



Politechnika Wrocławska

---

Wydział Chemiczny

Dr inż. Urszula Bazylińska  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska

Autoreferat PL

***Metody strukturyzacji układów nanoemulsyjnych  
w enkapsulacji związków  
terapeutycznych i diagnostycznych***

Załącznik nr 2-PL

Wrocław 2019

**I. Imię i Nazwisko:** Urszula Bazylińska

Dane adresowe: Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław  
Budynek A/2, pokój 47  
Tel: 71 3202183  
E-mail: urszula.bazylińska@pwr.edu.pl

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

- Dyplom **doktora nauk chemicznych** w dyscyplinie biotechnologia (2013), Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska  
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Synteza i badania in vitro nowych nanokapsuł polielektrolitowych o spowolnionym uwalnianiu fotouczulaczy*  
Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk
- Dyplom **magistra inżyniera biotechnologii** (2008), specjalność Biotechnologia Środowiska, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska  
Tytuł pracy dyplomowej: *Solubilizacja i cytotoksyczność wybranych fotouczulaczy w układach mikroemulsyjnych*  
Opiekun pracy: prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk

**III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- 2015 – obecnie: adiunkt naukowo-dydaktyczny, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny
- 2012 – 2015: asystent naukowo-dydaktyczny, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny
- 2008 – 2009 – staż naukowy zrealizowany w ramach programu Leonardo Da Vinci, *Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse* (ENSACIET) przy współpracy z firmą VALGO Remediation

**IV. Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki(Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego jest moje osiągnięcie naukowe obejmujące wyniki zawarte w cyklu publikacji naukowych, objęte tytułem:

***Metody strukturyzacji układów nanoemulsyjnych w enkapsulacji związków terapeutycznych i diagnostycznych***

Cykl ten tworzy 9 publikacji naukowych o spójnej tematyce, wyszczególnionych w wykazie zamieszczonym poniżej w punkcie IVb. Wszystkie wymienione pozycje znajdują się na liście filadelfijskiej, a ich sumaryczny Impact Factor wynosi **32.091**.

**We wszystkich publikacjach z cyklu jestem pierwszym autorem, w tym pięciokrotnie autorem korespondencyjnym.**

Wykaz publikacji przedstawiony jest w kolejności opublikowania, natomiast pełne teksty publikacji oraz oświadczenia współautorów znajdują się w załącznikach

**b) Cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

**H1. U. Bazylińska\***, J. Kulbacka, K.A. Wilk (2014) *Dicephalic ionic surfactants in fabrication of biocompatible nanoemulsions: Factors influencing droplet size and stability*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 460, 312–320.

(IF<sup>a</sup> = **2.752**; 25 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 22)

**H2. U. Bazylińska\***, J. Saczko (2016) *Nanoemulsion-templated polyelectrolyte multifunctional nanocapsules for DNA entrapment and bioimaging*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 137, 191–202.

(IF<sup>a</sup> = **3.887**; 35 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 12)

**H3. U. Bazylińska**, D. Wawrzyńczyk, J. Kulbacka, R. Frąckowiak, B. Cichy, A. Bednarkiewicz, M. Samoć\*, K.A. Wilk\* (2016) *Polymeric nanocapsules with up-converting nanocrystals make ideal fluorescent bioprobes*. Scientific Reports 6, 1-14.

(IF<sup>a</sup> = **4.259**; 40 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 10)

**H4. U. Bazylińska\***, R. Frąckowiak, Z. Brzózka, K.A. Wilk (2017) *The effect of anionic dicephalic surfactants on fabrication of varied-core nanocarriers for sustained release of porphyrin photosensitizers*. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 166, 169–179.

(IF<sup>a</sup> = **3.165**; 30 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 4)

**H5. U. Bazylińska\*** (2017) *Rationally designed double emulsion process for co-encapsulation of hybrid cargo in stealth nanocarriers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 532, 476–482.

(IF<sup>a</sup> = **2.829**; 30 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 1)

**H6. U. Bazylińska\***, J. Pietkiewicz, J. Rossowska, G. Chodaczek, A. Gamian, K.A. Wilk\* (2017), *Polyelectrolyte oil-core nanocarriers for localized and sustained delivery of daunorubicin to colon carcinoma MC38 cells: the case of polysaccharide multilayer film in relation to PEG-ylated shell*. Macromolecular Bioscience 1600356, 1-17.

(IF<sup>a</sup> = **3.392**; 35 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 2)

**H7. U. Bazylińska**, D. Wawrzyńczyk\* (2017), *Encapsulation of TOPO stabilized NaYF<sub>4</sub>:Er<sup>3+</sup>,Yb<sup>3+</sup> nanoparticles in biocompatible nanocarriers: Synthesis, optical properties and colloidal stability*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 532, 556–563.

(IF<sup>a</sup> = **2.829**; 30 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 2)

**H8. U. Bazylińska**, W. Zieliński, J. Kulbacka, M. Samoć, K.A. Wilk\* (2016) *New diamidequat-type surfactants in fabrication of long-sustained theranostic nanocapsules: colloidal stability, drug delivery and bioimaging*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 137, 121–132.

(IF<sup>a</sup> = **3.887**; 35 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 12)

**H9. U. Bazylińska\***, J. Kulbacka, J. Schmidt, Y. Talmon, S. Murgia\* (2018) *Polymer-free cubosomes for simultaneous bioimaging and photodynamic action of photosensitizers in melanoma skin cancer cells*. Journal of Colloid and Interface Sciences 522, 163-173.

(IF<sup>a</sup> = **5.091**; 30 pkt MNiSW<sup>b</sup>, Cyt<sup>c</sup> = 5)

Sumaryczny impact factor (IF): **32.091**

(średnia **3.566**/publikację)

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **290**

(średnia **32.222** pkt/publikację)

Liczba cytowań bez autocytowań: **70**

\* Autor korespondencyjny publikacji

<sup>a</sup> Impact Factor podany jest dla roku opublikowania artykułu (dla publikacji z roku 2018 podano IF dla roku 2017)

<sup>b</sup> Zgodnie z wykazem czasopism opublikowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w dniu 09.12.2016r.

<sup>c</sup> Zgodnie z Web of Science z wyłączeniem autocytowań

Prowadzone przeze mnie badania naukowe (reprezentujące monotematyczny cykl publikacji), stanowiące osiągnięcie naukowe ujęte w przewodzie habilitacyjnym finansowane były przez:

- **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego, **Sonata 8**, nr 2014/15/D/ST4/00808 (06.09.2014-05.09.2019), *Strukturyzowane nanoemulsje jako funkcjonalne i biokompatybilne nanonośniki hybrydowych fluoroforów* którego jestem **Kierownikiem**
- **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego, **OPUS 5**, nr 2012/05/B/ST4/00095, (05.03.2013-04.03.2016), *Mechanizm i efektywność dostarczania nanośników wypełnionych fotouczulaczami w warunkach modelowych i z wykorzystaniem mikrosystemów*, którego byłam **Wykonawcą**
- **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego, **OPUS 4**, nr 2012/07/B/ST5/02753, (08.07.2013-07.07.2016), *Wielofunkcyjne nanonośniki dla teranostyki i ich oddziaływanie ze światłem*, którego byłam **Głównym Wykonawcą**
- **Wrocławskie Centrum Badań EIT+**, w ramach projektu *Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne (BioMed)*, Priorytet II. **Nowe leki i ich formy użytkowe**, Zadanie II.4. **Nanoenkapsułowanie farmaceutyków** (19.02.2010-31.03.2015), finansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 1.1.2), POIG 01.01.02-02-003/08, którego byłam **Wykonawcą**
- **Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego** w ramach działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej

Proponowany cykl publikacji [H1-H9], dotyczący projektowania, syntezy i analizy fizykochemicznej nanonośników do enkapsulacji związków terapeutycznych i diagnostycznych wytwarzanych metodami strukturyzacji nanoemulsji, stanowi nowość naukową w dziedzinie nauk chemicznych i plasuje się w obrębie chemii układów dyspersyjnych i koloidów, chemii medycznej, technologii chemicznej oraz nanobiotechnologii i farmacji.

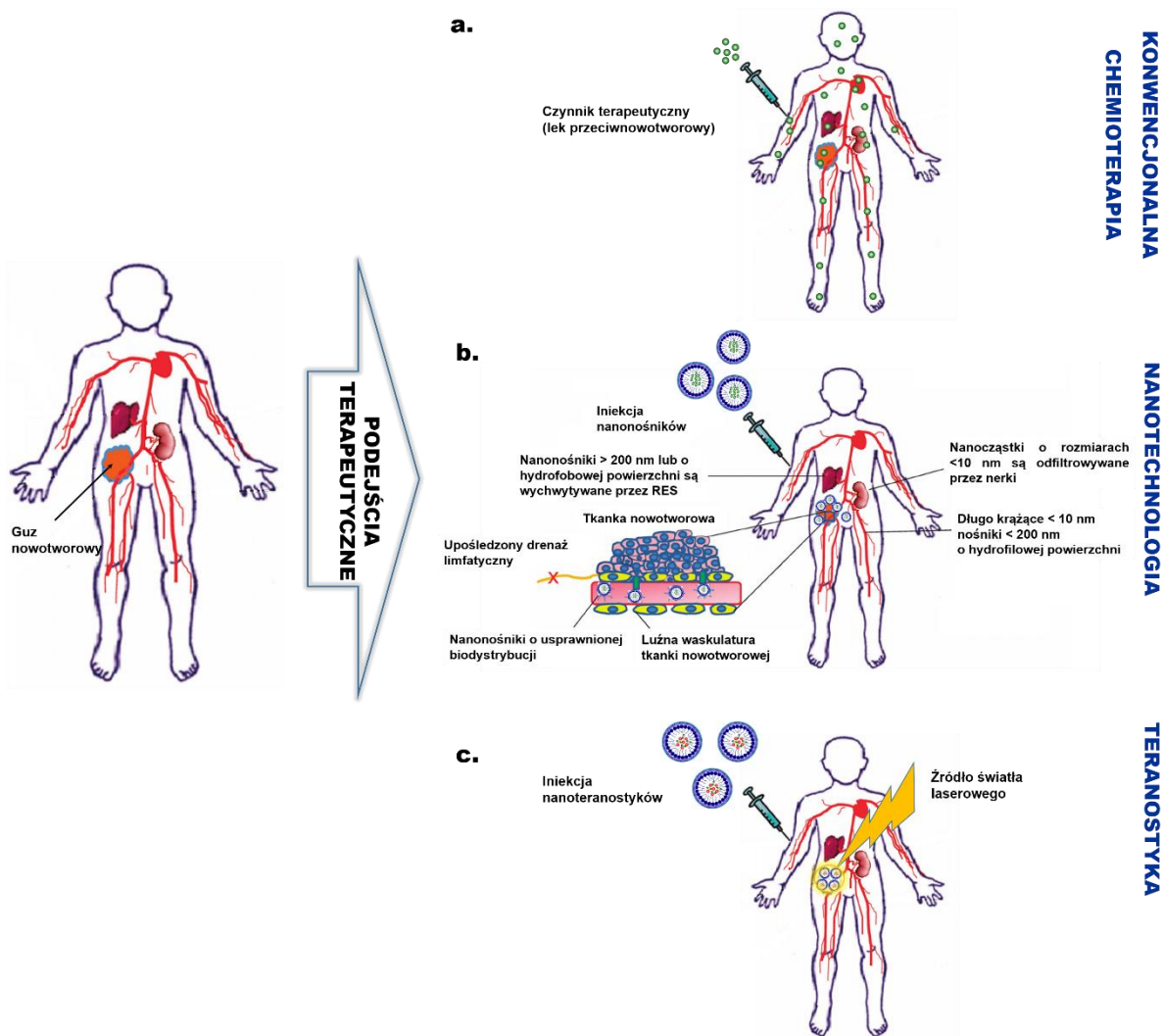
Prowadzone przeze mnie badania mają interdyscyplinarny charakter, dlatego wymagały nawiązania współpracy krajowej i zagranicznej z wieloma uznanymi ośrodkami badawczymi i specjalistami z różnych dziedzin (tj. chemia, fizyka, farmacja, medycyna i nanobiotechnologia) m.in. w ramach powyższych projektów badawczych.

**c) Omówienie celu i osiągnięć naukowych przedłożonych do oceny wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**WPROWADZENIE**

Projektowanie i synteza nowoczesnych układów dostarczania leków o specyficznych cechach użytkowych (ang. *rational design*) to obecnie główne trendy i wyzwania badawcze szeregu renomowanych zespołów naukowych i licznych koncernów farmaceutycznych [1-3]. Celem wieloletnich eksperymentów z pogranicza chemii układów dyspersyjnych i koloidów, chemii medycznej, technologii chemicznej (w tym chemikaliów specjalistycznych - ang. *fine chemicals*, FCs) oraz nanobiotechnologii i farmacji, stało się kreowanie nośników o określonej funkcjonalności, których odpowiedni rozmiar i struktura będzie w stanie zapewnić maksymalne korzyści terapeutyczne przy jednoczesnym monitorowaniu postępów danej terapii przeciwnowotworowej (np. chemio- czy radioterapii) [3-5].

Zgodnie z literaturą przedmiotu, przewaga nanonośników, nad tradycyjnym podawaniem niskocząsteczkowych leków i niszczeniem komórek nowotworowych za pomocą dożylną chemioterapii (**Rys. 1**), polega m.in. na efektywnym dostarczaniu i kontrolowanym uwalnianiu czynnika terapeutycznego lub mieszaniny związków biologicznie czynnych (tzw. aktywnego cargo) w komórkach patologicznych z marginesem zdrowych tkanek, dzięki efektowi EPR (ang. *enhanced vascular permeability and retention*) [4-7]. EPR pozwala na przenikanie do tkanki guza nanonośników o rozmiarach < 700 nm. Proces ten powodowany jest zjawiskiem fenestracji naczyń krwionośnych odżywiających nowotwór, powstałej w wyniku niekontrolowanej angiogenezy i hiperwaskuryzacji oraz niskiemu pH~6 i upośledzonej funkcji drenażu limfatycznego w obrębie guza. W prawidłowo rozwiniętym śródbłonku naczyń „szczeliny” pomiędzy komórkami wynoszą maksymalnie 6 nm, co powoduje, że do zdrowych tkanek z krwi mogą przenikać związki o maksymalnej masie 50 kDa, zaś nośniki o odpowiednio dużych rozmiarach zostają zatrzymane. Niestety nisko cząsteczkowe leki (5-30 kDa) powodują nieselektywność chemioterapii, uszkodzenie oby typów tkanek i poważne skutki uboczne u pacjenta [6,7].



**Rys. 1.** Schematyczne porównanie konwencjonalnego podawania czynników terapeutycznych - leków przeciwnowotworowych (a) z formą enkapsulowaną - nośnikami w skali nano (b) i teranostykami wykorzystującymi aspekt diagnostyczny (c) [8-11].

Dlatego, projektując nośnik o rozmiarach  $> 10$  nm (ryzyko odfiltrowania przez nerki), ale  $< 200$  nm (ryzyko wychwytu przez układ fagocytarny – ang. *reticuloendothelial system*, RES), wysokiej stabilności koloidalnej, hydrofilowej powierzchni i zdolności spowolnionego uwalnianiu czynnika aktywnego, jesteśmy w stanie wykreować uniwersalny nanokontener, którego aplikacja pozwoli na korzystną biodystrybucję oraz utrzymanie stałego poziomu leku we krwi pomiędzy maksimum - powyżej którego jego stężenie jest toksyczne, a minimum – poniżej, którego lek ten nie jest zbyt długo aktywny (**Rys. 1b**) [7,8].

