) o rozmiarach nanometrycznych (6 $Å^3$), mający symetryczną strukturę przestrzenną zbliżoną do sześcianu foremnego.[90] Ze względu na biokompatybilność i zdolność penetracji błon komórkowych[91] struktury te mogą być wykorzystywane jako nośniki leków (ibuprofenu, acetaminofenu, doksorubicyny, daunorubicyny).[92] Ponadto, ulegają one hydrolitycznej degradacji do obojętnego biologicznie kwasu ortokrzemowego.[93] Uwzględniając możliwość zastosowania POSS-ów jako nanokropek spełniających funkcję sondy fluorescencyjnej w optycznym obrazowaniu komórek[94] oraz w terapii fotodynamicznej (po przyłączeniu porfiryny IX lub chloryny e6)[95] są one rozpatrywane jako materiał medyczny nowej generacji. W moich badaniach wykorzystałam POSS-y z grupą bezwodnikową (np.: 3[(3-bezwodnik bursztynowy propylu)tiopropylheptaisobutyl oktasilseskwioksan, iBu-POSSAn), którą wyznakowałam fotosensybilizatorem – molekułą fenosafraniny.

Celem mojej pracy była synteza bezpiecznych środków kontrastowych (fluorescencyjnych kropek) przeznaczonych do obrazowania optycznego komórek. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* na linii komórkowej HeLa udowodniłam, że koniugat POSS-PSF swobodnie przenikając przez błony komórkowe nie wykazuje właściwości cytotoksycznych lecz działa jak interkalator kwasów nukleinowych (DNA), a więc może znaleźć zastosowanie w fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej.

Ponadto, dzięki przyłączonej hydrofilowej fenosafraninie (PSF^+) obdarzonej ładunkiem dodatnim koniugaty iBu-POSS-PSF (z hydrofobową klatką) ulegają w środowisku wodnym samoorganizacji tworząc sferyczne nanoagregaty o średnicy 250 nm (SD ± 20 nm). W terapii fotodynamicznej miejscowa kumulacja związku światłoczułego (tj. PSF) jest wskazana ze względu na uzyskanie większego stężenia czynnika aktywnego (tlenu singletowego $^1O_2$) powstającego w procesach metabolicznych komórek w wyniku naświetlania barwnika.



Rysunek 6. Panel prawy przedstawia widma masowe wykonane techniką fotojonizacji (APPI-MS, *atmospheric pressure photoionization mass spectra*) dla (A) iBu-POSS-PSF oraz (B) $(iBu\text{-}POSS)_2$-PSF. Sygnał o najwyższej intensywności *m/z* 2378 jest sumą wartości *m/z* 1347 (iBu-POSS-PSF) i *m/z* 1031 (iBu-POSS). Panel lewy opisuje widma absorpcyjne w zakresie UV-Vis (czarna linia) oraz emisyjne (niebieska linia) koniugatów POSS-PSF i POSS-PSF-POSS rozpuszczonych w metanolu. Wzbudzenie koniugatów falą o długości λ_{Ex} = 500 nm wywołuje maksimum emisji fluorescencji przy $\lambda_{Ex(max)}$ = 594 nm dla POSS-PSF i $\lambda_{Ex(max)}$ = 566 nm dla POSS-PSF-POSS. Linia pomarańczowa (panel A) i różowa (panel B) ilustrują widma emisyjne POSS-PSF i POSS-PSF-POSS otrzymane przy wzbudzeniu falą o długości λ_{Ex} = 370 nm. Fotografie z użyciem lampy UV (λ_{Ex} = 365 nm) uwidaczniają zmianę barwy mono- i di-podstawionej cząsteczki PSF. [H7] Różnica polarności cząsteczek POSS-PSF oraz PSF-POSS-PSF wynika z dodatniego efektu indukcyjnego (+*I*) generowanego przez klatkę POSS będącą podstawnikiem o właściwościach elektronodonorowych. Polaryzacja wiązań σ w cząsteczkach koniugatów wpływa na ich oddziaływania z rozpuszczalnikiem organicznym (np.: metanolem) wywołując efekt solwatochromowy, generujący zmiany w widmie emisyjnym fluorescencji.

Nowatorstwo zaprojektowanych przeze mnie nanostruktur POSS-PSF polega na wprowadzeniu nowego typu interkalatora DNA i RNA, który może znaleźć zastosowanie w celowanej terapii fotodynamicznej i diagnostyce medycznej. Analizy koniugatów przeprowadzone metodami spektralnymi (FTIR, NMR, UV-Vis oraz fluorometryczną) potwierdziły kowalencyjne przyłączenie barwnika do klatki POSS z utworzeniem wiązania amidowego. Ponadto, do symetrycznej molekuły PSF zawierającej dwie grupy aminowe z których jedna związana jest z klatkę POSS można przyłączyć cząsteczkę aktywną biologicznie (np. przeciwciało). Podkreślić należy, że asymetryczna cząsteczka POSS-PSF ma interesujące właściwości ze względu na silne wiązanie z kwasami nukleinowymi jąder komórkowych wykazując zwiększoną intensywność fluorescencji, dlatego też może być szeroko stosowana jako marker DNA. Szczegółowe wyniki badań dotyczące budowy strukturalnej i charakterystyki cząsteczek POSS-PSF (z zastosowaniem metod FTIR i NMR) wraz z analizą ich właściwości optycznych i fluorescencyjnych zostały przeze mnie opisane w publikacji [**H7**]. Właściwości optyczne syntezowanych nanoobiektów POSS-PSF przedstawiam poniżej na Rysunku 6, natomiast ich szczegółowa charakterystyka zamieszczona jest w publikacji [**H7**].

4.5. Podsumowanie i wnioski

Przedstawione przeze mnie badania mogłam zrealizować dzięki wsparciu finansowemu, które uzyskałam z Komitetu Badań Naukowych MNiSW na kierowanie projektem (nr. **NN 209 762 440**). Wszystkie oryginalne publikacje w których jestem autorem korespondencyjnym powstały według moich autorskich pomysłów i są efektem wieloletniej pracy naukowej oraz doświadczenia zawodowego.

Poniżej omawiam najważniejsze swoje osiągnięcia wynikające z prowadzonych badań.

1. Opracowałam metodę syntezy liposomalnych kapsułek polimerowych (LKP) z warstwą polistyrenową sieciowaną diwinylobenzenem, wykorzystując liposomy jako szablony do otrzymywania trwałych nanoobiektów o strukturze pęcherzyków. [**H1, H2**]

- Po raz pierwszy zastosowany został monomer *tert*-butylostyrenu modyfikujący usieciowaną powłokę polimerową kapsułek w celu wytworzenia w niej nanoporów umożliwiających ultra-szybką wymianę jonów z otoczeniem. [**H1**]

- Otrzymane polistyrenowe nanokapsułki z pułapkowanymi indykatorami (tj. błękitem bromofenolowym lub piraniną) wykazywały wrażliwość enkapsulowanych barwników na zmiany pH środowiska. Ze względu na czułość wyznakowanych LKP są one cennym materiałem, który można wykorzystać przy konstruowaniu nowych sensorów optycznych. [**H1**]

- Opracowałam metodę syntezy kapsułek z silnie fluorescencyjną powłoką polimerową wprowadzając po raz pierwszy do procesu kopolimeryzacji styrenu z diwinylobenzenem molekuły kumaryny-6. Wybrany przeze mnie światłoczuły analog kumaryny zawierający w cząsteczce grupę benzotiazolu zachował swoje właściwości fluorescencyjne podczas procesu polimeryzacji monomerów inicjowanej promieniowaniem UV (310 nm). Dimeryzacja *in situ* molekuł inkorporowanej kumaryny-6 nie zahamowała procesu polimeryzacji. [**H2**]

