



dr n. med. Rafał Krętowski

Autoreferat

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik Zakładu prof. dr hab. Marzanna Cechowska-Pasko

Białystok 2023

1. Imię i nazwisko.

Rafał Krętowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne.

25.09.2014r. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, stopień doktora nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna, tytuł rozprawy doktorskiej „Regulacyjna rola białka opiekuńczego *ORP150* w metabolizmie kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7.” Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. Marzanna Cechowska-Pasko.

09.06.2008r. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, studia jednolite magisterskie na kierunku Analityka Medyczna. Uzyskany tytuł zawodowy: magister analityki medycznej.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

od 01.10.2008r. do 30.06.2016r. Zakład Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku: asystent naukowo-dydaktyczny.

od 01.07.2016r. do obecnie Zakład Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku: adiunkt naukowo-dydaktyczny.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Efekty działania nanocząstek krzemionki i zredukowanego tlenku grafenu na wybrane komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie 4 oryginalnych artykułów naukowych [H-1–H-4], o sumarycznym współczynniku oddziaływania *Impact Factor* (IF) wynoszącym **22,128** i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki (MNiSW) wynoszącej **455, (520*)**. We wszystkich pracach jestem autorem korespondencyjnym.

* *punktacja MNiSW z 2021r.*

H-1 Krętowski Rafał, Kusaczuk Magdalena, Naumowicz Monika, Kotyńska Joanna, Szynaka Beata, Cechowska-Pasko Marzanna. The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomaterials*: 2017: 7, 8, E230, 22 pp.

IF = 3,504

MNiSW = 35 (100*)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, prowadzeniu hodowli komórek glejaka wielopostaciowego mózgu linii LBC3, LN-18 i fibroblastów skóry ludzkiej (CRL-1474) oraz analizie i interpretacji uzyskanych wyników badań. Przeprowadziłem analizy polegające na ocenie cytotoksyczności SiNPs na wyżej wymienionych liniach komórkowych. Ocenilem apoptozę, poziom RFT, potencjał błony mitochondrialnej, aktywność kaspazy-9 oraz ekspresję białka markerowego autofagii LC3 I/II. Wykonałem analizę mikroskopową kwaśnych organelli AVOs. Ponadto dokonałem opracowania i interpretacji wyników badań, przygotowania wszystkich rycin (z wyjątkiem rycin obrazujących zeta potencjał i DLS) oraz napisałem manuskrypt w języku angielskim. Jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział szacuję na 70%.

H-2 Krętowski Rafał, Jabłońska-Trypuć Agata, Cechowska-Pasko Marzanna. The Preliminary Study on the Proapoptotic Effect of Reduced Graphene Oxide in Breast Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*: 2021: 22, 22, 17 pp.

IF = 6,208

MNiSW = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, prowadzeniu hodowli komórek raka sutka linii MDA-MB-231, Hs 578T, T47D, MCF-7 oraz ZR-75-1. Przeprowadziłem analizy polegające na ocenie cytotoksyczności rGO na wyżej wymienionych liniach nowotworowych. Zbadałem wpływ rGO na proliferację komórek linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Ocenilem apoptozę oraz poziom RFT. Wykonałem barwienie fluorescencyjne DAPI oraz zbadałem zmiany morfologiczne komórek z wykorzystaniem barwienia fioletem krystalicznym. Ponadto dokonałem opracowania i interpretacji wyników badań, przygotowania wszystkich rycin, napisania manuskryptu w języku angielskim oraz korespondencji z edytorem. Mój udział szacuję na 80%.

H-3 Krętowski Rafał, Cechowska-Pasko Marzanna. The Reduced Graphene Oxide (rGO) Induces Apoptosis, Autophagy and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*: 2022: 23, 16, 20 pp.

IF = 6,208

MNiSW = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, prowadzeniu hodowli komórek raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1 oraz fibroblastów skóry ludzkiej (CRL-1474). Przeprowadziłem analizy polegające na ocenie cytotoksyczności rGO bez NAC oraz z udziałem NAC na liniach nowotworowych raka sutka. Ocenilem potencjał błony mitochondrialnej i cykl komórkowy. Dokonałem mikroskopowej analizy barwienia fluorochromami bromkiem etydyny i oranżem akrydyny. Ocenilem poziom ekspresji kaspazy-9 i kaspazy-3 metodą cytometrii przepływowej. Dokonałem analizy Western Blot białek markerowych świadczących o zatrzymaniu cyklu komórkowego, apoptozie oraz autofagii. Ponadto opracowałem i zinterpretowałem wyniki badań. Przygotowałem wszystkie ryciny oraz napisałem manuskrypt w języku angielskim i korespondowałem z edytorem. Mój udział szacuję na 80%.

H-4 Krętowski Rafał, Jabłońska-Trypuć Agata, Cechowska-Pasko Marzanna. The Effect of Silica Nanoparticles (SiNPs) on Cytotoxicity, Induction of Oxidative Stress and Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*: 2023: 24, 3, 14 pp.