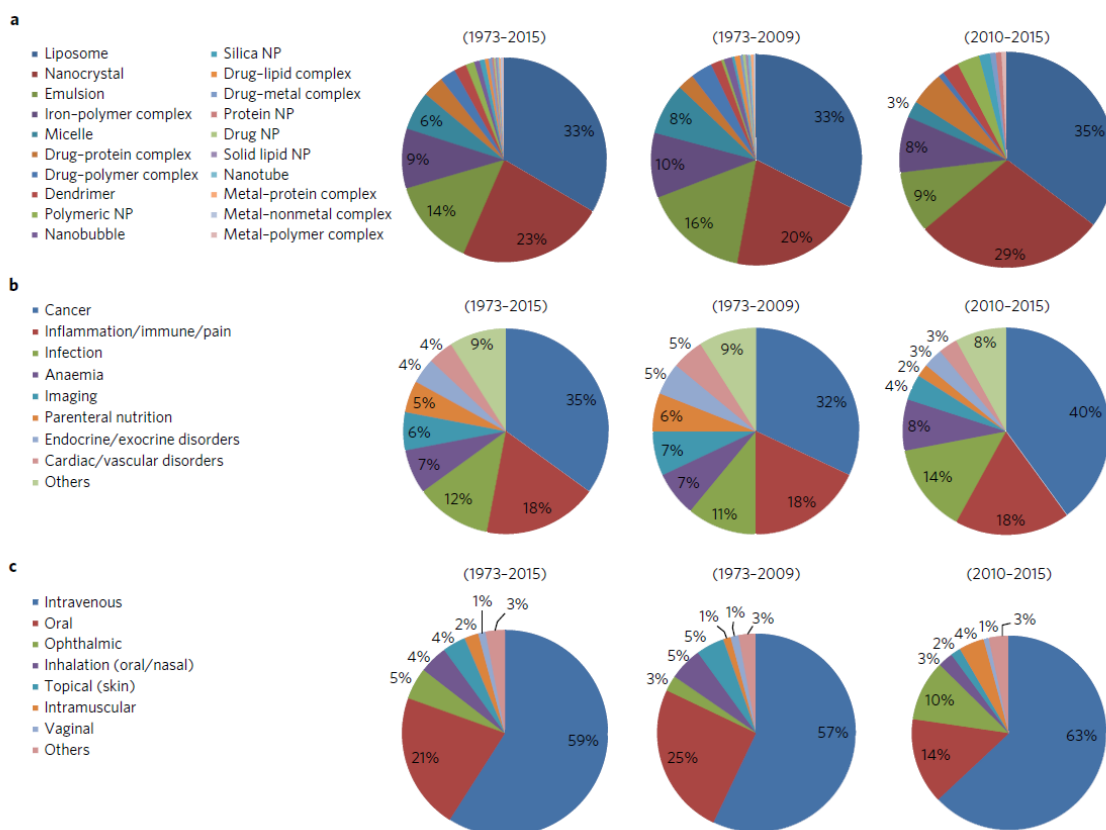
Ostatnimi czasy niezwykle istotna stała się również potrzeba diagnostyki guzów nowotworowych, która pozwala na szybsze wykrycie i monitorowanie postępów terapii. Tak narodziła się koncepcja teranostyki i układów teranostycznych (ang. *theranostic = therapeutic and diagnostic*), czyli tych łączących w sobie cechy

terapeutyczne i diagnostyczne (**Rys. 1c**), wychodząc naprzeciw tzw. medycynie spersonalizowanej. Odpowiednio zaprojektowane nośniki teranostyczne, oprócz optymalnej kompozycji, wysokiej stabilności koloidalnej, dużej pojemności załadunkowej i kontrolowanego uwalniania aktywnego cargo, dzięki obecności czynnika kontrastowego (markera fluorescencyjnego), dają dodatkową szansę na bioobrazowanie morfologii zmiany patologicznej i leczenie w czasie rzeczywistym, a tym samym szybsze wykrywanie komórek nowotworowych oraz znaczne zwiększenie skuteczności stosowanej terapii i komfortu leczenia pacjenta [9-11].

Duży potencjał aplikacyjny i wysoce interdyscyplinarny kierunek badań spowodował rozwój imponującej liczby technik syntetycznych wytwarzania nanonośników o znaczeniu terapeutycznym i diagnostycznym. Szacuje się, że globalny rynek nanofarmaceutyków osiągnie wkrótce wartość ponad 79.8 miliardów dolarów, jednakże do tej pory, jedynie 35 formuacji zostało dopuszczone przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) do dalszych badań klinicznych [2]. Większość z tych produktów to preparaty przeciwnowotworowe, oparte o proces wytwarzania agregatów micelarnych – koloidów asocjacyjnych, powstałych w wyniku procesów samoorganizacji surfaktantów, czyli związków amfifilowych o dobrze zdefiniowanej architekturze – typu liposomalnego, stosowane w tradycyjnej dożylniej chemioterapii, jak np. wprowadzony na rynek w 1995 r. Doxil® (doksorubicyna), czy jeden z najnowszych Marqibo® z 2012 r., będący liposomową wersją winkrystyny [2,12].

Jak podają doniesienia literaturowe olbrzymia ekspansja tych produktów wynika z faktu dużej popularności liposomów już w latach 70-tych i wygaśnięcia patentów, których dotyczyła ich, często prowizoryczna produkcja. Ostateczne działanie tych nanofarmaceutyków drugiej generacji (np. liposomów połączonych z czynnikami diagnostycznymi opartych na nanocząstkach metali), pozostaje nieznane i ich wpływ na ogólny portfel produktów leczniczych zawierających nanomateriały to obszar, który będzie monitorowany w przyszłości [2,13].





**Rys. 2.** Statystyczne pokazanie rozwoju sektora chemiczno-farmaceutycznego w latach 1973-2015 odnośnie formułacji opartych na nośnikach leków, z uwzględnieniem docelowych chorób i drogi podawania [2].

Jednakże, znaczny sukces i potencjał aplikacyjny liposomów, jak również duży potencjał badawczy formułacji micelarnych i emulsyjnych (**Rys. 2**), wyznaczył ścieżkę poszukiwań nowych koloidów asocjacyjnych, powstałych z agregatów surfaktantowych z ciekłym rdzeniem olejowym o usprawnionej zdolności enkapsulowania i uwalniania związków bioaktywnych [4,14,15]. Wobec tego najważniejsze ograniczenia liposomów, które należy wziąć pod uwagę projektując nanonośniki teranostyczne o strukturze koloidalnej to (1) niska pojemność załadunkowa układu podczas enkapsulacji hydrofobowego lub hybrydowego cargo, (2) ograniczona stabilność koloidalna i chemiczna, (3) podatność na zbyt szybkie uwolnienie leku poprzez np. utlenianie lub hydrolizę [2,13,15]. Powyższe wymagania są kluczowe w syntezie nowoczesnych, funkcjonalnych i stabilnych układów koloidalnych w nanoskali o znaczeniu terapeutycznym i diagnostycznym stanowiąc duże wyzwanie badawcze i pole eksperymentalne dla współczesnej chemii układów dyspersyjnych i koloidów, technologii farmaceutycznej, fizykochemii zjawisk międzyfazowych i inżynierii powierzchni, oraz nanobiotechnologii.

## CEL BADAWCZY

Celem naukowym moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. *Metody strukturyzacji układów nanoemulsyjnych w enkapsulacji związków terapeutycznych i diagnostycznych*, było **zaprojektowanie i opracowanie nowych uniwersalnych nanonośników substancji terapeutycznych i/lub diagnostycznych, w oparciu o metody samoorganizacji surfaktantów oraz syntezy transkrypcyjnej układów nanoemulsyjnych, o dobrze zdefiniowanej architekturze i specyficznych cechach użytkowych** tj. odpowiedni rozmiar 150-200 nm, hydrofilowa powierzchnia, duża pojemność załadunkowa, kontrolowane uwalnianie, biokompatybilność, korzystna biodystrybucja oraz maksymalna stabilność koloidalna i przydatność terapeutyczna.

Wszystkie otrzymane nanonośniki to produkty biozgodne, nietoksyczne i inerte chemicznie odnośnie enkapsulowanego czynnika terapeutycznego i/lub diagnostycznego. Pozytywne wyniki przeprowadzonych badań stanowią duży potencjał aplikacyjny stwarzając możliwości na interdyscyplinarny rozwój nauk chemicznych odnośnie takich dziedzin jak chemia medyczna, farmacja, nanotechnologia oraz medycyna spersonalizowana, a w przyszłości również terapia i diagnostyka chorób nowotworowych, prowadząc konsekwentnie do zwiększenia efektu terapeutycznego i komfortu leczenia pacjenta.

### 1. Układy nanoemulsyjne

Surfaktanty, czyli powierzchniowo-czynne związki amfifilowe, unikalne w swojej budowie, umożliwiające rozpuszczenie jednego związku w dwóch różnych rozpuszczalnikach jednocześnie, dzięki zdolności adsorbowania się na powierzchni międzyfazowej, tworzą agregaty micelarne - tzw. koloidy asocjacyjne, zwane również układami mikroheterogenicznymi - o rozwiniętej powierzchni zewnętrznej i szeregu interesujących cech [16-18]. Zastosowanie surfaktantów i procesów samoorganizacji (ang. *self assembly*) do efektywnej stabilizacji nanonośników aktywnego cargo jest jednak ograniczone ze względu na ich dynamiczny i ciekły charakter. Toteż, ostatnimi czasy używa się koloidów asocjacyjnych w syntezie transkrypcyjnej, podczas której nietrwała struktura agregatu zostaje „usztynwiona”. W ten sposób można otrzymać układy o dobrze zdefiniowanej architekturze i specyficznych cechach użytkowych na poziomie nanoskopowym, które z powodzeniem znajdują zastosowanie jako nośniki związków biologicznie aktywnych. W przypadku syntezy transkrypcyjnej szablony/templaty są używane jako środki ukierunkowujące i strukturyzujące.

Powierzchnia międzyfazowa pomiędzy szablonem i roztworem reprezentuje swoiste miejsce dla wzrostu materiału z roztworu. Jako szablony do konstruowania tego typu nanokonstruktów można zastosować m.in. emulsje (makroemulsje), nanoemulsje i mikroemulsje typu olej-w-wodzie (o/w) i woda w oleju (w/o) [18-20]. Nanoemulsje jako kinetycznie trwałe układy, o silnie rozwiniętej powierzchni zewnętrznej przy stosunkowo niewielkiej objętości i lepkości, to szczególnie interesujące agregaty surfaktantowe ze względu na duży potencjał aplikacyjny. Są to koloidowe dyspersje o rozmiarach nanometrycznych (średnice kropeł, w zależności od źródła przyjmują wielkości 20-500 nm) i dużej pojemności ładunkowej rdzenia [18,21,22]. W odróżnieniu od tradycyjnych emulsji (makroemulsji), oprócz mniejszej średnicy kropeł (zwykle o rząd wielkości) cechuje je wyższa stabilność kinetyczna. W kolei ich przewagą nad mikroemulsjami – dyspersjami termodynamicznie stabilnymi – jest niska cytotoxycznosc dzięki znacznie mniejszej ilości surfaktantu lub mieszaniny surfaktant:kosurfaktant, użytej do stabilizacji układu.

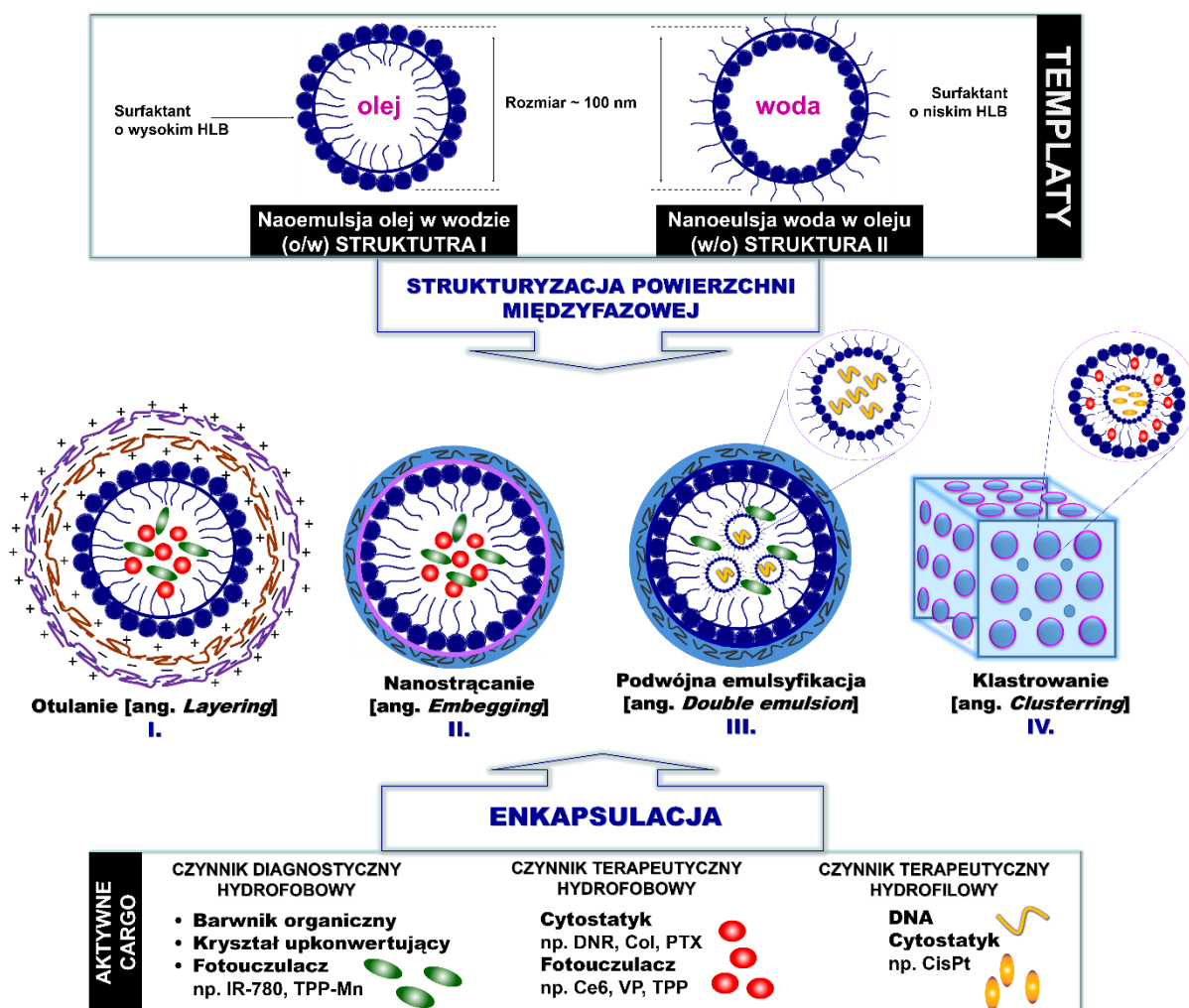
**Proces strukturyzacji (restrukturyzacji) powierzchni międzyfazowej nanoemulsji stwarza możliwość na wykreowanie nośników koloidalnych z nowymi funkcjonalnymi właściwościami tj. kontrolowane uwalnianie aktywnego cargo o właściwościach terapeutycznych i/lub diagnostycznych czy zwiększenie stabilności, biodystrybucji i biokompatybilności takich układów, które mogą być konkurencyjne do dostępnych na rynku chemiczno-farmaceutycznym preparatów liposomowych lub emulsyjnych.**

## **2. Metody strukturyzacji układów nanoemulsyjnych**

Koncepcję badań [H1-H9], nad syntezą nowych nanonośników koloidowych do enkapsulacji związków terapeutycznych i/lub diagnostycznych opracowałam w oparciu o techniki strukturyzacji (ang. *structural design*) układów nanoemulsyjnych z wykorzystaniem syntezy transkrypcyjnej i procesu samoorganizacji surfaktantów o różnej architekturze i hydrofobowości, zaprezentowałam schematycznie na **Rys. 3**,

Cel badań rozprawy habilitacyjnej został osiągnięty dzięki zastosowaniu najnowocześniejszych metod strukturyzacji powierzchni międzyfazowej dwóch typów dyspersji (szablonów) tj. nanoemulsji typu olej w wodzie (o/w) – struktura I i woda w oleju (w/o) – struktura II, dzięki którym otrzymałam różne typy funkcjonalizowanych nośników (**Rys. 3**), w zależności od zastosowanej techniki modyfikacji układu:

- I. Proces otulania (ang. *layering*) ciekłego rdzenia nanoemulsyjnego lub rdzenia (kolejno wymieniony nośnik II) otrzymanego techniką nanostrącania, za pomocą selektywnej adsorpcji polielektrolitów o przeciwnym ładunku – prace [H1,H2,H3,H4,H6]
- II. Proces nanostrącania i osadzania (ang. *embedding*), czyli zastosowania aktywnego cargo, jako budulcowego matryks współwytrącającego się z surfaktantami, olejami oraz polimerami w pseudofazie micelarnej – prace [H3,H4,H8]



Rys. 3. Schematyczna koncepcja badawcza nad otrzymywaniem strukturyzowanych układów nanoemulsyjnych do enkapsulacji związków terapeutycznych i diagnostycznych, wraz z lokalizacją potencjalnego cargo o różnym przeznaczeniu i hydrofobowości.