- Wykazałam biokompatybilność i przydatność nanokapsułek z kumarynową powłoką poli(styren-*co*-diwinylobenzen) do obrazowania biologicznego komórek. Neutralna powłoka polimerowa dzięki inkorporowanej kumarynie-6 spełnia rolę emitera fluorescencji. [**H2**]

2. Po raz pierwszy została opracowana metoda syntezy nanokapsułek polimerowych z odwracalnie sieciowaną pod wpływem promieniowania UV powłoką z poli(metakrylanu 2-etyloheksylu-*co*-akrylamidu 7-(4-trifluorometylo kumaryny). W procesie sieciowania kopolimeru (UV = 350 nm) wykorzystałam właściwości cząsteczek kumaryny do dimeryzacji z utworzeniem mostka cyklobutanu. [**H3**]

- Zaprojektowałam nowy typ kapsułek polimerowych przeznaczonych do enkapsulacji aktywnego czynnika przeciwnowotworowego 5-fluorouracylu. W trakcie syntezy kapsułek lek nie uległ degradacji zachowując swoje właściwości cytotoksyczne. [**H3**]

- Otrzymane przeze mnie fotołoczułe "inteligentne" kapsułki z porowatą powłoką służą do kontrolowanego uwalniania leków. LKP umożliwiają powolną dyfuzję 5-fluorouracylu ($t_{1/2}$ = 40 godz.) lub gwałtowne jego uwalnianie w wyniku promieniowania UV o długości λ = 254 nm, które indukuje pękanie pierścieni cyklobutanu. [**H3**]

- Opracowałam metodę *co*-enkapsulacji fotoczułego barwnika fluorescencyjnego - fenosafraniny z 5-fluorouracylem. Oba związki nie ulegają degradacji w trakcie syntezy polimerowych kapsułek, które spełniają funkcję markera, ułatwiając ich monitorowanie w komórkach. [**H3**]

- Badania *in vitro* przeprowadzone na linii komórkowej HeLa wykazały dobrą biokompatybilność i brak toksyczności materiału tworzącego polimerowy nośnik. Zachowana cytotoksyczność uwalnianego z nanokapsułek 5-fluorouracylu umożliwia zastosowanie ich w terapii przeciwnowotworowej. [**H3**]

- Opracowałam metodę syntezy nowego związku cytotoksycznego będącego koniugatem fenosafraniny i chlorambucylu (PSF-Chl) mającego właściwości interkalatora i aktywnego czynnika alkilującego. [**H6**]

3. Po raz pierwszy molekuły chlorambucylu zostały kowalencyjnie związane z płaską cząsteczką fluorescencyjnej fenosafraniny, która obdarzona ładunkiem dodatnim ułatwia interkalację koniugatu z kwasami nukleinowymi (DNA, RNA) komórek. [**H6**]

- Przeprowadzone badania cytotoksyczne PSF-Chl na liniach komórkowych HeLa wykazały silniejszą cytotoksyczność koniugatu (wartość IC_{50} = 52,3 ± 3 μM) od natywnego chlorambucylu. Otrzymałam więc innowacyjny związek cytotoksyczny nowej generacji o bardzo dobrej aktywność biologicznej, łatwy do monitorowania w komórkach, mający potencjalne zastosowanie w fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej (np.: w leczeniu czerniaka). [**H6**]

4. Po raz pierwszy nanoklatka silseskwioksanu wyznakowana cząsteczką fenosafraniny (POSS-PSF) służąca jako model markera i interkalatora oddziaływującego z DNA i RNA komórek może być potencjalnie wykorzystany w fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej (w leczeniu nowotworowych zmian skórnych). [**H7**]

4.6. Literatura

[1] (*a*) E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, *Biointerphases* **2012**, *7*, 1-27; (*b*) A. Babu, A. K. Templeton, A. Munshi, R. Ramesh, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2014**, *15*, 709-721; (*c*) G. G. De La Cruz, P. Rodriguez-Fragoso, J. Reyes-Esparza, A. Rodrígues-Lopez, R. Gomez-Cansino, L. Rodriguez-Fragoso "*Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials-From Biomedical to Environmental Applications*" **2018**, Chapter 3 37-59, (INTECH, http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69386); (*d*) M. Bj□rnmalm, K. J. Thurecht, M. Michael, A. M. Scott, F. Caruso, *ACS Nano*, **2017**, *11*, 9594-9613.

[2] G. Zan, Q, Wu, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 2099-2147.

[3] (*a*) R. Koynova, B. Tenchov, *Transition between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles.* OA Biochemistry **2013**, Apr 01;1(1):9; (*b*) *M. Eeman, M. Deleu, Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, *14*, 719-736.

[4] (*a*) N. Nandi, D. Vollhardt, *Adv. Coll. Interf. Sci.* **2014**, *208*, 110-120; (*b*) S Komura, D. Andelman, *Adv. Coll. Interf. Sci.* **2014**, *208*, 34-46; (*c*) A. A. Bischof, A. Mangiarotti, N. Wilke *Soft Matter* **2015**, *11*, 2147-2156.

[5] S. Šegota, D. Težak, *Adv. Coll. Inter. Sci.* **2006**, *121*, 51-75.

[6] D. D. Lasic, *Trends in Biotechnology*, **1998**, *16*, 307-321.

[7] T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, G. W. Feigenson, *Biochem. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2182-2194.

[8] (*a*) L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, S. Hua, *Frontiers in Pharmacol.* **2015**, *6*, article 286; doi: 10.3389/fphar.2015.00286, (*b*) B. S. Pattini, V. V. Chupin, V. P. Torchilin, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10938-10966, (*c*) D. Irby, C. Du, F. Li, *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 1325-1338; (*d*) N. Lamichhane, T. S. Udayakumar, W. D. D'Souza, C. B. Simone II, S. R. Raghavan, J. Polf, J. Mahmood, *Molecules,* **2018**, *23*, 288; DOI: 10.3390/molecules23020288.

[9] (*a*) D. Mellal, A. Zumbuehl, *J. Mater. Chem. B.* **2014**, *2*, 247-252; (*b*) K. B. Johnsen, J. M. Gudbergsson, M. Duroux, T. Moos, T. L. Andresen, J. B. Simonsen *J. Contr. Release* **2018**, *269*, 10-14; (*c*) A. Larrañaga, M. Lomora, J. R. Sarasua, C. G. Palivan, A. Pandit *Progress in Mater. Sci.* **2017**, *90*, 325-357.

[10] (*a*) H.-P. Hentze, E. W. Kaler, *Cur. Opin. Coll. Inter. Sci.* **2003**, *8*, 164-178; (*b*) A. Jesorka, O. Orwar *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 801-832.

[11] (*a*) R. Wódzki, *Membrany: teoria i praktyka* **2006**, Z. 2, 188-205. (ISBN 83-231-1973-2), (*b*) Q. He, Y. Cui, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2291-2303.

[12] A.-M. Chacko, E. D. Hood, B. J. Sern, V. R. Muzykanov, *Curr. Opin. Coll. & Inter. Sci.* **2011**, *16*, 215-227.