IF = 6,208

MNiSW = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, prowadzeniu hodowli komórek raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Przeprowadziłem analizy polegające na ocenie cytotoksyczności SiNPs bez NAC oraz z udziałem NAC na liniach nowotworowych raka sutka. Ocenilem apoptozę oraz potencjał błony mitochondrialnej. Ocenilem poziom ekspresji kaspazy-9 i kaspazy-3 metodą cytometrii przepływowej. Ponadto opracowałem i zinterpretowałem wyniki badań. Przygotowałem wszystkie ryciny oraz napisałem manuskrypt w języku angielskim i korespondowałem z edytorem. Mój udział szacuję na 80%.

b) Omówienie celu badawczego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Nowotwory złośliwe stanowią szczególnie poważny problem zdrowotny i ekonomiczny w krajach rozwijających się. Na początku XX wieku zachorowalność na raka stanowiła ósmą z kolei przyczynę zgonów w populacji ludzkiej. Z kolei kilkadziesiąt lat później nowotwory stanowiły już drugą, po chorobach układu krążenia, najczęściej występującą przyczynę zgonów u ludzi (Licznarska B i in., 2012). Każdego roku szacuje się około 10 mln nowych przypadków zachorowań na nowotwory. Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization* – WHO) w 2030 roku na raka zachoruje około 22 mln ludzi, natomiast największy odsetek zachorowań będzie dotyczył krajów rozwijających się (Mattiuzzi C i in., 2019). Ponadto według Polskiego Towarzystwa Onkologicznego szacuje się, że w 2025 roku zachorowalność na choroby nowotworowe wzrośnie o około 25% w odniesieniu do danych epidemiologicznych z 2011 roku (Didkowska J i in., 2009). Umieralność spowodowaną nowotworami można zmniejszyć poprzez wdrożenie wczesnej diagnostyki oraz opracowanie innowacyjnych strategii terapeutycznych (Mattiuzzi C i in., 2019).

Komórki nowotworowe charakteryzują się występowaniem licznych mutacji, które pobudzają cykl ich namnażania. Uszkodzone komórki podlegają niekontrolowanemu podziałom, mechanizm programowanej śmierci ulega rozregulowaniu, a komórki transformowane nowotworowo osiągają nieśmiertelność. Idealną strategią terapeutyczną byłoby wybiórcze wyeliminowanie komórek nowotworowych bez wpływu na zdrowe komórki (Kelley KD i in., 2022). Innowacyjne metody leczenia, w tym rozwój nauk nanobiomedycznych, dążą do odkrycia „inteligentnego leku” na raka. Jedną z podstawowych metod leczenia chorych na nowotwory jest leczenie chirurgiczne, którego skuteczność jest zauważalna, zwłaszcza u pacjentów, u których nie miały miejsca przerzuty. Oprócz leczenia chirurgicznego często stosuje się radioterapię i chemioterapię. Obecnie ograniczenia radioterapii i chemioterapii dotyczą niskiej selektywności związanej z brakiem specyficzności wobec komórek nowotworowych oraz rozwojem zjawiska lekooporności. W celu wyeliminowania działań niepożądanych oraz podniesienia specyficzności chemioterapeutyków wobec komórek nowotworowych poszukiwane są nowe strategie badań, polegające na wdrożeniu nanocząstek do leczenia chorych na nowotwory (Senga SS i in., 2021).

Nanotoksykologia jest jedną z dynamicznie rozwijających się dziedzin nauk zajmujących się toksycznością nanomateriałów. Obejmuje ona dziedziny wiedzy dotyczące rodzaju i źródeł substancji nanotoksycznych oraz molekularnych mechanizmów ich działania w organizmie człowieka (Lewinski N i in., 2008).

Nanomateriały obejmują struktury materii, które mają jeden lub więcej zewnętrznych wymiarów w skali nano (1–100 nm). Struktury nanomateriałów mają charakter zaglomerowanych cząstek lub ich agregatów, włókien bądź rurek o budowie prostej lub zakrzywionej oraz powłok o zróżnicowanym kształcie. Nanomateriały różnią się od materiałów w skali makro właściwościami fizykochemicznymi i toksykologicznymi. Właściwości te wynikają z innego rozkładu elektronów w cząsteczce. Gęstość elektronów na powierzchni nanoobjektów jest wyższa niż w przypadku obiektów w skali makro. W związku z tym badania nad nanocząstkami prowadzone są w szerokim zakresie wielu dziedzin nauki, takich jak: elektronika, chemia, inżynieria materiałowa, biotechnologia, nanotoksykologia oraz medycyna. Nanocząstki obejmują: nanorurki węglowe, grafen (G), tlenek grafenu (GO), **zredukowany tlenek grafenu (rGO)**, **nanocząstki krzemionki (SiNPs)**, liposomy, dendrymery oraz nanocząstki magnetyczne (Almeida JP i in., 2011; Raj S i in., 2021).

Nanocząstki charakteryzują się wysokim stosunkiem powierzchni do ich objętości. Struktury te są porównywalne z rozmiarami plazmidów DNA, immunoglobulin, enzymów oraz produktów komórkowych, takich jak egzosomy. Duża powierzchnia nanocząstek pozwala na ich funkcjonalizowanie środkami farmakologicznymi stosowanymi w leczeniu oraz obrazowaniu (Nune SK i in., 2009). Czynniki, które warunkują biodystrybucję nanocząstek w organizmie żywym, to: wielkość, ładunek powierzchniowy, dyspersja i hydrofobowość. Niewielkie rozmiary oraz właściwości powierzchniowe nanocząstek wpływają na ich wchłanianie przez komórkę drogą endocytozy. Nanostruktury mniejsze niż 8 nm są szybko eliminowane z organizmu przez nerki. Natomiast większe, powyżej 30 nm, gromadzą się w komórkach. Zmiany powierzchniowe nanocząstek mogą wpływać na ich hydrodynamiczny rozmiar, ładunek elektryczny oraz reaktywność. Chociaż nanocząstki mają mały rozmiar i dużą powierzchnię, różnią się pod względem właściwości endogennych, które decydują o ich biokompatybilności (Hoshyar N i in., 2016).

Początkowo uważano, że nanocząstki są biologicznie obojętne, w późniejszym okresie zwrócono uwagę na fakt ich cytotoksycznego działania. Badania nanotoksykologiczne potwierdziły cytotoksyczne działanie nanomateriałów na komórki prawidłowe i nowotworowe. Mechanizm cytotoksycznego działania w większości przypadków polega na generowaniu reaktywnych form tlenu (RFT), prowadząc do silnego stresu oksydacyjnego (Horie M i in., 2021).