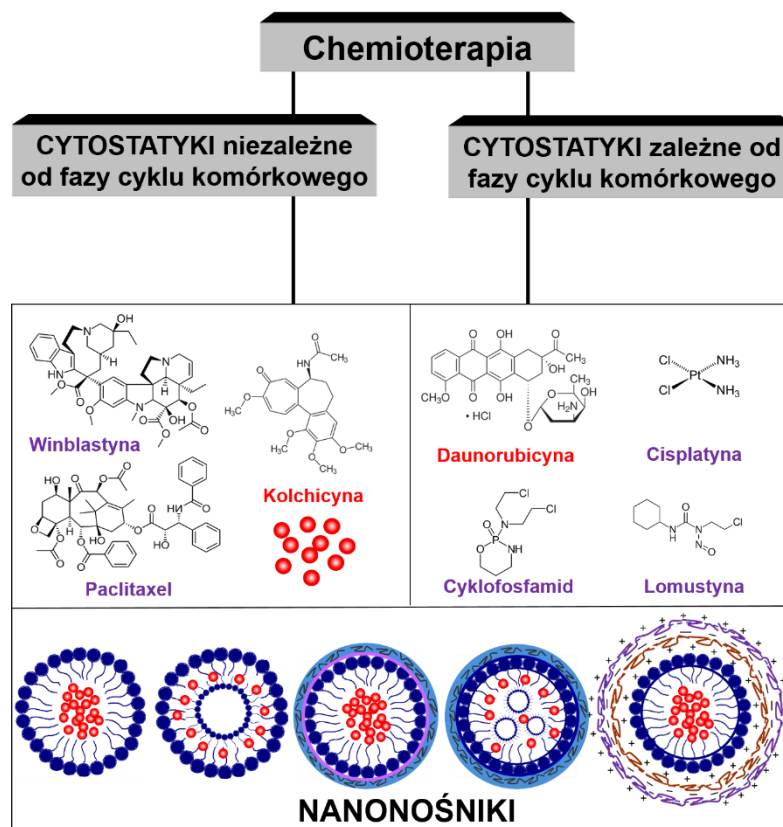
- III. Proces podwójnej emulsyfikacji (ang. *double emulsion*), czyli dwuetapowej metody tworzenia dwóch typów dyspersji, tj. pojedynczej nanoemulsji typu w/o, a następnie na rozproszeniu powstałego układu dyspersyjnego w fazie zewnętrznej (emulsję wielokrotną w/o/w) i odparowaniu rozpuszczalnika, prowadząc do utwardzenia nanośnika i enkapsulacji związków o różnej hydrofobowości (tzw. hybrydowego cargo) np. hydrofilowego DNA i hydrofobowego markera fluorescencyjnego - prace [H5, H7]
- IV. Proces grupowania, tzw. klastrowanie (ang. *clustering*) surfaktantów lipidowych i fosfolipidowych samoorganizujących się w mocno upakowane dwuciągłe struktury ciekłokrystaliczne o strukturze plastra miodu, tzw. klastry o strukturze kubicznej – kubosomy ze znacznie bogatszą i bardziej rozwiniętą powierzchnią międzyfazową powodująca większą stabilność i pojemność ładunkową układów w porównaniu np. do liposomów [H9]

### 3. Czynniki terapeutyczne i diagnostyczne

W moich badaniach jako czynniki terapeutyczne i diagnostyczne stosowałam tradycyjne leki o działaniu cytostatycznym (chemioterapeutyki), czynniki fotouczulające (fotosensybilizatory = fotouczulacze), kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) oraz markery fluorescencyjne w postaci barwników organicznych i nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców, wykazujące konwersję energii w górę (ang. *upconverting nanoparticles*, UCNPs)

#### I. Chemioterapeutyki

Tradycyjne leki przeciwnowotworowe zwane chemioterapeutykami lub cytostatykami, wykorzystywane w chemioterapii mają za zadanie hamować bądź zaburzać proces podziału komórek nowotworowych, swoiście lub nieswoiście do ich cyklu komórkowego, powodując w efekcie programowaną śmierć, czyli apoptozę [23]. Dlatego generalnie dla cytostatyków stosuje się podział na dwie grupy, tzw. leki zależne lub niezależne od cyklu komórkowego, choć są to bardzo zróżnicowane związki naturalne i syntetyczne (**Rys. 4**).



**Rys. 4.** Standardowy podział cytostatyków (chemioterapeutyków) na zależne i niezależne od cyklu komórkowego. Kolorem czerwonym przedstawiono leki przeciwnowotworowe uwzględnione w moich badaniach nad ich enkapsulacją w strukturyzowanych nośnikach nanoemulsyjnych [prace H6, H8].

Do leków działających niezależnie od fazy podziału komórki, czyli bez względu na to, czy jest ona w fazie  $G_1$ , S,  $G_2$ , M czy fazie spoczynku  $G_0$  należą m.in. związki platyny (cisplatyna i karboplatyna) antybiotyki antracyklinowe (doksorubicyna i daunorubicyna), dekarbazyna czy cyklofosamid. Z kolei leki fazowo-specyficzne to m.in. kolchicyna (alkaloid pozyskiwany z ziemowita jesiennego), winkrystyna czy winblastyna (alkaloidy barwinka różowego), które hamują podział komórki na etapie metafazy mitozy (faza M) poprzez blokowanie wytworzenia mikrotubul oraz taxole (pozyskiwany naturalnie paklitaksel lub syntetycznie docetaksel), które z kolei blokują depolimeryzację mikrotubul również w fazie M oraz dodatkowo działają w fazie  $G_2$  [24,25].

W każdym razie, niezależnie od fazy działania i swoistości cytostatyki większość chemioterapeutyków to leki trudno rozpuszczalne w wodzie, które nie działają wybiórczo wobec komórek nowotworowych, ale uderzają także w te zdrowe, stąd liczne efekty uboczne, z których alergie skórne, nudności, łysienie, niedrożność jelit, zapalenie mięśnia sercowego czy skurcze oskrzeli należą do tych najłagodniejszych [23-25].

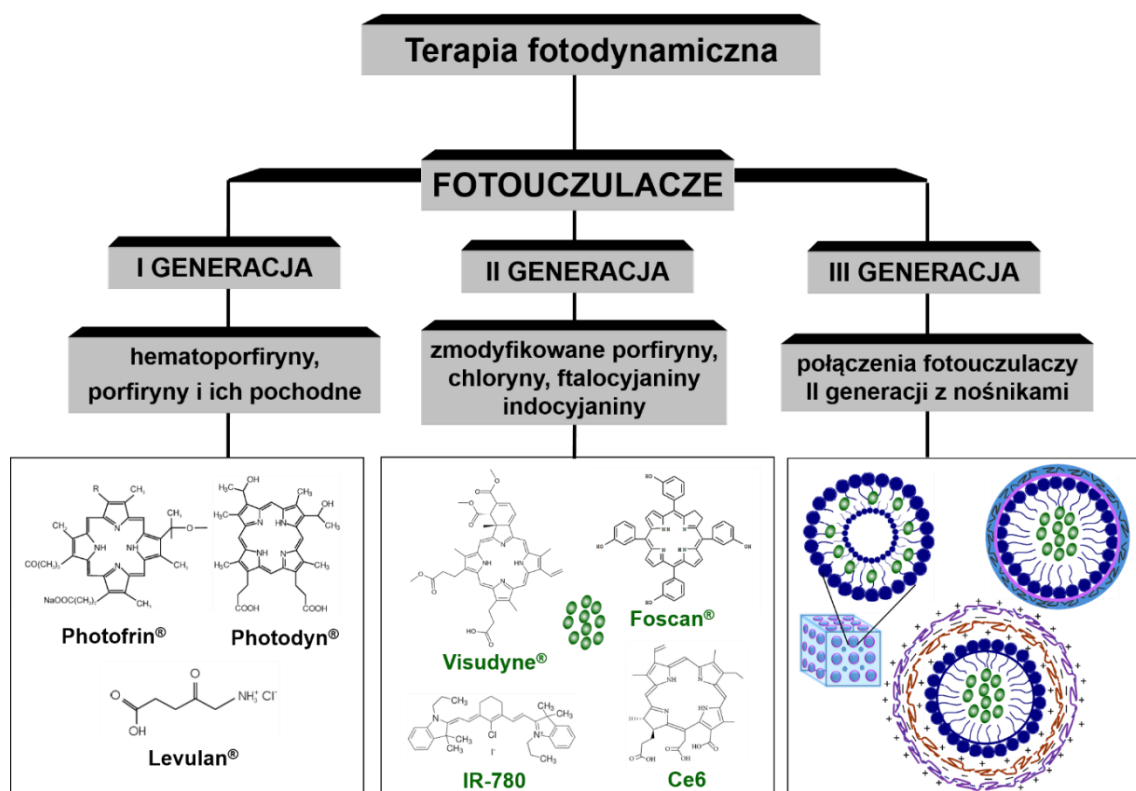
Dlatego, aby sprawdzić możliwość syntezy nowych postaci leku o zwiększonej masie cząsteczkowej, niższych kosztach i wyższym potencjale terapeutycznym do części badań obejmujących enkapsulację cytostatyków wybrałam trzy leki hydrofobowe o zróżnicowanej specyficzności działania oraz najwyższej przydatności badawczej tj. daunorubicynę i kolchicynę – są to cytostatyki z powodzeniem stosowane w terapii nowotworu piersi, jajnika, płuc, skóry czy jelita grubego.

## II. Fotouczulacze

Fotouczulacze, zwane również fotosensybilizatorami to barwniki fluorescencyjne stosowane w terapii fotodynamicznej nowotworów (ang. *photodynamic therapy*, PDT), które ulegają aktywacji przez światło o specyficznej dla nich długości fali i są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu (RFT), toksycznych dla komórek docelowych. Od początków PDT, przypadających na przełom lat 70-tych i 80-tych XX wieku opracowano trzy generacje fotosensybilizatorów, których podział zależny od czasu ich rozwoju, maksimum absorpcji światła i selektywności względem tkanek nowotworowych, pokazałam schematycznie na **Rys. 5** [26,27].

Do tej pory na rynku farmaceutycznym obecnych jest zaledwie kilka preparatów tzw. II generacji, z których najwyższy potencjał w leczeniu chorób nowotworowych wykazuje Visudyne® (oparty na werteporfynie - VP) i Foscan® (oparty na temoporfinie-TPP) [27].

Inne czynniki fotouczulające jak np. chloryna e6 czy barwniki indocyjaninowe (m.in. IR-780 czy ICG) o potencjalnie korzystniejszych parametrach fotochemicznych i fotofizycznych (m.in. max absorpcji światła 680 – 800 nm), które pozwalają zarówno na głębszą penetrację chorych tkanek, jak również potencjalne zastosowanie w teranostyce (jako markery fluorescencyjne NIR), są obecnie na etapie badań klinicznych lub przedklinicznych [13]. Wobec tego w części moich badaniach dotyczących syntezy fotouczulaczy III generacji za pomocą unikatowych technik strukturyzacji nanoemulsji zastosowałam hydrofobowe fotosensybilizatory II generacji (chloryna e6, cyjanina IR-780, porfiryny: TPP-Mn, VP, TPP) o najwyższym potencjale aplikacyjnym, które z powodzeniem mogą pełnić też funkcję cargo o znaczeniu teranostycznym, czyli jednocześnie związki terapeutyczne w PDT i efektywne markery fluorescencyjne w diagnostyce komórek nowotworowych (Rys. 5).

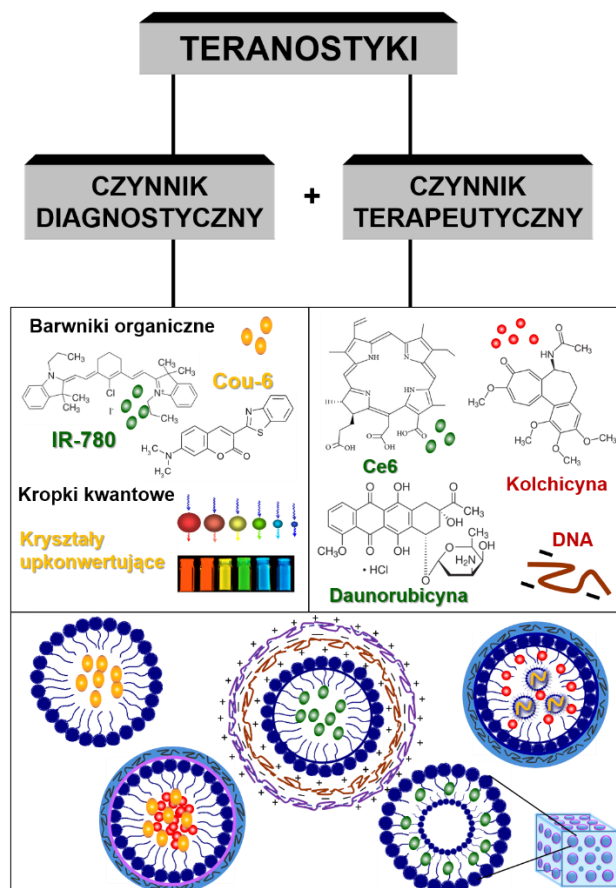


**Rys. 5.** Podział fotouczulaczy według generacji ich powstawania. I generacja: Photofrin® (porfimer sodu), Photodyn® (kwas 2,18- porfinodipropionowy), Levulan® (kwas 5-aminolewulinowy-ALA); II generacja: Vistudyne (werteporfina) Foscan® (temoporfina), IR-780 (indocyjanina), Ce6 (chloryna); III generacja: fotouczulacze enkapsułowane w nowoczesnych nanoosnikach. Kolorem zielonym przedstawiono związki zaproponowane w moich badaniach do procesu enkapsulacji i syntezy fotouczulaczy III generacji (tzw. nanofotouczulaczy) [prace H2, H4, H9].

### III. Markery fluorescencyjne i cargo teranostyczne

Znaczniiki (markery) fluorescencyjne stosowane w układach teranostycznych są niezwykle istotne ze względu na szybkie wykrycie (diagnostykę) oraz bioobrazowanie zmiany patologicznej (guza nowotworowego), a następnie raportowanie odnośnie morfologii guza i monitorowanie postępów terapii [9-11, 13]. Markery fluorescencyjne mogą być ko-enkapsułowane ze związkami o znaczeniu terapeutycznym (np. cytostatykami, kwasami nukleinowymi), tworząc tzw. cargo hybrydowe lub pełnić ambiwalentną funkcję czynnika teranostycznego (np. wspomniane powyżej fotouczulacze lub cytostatyki fluorescencyjne) (Rys. 6).





**Rys. 6.** Schematyczne pokazanie układów teranostycznych, tj. czynników diagnostycznych i terapeutycznych enkapsulowanych w strukturyzowanych nanoemulsjach. Kolorem żółtym oznaczono markery fluorescencyjne stosowane w moich badaniach, jako czynnik diagnostyczny [H3,H5,H7,H8], zaś zielonym czynnik pełniący ambiwalentną funkcję diagnostyczną i terapeutyczną (teranostyczną) [H2,H4,H6,H9].

Od kilku lat w bioobrazowaniu i biodiagnostyce chorób nowotworowych największą popularnością cieszą się barwniki organiczne tj. Coumarin-6, Nile Red, Thiazole Orange, Hoechst czy markery NIR, do których zalicza się m.in. indocyjaniny, pełniące często funkcję czynnika fotouczulającego wykorzystywanego w PDT [9,13]. Pomimo dość dobrych parametrów fotofizycznych, niskiej inwazyjności, a także możliwości łączenia z innymi metodami detekcji, głównym ograniczeniem stosowania tych markerów jest duża hydrofobowość i podatność na fotodegradację pod wpływem zbyt długiej ekspozycji na światło o odpowiedniej długości fali. Z drugiej strony popularne ostatnio nanocząstki nieorganiczne tj. półprzewodnikowe kropki kwantowe, nanokryształy domieszkowane jonami lantanowców wykazujące konwersję energii w górę (UCNPs) lub nanocząstki złota to związki o dużo większej stabilności fizycznej i chemicznej. Jednakże wysoka toksyczność, znikoma

rozpuszczalność w wodzie i brak grup funkcyjnych, które ułatwiałyby ich wiązanie do biomolekuł, ogranicza zastosowanie tych nanocząstek jako efektywnych czynników diagnostycznych. Dodatkowo niska masa cząsteczkowa lub rozmiar hydrodynamiczny, zarówno barwników organicznych, jak i nanocząstek nieorganicznych może powodować niekorzystną biodystrybucję w organizmie pacjenta poprzez zbyt szybkie odfiltrowywanie ich przez nerki lub niepożądaną akumulację, zarówno w zdrowych (np. mięśni gładkich), jak i chorobowo zmienionych tkankach, a tym samym wywoływać ich lokalne zapalenie i wzrost kosztów terapii [7,28].

Powyższe niekorzystne cechy w/w markerów fluorescencyjnych znacznie zmniejszają ich aplikacyjny potencjał biologiczny, toteż aby usprawnić stabilność fotofizyczną, rozpuszczalność we krwi i biodostępność oraz wykorzystać unikatowe właściwości czynników diagnostycznych w terapiach przeciwnowotworowych, należy je poddać procesom enkapsulacji bądź ko-enkapsulacji, za pomocą strukturyzacji (modyfikacji, funkcjonalizacji).

W literaturze naukowej pojawiają się jedynie nieliczne doniesienia na temat sposobów hydrofilizacji i zwiększania biokompatybilności nieorganicznych nanokryształów, zaś temat ko-enkapsulacji cargo hybrydowego o znaczeniu teranostycznym jest jednym z największych wyzwań badawczych przemysłu farmaceutycznego. Opisane podejścia odnośnie hydrofilizacji markerów nieorganicznych opierają się głównie na inżynierii powierzchni poprzez m.in. wymianę ligandu stabilizującego nanokryształ, funkcjonalizację jego powierzchni ligandem lub grupą ligandów rozpuszczalnych w wodzie, bądź pokrycie nanocząstki polimerowym filmem o strukturze amfifilowej [29]. Jednakże, w głównej mierze techniki transferu hydrofobowych nanocząstek do roztworów wodnych posiadają kosztowną i skomplikowaną procedurę syntezy, a nieodpowiedni rozmiar i pojemność załadunkowa takiego układu jest ograniczona, co jest szczególnie istotne w terapiach przeciwnowotworowych [28-30]. Dodatkowo w/w techniki uniemożliwiają syntezę nanocząstek o funkcji teranostycznej, co możemy osiągnąć m.in. dzięki procedurze ko-enkapsulacji cargo hybrydowego w różnych typach strukturyzowanych nanoemulsji, zachowując jego stabilność chemiczną i fizyczną, chroniąc przed wodnym środowiskiem fizjologicznym, redukując toksyczność oraz poprawiając biodostępność i biodystrybucję po wprowadzeniu do krwioobiegu. A zatem, ostatni etap moich badań objął syntezę funkcjonalnych nanonośników gdzie zastosowano różne typy hybrydowego (DNA lub cytostatyki enkapsulowane z barwnikami organicznymi) i nie hybrydowego (fotouczulacze, daunorubicyna, nanokryształy domieszkowane jonami lantanowców) cargo o znaczeniu teranostycznym.