[13] (*a*) S. Kumar, M. K. Ahmad, M. Wassem, A. K. Pandey, *Medicinal Chemistry* **2015**, 5:3, 115-123. (http://dx.doi.org/ 10.4172/2161-0444.1000252); (*b*) D. Liu, F. Yang, F. Xiong, N. Gu, *Theranostics* **2016**, *6*, 1306-1323.

[14] (*a*) J. A. Zasadzinski, B. Wong, N. Forbes, G. Braun, G. Wu, *Curr. Opin. Coll. Inter. Sci.* **2011**, *16*, 203-214; (*b*) B. Wong, C. Boyer, C. Steibeck, D. Peters, J. Schmidt, R van Zanten, B. Chmelka, J. A. Zasadzinski, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2320-2325; (*c*) A. Pratima Nikalije *Med. Chem (Los Angeles)* **2015**, *5*, 081-89.; DOI: 10.4172/2161-0444.1000247; (*d*) D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J. M. Karp, D. Peer, *Nature Commun.* **2018**, *9*, 1410. DOI: 10.1-38/s41467-018-03705y.

[15] (*a*) B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, "*Biomaterials Science. An introduction to Materials in Medicine*" Academic Press, San Diego, USA, **1996**; (*b*) N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu., O. C. Farokhzad, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2602-2663.

[16] (*a*) J. Israelachvili *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8378-8379; (*b*) Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain *Polymers* **2016**, *8*, 380.; DOI: 10.3390/polym8110380; (*c*) T.-Y. Pan, C.-F. Lee, C.-H. Chu, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 5203-5214.

[17] (*a*) J. Kopeček *Adv. Drug Deliv Rev.* **2013**, *65*, 49-59. (doi: 10.1016/j.addr.2012.10.014); (*b*) J. Yin, Y. Chen, Z.-H. Zhang, X. Han, *Polymers* **2016**, *8*, 268.; DOI: 10.3390/polym8070268; (*c*) A.-Z. Zardad, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, P. Kumar, M. Mabrouk, P. P. D. Kondiah, V. Pillay, *Polymers* **2016**, *8*, 359,; DOI: 10.3390/polym8100359; (*d*) T. Luo, C. Loira-Pastoriza, H. P. Patil, B. Ucakar, G. G. Muccioli, C. Bosquillon, R. Vanbever, *J. Contr. Release* **2016**, *239*, 62-71; (*e*) S. S. Banerjee, N. Aher, R. Patil, J. Khandare *J. Drug Delivery* (Hindawi) **2012**, ID 103973, 1-17; DOI: 10.1155/2012/103973. (*f*) Z. Shen, A. Fisher, W. K. Liu, Y. Li, *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems* **2018**, 1-26. DOI: 10.1016/B978-0-08101750-0.00001-5.; Ed. A. Parambath , ISBN: 978-0-08-101750-0.

[18] (*a*) J.-F. Gohy, Y. Zhao, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7117-7129, (*b*) G. Kaur, P. Johnston, K. Saito, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 2171-2186.

[19] A. Larranaga, M. Lomora, J. R. Sarasua, C. G. Palivan, A. Pandit, *Progr. Mater. Sci.* **2017**, *90*, 325-357.

[20] G. Li, X. Yang, B. Wang, J. Wang, X. Yang, *Polymer* **2008**, *49*, 3436-3443.

[21] (*a*) Z. Xing, C. Wang, J. Yan, L. Zhang, L. Li, L. Zha, *Coll. Polym. Sci.* **2010**, *288*, 1723-1729; (*b*) P. Bilalis, N. Boukos, G. C. Kordas, *Materials Letters* **2012**, *67*, 180-183; (*c*) X. Yang, L. Chen, B. Huang, F. Bai, X. Yang, *Polymer* **2009**, *50*, 3556-3563.

[22] J. C. Kraft, J. P. Freeling, Z. Wang, R. J. Y. Ho, *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 29-52.

[23] W. Czajkowski, "*Biomedyczne zastosowanie barwników*", Informator Chemika Kolorysty, Stowarzyszenie Polskich Chemików Kolorystów **2008**, nr. 12 (str. 3-10). (ISSN 1642-5065)

[24] S.-W. Yun, N.-Y. Kang, S.-J. Park, H.-H. Ha, Y.-K. Kim, J.-S. Lee, Y.-T. Chang, *Accounts Chem. Res.* **2014**, *47*, 1277-1286.

[25] L. Mohammad-Hadi, A. J. MacRobert, M. Loizidou, E. Yaghini, *Nanoscale* **2018**, *10*, 1570-1581.

[26] Z. Zhang, Y. Xue, P. Zhang, A. H. E. Müller, W. Zhang, *Macromol.* **2016**, *49*, 8440-8448.

[27] F. Jia, Y. Wang, H. Wang, Q. Jin, T. Cai, Y. Chen, J. Ji, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 2069-2075.

[28] S. Y. Lee, H. Lee, I. In, S. Y. Park, *Eur. Polym. J.* **2014**, *57*, 1-10.

[29] T.-L. Lee, C.-T. Lo, *J. Polym. Sci. Phys.* **2017**, *55*, 793-803.

[30] G. Wang, J. Shang, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2012**, *13*, 299-309.

[31] T. O. B. Olusanya, R. R. H. Ahmad, D. M. Ibegbu, J. R. Smith, A. A. Elkordy, *Molecules* **2018**, *23*, 907. (doi:10.3390/molecules23040907).

[32] (*a*) H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113-158; (*b*) C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, M. Melchiorre, A. Sansone, A. Torreggiani, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 255- 284.

[33] (*a*) J.-Y. Chun, M.-J. Choi, S.-G. Min, J. Weiss, *Food Hydrocolloids* **2013**, *30*, 249-257; (*b*) W. Shen, J. Hu, X. Hu, *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *600*, 56-61.

[34] (*a*) D. C. Danila, L. Todd Banner, E. J. Karimova, L. Tsurkan, X. Wang, E. Pinkhassik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7036-7039; (*b*) T. Ruysschaert, M. Germain, J. F. Pereira, da S. Gomes, D. Fournier, G. B. Sukhorukov, W. Meier, M. Winterhalter, *IEEE Transaction On Nanobioscience* **2004**, *3*, 49-55.

[35] (*a*) P. R. Gil, L. del Mercato, P. del Pino, A. Muñoz-Javier, W. Parak, *Nanotoday* **2008**, *3*, 12-21; (*b*) J.F. Pereira da S. Gomes, A. Rank, A. Kronenberg, J. Fritz, M. Winterhalter, Y. Ramaye, *Langmuir* **2009**, *25*, 6793-6799.

[36] (*a*) X. Li, J. Qi, Y. Xie, X. Zhang, S. Hu, Y. Xu, Y. Lu, W. Wu., *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 23-32; (*b*) S. Peng, L. Zou, W. Liu, Z. Li, W. Liu, X. Hu, X. Chen, C. Liu, *Carbohydrate Polym.* **2017**, *156*, 322-332; (*c*) S. Alavi, A. Haeri, S. Dadashzadeh, *Carbohydrate Polym.* **2017**, *157*, 991-1012.

[37] A. Campbell, P. Taylor, O. J. Cayre, V. N. Paunov, *Chem. Commun.* **2004**, *21*, 2378-2379.

[38] S. Chatterrjee, F. Salaün, C. Campagne, S. Vaupre, A. Beirao, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *90*, 967-975.

[39] K. Seki, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1984**, *17*, 1692-1698.