Naruszenie równowagi między procesami oksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi prowadzi do stresu oksydacyjnego. RFT zawierają w swojej cząsteczce atomy tlenu z niesparowanym elektronem, które cechują się dużą reaktywnością, prowadząc do modyfikacji chemicznych wielu makromolekuł, w tym: białek i lipidów oraz innych składników komórki. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych komórki transformowane nowotworowo charakteryzują się podwyższonym poziomem RFT. Przekroczenie granicznego stężenia RFT w komórkach nowotworowych może doprowadzić do indukcji apoptozy i/lub autofagii (Krętowski R i in., 2022; Krętowski R i in., 2023).

Z danych literaturowych wynika, że we wczesnym rozwoju komórek nowotworowych autofagia pełni rolę cytoprotekcyjną, pozwala komórkom usunąć

zagregowane białka lub przetrwać w niekorzystnych warunkach hipoksji. Autofagia indukowana stresem opisywana jest również jako śmierć komórkowa typu II, co wskazuje na dualistyczny charakter tego procesu. Apoptoza odpowiada za eliminowanie komórek nowotworowych z organizmu człowieka. Pomiędzy tymi procesami zachodzi ścisła korelacja, natomiast zrozumienie molekularnych mechanizmów działania obydwu procesów mogłoby wpłynąć na opracowanie nowych strategii terapeutycznych mających na celu zwiększenie efektywności terapii (Krętowski R i in., 2022). Ponadto mechanizm cytotoksycznego działania nanocząstek na komórki nowotworowe obejmuje wpływ na ich morfologię poprzez interakcję z błoną komórkową. Z danych literaturowych wynika, że SiNPs oraz rGO dodane do pożywki hodowlanej izolują komórki nowotworowe od środowiska zewnętrznego, a także blokują dostęp tlenu oraz transport składników odżywczych, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki (Krętowski R i in., 2017; Krętowski R i in., 2021). Oddziaływanie SiNPs i rGO z powierzchnią komórki w znacznym stopniu zależy od ich właściwości fizycznych, takich jak: wielkość, kształt oraz w przypadku rGO – obecność ostrych krawędzi (Zhang B i in., 2016; Krętowski R i in., 2017, Rahimi S i in., 2022). Wszystkie wyżej wspomniane mechanizmy toksycznego działania omawianych nanostruktur mogą indukować programowaną śmierć komórki – apoptozę i/lub autofagię (Krętowski R i in., 2017).

Unikalne właściwości fizykochemiczne nanocząstek sprawiły, że znalazły się one w obszarze zainteresowań wielu badaczy. Ze względu na niezwykle właściwości fizykochemiczne nanocząstki są przedmiotem wielu badań w celu ich wykorzystania w teranostyce jako nośnik genów, leków, w inżynierii tkankowej lub jako środki terapeutyczne do leczenia chorych na nowotwory. Pomimo postępu w naukach nanobiomedycznych mechanizm interakcji nanocząstek, w tym SiNPs oraz rGO, z żywym organizmem jest złożony i wciąż daleki do pełnego poznania oraz zrozumienia (Gehr P i in., 2018).

Właściwości fizykochemiczne SiNPs oraz rGO wynikają z ich struktury przestrzennej. SiNPs to kuliste amorficzne molekuly (Krętowski R i in., 2021), syntetyzowane w różnych kształtach i rozmiarach, a właściwości ich powierzchni można łatwo modyfikować (Chen L i in., 2018). rGO powstaje na skutek chemicznej, termicznej lub elektrochemicznej modyfikacji tlenku grafenu (GO). Charakteryzuje się on strukturą dwuwymiarową (2D) oraz składa się z pojedynczej warstwy atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 . Natomiast rGO jest strukturą pośrednią pomiędzy grafenem (G) a GO. W strukturze rGO znajduje się mała liczba grup funkcyjnych zawierających tlen. Dane eksperymentalne wskazują, że rGO zawiera około 25% tlenu w cząsteczce w porównaniu do GO (Eatemadi A i in., 2014). rGO charakteryzuje się bardzo wysoką aktywnością elektrochemiczną w porównaniu do G. rGO wykazuje szczególne właściwości fizykochemiczne: znacznie wyższą niż w innych znanych tworzywach półprzewodnikowych ruchliwością elektronów oraz wyjątkową wytrzymałością wiązań pomiędzy poszczególnymi atomami warstwy grafenowej (Eatemadi A i in., 2014; Liao C i in., 2018).

Zastosowanie nanoterapii otwiera nowe możliwości terapeutyczne w walce z nowotworami, w tym z glejakiem wielopostaciowym mózgu oraz rakiem sutka, które do tej pory wykazywały dużą oporność na standardowy schemat leczenia. Wykorzystanie SiNPs i rGO może stanowić inspirację dla firm farmaceutycznych dążących do pozyskania nowoczesnych chemio-nanoterapeutyków, skierowanych wybiórczo w celu eliminacji komórek nowotworowych.

Analizy nanotoksykologiczne prowadzone z wykorzystaniem linii komórek ludzkich

w hodowli *in vitro* stanowią obecnie kluczowy element badań przedklinicznych, ponieważ pozwalają na wykazanie właściwości badanej substancji pozaustrojowo. Ich stosowanie umożliwia eliminację badań na zwierzętach na wczesnym etapie testów.

Nanomateriały mają bardzo szerokie zastosowanie w terapii nowotworów ze względu na swoją wielofunkcyjność oraz wysoki poziom bioakumulacji.

Prezentowany cykl publikacji przedstawia kompleksowe badania prowadzone na najlepszych z nanotoksykologicznego punktu widzenia modelach biologicznych stosowanych na wstępnym etapie badań przedklinicznych *in vitro*.