## WYNIKI BADAŃ

W ramach przedłożonej rozprawy habilitacyjnej zaprojektowałam szereg nowych nanonośników zsyntezowanych z zastosowaniem metod strukturyzacji powierzchni międzyfazowej układów nanoemulsyjnych, załadowanych związkami o zastosowaniu terapeutycznym/i lub diagnostycznym w formie farmaceutyków (cytostatyków, fotouczulaczy i DNA) oraz czynników diagnostycznych (barwników organicznych i nieorganicznych kryształów domieszkowanych jonami lantanowców). Korzystne parametry aplikacyjne zsyntezowanych układów w potencjalnych terapiach przeciwnowotworowych potwierdzają otrzymane wartości rozmiaru ( $D_H$  100-200 nm), niskiej polidispersyjności ( $PdI < 0.3$ ), odpowiedniego kształtu, wysokiego stopnia enkapsulacji ( $EE > 85\%$ ) i dużej stabilności koloidalnej.

Otrzymane układy zestawiałam w **Tabeli 1**. Wszystkie metody i procedury eksperymentalne są szczegółowo opisane w załączonych publikacjach [[H1-H9](#)].

### Metody instrumentalne

Strukturyzowane nanonośniki zostały scharakteryzowane różnymi technikami instrumentalnymi z których najważniejsze to: dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *dynamic light scattering* - DLS), wsteczne rozpraszanie światła (ang. *backscattering* BS), elektroforeza z analizą dopplerowską (ang. *laser Doppler electrophoresis*, LDE), małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *small-angle X-ray scattering*, SAXS), mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM), skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*, SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa, również prowadzona w warunkach kriogenicznych (ang. *transmission electron microscopy*, TEM i ang. *cryogenic transmission electron microscopy*, cryo-TEM), spektrofotometria UV-Vis, spektrofluorymetria, konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (ang. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM), mikroskopia fluorescencyjna z całkowitym wewnętrznym odbiciem (ang. *total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM)

**Tabela.1.** Zestawienie wszystkich zaprojektowanych nanoosińników będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej.

Artykuł	Typ strukturyzacji nanoemulsji	Surfaktanty	Czynnik diagnostyczny	Czynnik terapeutyczny	Obrazowanie	D <sub>H</sub> (nm)	ζ (mV)	Potencjalne zastosowanie
H1	Templaty do otulania	Kationowe i anionowe dwugłowe "dicephalic"	-		Cryo-TEM	74-96	±43	Terapie transdermalne, ludzkie fibroblasty (HGF) i keratynocyty (HaCaT)
H2	Otulanie (LbL)	Kationowe bliźniacze "gemini"	Cyjanina IR-780	DNA	SEM, AFM, CLSM, TIRFM	110-116	+42	Nowotwór płuca (A549), piersi (MCF-7/WT), czerniaka (MEWO), terapia genowa
H3	Nanostrącanie+otulanie	Kationowe dwugłowe "dicephalic"	Kryształy up-konwertujące	-	TEM, fluorescencja	114-147	Od +40 do +55	Nowotwór jajnika (komórki SKOV-3), markery NIR
H4	Nanostrącanie+otulanie	Anionowe dwugłowe "dicephalic"	Fotocuczulacze VP i TPP		TEM, AFM	132-170	Od +37 do +44	Terapia przeciwnowotworowa, w tym PDT
H5	Podwójna emulsyfikacja	Kationowe dwułańcuchowe + niejonowe komercyjne	Thiazol Orange	DNA	TEM, AFM	151-189	Od -4 do -1	Terapia genowa, markery NIR
H6	Otulanie (LbL)	Kationowe dwugłowe "dicephalic"	Daunorubicyna		Cryo-TEM, CLSM	103-120	Od -4 do +50	Rak jelita grubego (komórki MC38), chemioterapia
H7	Podwójna emulsyfikacja	Niejonowe komercyjne	Kryształy up-konwertujące	-	TEM	155-265	Od -18 do -11	Terapia przeciwnowotworowa, markery NIR, PDT
H8	Nanostrącanie	Kationowe dwułańcuchowe	Coumarin-6	Kolchicyna	AFM, CLSM	129-197	Od +50 do +72	Nowotwór płuca (A549), piersi (MCF-7/WT), czerniaka (MEWO), chemioterapia
H9	Klastrowanie	Amfoteryczne dwułańcuchowe	Fotocuczulacze Ce6 i Mn		Cryo-TEM, CLSM	130-162	Od -34 do -55	Nowotwór skóry - czerniak (komórki MEWO i Me45)

Do oceny aspektów biologicznych enkapsulowanego cargo zastosowano oznaczanie żywotności komórek metodą kolorymetryczną MTT, pomiary aktywności hemolitycznej, cytometrię przepływową z sortowaniem komórek (ang. *fluorescence activating cell sorting*, FACS) oraz mikroskopię CLSM.

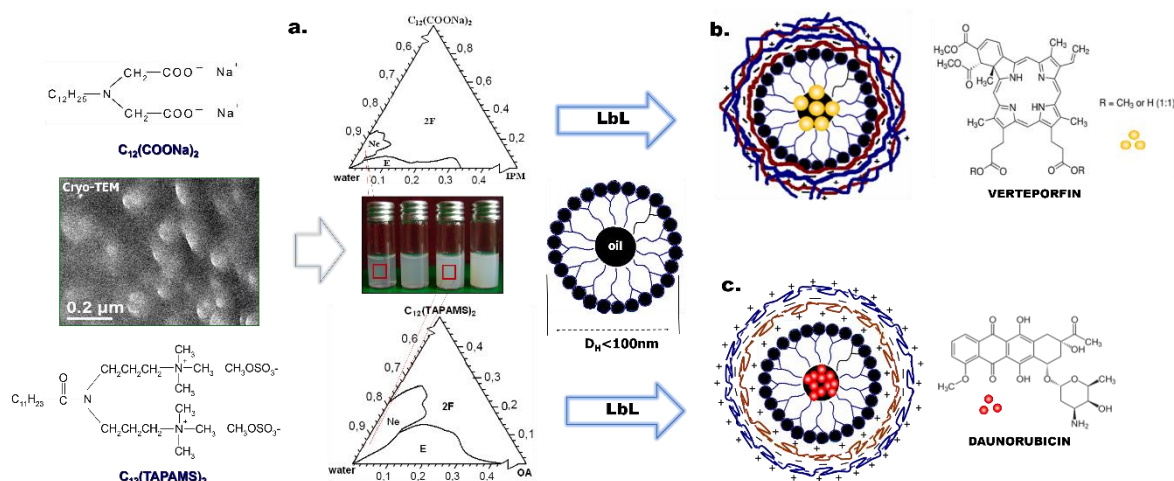
## **Opracowanie i charakterystyka nanonośników za pomocą metod strukturyzacji układów nanoemulsyjnych**

### **I. Otulanie [H1, H2, H3, H4, H6]**

Pierwszą grupę strukturyzowanych nanoemulsji opracowałam z wykorzystaniem techniki otulania, czyli syntezy transkrypcyjnej wykorzystującej proces adsorpcji następczej anionowych i kationowych polielektrolitów (PE) na jonowych rdzeniach – stałych bądź ciekłych, zwaną powszechnie metodą warstwa po warstwie (ang. *layer-by-layer*, LbL). Metoda LbL pozwala na sterowanie rozmiarem i kontrolowanym uwalnianiem aktywnego cargo, co stanowi ogromną zaletę przy możliwościach aplikacyjnych otrzymanych układów. Metodą tą zainteresowałam się już podczas studiów doktoranckich, gdzie z powodzeniem stosowałam ją do enkapsulacji indocyjanin w potencjalnej terapii fotodynamicznej. Po uzyskaniu stopnia doktora technikę tę rozwinęłam o enkapsulację cytostatyków [H6], DNA [H2], nieorganicznych kryształów domieszkowanych jonami lantanowców [H3] oraz zastosowanie innych typów matryc (rdzeni) do procesu otulania [H1,H3,H4], które są częścią mojego osiągnięcia.

Pierwszy etap procedury otulania polegał na zaprojektowaniu i otrzymaniu stabilnych templatów nanoemulsyjnych typu olej w wodzie, o/w (tzw. ciekłych rdzeni), których składy wyznaczyłam na podstawie trójskładnikowych diagramów fazowych, sporządzonych przy zastosowaniu połączonych metod spontanicznej emulsyfikacji i sonifikacji ultradźwiękowej. Szczegółowy proces przygotowania templatów ciekłych i ocenę ich stabilności do techniki LbL został opisany w publikacjach [H1,H2,H4,H6]. Przykład diagramów trójskładnikowych otrzymanych w ramach tego etapu badawczego wraz ze schematycznym przedstawieniem zsyntezowanych nanonośników pokazałam poniżej na **Rys. 7**.

## STRUKTURYZOWANE NANOEMULSJE

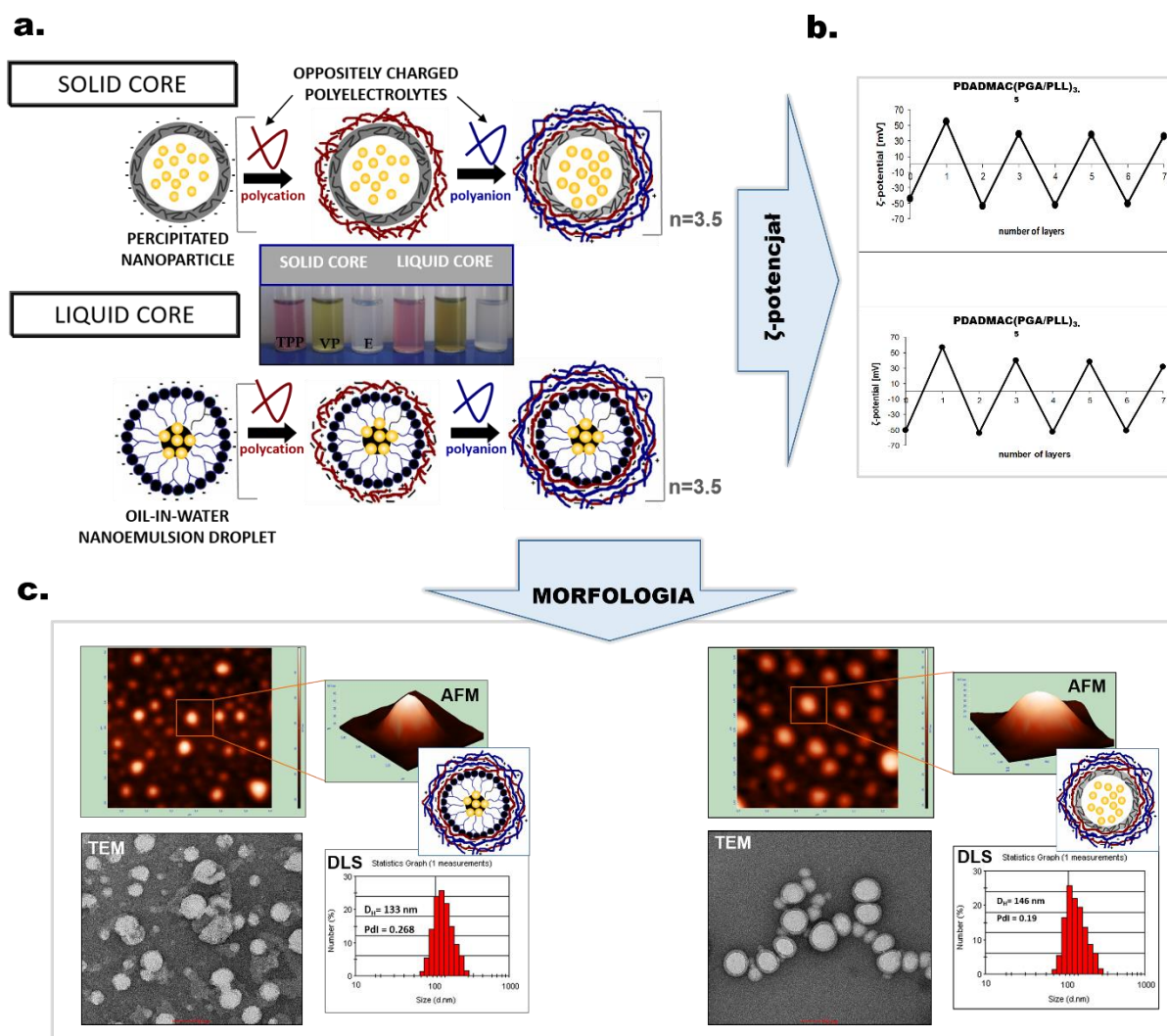


## TEMPLATY NANOEMULSYJNE

**Rys. 7.** Schematyczna idea zastosowania szablonów nanoemulsiyjnych stabilizowanych różnymi typami surfaktantów dwufunkcyjnych opisanych w publikacji [H1] do enkapsulacji werterporfiny, VP [H4] i daunorubicyny, DNR [H6] w nanokapsułach wielowarstwowych.

Innym typem szablonów do strukturyzacji powierzchni międzyfazowej za pomocą procesu LbL były tzw. rdzenie stałe, wytworzone metodami nanostrącania – nanoemulsiyfikacji połączonej z odparowaniem rozpuszczalnika opisane w pracach [H3 i H4] (**Rys. 8a**). Proces syntezy transkrypcyjnej za pomocą adsorpcji następczej PE na ciekłym lub stałym rdzeniu wykonałam za pomocą tzw. metody saturacyjnej, w której stopień pokrycia powierzchni monitorowałam pomiarami potencjału zeta ( $\zeta$ ) warstwy podwójnej **Rys. 8b**. Typowa zygzakowata zmiana potencjału  $\zeta$  jest dowodem na tworzenie stabilnej wielowarstwy struktury nanokapsuły, niezależnie od typu zastosowanego rdzenia. Szablony, które zastosowałam były stabilizowane surfaktantami jonowymi o podwójnym ugrupowaniu hydrofilowym, tzw. dwufunkcyjne (ang. *dicapalic*) [H1, H3, H4, H6] lub bliźniaczej cząsteczce (ang. *gemini*) [H2], które jak dowiedziałam podczas moich wieloletnich badań najlepiej oddziałują z przeciwnie naładowanymi parami PE. Na potrzeby otulania zastosowałam polielektrolity standardowe: poli(4-styrenosulfonian sodu) i chlorek polidialilodimetyloamoniowy, PSS/PDADMAC, biokompatybilne: poli(L-lizyna) i kwas poli(L-glutaminowy), PLL/PGA, cukrowe: chitozan i sól sodową dekstranu (CHIT/DEX), jak również PEG-ylowane: PGA-*g*-PEG oraz DNA w ambiwalentnej funkcji czynnika terapeutycznego i polianionu. Jak dowiedziono podczas badań biologicznych typ zastosowanego PE do modyfikacji powierzchni międzyfazowej miał kluczowe znaczenie

w oddziaływaniach danego nanoosińnika z docelowymi komórkami nowotworowymi, w tym ochronne przed ewentualnym procesem opsonizacji i zbyt szybkim wychwytem nanoosińnika przez systemy makrofaqowe. Szczegółowa procedura syntetyczna jest opisana w pracach [H1, H2, H3, H4, H6].