[40] M. Germain, S. Grube, V. Carriere, H. Richard-Foy, M. Winterhalter, D. Fournier, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2868-2871.

[41] J.-C. Kim, J.-D. Kim, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *24*, 45-52.

[42] T. Ta, A. J. Convertine, C. Reyes, P. S. Stayton, T. Porter, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1915-1920.

[43] (*a*) P. Chandaroy, A. Sen, S. W. Hui, *J. Contr. Release* **2001**, *76*, 27-37; (*b*) P. Chandaroy, A. Sen, P. Alexandridis, S. W. Hui, *Biochim.Biophys. Acta* **2002**, *1559*, 32-42; (*c*) R. Liu, Y. Li, Z. Zhang, X. Zhang, *Regenerative Biomater.* **2015**, *125-133.* (doi: 10.1093/rb/rbv003).

[44] (*a*) D. D. Lasic *Trends in Biotech.* **1998**, *16*, 307-321; (*b*) M. D. Kim, S. A. Dergunov, E. Pinkhassik, *Langmuir* **2015**, *31*, 2561-2568.

[45] S. A. Dergunov, A. G. Richter, M. D. Kim, S. V. Pingali, V. S. Urban, E. Pinkhassik, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11026-11028.

[46] (*a*) N. Ehterami, S. A. Dergunov, Y. Ussipbekova, V. B. Birman, E. Pinkhassik, *New J. Chem.* **2014**, *38*, 481-485; (*b*) P. Wang, J. T. Koberstein *Macromolecules* **2004**, *37*, 5671-5681; (*c*) J. D. Morgan, C. A. Johnson, E. W. Kaler, *Langmuir* **1997**, *13*, 6447-6451.

[47] (*a*) A. G. Richter, S. A. Dergunov, M. D. Kim, S. N. Shmakov, S. V. Pingali, V. S. Urban, Y. Liu, E. Pinkhassik, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 3630-3636; (*b*) A. G. Richter, S. A. Dergunov, B. Ganus, Z. Thomas, S. V. Pingali, V. Urban, Y. Liu, L. Porcar, E. Pinkhassik, *Langmuir* **2011**, 27, 3792-3797.

[48] M. D. Kim, S. A. Dergunov, A. G. Richter, J. Durbin, S. N. Shmakov, Y. Jia, S. Kenbeilova, Y. Orazbekuly, A. Kengpeiil, E. Lindner, S. V. Pingali, V. S. Urban, S. Weigand, E. Pinkhassik, *Langmuir* **2014**, *30*, 7061-7069.

[49] S. A. Dergunov, J. Durbin, S. Pattanaik, E. Pinkhassik, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2212-2215.

[50] S. A. Dergunov, E. Pinkhassik, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19656-19659.

[51] N. G. Zhegalova, S. A. Dergunov, S. T. Wang, E. Pinkhassik, M. Y. Berezin, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10292-10297.

[52] S. A. Dergunov, E. Pinkhassik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8264-8267.

[53] T. P. Gustafson, S. A. Drgunov, W. J. Akers, Q. Cao, S. Magalotti, S. Achilefu, E. Pinkhassik, M. Y. Berezin, *RSC Advances* **2013**, *3*, 5547-5555.

[54] S. A. Dergunov, B. Miksa, B. Ganus, E. Lindner, E. Pinkhassik, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 1485-1487.

[55] M. D. Kim, S. A. Dergunov, E. Lindner, E. Pinkhassik, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2695-2701.

[56] Y. Jia, S. N. Shmakov, P. Register, E. Pinhassik, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12709-12714.

[57] S. A. Dergunov, N. Ehterami, E. Pinkhassik, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14137-14140.

[58] B. Miksa, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 87781-87805.

[59] S. A. Dergunov, K. Kesterson, W. Li, Z. Wang, E. Pinkhassik, *Macromolecules* **2010**, *43*, 7785-7792.

[60] B. Miksa, *Med. Chem.(Los Angeles)* **2016**, *6*, 611-39.

[61] T. Sotyłsiński, A. Liebert, I. Zawicki, R. Maniewski, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica* **2008**, (4)14, 331-35.

[62] M. Sierant, P. Paluch, M. Florczak, A. Rozanski, B. Miksa, *Coll. Sur. B: Biointerfaces* **2013**, *111*, 571-578.

[63] (*a*) I. Rivolta, A. Panariti, B. Lettiero, S. Sesana, P. Gasco, M. R. Gasco, M. Masserini, G. Miserocchi, *J.* Physiol. Pharmacol. **2011**, *62*, 45-53; (*b*) Y. Inokuchi, K. Hironaka, T. Fujisawa, Y. Tozuka, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Takeuchi, H. Hara, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2010**, *51*, 3162-3170.

[64] Q. Zhou, S. A. Dergunov, Y. Zhang, X. Li, Q. Mu, Q. Zhang, G. Jiang, E. Pinkhassik, B. Yan, *Nanoscale* **2011**, *3*, 2576-2582.

[65] (*a*) N. Poulain, E. Nakache, A. Pina, G. Levesque, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1996**, *34*, 729-737; (*b*) N. Poulain E. Nakache, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1998**, *36*, 3035-3043.

[66] M. P. Krafft, L. Schieldknecht, P. Marie, F. Giulieri, M. Schmutz, N. Poulain, E. Nakache, *Langmuir* **2001**, *17*, 2872-2877.

[67] S. M. Malone, S. Trabelsi, S. Zhang, T. R. Lee, D. K. Schwartz, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8616-8620.

[68] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.

[69] A. Strunecká, J. Patoèka, P. Connett, *J. Appl. Biomed.* **2004**, *2*, 141-150.

[70] R. Filler, R. Saha, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 777-791.

[71] J. Ruiz-Cabello, B.P. Barnett, P.A. Bottomley, J.W.M. Bulte, *NMR Biomed.* **2011**, *2*, 114-129.

[72] T. Karatsu, M. Narusawa, S Yagai, A. Kitamura, H. Suzuki, H. Okamoto, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **2013**, *26*, 259-270.

[73] (*a*) Y. Chen, J. L. Geh, *Polymer* **1996**, *37*, 4481-4486; (*b*) K. Tietz, S. Finkhäuser, K. Samwer, P. Vana, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 1563-1572.

[74] F. Fleischhaker, A. P. Haehnel, A. M. Misske, M. Blanchot, S. Haremza, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 1192-1200.

[75] K. Mukumoto, A. E. Averick, S. Park, A. Nese, A. Mpoukouvalas, Y. Zeng, K. Koynov, P. R. Leduc, K. Matyjaszewski *Macromolecules* **2014**, *47*, 7852-7857.

[76] K. Tietz, S. Finkhäuser, K. Samwer, P. Vana, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 1563-1572.

[77] (*a*) E. Sato, S. Nagai, A. Matsumoto, *Prog. Org. Coatings* **2013**, *76*, 1747-1751; (*b*) K. C. Hribar, M. H. Lee, D. Lee, J. A. Burdick, *ACS Nano* **2011**, *5*, 2948-2956.

[78] (*a*) A. M. Nelson, S. T. Memp, J. Chau, T. E. Long, *J. Polym. Sci. Part A.:Polym. Chem.* **2015**, *53*, 2829-2837; (*b*) C. L. Elkins, T. Park, M. G. Mckee, T. E. Long, *J. Polym. Sci. Part A.:Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4618-4631.

[79] K. Zhang, G. B. Fahs, M. Aiba, R. B. Moore, T. E. Long, *Chem. Comm.* **2014**, *50*, 9145-9148.