Analizowane nanocząstki oraz modele badawcze wybrano uwzględniając częstotliwość występowania określonych typów nowotworów oraz ich oporność na standardowy schemat leczenia i fakt, że nadal brakuje danych literaturowych na temat stresu oksydacyjnego, apoptozy i autofagii, indukowanych przez SiNPs oraz rGO.

W związku z powyższym głównym celem osiągnięcia naukowego było zbadanie:

- 1. profilu nanotoksykologicznego rGO i SiNPs na wybranych liniach komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowej linii fibroblastów.**
- 2. efektów biologicznego działania, wybranych nanomateriałów w analizowanych liniach komórkowych, determinujących obserwowany efekt cytotoksyczny.**

Omówienie uzyskanych wyników

SiNPs są jednymi z najczęściej stosowanych nanomateriałów w różnych dziedzinach medycyny ze względu na dobrą biodystrybucję oraz internalizację komórkową (Chen L i in., 2018). Celem mojej pracy była ocena efektów komórkowych i molekularnych działania SiNPs na ludzkie komórki glejaka wielopostaciowego mózgu. Właściwości fizykochemiczne SiNPs są ważnymi czynnikami w badaniach nad ich nanotoksycznością. **Pierwszym zagadnieniem, które podjąłem podczas pracy nad osiągnięciem naukowym, było wykazanie istotnej różnicy w wartości potencjału zeta ζ i rozmiarach SiNPs w zależności od ośrodka dyspersyjnego.** Różnice te wynikają z adsorpcji białek surowicy na powierzchni SiNPs. Po kontakcie SiNPs z płynami biologicznymi (surowica i inne makrocząsteczki) następuje natychmiastowa adsorpcja białek na powierzchni SiNPs w postaci warstwy zwanej koroną białkową. Ponieważ medium hodowlane zawiera 10% FBS, warstwa ta prawdopodobnie adsorbuje się na powierzchni SiNPs. Powłoka białkowa może zmienić zachowanie SiNPs, potencjalnie modyfikując stan agregacji i odpowiedź komórkową.

Kolejnym krokiem były badania zmierzające do określenia stopnia cytotoksycznego działania, za pomocą spektrofotometrycznego testu MTT, trzech różnej wielkości SiNPs: 7 nm, 5–15 nm oraz 10–20 nm w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu linii LBC3, LN-18 oraz fibroblastach skóry ludzkiej (CRL-1474). Test MTT oparty jest na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do konwersji pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego purpurowego formazanu. Po rozpuszczeniu powstałych kryształków w HCl/izopropanolu powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie przy długości fali 565 nm. Ilość barwnego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych – do liczby aktywnych metabolicznie, żywych, komórek (Carmichael J i in., 1987; Stokłosowa S i in., 2006). Wybór wyżej wspomnianych linii komórkowych był związany z oceną wpływu SiNPs na dwa różne molekularne modele

komórek glejaka wielopostaciowego mózgu linii LBC3 i LN-18 oraz na komórki prawidłowej linii fibroblastów (CRL-1474).

Poziom cytotoksycznego działania nanocząstek zależy przede wszystkim od: kształtu i wielkości, czasu ekspozycji i stężenia, biofunkcjonalizacji, czystości chemicznej oraz metody syntezy i stopnia agregacji w medium hodowlanym (Almeida JP i in., 2011; Krętowski R i in., 2017). Komórki hodowałem we wzrastającym zakresie stężeń SiNPs od 12,5 µg/ml do 1000 µg/ml, natomiast odpowiedź komórkową zbadałem po 24 h i 48 h inkubacji. **Z przeprowadzonych badań wynika, że SiNPs, o wielkości 7 nm, 5–15 nm oraz 10–20 nm indukowały, zależną od wzrastającej dawki i czasu inkubacji, cytotoksyczność w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu, a w fibroblastach skóry ludzkiej tylko nieznacznie obniżały żywotność.** Do dalszych badań wybrałem najbardziej efektywnie działające stężenia SiNPs (50 µg/ml i 100 µg/ml) oraz ich rozmiar w przedziale od 5 do 15 nm.

Wykorzystując metodę cytometrii przepływowej, wykonałem test oparty na badaniu integralności błony komórkowej z wykorzystaniem barwienia aneksyną V-FITC/PI. **Stwierdziłem indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii LBC3, traktowanych 50 µg/ml i 100 µg/ml SiNPs, o wielkości 5-15 nm, podczas gdy w komórkach linii LN-18 obserwowałem nekrozę.** Dlatego do dalszych badań wybrałem linię LBC3 w celu zbadania mechanizmu apoptozy.

Apoptoza może być indukowana stresem oksydacyjnym, a zatem mitochondria odgrywają kluczową rolę w tym procesie, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu – RFT: anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), rodnika hydroksylowego ($HO\cdot$) oraz nadtlenku wodoru (H_2O_2). RFT uczestniczą w sygnalizacji komórkowej, metabolizmie komórkowym i homeostazie. Akumulacja RFT w komórkach nowotworowych może prowadzić do uszkodzenia białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych (Villalpando-Rodriguez GE i in., 2021). **Stwierdziłem, że SiNPs o wielkości 5–15 nm indukowały wzrost RFT, obniżały potencjał błony mitochondrialnej oraz powodowały pęcznienie i deformację błony mitochondrialnej w komórkach linii LBC3.** W związku z powyższym postanowiłem zbadać aktywność kaspazy-9 uczestniczącej w wewnątrzpochodnej drodze apoptozy. **Stwierdziłem zależną od dawki i czasu nasiloną aktywność kaspazy-9 w komórkach linii LBC3. Ponadto wykazałem wzrost ekspresji genów proapoptotycznych: *Bim, Bax, Puma* oraz *Noxa*.**