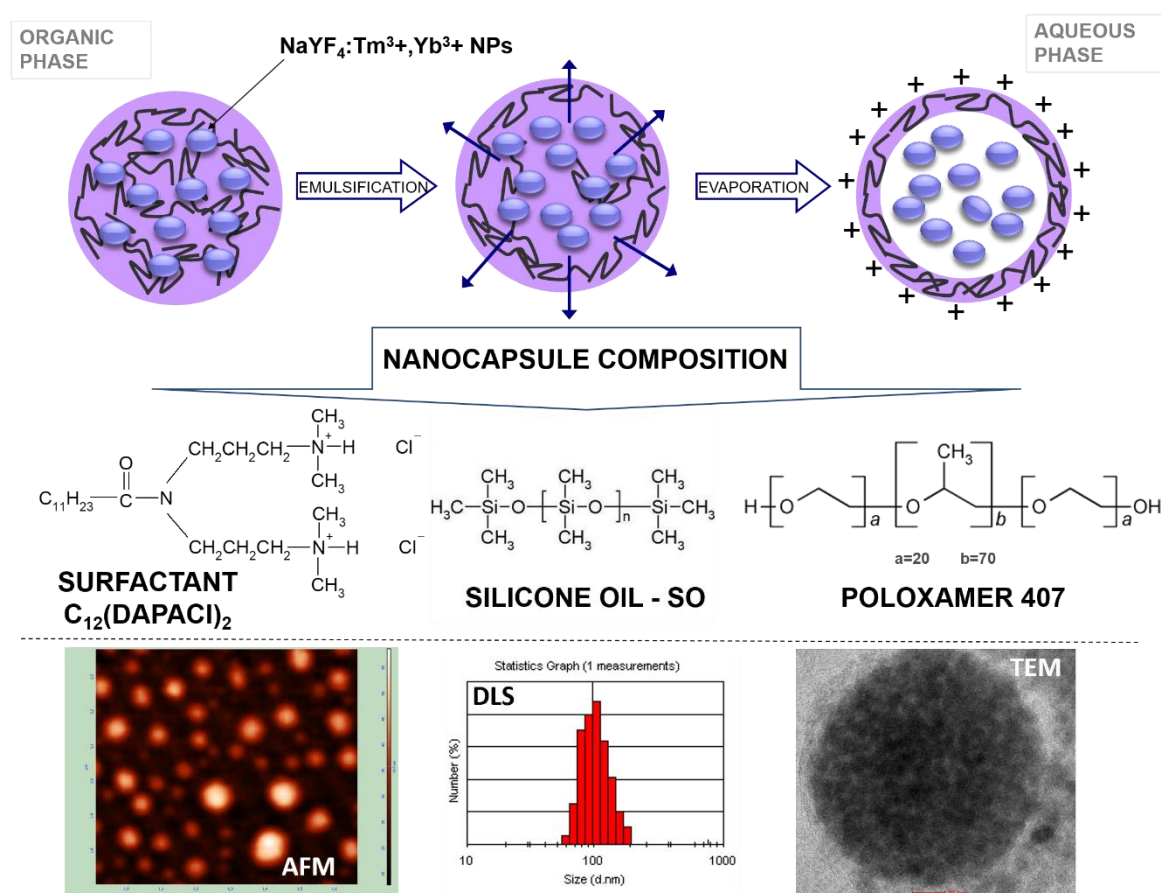
**Rys. 8.** Tworzenie nośników ze stałym lub ciekłym rdzeniem nanoemulsyjnym (a) wraz ze zmianami  $\zeta$ -potencjału nanoszonych warstw PDADMAC/PGA/PLL, dystrybucją rozmiaru ( $D_H$  i  $PdI$ ) i obrazowaniem morfologii otrzymanych układów za pomocą AFM i TEM (c). Powyższe dane pochodzą z pracy [H4].

Za pomocą otulania otrzymałam nośniki o rozmiarach od 103 do 170 nm (Tabela 1), z których do badań stabilności i odpowiedzi biologicznej *in vitro* wybrałam te o najniższym współczynniku polidispersyjności ( $PdI < 0.3$ ). Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik mikroskopowych AFM, SEM i TEM, potwierdziłam powyższy rozmiar nanoosińników otrzymany metodą DLS oraz

dowodłam, iż otrzymane struktury mają niemal sferyczny kształt i nie ulegają procesowi agregacji. Różnice w morfologii zaobserwowałam jedynie odnośnie nanoosników o różnych typach szkieletów obrazowanych za pomocą TEM. W przypadku układów zsyntezowanych na stałych rdzeniach można było dostrzec wyraźną matrycę polimerową i PE „koronę” - otoczkę niewidoczną dla tych otrzymanych na szkieletach ciekłych (**Rys. 8c**).

## II. Nanostrącanie [H3, H4, H8]

Druga grupa kontenerów obejmowała nanoosniki zsyntezowane metodą nanostrącania z wykorzystaniem technik opartych na nanoemulsyfikacji i odparowaniu rozpuszczalnika, których siłą napędową jest różnica między napięciami powierzchniowymi rozpuszczalników na granicy faz. Metoda ta polega na osadzaniu (ang. *embedding*) cargo diagnostycznego i/lub terapeutycznego jako budulcowego matryks współwytrącającego się z surfaktanem, olejem oraz polimerem w pseudofazie micelarnej (**Rys. 9**).



**Rys. 9.** Schematyczne przedstawienie procesu wytwarzania nanoosników polimerowych za pomocą techniki nanostrącania do enkapsulacji nanokryształów wykazujących konwersję energii w górę -  $\text{NaYF}_4:\text{Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$  NPs [H3].



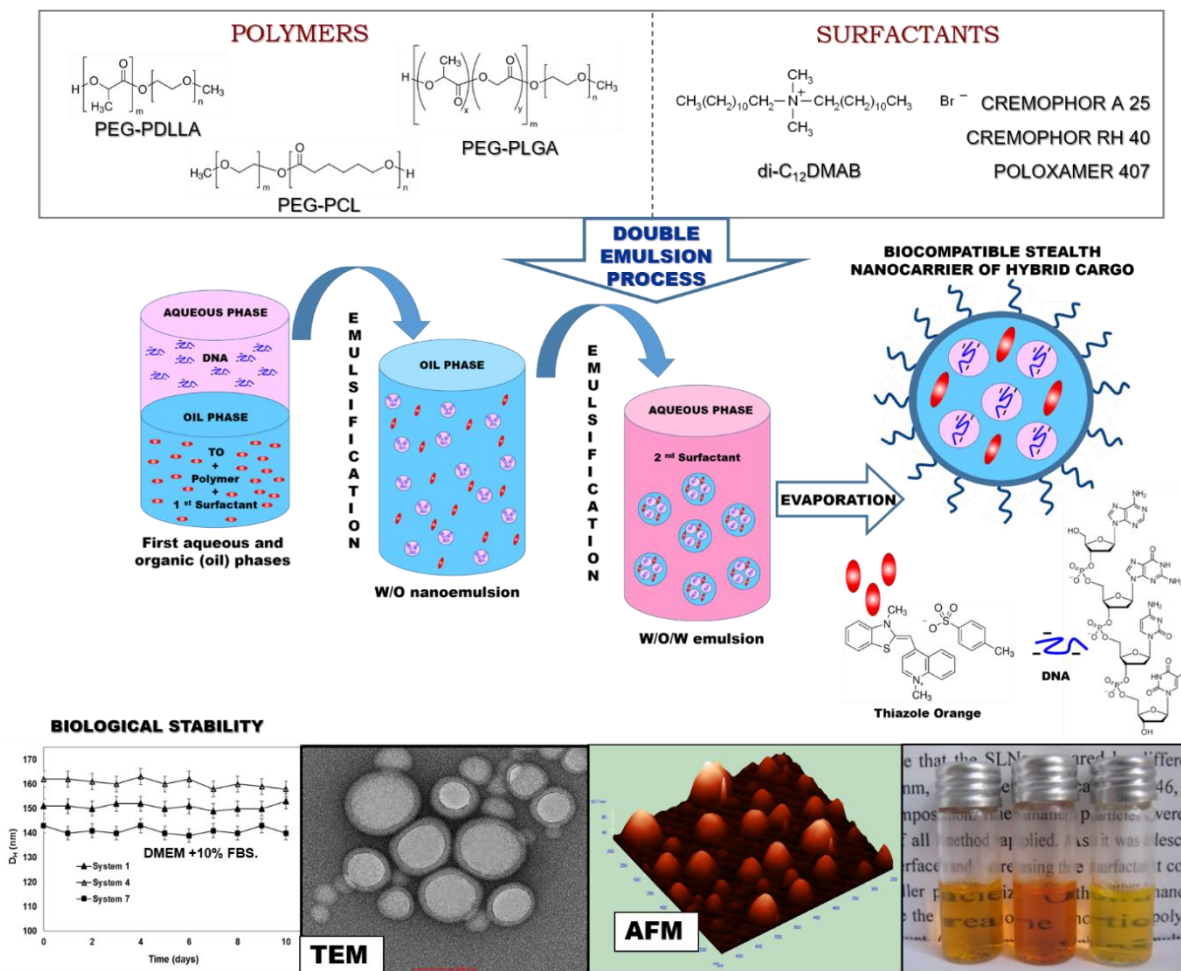
Synteza nanonośników metodą nanostrącania wymagała ode mnie zaprojektowania i skomponowania dwóch faz: wodnej (wzbogaconej przez surfaktanty specjalistyczne jako stabilizatory) oraz organicznej, która zawierała biodegradowalny polimer (Poloxamer 407 lub poli(kwas mlekowy), inaczej polilaktyd – PLA - tworzący szkielet danej nanocząstki oraz nietoksyczny olej (silikonowy lub palmowy) zawieszony w formie suspensji wraz z polimerem w rozpuszczalniku organicznym. Jako stabilizatory wybrałam surfaktanty jonowe typu „dicephalic” lub dwułańcuchowe pochodne typu diamidequatów. Szczegółowa procedura syntetyczna jest opisana w pracach [H3,H4,H8]. W przypadku dwóch typów nanonośników tj. tych użytych do enkapsulacji nanokryształów wykazujących konwersję energii w górę -  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$  oraz fotouczulaczy porfiryńowych (VP i TPP), nanoprecypitowane produkty zastosowałam jako templaty do procesu otulania LbL, opisanego powyżej, aby zwiększyć funkcjonalność i biodostępność wytworzonych układów [H3,H4]. Pozostałe nanonośniki posłużyły jako teranostyki, tj. do enkapsulacji kolchicyny - hydrofobowego cytostatiku, wspólnie z czynnikiem diagnostycznym tj. barwnikiem Coumarin-6 [H8].

Zasadnicze korzyści z syntezy nośników metodą nanostrącania polegają na możliwości wytwarzania bardzo prostą i taną metodą, bez konieczności stosowania kosztownej aparatury i dużych nakładów energii, biokompatybilnych, stabilnych i dobrze rozpuszczalnych w płynach ustrojowych układów o unimodalnych rozmiarach ok. 150 nm (**Tabela 1**), których strukturyzowaną powierzchnię międzyfazową można dodatkowo rozwijać w zależności od finalnego przeznaczenia nośnika w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych.

### III. Podwójna emulsyfikacja [H5, H7]

Trzecim etapem mojego osiągnięcia badawczego była synteza nanonośników za pomocą techniki podwójnej emulsyfikacji (ang. *double emulsion*). Zaproponowana przeze mnie metoda obejmowała dwa etapy, z których pierwszy opierał się o wytworzenie nanoemulsji pojedynczej (w naszym przypadku W/O), a następnie na rozproszeniu (poprzez homogenizację) powstałego układu dyspersyjnego w fazie zewnętrznej (w moim wypadku wodnej) i odparowaniu rozpuszczalnika na granicy emulsja/powietrze powodując usztywnienie agregatu i utwardzenie nanośnika (**Rys. 10**). Metoda ta umożliwia jednoczesną enkapsulację dwóch czynników o różnej hydrofobowości (tzw. hybrydowego cargo), co stanowi jej dużą zaletę i przewagę nad innymi typami kontenerów [H5, H7]. Jednakże, aby zapewnić stabilność powstałego układu konieczne jest użycie odpowiednich

emulgatorów o różnej hydrofobowości i dodatkowo biokompatybilnego polimeru, który zapewni również ochronę hybrydowego cargo przed środowiskiem zewnętrznym.



**Rys. 10.** Schematyczne podejście to syntezy nanoosińków teranostycznych za pomocą techniki podwójnej emulsyfikacji do ko-encapsulacji DNA i barwnika organicznego [H5].

Dlatego znaczna część badań przedstawionych w pracy [H5] objęła proces optymalizacji procedury syntezy i dobór najkorzystniejszych reagentów (typu surfaktantu i polimeru) do otrzymania stabilnych układów, które następnie zastosowałam do procesu encapsulacji DNA i barwnika organicznego (Thiazol Orange), mającego zdolność interkalacji cząsteczki kwasu nukleinowego (**Rys. 10**). Jako surfaktant o niskiej hydrofobowości, zaproponowałam dwułańcuchowy bromek didodecyldimetylo-amoniowy (di-C<sub>12</sub>DMAB), którego kationowy charakter zapewnił maksymalną zdolność wiązania cząsteczki kwasu nukleinowego, poprzez utworzenie stabilnego kompleksu di-C<sub>12</sub>DMAB-DNA oraz wzrost adsorpcji alkilowych łańcuchów hydrofobowych na powierzchni międzyfazowej nanoemulsji typu w/o. Z pośród hydrofilowych surfaktantów,

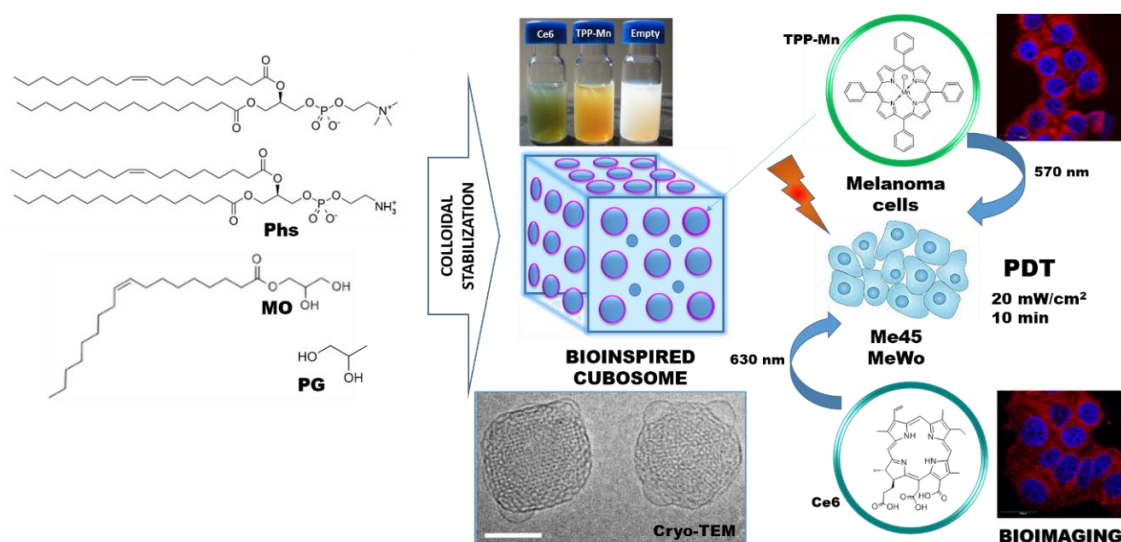
użytych do drugiego etapu najkorzystniejszy okazał się niejonowy emulgator Cremofor RH 40 (*PEG-40 hydrogenated castor oil*). W ten sposób otrzymałam stabilne układy o rozmiarze ok. 160 nm i niskiej polidispersyjności ( $PdI < 0.3$ ), których dodatkową zaletą może być funkcja ochronna przed procesem opsonizacji przez układ fagocytarny, dzięki zastosowaniu polimerów funkcjonalizowanych glikolem polietylenowym (PEG) (**Rys. 10**). Zaletę nanonośników PEG-yłowanych i enkapsulację kwasów nukleinowych bardziej szczegółowo opisałam podczas omawiania kolejnych etapów badawczych.

Druga praca z zakresu podwójnej emulsyfikacji [H7] dotyczyła enkapsulacji jednych z najnowocześniejszych nanocząstek nieorganicznych tj. nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców, w których zachodzi zjawisko tzw. konwersji energii w górę (z *ang. up-conversion*, UC). UPNCs są znakomitymi czynnikiem diagnostycznymi dzięki przesunięciu fali wzbudzenia w stronę dłuższych długości fal (ok. 980 nm), czyli w tzw. oknie terapeutycznym. Dodatkowo dzięki zastosowaniu procesu ko-enkapsulacji z fotouczulaczami, czyli załadowaniu do nośnika tzw. hybrydowych fluoroforów (planowanych w kolejnych etapach badawczych), jest możliwy transfer energii do organicznych fotosensybilizatorów (tzw. z *ang. Förster Resonance Energy Transfer* – FRET), które po wzbudzeniu pozwolą na efektywniejsze generowanie reaktywnych form tlenu, w tym tlenu singletowego ( $^1O_2$ ) - czynnika najbardziej toksycznego dla docelowych komórek nowotworowych w PDT. W ramach osiągnięcia badawczego, zastosowałam zoptymalizowaną procedurę obejmującą analogiczne podejście do tego pokazanego na **Rys. 10**, do której wybrałam niejonowe emulgatory o różnej hydrofobowości (Span 80 i Cremophor A25) oraz biokompatybilny kopolimer kwasu polimlekowego i kwasu glikolowego PLGA. Otrzymałam nanonośniki załadowane nanocząstkami  $NaYF_4:Er^{3+},Yb^{3+}$ , których efektywna enkapsulacja została potwierdzona badaniami spektroskopowymi i mikroskopowymi – odpowiednie widma i przykładowe zdjęcie TEM pokazałam na **Rys. 13**, przy okazji omawiania efektywności procesu enkapsulacji.