[80] Y. Ogura, M. Artar, A. R. A. Palmans, M. Sawamoto, E. W. Meijer, T. Terashima, *Macromolecules,* **2017**, *50*, 3215-3223.

[81] M. Sierant, S. Kazmierski, A. Rozanski, P. Paluch, U. Bienias, B.J. Miksa, *New J. Chem.* **2015**, *39*, 1506-1516.

[82] (*a*) A. Ligabue, G. Marverti, U. Liebl, H. Myllykallio, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e47318; (*b*) J. B. Parker, J. T. Strivers, *Biochemistry* **2011**, *50*, 612-617; (*c*) R. Humeniuk, L. G. Menon, P. J. Mishra, R. Gorlick, R. Sowers, W. Rode, G. Pizzorno, Y.-C. Cheng, N. Kemeny, J. R. Bertino, D. Banerjee, *Mol. Cancer. Ther.* **2009**, *8*, 1037-1044.

[83] M. Mobed-Miremadi, R. K. Nagendra, S. L. Ramachandruni, J. J. Rook, M. Keralapura, M. Goedert, *Progress in Biomater.* **2013**, *2*:1, 1-13.

[84] (*a*) M. V. Sultanbaev, S. S. Ostakhov, Sh. Kh. Gantsev, F. A. Khalilullin, V. P. Kazakov, *High Energy Chemistry* **2010**, *44*, 383-386; (*b*) M. L. Pascu, M. Brezeanu, L. Voicu, A. Staicu, B. Carstocea, R. A. Pascu, *In vivo* **2005**, *19*, 215-220; (*c*) L. J. Villarreal-G□mez, A. Serrano-Medina, E. J. Torres-Martinez, G. L. Perez-González, J. M. Cornejo-Bravo. (https://doi.org/10.1515/epol-2017-0202)

[85] F. R. Vogenberg, C. I. Barash, M. Pursel *Pharm. & Ther.* **2010**, *35*, 560-576.

[86] G. M. Fioramonti Calixto, J. Bernegossi, L. M. de Freitas, C. R. Fontana, M. Chorilli, *Molecules* **2016**, *21*, 342; doi: 10.3390/molecules21030342

[87] L. M. Moreira, J. P. Lyon, A. P. Romani, D. Severino, M. R. Rodrigues, H. P. M. de Oliveira, **2012**, Chapter 4, 393-422, (INTECH, http://dx.doi.org/10.5772/48087/intech.open)

[88] P. Paul, S. Kumar, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *107*, 303-310.

[89] E. Pèrez-Herrero, A. Fernández-Medarde, *Europ. J. Pharma. Biopharma.* **2015**, *93*, 52-79

[90] D. B. Cordes, P. D. Lickiss, F. Rataboul, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2081-173.

[91] C. McCusker, J. B. Carroll, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **2005**, 996-998.

[92] (*a*) L. John, M. Malik, M. Janeta, S. Szafert, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 8394-8401; (*b*) K. Rozga-Wijas, A. Michalski, *Eur. Polym. J.* **2016**, *84*, 490-501; (*c*) Y. Pu, S. Chang, H. Yuan, G. Wang, B. He, Z. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3658-3666; (*d*) T. L. Kaneshiro, Z. R. Lu, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5660-5666.

[93] A. Janaszewska, K. Gradzinska, M. Marcinkowska, B. Klajnert-Maculewicz, W. A. Stanczyk, *Materials* **2015**, *8*, 6062-6070.

[94] (*a*) K. Y. PU, K. Li, X. Zhang, B. Liu, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4186-4189; (*b*) K. Y. Pu, K. Li, B. Liu, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 643-646; (*c*) M. Tang, Z. Ye, E. K. Jeang, X. Wu, D. L. Parker, Z. R. Lu, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 931-937.

[95] (*a*) H. I. Lee, Y. J. Kim, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2016**, *142*, 182-191; (*b*) Y. X. Zhu, H. R. Jia, Z. Chen, F. G. Wu, *Nanoscale* **2017**, *9*, 12874-12884.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i wykaz innych (nie wchodzących w skład osiągnięcia) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych

5.1. Omówienie osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora

W latach 1990-2006 pracowałam w CBMiM PAN Zakładzie Chemii Polimerów kierowanym przez Prof. dr hab. Stanisława Pęczka w zespole Profesora dr hab. Stanisława Słomkowskiego, który był promotorem mojej pracy doktorskiej dotyczącej "Układów mikrosfer polimerowych".

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych (2005 r.) odbyłam roczny staż (15.02.2006 to 25.02.2007) pracując na Uniwersytecie w Kansas State, Manhattan KS (USA) w grupie Profesora Ryszarda Jankowiaka. Badania w których uczestniczyłam dotyczyły separacji enancjomerów dioli epoksybenzo(*a*)pirenu (BPDE) będących pochodnymi adduktów DNA (deoksyguanozyny, dG) za pomocą monoklonalnych przeciwciał (mAb, 8E11) które silnie oddziaływują z BPDE-N^2-dG. Stosując technikę przepływowej elektroforezy kapilarnej (*free flow capillary electrophoresis,* FFCE) rozdzieliłam cztery diasteroizomery: (+) i (-)-*anty-trans*-BPDE-N^2-dG oraz (+) i (-)-*anty-cis*-BPDE-N^2-dG, wykorzystując różnice w powinowactwie przeciwciał 8E11 do badanych ligandów. Szybkość migracji związków w trakcie przepływu przez kapilarę pod wpływem przyłożonego napięcia wynikała z wielkości ładunku powierzchniowego wpływającego na ruchliwość mAb i ligandów oraz z trwałości utworzonych kompleksów. Badania wykazały, że wszystkie cztery ligandy ulegały kompleksowaniu z 8E11 lecz konformacja *cis*-adduktów była uprzywilejowana pod względem wiązania z tzw. "kieszenią" mAb. Tego rodzaju badania mają istotne znaczenie w przewidywaniu oddziaływań ważnych biologicznie molekuł (metabolitów) indukujących uszkodzenie DNA komórek. Wyniki analizy zostały opublikowane w czasopiśmie (*Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1192-1199) dokument potwierdzający autentyczność mojego udziału w pracy załączyłam w oświadczeniach autora.

Po odbyciu stażu podoktorskiego (01.10.2007 r. do 30.11.2008 r.) na Uniwersytecie w Memphis (TN, USA) w grupie Prof. dr. Eugene Pinkhassik ponownie rozpoczełam w 2009 r. pracę w CBMiM PAN w Pracowni Spektrometrii Mas.

Pracując pod opieką dr Marka Sochackiego miałam możliwość pogłębienia wiedzy z zakresu metod analitycznych, a w szczególności spektrometrii mas i techniki jonizacji MALDI-TOF MS *(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time-of-flight)*. Technika ta jest powszechnie wykorzystywana w analizie związków wysokocząsteczkowych (polimerów syntetycznych i naturalnych), w celu określenia ich mas molowych. Analizowane związki wzbudzane są laserowo, a proces desorpcji/jonizacji jest wspomagany matrycą, która początkowo adsorbując energię lasera przekazuję ją do analizowanego związku. W swoich badaniach jako matryce MALDI wykorzystałam ciecze jonowe drugiej generacji otrzymane w wyniku *N*-diizopropyloetyloaminy (DEA) i kwasów: 2,5-dihydroksybenzoesowego (DHB), 2-(4-hydroksyfenyloazo)benzoesowego (HABA) oraz 3-*trans*-indoloakrylowego (IAA).