Ponieważ apoptoza może być indukowana na drodze autofagii zależnej od Atg5 (Eisenberg-Lerner i in., 2009), zbadałem ekspresję czynnościowego markera autofagii, jakim jest lipidacja białka LC3, oraz ekspresję genu *Atg5*. **Uzyskane wyniki wskazują na wzrost stosunku LC3II/LC3I oraz nasiloną ekspresję genu *Atg5* w badanych komórkach.** Charakterystyczną cechą autofagii jest tworzenie na obszarze cytoplazmy autofagolizosomów. Mikroskopową obserwację tych struktur prowadziłem w oparciu o fluorescencyjne barwienie komórek bromkiem etydydy i oranżem akrydydy (Krętowski R i in., 2017). **Wykazałem zależny od czasu i dawki SiNPs, o wielkości 5–15 nm, wzrost liczby komórek z kwaśnymi organellami pęcherzykowatymi (ang. *acidic vesicular organelles*, AVOs).** Uzyskane wyniki sugerują, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, skutecznie hamują wzrost komórek glejaka wielopostaciowego mózgu na drodze indukcji apoptozy i autofagii.

Uzyskane wyniki opisane zostały w pracy:

H-1 Krętowski R, Kusaczuk M, Naumowicz M, Kotyńska J, Szynaka B, Cechowska-Pasko M. The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomaterials (Basel)* 2017, 21; 7(8): 230.

IF = 3.504

MNiSW = 35 (*100); * punktacja MNiSW z 2021r.

W dalszym etapie badań poszerzyłem warsztat badawczy o komórki raka sutka, różnych molekularnych podtypów, MDA-MB-231 (estrogenoniezależne, ER-) oraz ZR-75-1 (estrogenozależne, ER+). Celem pracy była ocena wpływu przeciwnowotworowego i mechanizmu działania SiNPs, o wielkości 5–15 nm, w liniach komórkowych raka sutka. Do dalszych badań na komórkach raka sutka wybrałem najbardziej efektywne ich stężenie 100 µg/ml, natomiast odpowiedź komórkową zbadałem po 48 h inkubacji. **Przy pomocy testu cytotoksyczności (MTT) wykazałem, że SiNPs o wielkości 5–15 nm indukowały obniżenie żywotności komórek linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.** Stres oksydacyjny jest jednym z kluczowych mechanizmów cytotoksycznego działania SiNPs na komórki nowotworowe. Zachwianie równowagi pomiędzy syntezą RFT a zdolnościami antyoksydacyjnymi komórek określa się mianem stresu oksydacyjnego. Komórki mające styczność z RFT wytworzyły enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy obronne mające na celu ochronę integralności błon komórkowych i wnętrza komórki (Redza-Dutordoir M i in., 2016). RFT uczestniczą w licznych procesach komórkowych, m.in.: we wzroście komórek, w proliferacji, różnicowaniu, apoptozie i autofagii. Komórki nowotworowe charakteryzują się podwyższonym poziomem RFT w odniesieniu do komórek prawidłowych. Wysokie stężenie RFT jest toksyczne dla komórek. Natomiast umiarkowane stężenia RFT są dobrze tolerowane przez komórki nowotworowe, pobudzają ich podział oraz proliferację. Przekroczenie granicznego stężenia RFT w komórkach nowotworowych prowadzi do indukcji apoptozy i/lub autofagii (Krętowski R i in., 2023). Działanie wysokich stężeń RFT na komórki polega na: chemicznych modyfikacjach oraz uszkodzeniach białek (agregacja i denaturacja), lipidów (peroksydacja), węglowodanów oraz nukleotydów, zmianach na poziomie epigenetycznym, uszkodzeniach mitochondriów, a w konsekwencji prowadzi do mutacji lub silnych efektów destrukcyjnych komórki (Redza-Dutordoir M i in., 2016). Istnieją dwa mechanizmy indukcji stresu oksydacyjnego przez nanocząstki. Bezpośredni mechanizm polega na powstawaniu RFT na powierzchni nanocząstek na drodze fotokatalizy. Natomiast pośredni mechanizm jest związany z generowaniem RFT na drodze uszkodzenia mitochondriów przez nanocząstki (Horie M i in., 2021). Postanowiłem zbadać wpływ SiNPs, o wielkości 5–15 nm, na wewnątrzkomórkową produkcję RFT, peroksydację lipidów – TBARS i zawartość grup tiolowych -SH oraz stosunek GSH/GSSG w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. **W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że SiNPs 5–15 nm indukowały syntezę RFT w badanych komórkach. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na związek pomiędzy nasiloną produkcją RFT a obniżeniem poziomu grup -SH, które są ważnym markerem uszkodzeń oksydacyjnych białek pod wpływem SiNPs, o wielkości 5–15 nm. Ponadto SiNPs spowodowały nasilenie peroksydacji lipidów (TBARS) i obniżenie stosunku glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG), które również pozytywnie korelowały ze wzrostem wytwarzania RFT przez komórki MDA-MB-231 oraz ZR-75-1. Dodatkowo zaobserwowałem, że wstępne traktowanie**

komórek 5 mmol/l NAC redukowało stres oksydacyjny (obniżało wytwarzanie RFT oraz ilość TBARS, zwiększało stosunek GSH/GSSG i zawartość grup tiolowych) i, co ciekawe, obniżało cytotoksyczność wywołaną przez SiNPs, o wielkości 5–15 nm. Ponadto z przeprowadzonych badań wynika, że wzmożona synteza RFT prowadziła do nasilenia stresu oksydacyjnego, który indukował cytotoksyczność oraz apoptozę w badanych komórkach.