#### IV. Klastrowanie [H9]

Ostatnia grupa nanonośników dotyczyła zaprojektowania i opracowania metody wytwarzania nowej generacji biodegradowalnych agregatów lipidowych i fosfolipidowych samoorganizujących się w mocno upakowane dwuciągłe struktury ciekłokrystaliczne o strukturze plastra miodu, tzw. klastry (*ang. clusterring*), zwanej w literaturze strukturą kubiczną – kubosomy [H9]. Kubosomy charakteryzują się silnie rozwiniętą powierzchnią międzyfazową przy

termodynamicznej stabilności i niewielkiej lepkości oraz obecnością w fazie kubicznej zdefiniowanych hydrofilowych i hydrofobowych domen, co umożliwia efektywne enkapsulowanie w ich wnętrzu związków hybrydowych o znaczeniu terapeutycznym i diagnostycznym. Zakrzywiona dwuwarstwa lipidowa wykazuje samoorganizację w trzech wymiarach kubicznych (fazy Pn3m, Im3m i Ia3d). Dodatkowo struktura kubosomów jest zbliżona do membran biologicznych, dzięki czemu mogą się one integrować z komórkami nabłonkowymi naskórka i być z powodzeniem funkcjonalne w terapiach transdermalnych. Stąd narodził się nowatorski pomysł, aby zastosować formułację kubosomalną do zwalczania czerniaka skóry, a efekt ten wspomóc użyciem fosfolipidów, jako dodatkowych stabilizatorów o biomimetycznej budowie oraz wykorzystać te układy w PDT *in vitro* wobec ludzkich komórek MEWO i Me45 (**Rys. 11**).



**Rys 11.** Schematyczne przedstawienie badań prowadzących do wytworzenia stabilnych dwuciągłych struktur kubicznych za pomocą techniki nanoemulsyfikacji ciekłej fazy krystalicznej [H9].

Syntezę kubosomów oparłam o procedurę nanoemulsyfikacji ciekłej fazy krystalicznej (tzw. 'liquid crystalline' nanoemulsion) podgrzanej do temperatury 36° C, tj. monooleinianu glicerolu (MO), glikolu polipropylenowego (PG) i mieszaniny fosfolipidów (Lipoid S75), w wodzie za pomocą homogenizacji ultradźwiękowej. Jak dowiodły badania przedstawione w pracy [H9], przejścia fazowe spowodowane zwiększeniem temperatury i zawartości wody w układzie dorowadziły do wytworzenia odwróconych dwuciągłych faz o strukturze kubicznej typu Im3m i Pn3m (struktury te zostały potwierdzone pomiarami SAXS) oraz rozmiarach 132-160 nm, PDI <0.3 i ujemnym ζ-potencjale (**Tabela 1**). Sześcienny kształt otrzymanych formułacji został dodatkowo potwierdzony

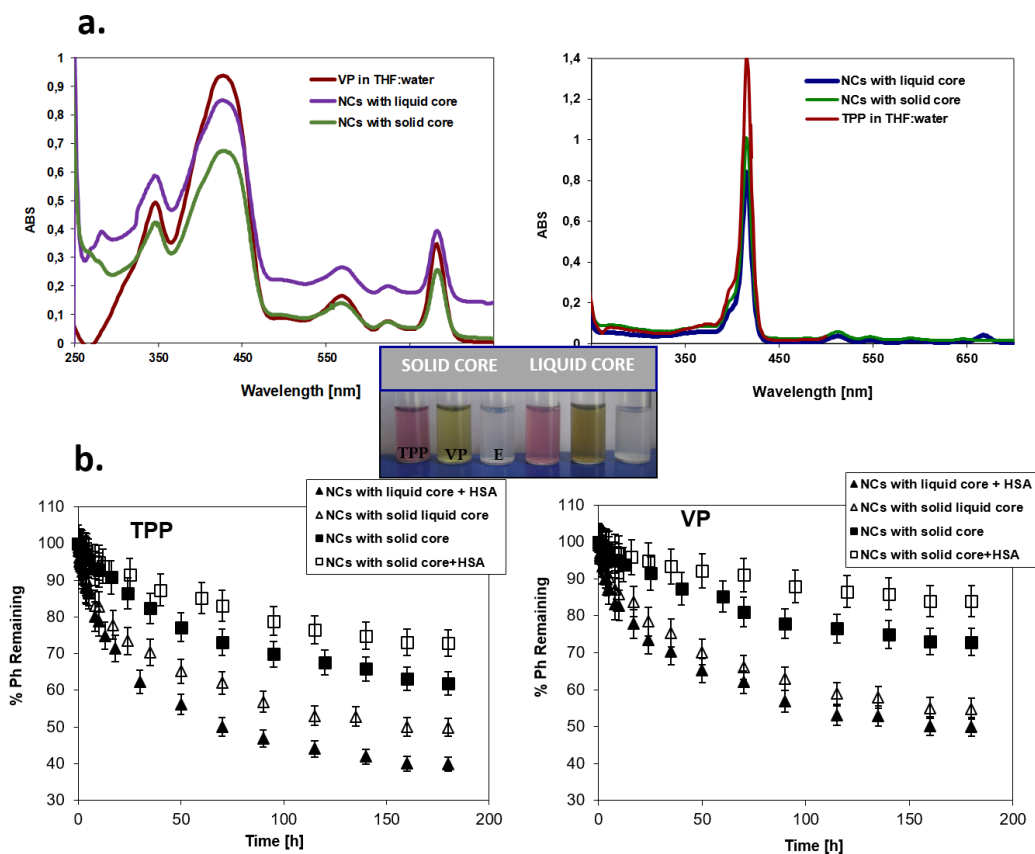
badaniami transmisyjnej mikroskopii elektronowej prowadzonej w warunkach kriogenicznych (cryo-TEM). Natomiast, nieznaczne różnice w rozmiarze i ładunku były spowodowane zmiennym dodatkiem PG, który pełnił funkcję hydrotropu (ko-surfakantu), jednakże obecność faz kubicznych pozostawała bez zmian. Parametry fizykochemiczne zostały zachowane również po przeprowadzeniu procesu enkapsulacji dwóch fotouczulaczy z grupy porfiryn (TPP-Mn) i chloryn (Ce6) oraz ich efektywnego przeznaczenia, jako czynniki diagnostyczne (bioobrazowanie) i terapeutyczne (PDT) wobec komórek czerniaka skóry (**Rys. 11**)

Obie prace z zakresu podwójnej emulsyfikacji oraz praca z zakresu klastrowania zostały wykonane w ramach grantu badawczego NCN, Sonata 8 pt. *Strukturyzowane nanoemulsje, jako funkcjonalne i biokompatybilne nanonośniki hybrydowych fluoroforów*, którego jestem kierownikiem.

**Dodatkowo na potrzeby realizacji pracy [H9] i kolejnych w toku, nawiązałam współpracę z dwoma renomowanymi ośrodkami badawczymi, tj. Uniwersytetem w Cagliari (Włochy) – grupa badawcza prof. Sergia Murgii oraz Izraelskim Instytutem Technologii (TECHNION) – grupa badawcza prof. Yeshayahu (Ishi) Talmon. Nawiązane współpracy dały mi szansę na rozwój nowej koncepcji naukowej oraz stanowiły inspirację do podjęcia badań nad przełomowymi nanonośnikami o unikatowym potencjale aplikacyjnym z zakresu zastosowania układów koloidalnych w teranostyce i nanomedycynie. Dlatego też, pracę [H9] uważam za szczególnie przełomową w kontynuowaniu przedstawionej tematyki badawczej na arenie międzynarodowej.**

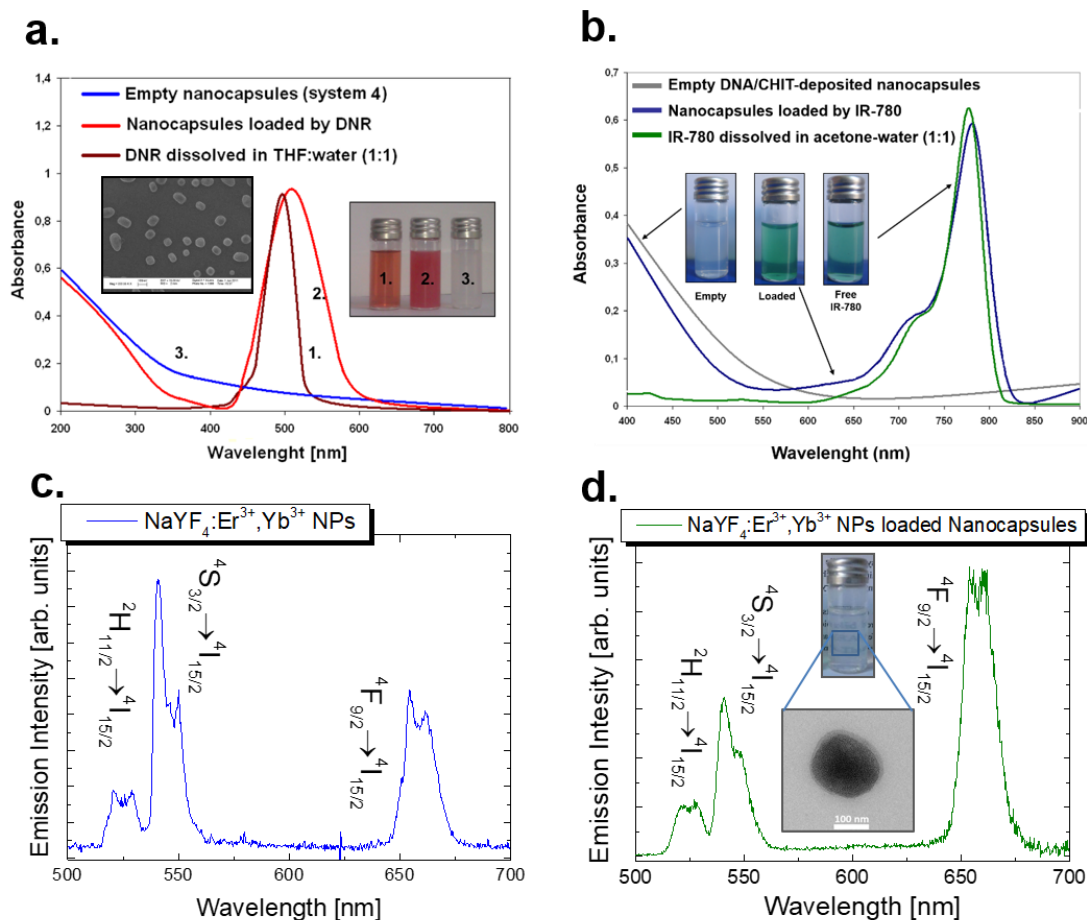
### **Enkapsułowanie, uwalnianie i fotostabilność aktywnego cargo**

Jako aktywne cargo o znaczeniu diagnostycznym zaproponowałam barwniki organiczne tj. Coumarin-6 [H8], Thiazol Orange [H6] i indocyjaninę IR-780 [H2], która jest znana również ze swoich właściwości fotouczulających. Efektywnym markerem fluorescencyjnym okazały się również enkapsułowane nieorganiczne kryształy wykazujące konwersję energii w górę [H3,H7]. Z kolei jako terapeutyki wykorzystywałam modelowy kwas deoksyrybonukelinowy (DNA) [H5] i kolchicynę [H8]. Ambiwalentną funkcję diagnostyczną i terapeutyczną (wielofunkcyjną) pełniła daunorubicyna [H6] - stosowana również jako cytostatyk oraz fotouczulacze porfiryne i chloryna (VP, TPP, MnTP, Ce6) [H4,H9]. Podsumowanie funkcji danego cargo zestawiałam w **Tabeli 1**.



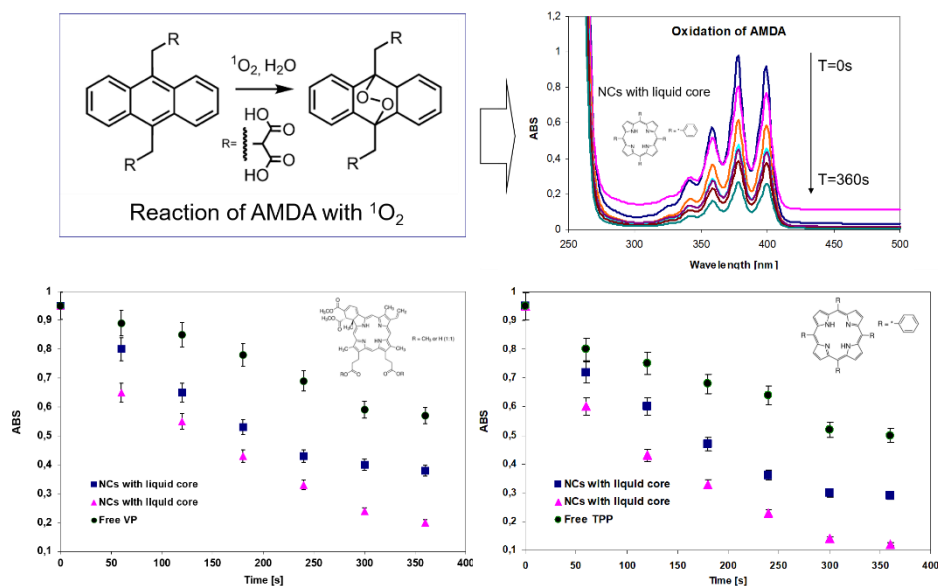
**Rys. 12.** Widma UV-Vis (a) oraz profile uwalniania wolnych i enkapsułowanych fotocuczulaczy porfiryńowych (VP i TPP) w nanoosnikach polielektrolitowych ze stałym lub ciekłym rdzeniem. Badania wykonałam na potrzeby publikacji [H4].

Stopień enkapsułowania czynników bioaktywnych wynosił ponad 85%, niezależnie od zastosowanej metody strukturyzacji, co stanowi o dużym potencjale aplikacyjnym tych układów. Dodatkowo, zaprojektowane przeze mnie nanoosniki charakteryzują się spowolnionym uwalnianiem do około 200 h od podania (przykładowe profile pochodzące z publikacji [H4] są pokazane na **Rys. 12**), co może być korzystne w znacznym ograniczeniu kosztów potencjalnej terapii, poprzez zmniejszenie liczby dawek podawanych pacjentowi. Bardzo ważnym aspektem badawczym była również ocena utrzymania właściwości fizykochemicznych (w tym optycznych) i/lub tzw. fotowrażliwości hydrofobowego cargo po podaniu go procesowi enkapsulacji/hydrofilizacji. Poniżej (**Rys. 13**) pokazałam przykładowe widma spektroskopowe załadowanych DNR, IR-780 i  $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$  NPs i w zestawieniu z ich wolną (nieenkapsułowaną) formą, z których wynika, że proces enkapsulacji zachowuje właściwości optyczne trudno rozpuszczalnych czynników diagnostycznych poddanych procesowi hydrofilizacji.



**Rys. 13.** Widma spektroskopowe cargo terapeutycznego i/lub diagnostycznego w formie wolnej i enkapsułowanej dla odpowiednio daunorubicyny, DNR (a), indocyjaniny IR-780 (b) oraz nanokryształów up-konwertujących, NaYF<sub>4</sub>:Er<sup>3+</sup>,Yb<sup>3+</sup> NPs (c i d). Wykresy pochodzą z publikacji [H2, H6, H7].

Innym dowodem na zachowanie fotowrażliwości enkapsułowanego cargo, były badania porównania efektywności generowania tlenu singletowego (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) przez wolne i enkapsulowane fotouczulacze porfirynowe (VP i TPP). W tym celu zastosowałam tzw. wygaszacz lub pułapkę <sup>1</sup>O<sub>2</sub> – związek AMDA (inaczej ABMDMA) (ang. *9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid*), który pod wpływem wygaszania przez tlen singletowy traci swoją aktywność, czyli ulega procesowi tzw. fotowycielania (ang. *photobleaching*), co skutkuje spadkiem absorpcji na widmach UV-Vis (**Rys. 14**). Przeprowadzone badania pokazane w publikacji [H4] dowiodły, że enkapsulowane fotouczulacze generują <sup>1</sup>O<sub>2</sub> o 20-45% (w zależności od typu zastosowanego rdzenia i rodzaju fotouczulacza) bardziej efektywnie, w porównaniu do formy nieenkapsulowanych fotouczulaczy (**Rys. 14**).

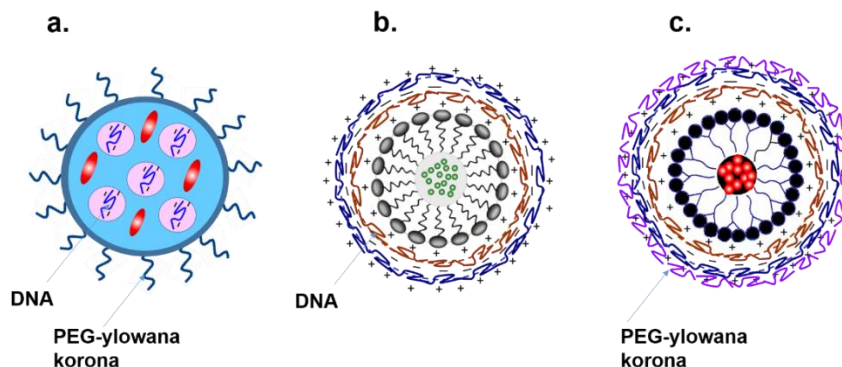


**Rys. 14.** Generowanie tlenu singletowego ( $^1O_2$ ) przez wolne i enkapsułowane fotocuczulacze porfiryne (4  $\mu$ M VP i TPP) przy zastosowaniu AMDA jako wygaszacza, absorbancja tego związku maleje wskutek postępu reakcji. Badania wykonałam na potrzeby publikacji [H5].