Głównym celem badań było określenie wpływu krystaliczności układu matryca-analit na jakość uzyskanych widm MALDI analizowanego polilaktydu (PLLA) o średniej masie molowej M_n 2800. Wyniki otrzymane metodą MALDI-TOF MS były komplementarne z danymi uzyskanymi z pomiarów wykorzystujących spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego w fazie stałej (SS NMR). Obie techniki potwierdziły wysoki stopień homogeniczności otrzymanego układu podczas krystalizacji polilaktydu z zastosowanymi cieczami jonowymi, wynikającą z równomiernego rozproszenia oligomerów PLLA w matrycy. W efekcie zaobserwowałam znaczącą poprawę jakości widm MALDI w porównaniu z tymi uzyskanymi w analogiczny sposób lecz wykorzystujacych matryce standardowe (zwiększenie dokładności pomiarów masy molowej PLLA, wyższa wartość S/N).

Chcę podkreślić, że przeprowadzone badania wykorzystujące technikę MALDI-TOF MS oraz spektroskopię SS NMR zostały po raz pierwszy skorelowane w celu wyjaśnienia wpływu krystaliczności analizowanych próbek na precyzję pomiarów mas molowych makrocząsteczek. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Anal. Methods* (**2012**, 4, 377-383).

Praca w laboratorium spekrometrii mas umożliwiła mi prowadzeniem badań nad właściwościami powierzchni pokrytych parylenem-*N*. Polimer ten dzięki swej hydrofobowości wzmacnia desorpcję analizowanej próbki, umożliwiając wyznaczenie jej masy molowej techniką ELDI-TOF (*Enhanced Laser Desorption/Ionization-time-of-flight)* bez udziału matrycy. Eliminacja matrycy ma istotne znaczenie, ponieważ jej obecność może wpływać na degradację np.: polilaktydów, a więc zaniżyć wyznaczaną średnią wartość M_n polimerów. Wyniki badań zostały opublikowane w monografii zatytułowanej "*Application of parylene for surface (polymer) enhanced laser desorption/ionization of synthetic polymers*" w czasopiśmie Rapid Commun. Mass Spectrom. 2013, *27*, 767-772.

Pełniłam funkcję opiekuna pracy magisterskiej pani Angeliki Adamus, realizowanej w CBMiM PAN w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych kierowanej przez Prof. dr hab. Marka Potrzebowskiego będącego promotorem pracy. Drugim promotorem był Prof. dr hab. Zbigniew Kudzin z Katedry Chemii Organicznej, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Praca magisterska dotycząca: "*Syntezy i badań strukturalnych nanolipopolimersomów*" została zrealizowana w 2012 r. i bardzo dobrze oceniona.

5.2. Wykaz monografii opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora znajdujące się w bazie (JRC).

1. **Beata Miksa**, Raja Chinnappan, Nhan C. Dang, Mike Geppert, Brock Master, Natalia Tretyakova, Nenad M. Grubor, Ryszard Jankowiak, **2007**, Electrophoresis Separation of Enantiomeric Benzo(*a*)pyrene Diol Epoxide-Derived DNA adducts, **Chemical Research in Toxicology** *20*, 1192-1199. (**IF**$_{5letni}$ 3.867, liczba cytowań 9, punkty MNiSW 40)

Mój udział w tej pracy polegał na wykonaniu wszystkich eksperymentów wykorzystujących technikę FFCE i opracowaniu nowej metodologii pomiarów, a także na czynnym udziale w dyskusji i opracowaniu zamieszczonych danych. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

2. **Beata Miksa**, Marek Sochacki, Jan Libiszowski, Andrzej Duda, Włodzimierz Ciesielski, Marek J. Potrzebowski, **2012**, Application of ionic liquids matrices in spectral analysis of poly(lactide) – solid state NMR spectroscopy versus matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spektrometry, **Analytical Methods** *4*, 377-383. (**IF**$_{5letni}$ 2.0, liczba cytowań 10, punkty MNiSW 25)

Mój udział w powstanie tej pracy polegał na wykorzystaniu czwartorzędowych soli amoniowych jako matryc jonowych do wyznaczania masy molowej polilaktydów stosując technikę MALDI-TOF. Wykonałam wszystkie eksperymenty i opracowałam wyniki zamieszczone w publikacji oraz uczestniczyłam w pisaniu i redagowaniu manuskryptu. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 70%.

3. Marek J. Potrzebowski, Sławomir Kazmierski, Hassan Kassassir, **Beata Miksa**, **2010**, Phosphorus-31 NMR Spectroscopy of Condensed Matter, **Annual Reports on NMR spectroscopy** 70, 114-235. (**IF**$_{5letni}$ 2.205, liczba cytowań 10)

Mój udział w powstanie tej pracy polegał na zebraniu literatury i czynnym udziale w pisaniu i redagowaniu monografii. Mój wkład pracy szacuję na 25%.

4. **Beata Miksa***, Marek Sochacki, Anna Sroka-Bartnicka, Pawel Uznański, Andrzej Nosal, Marek Potrzebowski*, **2013**, Application of parylene for Surface (polymer) enhanced laser desorption/ionization of synthetic polymers, **Rapid Communication in Mass Spektrometry** 27, 767-772. (**IF**$_{5letni}$ 1.989, liczba cytowań 1, punkty MNiSW 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu wszystkich eksperymentów wykorzystujących technikę MALDI-TOF i całościowym opracowaniu wyników zamieszczonych w publikacji. Manuskrypt został przeze mnie samodzielnie zredagowany. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.

Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora inne niż znajdujące się w bazie (JRC)

1. **Beata Miksa***, Marek Potrzebowski, **2014**, Analiza syntetycznych polimerów biodegradowalnych metodą spektrometrii mas z udziałem matrycy (MALDI-TOF) kontra pomiary za pomocą wzmocnienia laserowej desorpcji/jonizacji (ELDI-TOF) z wykorzystaniem parylenu. **Przetwórstwo Tworzyw** (styczeń-luty) 1, 50-55. (punkty MNiSW 7)
Mój udział procentowy w tej publikacji szacuję na 90%, ponieważ praca została przeze mnie napisana

2. Małgorzata Sierant, **Beata Miksa***, **2014**, Fluorescencyjne nanolipopolimersomy jako bezpieczne kontrasty w diagnostyce medycznej. **Przetwórstwo Tworzyw** (styczeń-luty) 1, 88-91. (punkty MNiSW 7)
Mój udział procentowy w tej publikacji szacuję na 90%, ponieważ praca została przeze mnie napisana.

5.3. Wykaz monografii opublikowanych przed uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora znajdujące się w bazie (JRC).

1. **Miksa B.**, Wilczyńska M.,Cieniewski C., Basińska T., Slomkowski S., **1995**, Composit poly(metyl methacrylate acid-2-hydroxyethyl methacrylate) latex for immunoassy. The case of plasminogen, **J. Biomaterial Science Polimer Edn.** 7, 503-513. (**IF**$_{5letni}$1.902, liczba cytowań 18, punkty MNiSW 25)

Byłam wykonawcą wszystkich przeprowadzonych eksperymentów, których wyniki zostały zamieszczone na rys. 3, 4, 5, 6. Moje doświadczenia polegały na syntezie mikrosfer i ich kowalencyjnym wiązaniu z plazminogenem oraz na przeprowadzeniu testów agregacyjnych. Praca została zrealizowana w ramach grantu KBN nr. 2 0624 91 01, w którym byłam głównym wykonawcą. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacki szacuję na 70%.