Zaprogramowana śmierć komórki jest jedną z najważniejszych dróg utrzymania homeostazy w warunkach podziału lub śmierci komórki (Elmore S i in., 2007). Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w walce z rakiem polega na wdrożeniu nanotechnologii do badań *in vitro*. Uzyskane wyniki sugerują, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, indukowały apoptozę w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. W aktywacji wewnątrzprochodnej ścieżki apoptozy istotną rolę odgrywają mitochondria. Podczas poszukiwania mechanizmu działania SiNPs, o wielkości 5–15 nm, na komórki MDA-MB-231 i ZR-75-1 metodą cytometrii przepływowej zbadałem potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$). Z przeprowadzonych badań wynika, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, wyraźnie redukowały $\Delta\Psi_m$, w szczególności w komórkach linii ZR-75-1. We wcześniejszych badaniach [H-1] prezentowałem wpływ SiNPs, o wielkości 5–15 nm, na zmiany w ultrastrukturze mitochondrium, a także udowodniłem, że badane nanocząstki aktywowały apoptozę w komórkach LBC3 na drodze indukcji szlaku mitochondrialnego. SiNPs powodowały otwarcie mitochondrialnych porów przejściowej przepuszczalności (*ang. permeability transition pore* – PTP) i obniżały potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) oraz indukowały produkcję RFT – i w konsekwencji prowadziły do apoptozy. W celu dodatkowego potwierdzenia, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, indukowały apoptozę, w badanych komórkach, metodą cytometrii przepływowej oceniłem ekspresję aktywnej formy kaspazy-9 oraz kaspazy-3. Stwierdziłem, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, aktywowały kaspazę-9 oraz kaspazę-3 w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.

Z przeprowadzonych badań wynika, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, powodowały indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach raka sutka. Ponadto prezentowane badania wyjaśniają możliwe mechanizmy działania SiNPs, o wielkości 5–15 nm, w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.

Uzyskane wyniki opisane zostały w pracy:

H-4 Krętowski R, Jabłońska-Trypuć A, Cechowska-Pasko M. The Effect of Silica Nanoparticles (SiNPs) on Cytotoxicity, Induction of Oxidative Stress and Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(3), 2037.

IF = 6.208

MNiSW = 140

Mechanizm cytotoksycznego działania SiNPs oraz rGO na komórki nowotworowe obejmuje wpływ na ich morfologię, poprzez interakcję z błoną komórkową (Krętowski R i in., 2017; Krętowski R i in., 2021). Z danych literaturowych wynika, że rGO dodany do pożywki hodowlanej izoluje komórki nowotworowe od środowiska zewnętrznego, blokuje dostęp tlenu oraz transport składników odżywczych, w tym glukozy i aminokwasów, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki (Jarosz A i in., 2016). Szczególny efekt wpływu

nanocząstek na komórki nowotworowe może być obserwowany w momencie zahamowania mechanizmów adaptujących te komórki do niekorzystnych warunków panujących w mikrośrodowisku (Krętowski R i in., 2021). Oddziaływanie rGO z powierzchnią komórki w znacznym stopniu zależy od ich właściwości fizycznych, takich jak: wielkość, kształt oraz w przypadku rGO – obecność ostrych krawędzi. Hydrofobowy charakter rGO powoduje wiązanie się z lipidami błon komórkowych (Jarosz A i in., 2016). Celem tych badań była ocena wpływu rGO, w warunkach *in vitro*, na: cytotoksyczność, zmiany morfologii, proliferację, stres oksydacyjny i apoptozę w liniach komórkowych raka sutka. Wykorzystując test kolorymetryczny oparty na zdolności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do przekształcenia pirogronianu do kwasu mlekowego, oceniłem cytotoksyczność na komórkach raka sutka linii: T-47D, MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 oraz Hs 578T. LDH występuje w cytoplazmie wszystkich komórek. W momencie uszkodzenia błony komórkowej przez rGO jest bardzo szybko uwalniany do pożywki hodowlanej. Pirogronian reaguje z 2,4-dinitrofenylohydrazyną. Prowadzi to do wytworzenia barwnego produktu reakcji – hydrazonu, którego maksimum absorpcji wynosi od 400 nm do 550 nm (Stokłosowa S i in., 2006). W celu dodatkowego potwierdzenia, że rGO wykazuje działanie cytotoksyczne na analizowane komórki, postanowiłem przeprowadzić eksperyment z wykorzystaniem cytometru przepływowego, polegający na ocenie integralności błony komórkowej z jodkiem propidyny (PI). Badane komórki hodowałem we wzrastającym zakresie stężeń rGO od 25 µg/ml do 300 µg/ml, a odpowiedź komórkową oceniałem po 24 h i 48 h inkubacji. **Wykazałem, że rGO powodował zależne od czasu i dawki nasilenie uwalniania LDH do medium hodowlanego komórek oraz wychwytywanie PI przez komórki linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Nie stwierdziłem istotnego statystycznie wzrostu uwalniania LDH do medium hodowlanego oraz wychwytywania PI przez komórki linii T-47D, MCF-7 oraz Hs 578T.** Do dalszych analiz wybrałem estrogenoniezależne (ER-) komórki raka sutka linii MDA-MB-231 i estrogenozależne (ER+) linii ZR-75-1 oraz rGO w stężeniu 100 µg/ml. Różna wrażliwość komórek raka sutka na działanie rGO może wynikać z różnic w ekspresji genów uczestniczących w procesie apoptozy i autofagii. Ponadto w celu walidacji wyników cytotoksyczności, przeprowadziłem test proliferacji z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. **Wykazałem zależne od czasu i dawki zahamowanie proliferacji komórek MDA-MB-231 i ZR-75-1.** Może być ono spowodowane nie tylko stresem izolacyjnym wywołanym przez rGO, ale również stresem oksydacyjnym generowanym przez długotrwałe narażenie komórek na badaną nanostrukturę. **Z przeprowadzonych badań wynika, że rGO indukował wytwarzanie RFT w sposób zależny od czasu i użytej dawki w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.** Zhang i in. wykazali, że inkubacja komórek HeLa z GO zwiększa poziom RFT, zmniejsza aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i nasila produkcję dialdehydu malonowego (Zhang B i in., 2016). Sasidharan i in. zasugerowali, że nanomateriały węglowe mogą indukować wewnątrzkomórkowe wytwarzanie RFT, a zjawisko to było związane z brakiem równowagi między mechanizmami oksydacyjnymi i przeciwutleniającymi (Sasidharan A i in., 2015). **W badaniach własnych sugeruję, że rGO indukując silny stres oksydacyjny, polegający m.in. na wzroście RFT, mógł prowadzić do apoptozy komórek raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.**