### Nanonośniki z DNA i funkcjonalizowane PEG-iem

Szczególnie istotnym osiągnięciem, moich badań było zaproponowanie zastosowania DNA, jako czynnika terapeutycznego ko-enkapsułowanego wspólnie z indocyjaniną IR-780 [H2] lub barwnikiem Thiazole Orange [H4], jako czynnikami diagnostycznymi. Kwas dezoksyrybonukleinowy ze względu na ujemny potencjał powierzchniowy nie może być dostarczany do komórek w postaci wolnej jako, że błona komórkowa posiada taki sam ładunek, uniemożliwiając samoistne wnikanie cząstek DNA. Dodatkowo proces enkapsulacji może zwiększyć stabilność DNA, jego stężenie oraz ochronę przed zbyt szybką degradacją przez enzymy komórkowe (DNA-zy) zwiększając tym samym ekspresję genu *in vivo*. Dlatego do tego celu zaproponowałam dwa typy strukturyzacji nanoemulsji, tj. metodę otulania, gdzie kwas nukleinowy stanowił jednocześnie funkcję polielektrolitu o ujemnym ładunku [H2] oraz metodę podwójnej emulsyfikacji, która dodatkowo pozwoliła na wytworzenie nanonośników pokrytych glikolem polietylenowym (tzw. PEG-yłowanych), czyli funkcjonalizowanych sterycznym czynnikiem typu „stealth” [H5].



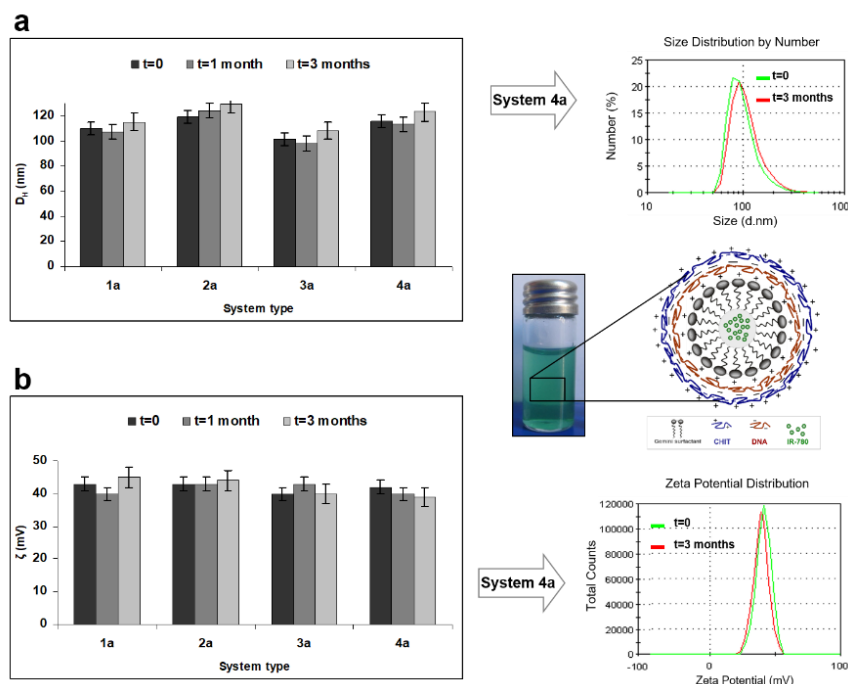


**Rys. 15.** Zestawienie nanonośników z DNA oraz PEG-yłowanych [H2, H5, H6].

Oba procesy strukturyzacji spowodowały odwrócenie ujemnego potencjału zeta na dodatni, z około  $-55$  mV na  $+42$  mV w przypadku zastosowania procesu otulania, lub niemal całkowitą neutralizację  $\zeta$ -potencjału do  $-1$  mV dla nanonośników otrzymanych za pomocą podwójnej emulsyfikacji i funkcjonalizowanych PEG-iem (**Tabela 1**). Ponadto, synteza układów z PEG-yłowaną koroną (**Rys. 15**) może stanowić dodatkową ochronę przed ewentualnym procesem opsonizacji i zbyt szybkim wychwytem nanonośnika z krwioobiegu przez systemy makrofagowe, będące częścią układu RES, co udowodniłam za pomocą badań stabilności biologicznej opisanych w pracy [H5]. Nanonośniki pokryte glikolem polietylenowym zsyntezowałam również za pomocą techniki selektywnej adsorpcji polielektrolitów cukrowych (CHIT/DEX) na rdzeniu nanoemulsyjnym, w celu enkapsulacji daunorubicyny (DNR) do potencjalnej terapii raka jelita grubego [H6]. Praca ta dowiodła ponadto, iż zastosowanie PE cukrowych, może być konkurencyjne do tych PEG-yłowanych, dzięki ochronie układu przed opsonizacją przy jednocześnie zwiększonej internalizacji przez komórki nowotworowe nanonośników otulonych przez DEX/CHIT.

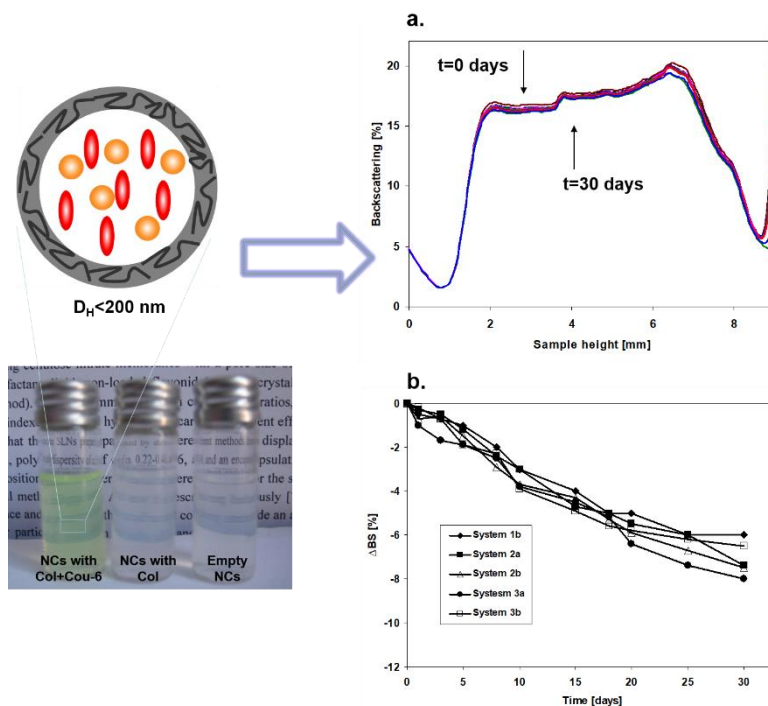
### Stabilność koloidalna

Aspekt stabilności koloidalnej należy do najważniejszych indykatorów przydatności danych nanonośników po wprowadzaniu do ustroju pacjenta *in vivo*. Dlatego też, projektując dany układ teranostyczny musiałam wziąć po uwagę dobór efektywnego surfaktantu i/lub innego związku amfifilowego (np. polimeru), nadającego wymagany ładunek na powierzchni międzyfazowej, wyrażony wartościami  $\zeta$  - potencjału zeta rzędu  $\pm 30$  mV - w przypadku układów stabilizowanych elektrostatycznie, jak również inkrustowanie powierzchni nanonośnika sterycznym np. wspomnianym powyżej, ugrupowaniem glikolu polietylenowego lub pochodnymi polilaktydu (PLA lub PLGA).



**Rys. 16.** Przykładowa ocena nanoosiłków teranostycznych (układ DNA z IR-780) za pomocą pomiarów zmian  $\zeta$  - potencjału zeta lub średnicy hydrodynamicznej ( $D_H$ ) w czasie. Badania wykonałam na potrzeby pracy [H2].

Biorąc po uwagę powyższe, we wszystkich pracach z cyklu aspekt stabilności koloidalnej odgrywał kluczowe znaczenie i był badany za pomocą zmian  $\zeta$  - potencjału lub średnicy hydrodynamicznej ( $D_H$ ) w czasie (np. 30 dni), przykładowo w pracach [H2,H4,H5,H7], jak również za pomocą pomiarów wstecznego rozproszenia światła (ang. *backscattering*, BS), czyli z zastosowaniem metody turbidymetrycznej [H1,H2,H3,H4,H5,H8,H9], które prowadziłam analogicznie przez okres minimum 30 dni przechowywania nanoosiłków w temperaturze  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Przykładowe wyniki odnośnie stabilności koloidalnej badanej za pomocą zmian  $\zeta$ -potencjału lub  $D_H$  w czasie, jak również profile BS w funkcji wysokości kolumny pomiarowej pokazałam poniżej dla różnych typów nanoteranostyków: układ DNA z barwnikiem indocyjaninowym (IR-780) praca [H2] na **Rys. 16** oraz układ z organicznym barwnikiem (Cou-6) i cytostatykiem (Col), praca [H8] na **Rys. 17**. W przypadku techniki turbidymetrycznej, brak ewolucji w profilach wstecznego rozpraszania światła, było dowodem na wysoką stabilność kinetyczną otrzymanych układów i kluczowym parametrem predestynującym dany układ do przeprowadzenia testów odpowiedzi biologicznej *in vitro* przez ludzkie i zwierzęce komórki nowotworowe oraz linie prawidłowe.



**Rys. 17.** Przykładowa ocena stabilności nanokapsuł teranostycznych (układ Col+Cou-6) przeprowadzona metodą turbidymetryczną za pomocą zmian wstecznego rozpraszania światła (ang. *Backscattering*, BS). Badania te wykonałam na potrzeby pracy [H8].

## PODSUMOWANIE (aspekty biologiczne i aplikacyjne)

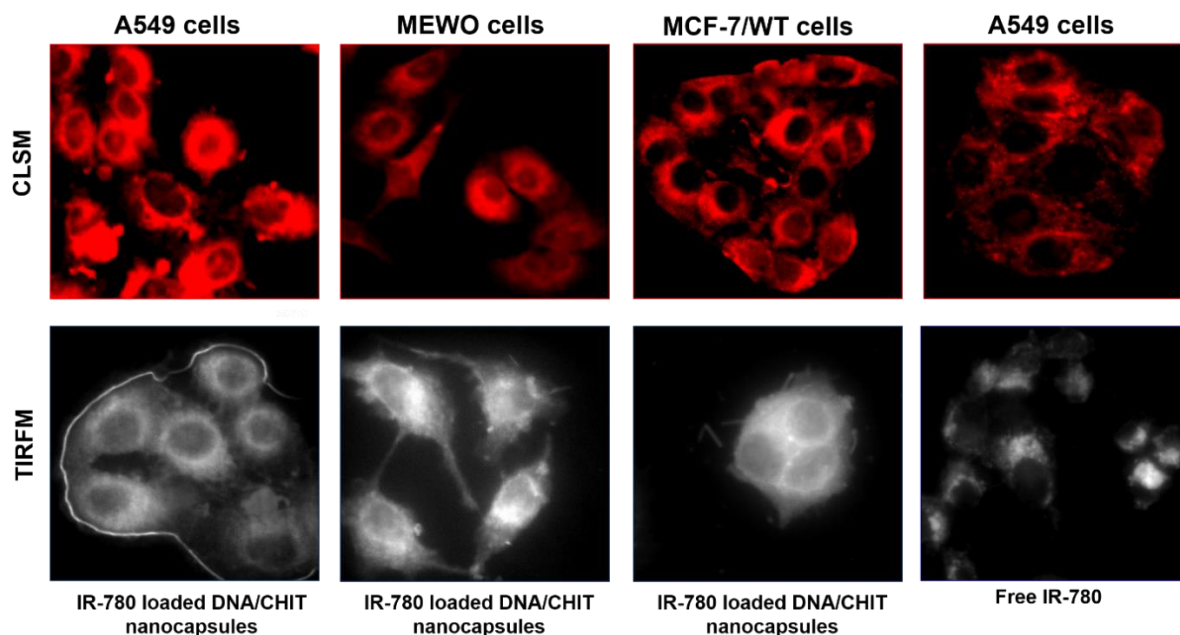
Projektując dany układ terapeutyczny i/lub diagnostyczny należy wziąć pod uwagę zarówno jego wpływ i skuteczność względem docelowych komórek nowotworowych, będących przedmiotem terapii, jak również biokompatybilność i bezpieczeństwo odnośnie komórek i tkanek prawidłowych, które trzeba ominąć.

Aby sprawdzić wpływ otrzymanych nanoproduktów względem komórek prawidłowych i nowotworowych *in vitro*, przeprowadzono testy cytotoksyczności, fotocytotoksyczności, odpowiedzi apoptotycznej, aktywności hemolitycznej i bioobrazowania przy współpracy z prof. Jolantą Saczko i dr hab. inż. Julią Kulbacką (Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu), prof. Andrzejem Gamianem i dr inż. Jadwigą Pietkiewicz (Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, we Wrocławiu), oraz dr Joanną Rossowską (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu) i dr Grzegorzem Chodaczkiem (Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej, PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii, Wrocław), których indywidualny wkład do poszczególnych prac jest zawarty w oświadczeniach Współautorów.

Część testów cytotoksyczności i badań bioobrazowania za pomocą CLSM i TIRFM, tj. przedstawionych w publikacji [H2] wykonałam osobiście, dzięki uprzejmości pani Profesor Jolanty Saczko (kierownika laboratorium hodowli komórkowej i współautorki publikacji). Realizacja tych badań była możliwa także dzięki solidnemu warsztatowi biotechnologicznemu, który zdobyłam podczas realizacji studiów doktoranckich.

Odpowiedź biologiczna na nanoproducty zaprojektowane przeze mnie za pomocą technik strukturyzacji powierzchni międzyfazowej układów nanoemulsyjnych względem badanych linii komórkowych (**Tabela 1**) wykazała, że wszystkie układy, poddane procesowi optymalizacji i wytypowane do dalszych badań *in vitro*:

- posiadają odpowiedni unimodalny rozmiar (<200 nm) i kształt, aby być efektywniej wychwytywane przez komórki nowotworowe niż te prawidłowe
- charakteryzują się wysoką stabilnością koloidalną, wysokim stopniem enkapsulacji aktywnego cargo oraz spowolnionym uwalnianiem, co znacznie podnosi efektywność biologiczną oraz obniża potencjalne koszty terapii (mniej wymaganych dawek leku)
- zapewniają efektywną hydrofilizację czynników trudno rozpuszczalnych, zwłaszcza nieorganicznych kryształów up-konwertujących, fotouczulaczy i toksycznych cytostatyków hydrofobowych
- stanowią efektywną ochronę enkapsulowanych czynników diagnostycznych i/lub terapeutycznych przez środowiskiem zewnętrznym (temperatura, pH, enzymy), zachowując przy tym ich unikalne cechy fotofizyczne tj. fotowrażliwość i właściwości optyczne
- są również w stanie niwelować niepożądane cechy fizykochemiczne tj. ujemny ładunek powierzchniowy, stanowiące przeszkodę przy internalizacji nanocząsteczek biologicznych typu kwasów nukleinowych, w tym DNA
- są biokompatybilne i nietoksyczne, ich cytotoksyczność względem komórek niepoddanych terapii utrzymuje się na poziomie ponad 70-95%
- enkapsulowane leki mają wyższy potencjał terapeutyczny (terapia fotodynamiczna, chemioterapia i terapia genowa), w porównaniu do wolnego cargo, niezwiązanego z nanonośnikiem
- nanonośniki z otoczką cukrową mogą być konkurencyjne do tych PEG-yłowanych oraz chronić aktywne cargo przed procesem opsonizacji przez makrofagi, zwiększając tym samym biodystrybucję nanoteranostyków.



**Rys. 18.** Przykładowe badania internalizacji nanoteranostyków w nowotworowych liniach komórkowych raka płuca (A549), raka piersi (MCF-7/WT) i czerniaka skóry (MEWO), przy użyciu mikroskopii konfokalnej (CLSM) i mikroskopii fluorescencyjnej z całkowitym wewnętrznym odbiciem (TIRFM). Badania te wykonałam na potrzeby pracy [H2].

Powyżej wymienione cechy dowodzą wszechstronności zaproponowanych metod strukturyzacji nanoemulsji, a ich przydatność jest dopasowana do poszczególnych właściwości enkapsulowanego czynnika, wychodząc naprzeciw tzw. medycynie spersonalizowanej. Zsyntezowane nanokontenery pełnią funkcję ochronną, hydrofilizującą, stabilizującą, konserwującą i maskującą, a zatem wielofunkcyjną, względem aktywnego (modelowego) cargo prowadząc do zwiększenia efektywności diagnostycznej (bioobrazowania komórek i tkanek nowotworowych) oraz terapeutycznej (potencjalna chemioterapia, terapia fotodynamiczna lub terapia genowa) w badaniach *in vitro*. Wyraźne efekty odpowiedzi biologicznej przeprowadzonej na prawidłowych oraz nowotworowych ludzkich i zwierzęcych liniach komórkowych stanowią obiecujący materiał do przyszłych testów *in vivo* oraz prób klinicznych. Wyniki badań zaprezentowane w przedłożonym cyklu publikacyjnym [H1-H9] wnoszą istotny wkład w interdyscyplinarny rozwój nauk chemicznych z pogranicza chemii koloidów i układów dyspersyjnych, chemii medycznej, technologii farmaceutycznej oraz nanobiotechnologii i nanomedycyny. Są również dowodem na to, iż zaproponowane nanonośniki posiadają duży potencjał aplikacyjny do zastosowania ich jako konkurencyjnych, do obecnych na rynku farmaceutycznym układów transportu leków, tj. formułacje liposomowe, micelarne lub emulsyjne, co uważam za swoje największe osiągnięcie naukowe.