2. Miksa B., Slomkowski S., **1995**, Adsorption and covalent immobilization of human serum albumin (HSA) and gamma globulins (γG) onto poly(styrene/acrolein) latex with pyrene, dansyl, and 2,4-dinitrophenyl labels) **J. Biomaterial Science Polymer Edn.** 7 77-96 (**IF**$_{5letni}$1.902, liczba cytowani 10, punkty MNiSW 25)

Byłam wykonawcą wszystkich przeprowadzonych eksperymentów, których wyniki zostały zamieszczone na rys.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, oraz zebranych w tabeli 5. Przeprowadziłam syntezę wszystkich typów mikrosfer poli(styren/akroleina), które następnie znakowałam barwnikami i opłaszczałamalbuminą ludzką lub globuliną. Wykonałam również testy aglutynacyjne. Praca została zrealizowana w ramach grantu KBN nr. 2 0624 91 01, w którym byłam głównym wykonawcą. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję szacuję na 70%.

3. Miksa B., Slomkowski S., **1995**, Polypyrrole core/polyacrolein Stell latex for protein immobilization, **Colloid and Polymer Science**, *273*, 47-52. (**IF**$_{5letni}$ 1.854, liczba cytowań 55, punkty MNiSW 30)

Byłam wykonawcą wszystkich przeprowadzonych eksperymentów polegających na syntezie mikrosfer polipirolowych oraz immobilizacji albuminy ludzkiej i globuliny. Wyniki moich badań są zamieszczone na rys.3, 4, oraz w tabeli 1. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję szacuję na 70 %.

4. Basinska T., Kowalczyk D., **Miksa B.**, Slomkowski S.,**1995**, Interaction of Proteins with Polymeric Latexes. **Polymers for Advanced Technology**, *6*, 526-533. (IF$_{5letni}$ 1.962, liczba cytowań 13, punkty MNiSW 30)

Byłam wykonawcą eksperymentów polegających na syntezie mikrosfer poli(styren/akroleina) wyznakowanych związkiem fluorescencyjnym (dansylem) z którymi kowalencyjnie wiązałam białka (albuminę ludzką i globulinę). Wyniki moich badań są zilustrowane na rys. 3, 4, oraz w tabeli 1. Pracowałam jako wykonawca w grancie KBN nr. 2 0624 91 01. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50 %.

5. Miksa B., Slomkowski S., Massault J, **1998**, Surfaces morphology of polypyrrole core/polyacrolein Stell latex by atomic force microscopy (AFM). **Colloid and Polymer Science** *276, 34-39.*(IF$_{5letni}$ 1.854, liczba cytowań 5, punkty MNiSW 30)

Wykonałam syntezę mikrosfer poliprolowych pokrytych warstwą poliakroleiny. Pracowałam jako wykonawca w grancie otrzymanym z KBN nr. 3 TO9A 033 11. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

6. Miksa B., Slomkowski S., Chehimi M., Majoral J., Caminade A., **1999**, Tailores modification of quartz surfaces by covalent immobilization of small molecules (γ-aminopropyltriethoxysilane), monodisperse macromolecules (dendrimers), and poly(styrene/acrolein/divinylbenzene) microspheres with narrow diameter distribution. **Colloid Polymer Science** *277, 58-65.* (**IF**$_{5letni}$ 1.854, liczba cytowań 38, punkty MNiSW 30)
Mój udział w tej publikacji polegał na osadzeniu dendrymerów różniących się grupami funkcyjnymi oraz generacją na powierzchni kwarcu, w celu sprawdzenia ich wzajemnych oddziaływań. Pracowałam jako wykonawca w grancie otrzymanym z KBN nr. 3 TO9A 033 11. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

7. Slomkowski S., **Miksa B**, Chehimi M., Delamar M., Cabe-Deliry E., Majoral J., **1999**, Inorganic-organic systems with tailored properties controlled on molecular, macromolecular and microscopic level. **Reactive polymers** *41*, 45-57. (**IF**$_{5letni}$ 2.843, liczba cytowań 37, punkty MNiSW 30)

Mój udział w tej publikacji polegał na osadzeniu dendrymerów różniących się grupami funkcyjnymi oraz generacją na powierzchni kwarcu, w celu sprawdzenia ich wzajemnych oddziaływań. Pracowałam jako wykonawca w grancie otrzymanym z KBN nr. 3 TO9A 033 11. Mwój wkład pracy w całokształt ttej publikacji szacuję na 50%.

8. Perruchot C., Chehimi M. M., Delawar M., Cabet-Deliry E., **Miksa B.**, Slomkowski S., Khan M. A., Armes S. P., **2000**, Chemical deposition and characterization of thin polypyrrole films on glass plate: role of organosilane treatment. **Colloid and Polymer Science** *278*, 1139-1154. (**IF**$_{5letni}$ 1.854, liczba cytowań 42, punkty MNiSW 30)

Przeprowadziłam syntezę związaną z wytworzeniem in situ warstwy polipirolu na powierzchni kwarcu, która następnie była analizowana metodą XPC. Badania w których uczestniczyłam były zrealizowane w ramach programu POLONIUM i współpracy Polsko-Francuskiej. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%,

9. Azioune A., Chechimi M., **Miksa B.**, Basinska T.,Slomkowski S., **2002**, Hydrophobic Protein-Polypyrrole interactions: The role of van der Waals and Lewis Acid-Base Forces as determined by contact angle measurements. **Langmuir**, *18*, 1150-1156. (**IF**$_{5letni}$ 4.139, liczba cytowań 71, punkty MNiSW 35).

Mój udział w tej publikacji polegał na immobilizacji albuminy ludzkiej na powierzchni pokrytej warstwą polipirolu i pomiarach kątów zwilżania, w celu określenia hydrofobowości powierzchni. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

10. Gambir A., Kumar A., Malhotra B. **Miksa B.**, Slomkowski S., **2002**, Covalent immobilization of Urease on polypyrrole microspheres for application as a urea biosensor. **e-Polymers**, *No. 052*, 1-9. (**IF**$_{5letni}$= 0.841, liczba cytowań 5, punkty MNiSW 15)

Mój udział w tej publikacji polegał na syntezie mikrosfer polipirolowych oraz na adsorpcji lub kowalencyjnym związaniu ureazy z ich powierzchnią. Projekt był zrealizowany w ramach współpracy Polsko-Indyjskiej nr. INTPOL/015.00. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 60%.

11. Slomkowski S., Basinska T., **Miksa B.**, **2002,** New type of microspheres and microsphere-related materials for medical diagnostics. **Polymer for Advanced Technologies** *23*, 1-14. (**IF**$_{5letni}$ 1.962, liczba cytowań 39, punkty MNiSW 30)

Mój udział w tej publikacji polegał na syntezie mikrosfer poli(styren/akroleina), które zastosowałam do przyłączenia kowalencyjnego enzymu oksydazy glukozy. Ponadto, przeprowadziłam syntezę mikrosfer poliakrylowych które związałam z plazminogenem. Wyniki moich doświadczeń są zilustrowane na rys.10 i 12. Praca była zrealizowana w ramach grantu uzyskanego z KBN nr. 3T09A 07016, w którym byłam wykonawcą. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 50%.