W dalszym etapie badań oceniłem wpływ rGO na poziom peroksydacji lipidów, stosunek glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG) oraz poziom grup tiolowych (-SH). Uzyskane wyniki wskazują, że rGO powodował nasilenie poziomu

peroksydacji lipidów (TBARS) i obniżenie stosunku GSH/GSSG, które również pozytywnie korelowały z obniżeniem zawartości grup tiolowych oraz ze wzrostem wytwarzania RFT w komórkach linii MDA-MB-231 oraz ZR-75-1. W związku z powyższym mogę stwierdzić, że rGO w badanych komórkach powodował uszkodzenie dwuwarstwy lipidowej i białek błonowych na drodze peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnych uszkodzeń białek.

RFT, powstające pod wpływem rGO, mogą aktywować kaskadę kaspaz i stymulować proces apoptozy (Jarosz A i in., 2016). **Wykazałem, że rGO indukuje apoptozę i nekrozę w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.** Ponadto w celu walidacji wyników cytometrycznych, oceny apoptozy i nekrozy przeprowadziłem barwienie fluorescencyjne z wykorzystaniem DAPI. **Stwierdziłem, że komórki MDA-MB-231 i ZR-75-1 wykazywały typowe zmiany występujące w morfologii komórek apoptotycznych, polegające na obkurczeniu komórki, kondensacji chromatyny jądrowej, fragmentacji jądra komórkowego oraz tworzeniu ciałek apoptotycznych.** Nekroza, obserwowana w obydwu liniach komórkowych, może wynikać z uszkodzenia błony komórkowej oraz nagłej redukcji wewnątrzkomórkowych pokładów ATP i utraty równowagi osmotycznej komórki. **Ponadto barwienie fioletem krystalicznym wykazało, że komórki inkubowane z rGO charakteryzowały się przyleganiem do błony komórkowej czarnych aglomeratów rGO.** Co ciekawe – zaobserwowałem kumulację rGO w obszarze jądra komórkowego w komórkach MDA-MB-231. Ponadto komórki inkubowane z rGO były bardziej owalne i obkurczone w porównaniu do komórek kontrolnych, inkubowanych bez rGO. Wyżej opisane zmiany morfologiczne mogą również świadczyć o zapoczątkowanym procesie apoptozy.

Podsumowując, można stwierdzić, że rGO indukował cytotoksyczność w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Ponadto w obydwu liniach komórkowych obserwowałem: aktywację stresu oksydacyjnego oraz apoptozę, obniżenie proliferacji, kondensację i marginalizację chromatyny jądrowej. Wyniki te sugerują, że rGO wykazuje działanie przeciwnowotworowe, które może być wykorzystane podczas terapii raka sutka.

Uzyskane wyniki opisane zostały w pracy:

H-2 Krętowski R, Jabłońska-Trypuć A, Cechowska-Pasko M. The Preliminary Study on the Proapoptotic Effect of Reduced Graphene Oxide in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2021, 22;22(22):12593.

IF = 6.208

MNiSW = 140

Z uwagi na fakt, iż moje poprzednie badania wykazały cytotoksyczne działanie rGO na drodze uszkodzenia błony komórkowej, w celu walidacji tych wyników przeprowadziłem badanie oceniające cytotoksyczność z wykorzystaniem testu MTT. Celem pracy było poszukiwanie molekularnego punktu działania rGO na komórki raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Badane komórki hodowałem we wzrastającym zakresie stężeń rGO od 10 µg/ml do 300 µg/ml, a odpowiedź komórkową oceniałem po 24 h i 48 h inkubacji. Do dalszych analiz wybrałem najbardziej efektywnie działające stężenie rGO, a mianowicie 100 µg/ml. **Wykazałem, że rGO powodował zależną od czasu i dawki redukcję żywotności komórek**

raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. W przeciwieństwie do linii nowotworowych fibroblasty skóry ludzkiej (CRL1474) wykazywały nieznaczne zmniejszenie żywotności po inkubacji z 300 µg/ml rGO. We wcześniejszych badaniach (H-2) wykazałem, że rGO silnie indukował wytwarzanie RFT w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałem współlistnienie cytotoksycznego działania rGO oraz nasiloną syntezę RFT w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. W celu udowodnienia cytotoksycznego działania RFT na komórki raka sutka przeprowadziłem eksperyment z 5 mmol/l NAC. Z przeprowadzonych badań wynika, że NAC nasilał żywotność w badanych komórkach inkubowanych w obecności 100 µg/ml rGO przez 24 h i 48 h. Ponadto wzrost produkcji RFT może prowadzić do uszkodzenia mitochondriów i zaburzać potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) (Krętowski R i in., 2022). Uzyskane wyniki wskazują, że rGO indukował apoptozę oraz obniżał potencjał błony mitochondrialnej w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Ze względu na obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, zmiany morfologiczne komórek apoptotycznych (barwienie bromkiem etydyny i oranżem akrydyny) sugerują, że rGO indukował apoptozę na drodze mitochondrialnej. Mechanizm apoptozy indukowany przez nanomateriały polega na obniżeniu ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 oraz nasileniu syntezy białek proapoptotycznych, takich jak Bim czy Bax (Krętowski R i in., 2022). W badaniach własnych, wykorzystując technikę Western blot z immunoidentyfikacją, oceniłem wpływ rGO na ekspresję białek uczestniczących w procesie apoptozy. Wykazałem, że rGO nasilał ekspresję białka Bax oraz obniżał ekspresję białek Bcl-xl i Bcl-2. Białko Bax jest zbudowane z domeny α -helikalnej, która uczestniczy w tworzeniu kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i zwiększa jej przepuszczalność dla cytochromu c. Kompleks Apaf-1 łączy się z cytochromem c i aktywuje kaspazę-9. Kaspaza-9 odgrywa istotną rolę w mitochondrialnej drodze apoptozy. Aktywna kaspaza-9 prowadzi do aktywacji wykonawczej kaspazy-3 (Elmore S i in., 2007). W badaniach własnych wykazałem zależny od czasu wzrost aktywnej kaspazy-9 i aktywnej kaspazy-3 oraz zwiększoną ekspresję PARP (89kDa) w komórkach linii MDA-MB-231 i ZR-75-1.