**LITERATURA**

1. Y. Yang, D. Nie, Y. Liu, M. Yu, Y. Gan, *Advances in particle shape engineering for improved drug delivery. Drug Discov Today (2019) in press* DOI:10.1016/j.drudis.2018.10.006
2. S.R. D'Mello, C.N. Cruz, M.L. Chen, M. Kapoor, S. L. Lee, K.M. Tyner, *The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. Nature Nanotech.* 12 (2017) 523.
3. M. Sheikhpour, L. Barani, A. Kasaeian, *Biomimetics in drug delivery systems: a critical review. J Control Release* 253 (2017) 97.
4. L. Zhao, G. Shen, G. Ma, X. Yan, *Engineering and delivery of nanocolloids of hydrophobic drugs. Adv Colloid Interf Sci.* 249 (2017) 308.
5. Y. Su, Z. Xie, G.B. Kim, C. Dong, J. Yang, *Design strategies and applications of circulating cell-mediated drug delivery systems. ACS Biomater Sci Eng.* 1 (2015) 201.
6. Y. Matsumura, H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, Cancer Res.* 46 (1986) 6387.
7. H. Maeda, *Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. Adv Drug Deliv Rev.* 91 (2015) 3.
8. G.M. Soliman, A. Sharma, D. Maysinger, A. Kakkar, *Dendrimers and miktoarm polymers based multivalent nanocarriers for efficient and targeted drug delivery. Chem. Commun.* 47 (2011) 9572.
9. Y. Shetty, P. Prabhu, B. Prabhakar, *Emerging vistas in theranostic medicine. Int J Pharm.* 558 (2019) 29.
10. S. Parvanyan, S.M. Mostafavi, M. Aghashiri, *Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment. Sens Bio-Sensing Res.* 13 (2017) 81.
11. N. Drude, L. Tienken, F.M. Mottaghy, *Theranostic and nanotheranostic probes in nuclear medicine. Methods* 130 (2017) 14.
12. U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, *Liposomal formulations in clinical use: an updated review. Pharmaceutics* 9 (2017) 12.
13. E. T. Sarcan, M. Silindir-Gunay, A.Y. Ozer, *Theranostic polymeric nanoparticles for NIR imaging and photodynamic therapy. Int J Pharm.* 551 (2018) 329.
14. M. Beija, R. Salvayre, N. Lauth-de Viguerie, J.D. Marty, *Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. Trends Biotechnol.* 30 (2012) 485.
15. E. Busseron, Y. Ruff, E. Moulin, N. Giuseppone, *Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. Nanoscale* 5 (2013) 7098.

16. R. Zieliński, *Surfaktanty. Budowa, właściwości, zastosowanie*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań (2009).
17. T.F. Tadros, *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (2005).
18. D.J. McClements, Y. Li, *Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components*. **Adv Colloid Interface Sci.** 159 (2010) 213.
19. D.J. McClements, *Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles*. **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 17 (2012) 235.
20. A. Gupta, H.B. Eral, T.A. Hatton, P.S. Doyle, *Nanoemulsions: formation, properties and applications*. **Soft Matter** 12 (2016) 2826.
21. C. Solans, I. Sole, *Nano-emulsions: Formation by low-energy methods*. **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 17 (2012) 246.
22. Y. Singh, J. Gopal, M. Kavit, R.F. AliKhan, M. Chaurasia, N.K. Jain M.K. Chourasia, *Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery*. **J Control Release** 252 (2017) 28.
23. C. Rioufol, F. Ranchon, V. Schwiertz, N. Vantard, E. Joue, C. Gourc, N. Gauthier, M.G. Guedat, G. Salles, P.J. Souquet, B. Favier, L. Gilles, G. Freyer, B. You, V. Trillet-Lenoir, J. Guitton, *Administration of anticancer drugs: exposure in hospital nurses*. **Clin Ther.** 36 (2014) 401.
24. J. Sun, Q. Wei, Y. Zhou, J. Wang, Q. Liu, H. Xy, *A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs*. **BMC Syst Biol.** 11 (2017) 87.
25. S. Nussbaumer, P. Bonnabry J.L. Veuthey, S. Fleury-Souverain, *Analysis of anticancer drugs: A review*. **Talanta** 85 (2011) 2265.
26. N. Drude, L. Tienken, F.M. Mottaghy, *Porphyrins and related macrocycles: Combining photosensitization with radio- or optical-imaging for next generation theranostic agents*. **Methods** 130 (2017) 14.
27. A. B. Ormond, H.S. Freema, *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy*. **Materials** 6 (2013) 817.
28. J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. **Adv Drug Deliv Rev** 63 (2011) 136.
29. A. Gnach, A. Bednarkiewicz, *Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges*. **Nano Today** 7 (2012) 532.
30. L.J. Jacob, H.P. Daigner, *Chapter 10 - Nanoparticles and Nanosized Structures in Diagnostics and Therapy*. **Precision Medicine** (2018) 229.

## V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - dydaktycznych

Studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej ukończyłam w 2008 roku na kierunku biotechnologia (specjalność – biotechnologia środowiska), już podczas wykonywania pracy magisterskiej zainteresowałam się tematyką surfaktantów i układów dyspersyjnych oraz otrzymywaniem nowych formułacji farmaceutycznych i substancji biologicznie aktywnych, które można enkapsułować na poziomie nanoskopowym. Pierwszą pracę o profilu technologicznym z zakresu agregatów surfaktantowych typu mikroemulsji, opublikowałam w *Przemśle Chemicznym* (2010) [D6]. Tematykę bezpiecznych reagentów realizowałam następnie (2008-2009) w grupie badawczej prof. Mireille Montrejaud-Vignole (*Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques, ENSIACET*) w Tuluzie (Francja) w ramach stażu Leonardo da Vinci. Zapoznałam się tam z technikami spektroskopowymi i chromatograficznymi, stosowanymi w przemyśle biotechnologicznym, chemicznym i farmaceutycznym. Po powrocie ze stażu w 2009 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem profesor Kazimiery A. Wilk, które ukończyłam z wyróżnieniem w 2013 roku. Podczas doktoratu zajmowałam się badaniami nad syntezą nanokapsuł wielowarstwowych do spowolnionego uwalniania fotouczulaczy indocyjaninowych. Dopracowana przeze mnie nowa technika konstrukcji nanostruktur za pomocą selektywnej adsorpcji polielektrolitów (ang. *Layer-by-Layer, LbL*), na ciekłych rdzeniach stabilizowanych surfaktantami jonowymi, stworzyła szansę wykreowania nanokapsuł o pożądanym rozmiarach i kontrolowanym uwalnianiu aktywnego cargo, których technologię wytwarzania można przenieść na skalę aplikacyjną. Badania te zostały opisane w pięciu publikacjach z listy filadelfijskiej [D1-D5], opatentowane [P1-P3] i nagrodzone wyróżnieniami m.in. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia dla doktorantów czy Nagrodą National Science Foundation (NSF)(szczegóły zawarłam w wykazie dorobku). Podczas doktoratu odbyłam ponadto 2 staże w zagranicznych ośrodkach naukowych (Stany Zjednoczone na Northwestern University i Holandia na University of Wageningen) oraz liczne staże naukowe w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie.

**Moja praca po doktoracie** skupiła się na zastosowaniu techniki LbL do enkapsulacji związków cytostatycznych i cargo teranostycznego oraz rozwinięcia nowych metod strukturyzacji powierzchni międzyfazowej układów nanoemulsyjnych, których część jest przedmiotem niniejszej rozprawy.



Inne nanoproducty, załadowane fotouczulaczmi II generacji, które zsyntezowałam, zostały z powodzeniem poddane badaniom na miniaturowych systemach typu „Lab-on-a-chip” przez Zespół Pana Profesora Zbigniewa Brzózki (Politechnika Warszawska) w ramach grantu NCN OPU5. Jednym z najważniejszych aspektów mojej pracy po doktoracie było nawiązanie współpracy z zespołem Profesora Sergio Murgii (Uniwersytet w Cagliari i Profesora Yeshayahu (Ishi) Talmon (Izraelski Instytut Technologii, TECHNION), odnośnie projektowania i syntezy nowych formułacji farmaceutycznych o ciekłokrystalicznej strukturze kubicznej. Pierwszy staż badawczy w Laboratorium Koloidów wygrałam w ramach stypendium *The Young Investigator Training Program (YITP)* przyznanego przez *European Colloid and Interface Society (ECIS)* za wybitne osiągnięcia naukowe, a kolejne obyłam w ramach stypendium Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW). Z kolei w Instytucie TECHNION odbyłam szkolenie z zastosowania zaawansowanych technik mikroskopowych w obrazowaniu koloidów i układów dyspersyjnych, prowadzonych w warunkach kriogenicznych (Cryo-EM) w ramach *Colloidal Aspects of Nanoscience for Innovative Processes and Materials* (COST Action CM 1101). Współpraca ta, jak do tej pory zaowocowała pracą w *Journal of Colloid and Interface Sciences* [H9] i jest kontynuowana o syntezę nowych produktów funkcjonalizowanych czynnikami biologicznymi dla teranostyki. Innym ważnym etapem był staż naukowy na Uniwersytecie w Sienie (Zakład Biotechnologii Medycznej, kierowany przez prof. Gianni-ego Pozzi), zrealizowany w ramach Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW). Podczas stażu badałam zdolności adhezyjne bakterii *Lactobacillus* za pomocą pomiarów  $\zeta$ -potencjału do zastosowań teranostycznych oraz wygłosiłam wykład na zaproszenie z zakresu mojego osiągnięcia naukowego, czyli strukturyzowanych nanoemulsji. Staż ten był dla mnie również inspiracją, aby w przyszłości zająć się tematyką aplikacji moich nanonośników, jako potencjalnych adiuwantów, czyli czynników wzmacniających odpowiedź pacjenta na szczepienie m.in. przeciwko HIV i gruźlicy. Zespół Prof. Pozzi (Siena) jest szczególnie zainteresowany badaniami nad tymi układami zsyntezowanymi metodą podwójnej emulsyfikacji. W ostatnim okresie odbyłam również kilka prestiżowych szkoleń z zakresu zaawansowanych metod instrumentalnych, w tym mikroskopii elektronowej (Francja, Włochy, Izrael, Hiszpania, Niemcy), oraz zastosowania technik ilościowych w tych dziedzinach tj. obrazowanie konwencjonalne i wysokorozdzielcze (ang. *High Resolution Electron Microscopy*, HREM), holografia, tomografia, ilościowa dyfrakcja elektronowa, spektroskopia strat energii elektronów (ang. *Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS), spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. *X-ray*

*Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) oraz środowiskowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Environmental Transmission Electron Microscopy*, ETEM), pozwalająca na obserwacje *in-situ* procesów chemicznych i biochemicznych. Wiedzę zdobytą w/w zakresie chciałabym rozwijać, m.in. w ramach grantu aparaturowego na zakup nowoczesnego mikroskopu elektronowego, zdolnego do obrazowania układów dyspersyjnych i biologicznych w warunkach kriogenicznych, byłby to sprzęt unikatowy na skalę krajową.

### **Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski naukę**

Mój dorobek dydaktyczny obejmuje wykłady, seminaria i zajęcia laboratoryjne na kierunkach technologia chemiczna, chemia i biotechnologia, w obrębie których wykazałam się umiejętnościami w prowadzeniu oraz tworzeniu nowych instrukcji do ćwiczeń i wykładów (głównie nowych zagadnień z zakresu fizykochemii i technologii surfaktantów, układów dyspersyjnych oraz formulacji kosmetycznych i farmaceutycznych): *Disperse systems - physicochemistry and technology* (wykład oraz laboratorium w języku angielskim), *Bionanomaterials: BioNaM* (wykład dla doktorantów w języku angielskim), *Instrumental analysis* (laboratorium w języku angielskim), Układy dyspersyjne (wykład), Najlepsze dostępne technologie chemiczne (seminarium), Tendencje rozwoju biotechnologii (wykład), Podstawy technologii organicznej (lab.), Produkty chemiczne (lab.), Procesy chemiczne (lab.), Technologia surfaktantów (lab.), Sektorowe procesy produkcyjne (lab.), Chemia techniczna organiczna (lab.), Nanobiotechnologia (lab.), Biochemia i mikrobiologia środowiska (lab.). W ramach działalności dydaktycznej byłam opiekunem licznych projektów inżynierskich i prac magisterskich na kierunkach technologia chemiczna, chemia i biotechnologia (w tym trzech dyplomów zrealizowanych przy współpracy z przemysłem w PCC Rokita SA). Pełniłam również funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr inż. Sławomira Drozdka.

Z równie dużym zaangażowaniem uczestniczę w pracach organizacyjnych i popularyzatorskich prowadzonych na Wydziale Chemicznym PWr i poza nim (m.in. przygotowanie pokazów popularno-naukowych dla młodzieży, wykładów dla koła naukowego „ChemiTech”, w ramach projektu LabDay, Dolnośląskiego Festiwalu Nauki i Pikniku Naukowego Wrocławskiego Centrum Badań EIT+, prowadzenie sesji naukowych i recenzowanie prac badawczych w ramach kilku edycji Konferencji Naukowej Studentów). Brałam udział w organizacji 60-tego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Chemicznego (PTChem) – 17-21.09.2017 we Wrocławiu. Jestem członkinią *European Colloid and Interface Society* (ECIS), Stowarzyszenia Inżynierów Techników Przemysłu Chemicznego (SITPChem) i Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (PTBioch) oraz Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej (kadencja 2016-2020).

**PODSUMOWUJĄC**, mój dotychczasowy dorobek obejmuje **39** pozycji, w tym **28** artykułów w czasopismach z bazy JCR, których sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi **IF = 99.460 (Indeks  $h = 12$ )**. Dorobek technologiczny obejmuje ponadto **6** patentów i **2** zgłoszenia patentowe a także **46** komunikatów konferencyjnych prezentowanych na zagranicznych i krajowych kongresach naukowych. Od kilku lat jestem również recenzentką w czasopismach z listy filadelfijskiej – wykonałam łącznie **34 recenzje**. W celu nawiązania współpracy naukowej i poszerzenia wiedzy z zakresu chemii koloidów i układów dyspersyjnych oraz technologii farmaceutycznej i nanobiotechnologii, odbyłam łącznie **6** staży badawczych w renomowanych ośrodkach Zagranicznych tj. *Università degli Studi di Cagliari* (Włochy), *Northwestern University* (Stany Zjednoczone), *University of Wageningen* (Holandia), *Università degli Studi di Siena* (Włochy) i *Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques*, (Francja) i Krajowych (Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk w Krakowie). Ponadto ukończyłam kilka prestiżowych szkoleń z zakresu zastosowania zaawansowanych technik analitycznych i mikroskopowych w nanotechnologii i badaniu nanosystemów biologicznych, (m.in. finansowanych przez COST i KNOW). Aktywnie realizowałam działania na rzecz rozwoju nauki i dydaktyki (stworzyłam nowe wykłady, instrukcje do ćwiczeń w języku polskim i angielskim, zdobyłam liczne dofinansowania na rzecz wyposażenia laboratoriów badawczych) oraz propagowania wiedzy o Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Moja praca naukowa została doceniona licznymi wyróżnieniami m.in. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (dwukrotnie, tj. dla doktorantów i po doktoracie dla wybitnych młodych naukowców) oraz Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (stypendium START), Nagrodami: Rektora Politechniki Wrocławskiej, *National Science Foundation*, *European Colloid and Interface Society* (ECIS) i Stowarzyszenia na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem. Brałam udział, jako kierownik i wykonawca, w kilku projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) oraz Fundusze Europejskie. Mój grant badawczy z NCN, który aktualnie realizuję z w ramach 8 konkursu SONATA dla młodych naukowców, otrzymał pierwszą lokatę na liście rankingowej (panel ST4 - Chemia).

**Liczbowe zestawienie dorobku naukowego**

<b>Parametr naukowy</b>	<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>	<b>Łącznie</b>
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	6	22	28
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	0	3	3
Sumaryczny Impact Factor (IF) - zgodnie z rokiem opublikowania*	15.316	84.144	99.460
Liczba punktów MNiSW**	178	6370	6548
Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem autocytowań***	6	305	311
Indeks Hirscha***	2	12	12
Uzyskane patenty	2	4	6
Zgłoszenia patentowe	3	2	5
Suplementy opublikowane w materiałach konferencyjnych	4	2	6
Komunikaty niepublikowane, przedstawione na konferencjach	15	31	46
Udział w konferencjach krajowych	4	3	7
Udział w konferencjach zagranicznych	10	20	30
Wykłady na zaproszenie	0	5	5
Kierownictwo projektów badawczych	0	4	4
Udział w projektach badawczych	1	2	3
Nagrody za działalność naukową	4	5	9

\* w tym dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **32.091**

\*\* w tym dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **290**

\*\*\*według Web of Science

Urszula Bazylińska