12. Kayastha A., Srivastava P., **Miksa B.**, Slomkowski S., **2003**, Unique activity of ureases immobilized on poly(styrene-co-acrolein) microspheres. **J. Bioactive and Compatible Polymers** *18*, 113-124. (**IF**$_{5letni}$1.564, liczba cytowani 12, punkty MNiSW 25)

Mój udział w tej publikacji polegał na przyłączeniu ureazy do powierzchni mikrosfer polistyrenowych i sprawdzeniu jej aktywności biologicznej. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów są umieszczone na rys. 1, 2, 3, 4, 5. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 80%.

13. Bousalem S., Yassar A., Basinska T., **Miksa B.**, Slomkowski S., Azioune A., Chehimi M. M., **2003**, Synthesis, characterization and biomedical applications of functionalized polypyrrole-coated polystyrene latex particles. **Polymer for Advaced Technology** *14*, 20-825. (**IF**$_{5letni}$ 1.962, liczba cytowań 21, punkty MNiSW 30)

Brałam udział w merytorycznej dyskusji dotyczącej otrzymanych wyników. Mój udział w tej publikacji szacuję na 20%.

14. Bousalem S., Mangeney C., Chehimi M., Basinska T., **Miksa B.**, Slomkowski S., **2004**, Synthesis, characterization and potential biomedical applicatopns of *N*-succinimidyl ester functionalized, polypyrrole-coated polystyrene latex particles. **Colloid Polymer Science** *282*, 1301-1307. (**IF**$_{5letni}$ 1.854, liczba cytowań 14, punkty MNiSW 30)

Brałam udział w merytorycznej dyskusji dotyczącej otrzymanych wyników. Mój udział w tej publikacji szacuję na 20%.

15. Azioun A., Siroti F., Tangu J., Jogini M., Chehimi M., Miksa B., Slomkowski S., **2005**, Interaction and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films. **Electrochimica Acta** *50*, 1661-1667. (**IF**$_{5letni}$ 4.857, liczba cytowań 44, punkty MNiSW 40)

Brałam udział w merytorycznej dyskusji dotyczącej otrzymanych wyników. Mój udział w tej publikacji szacuję na 20 %.

Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora inne niż znajdujące się w bazie (JRC)

1. Miksa B., Slomkowski S. **1993,** Chemically induced aggregation of microspheres, **Macromolecules** Ed. J. Kahovec, VSP International Science Publisher 15-28.

Byłam wykonawcą wszystkich przeprowadzonych eksperymentów związanych z syntezą mikrosfer oraz analizą procesów ich agregacji. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 70%.

2. Slomkowski S., **Miksa B.**, Kowalczyk D., Basinska T., Chehimi M., Delawar M., **2002**, Polymeric microspheres and related material for medical diagnostics, *24*, 393-412. Edited by Wai Tak Law, Naim Akmal, Arthur M. Usmani. Publisher: New York, Marcel Dekker.

Mój udział tej pracy polegał na syntezie polipirolowych mikrosfer. Mój wkład pracy w całokształt tej publikacji szacuję na 40%.

3. Gambhir A., Kumar A., Malhotra B. D., **Miksa B.**, Slomkowski S., **2003**, Enhanced loading and stability of Urease covalently attache to polypyrrole microspheres for application to urea biosensor. *01*, 153-161. Edited by Roussos S., Soccol C. R., Pandey A., ISBN: 978-90-481-6468-4. Publisher: Springer.

Przeprowadziłam syntezę polipirolowych mikrosfer i przyłączyłam do ich powierzchni ureazę. Mój wkład pracy w całokształt rozdziałuzamieszonego w tej książce szacuję na 40 %.

5.3. Wskaźniki bibliometryczne

Zgodnie z raportem z dnia 05.12.2018r.

Sumaryczny *impact factor* (IF) według listy Journal Citation Report (JCR)

Liczba wszystkich cytowanych publikacji z bazy (WoS): **28**

Suma **IF** *dla 28 publikacji* **(włączając 11 publikacji po uzyskaniu Ph.D.) = 55.743**

Suma **IF** *dla 7 publikacji wchodzących w skład* ***osiągnięcia naukowego*** **= 24.501**

Liczba cytowań publikacji według bazy (WoS):

Suma cytowań dla **28** publikacji: **513**,
Suma cytowań dla **28** publikacji bez autocytowań: **485**

Indeks Hirscha ***h-index***: **13**

Liczba punktów dla **28** publikacji z MNiSW**: 710**

5.5. Kierowanie projektami krajowymi

1. Kierowałam projektem zatytułowanym: Synteza i badania strukturalne liposomalnych nanopęcherzyków polimerowych z enkapsulowanymi substancjami czynnymi farmakologicznie. Grant uzyskałam z Komitetu Badań Naukowych (KBN) MNiSW, o numerze**: NN 209 762440** i realizowałam od **6.04.2011 r.** do **5.04.2014 r.** Projekt został w wyznaczonym terminie pozytywnie rozliczony.

5.6. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

1. Wykład na temat: ***Nanolipopolymersomes with a fluorescent wall as imaging agents in medical diagnostcs*** wygłosiłam na IV Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Technicznej zorganizowanej we Włoszech w miejscowości Aprica w dniach 2-7 lutego 2014 r. Konferencję zorganizowała Politechnika Śląska (Gliwice) pod hasłem: Diagnostyka materiałów polimerowych.

2. Wykład na temat: ***Analiza syntetycznych polimerów biodegradowalnych metodą spektrometrii mas z udziałem matrycy (MALDI-TOF) kontra pomiary za pomocą wzmocnienia laserowej desorpcji/jonizacji (ELDI-TOF) z wykorzystaniem parylenu***, wygłosiłam na IV Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Technicznej zorganizowanej we Włoszech w miejscowości Aprica w dniach 2-7 lutego 2014 r. Konferencję zorganizowała Politechnika Śląska (Gliwice) pod hasłem : Diagnostyka materiałów polimerowych.

3. Komunikat na temat: ***Kumarynowe nanokapsułki z odwracalnie sieciowaną i fluorescencyjną powłoka polimerową przeznaczone do transportu leków i diagnostyki medycznej*** wygłosiłam na 58 Zjeździe Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku w sekcji Chemii Medycznej i Farmaceutycznej, SO7KS10)

5.7. Staże naukowe w ośrodkach zagranicznych

02.2006-03.2007 – staż podoktorski w Kansas State University, Manhattan KS, USA

10.2007-11.2008 – staż podoktorski w The University of Memphis, Memphis, TN, USA

5.8. Opieka nad studentami

Pełniłam funkcję opiekuna pracy magisterskiej pani Angeliki Adamus, realizowanej w CBMiM PAN w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych kierowanej przez Prof. dr hab. Marka Potrzebowskiego będącego promotorem pracy. Drugim promotorem był Prof. dr hab. Zbigniew Kudzin z Katedry Chemii Organicznej, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Praca magisterska dotycząca: "*Syntezy i badań strukturalnych nanolipopolimersomów*" została zrealizowana w 2012 r. i bardzo dobrze oceniona.

5.9. Recenzowane prace w czasopismach międzynarodowych

- Dyes and Pigments (ELSEVIER) manuskrypt ID: DYPI_2018_2170.
- Chemical Science International Journal, manuskrypt ID: Ms_CSIJ_30467.
- International Journal of Pharmaceutics (ELSEVIER) DOI: 10.1016/.ijpharm.2013.12.050
- Rapid Communication in Mass Spectrometry DOI: 10.1001/rcm.6782

Beata Miksa