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – NF- κ B) odgrywa istotną rolę regulacji transkrypcji genów kodujących białka związane ze stanem zapalnym, proliferacją komórek oraz apoptozą (Krętowski R i in., 2022). W poprzedniej pracy (H-2) wykazałem, że rGO spowodował zależne od dawki i czasu obniżenie proliferacji komórek raka sutka. Mechanizm aktywacji czynnika NF- κ B przez RFT nie jest do końca zbadany. Zaobserwowałem, że rGO obniżał ekspresję NF- κ B P65 w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1, co korelowało z indukcją apoptozy. Może to sugerować, że rGO w stężeniu 100 µg/ml indukował apoptozę poprzez hamowanie P65 w komórkach raka sutka. W celu potwierdzenia wyników dotyczących obniżonej proliferacji komórek przez rGO wykonałem ocenę cyklu komórkowego. Analiza ta wykazała istotnie podwyższony procent komórek raka sutka wchodzących w fazę S i subG1, świadczący o apoptozie. Dodatkowo metodą Western Blot zbadałem poziom ekspresji białek: P21 i P-P53, zaangażowanych w hamowanie cyklu komórkowego. Stwierdziłem zależny od czasu wzrost ekspresji P21 w obydwu liniach komórkowych i dodatkowo nasiloną ekspresję P-P53 w komórkach linii ZR-75-1 traktowanych 100 µg/ml rGO przez 24 h i 48 h. Nasilona ekspresja P-P53 i P21 w komórkach ZR-75-1 i P21 w

komórkach linii MDA-MB-231 świadczyła o zatrzymaniu cyklu komórkowego. Wang i in. wykazali, że GO hamował cykl komórkowy w fazie S (Wang Y i in., 2020). Hashemi i in. stwierdzili, że cząsteczki GO zwiększają syntezę DNA poprzez generowanie RFT i uszkadzają DNA fibroblastów (Hashemi i E in., 2018). **Sugeruje to, że zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S mogło być związane ze wzrostem ekspresji białka P21.**

W ostatnich latach wzrosła liczba badań dotyczących apoptozy indukowanej rGO i autofagowej śmierci komórek. Apoptoza i autofagia spełniają odmienne funkcje oraz mają różne cechy morfologiczne i biochemiczne, jednak między ścieżkami sygnałowymi kontrolującymi zarówno fazy inicjacji, jak i egzekucji obu procesów zachodzą liczne interakcje. Autofagia chroni komórki przed apoptozą, ale w niektórych warunkach również może przyczyniać się do śmierci komórkowej (Xi H i in., 2022). W niniejszej pracy ocenilem wpływ rGO na ekspresję białek markerowych autofagii (Atg5, P62 oraz LC3I/II). **Z przeprowadzonych badań wynika, że rGO (100 µg/ml) nasilał poziom ekspresji Atg5 i LC3-II oraz obniżał poziom ekspresji białka P62 w komórkach MDA-MB-231 i ZR-75-1.** Uzyskane wyniki wskazują na zależność pomiędzy wzrostem ekspresji LC3-II oraz nasiloną ekspresją białka Atg5.

Przeprowadzone badania sugerują, że rGO wywoływał cytotoksyczne działanie w komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1, ale nie w fibroblastach skóry ludzkiej. Co ciekawe – zaobserwowałem współistnienie apoptozy i autofagii w badanych komórkach nowotworowych.

Uzyskane wyniki opisane zostały w pracy:

H-3 Krętowski R, Cechowska-Pasko M. The Reduced Graphene Oxide (rGO) Induces Apoptosis, Autophagy and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022, 18;23(16):9285.

IF = 6.208

MNiSW = 140

Podsumowanie i element nowatorski prac stanowiących osiągnięcie naukowe:

Przedstawiony cykl prac stanowi uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat oddziaływań SiNPs oraz rGO z komórkami nowotworowymi. Badania te przedstawiają możliwy mechanizm cytotoksycznego działania, wyżej wspomnianych nanocząstek na drodze indukcji stresu oksydacyjnego oraz aktywacji wewnątrzpochodnej drogi apoptozy i aktywacji autofagii.

Wyniki otrzymane podczas badań prowadzonych nad wyżej opisanym osiągnięciem naukowym mają nie tylko charakter poznawczy, ale również nowatorski.

Nowatorski charakter badań polegał na:

- Poszukiwaniu i identyfikacji molekularnych punktów uchwytu oraz mechanizmów działania SiNPs i rGO na komórki nowotworowe.
- Modyfikacjach molekularnych, pod wpływem działania badanych nanostruktur, zachodzących w obrębie komórek nowotworowych, pozytywnie korelując z zahamowaniem ich proliferacji.

- Wykazaniu, że SiNPs oraz rGO mogą stanowić doskonałą alternatywę jako potencjalne nanochemioterapeutyki, wybiórczo niszczące komórki nowotworowe, które do tej pory wykazywały lekooporność.
- Przedstawieniu, że SiNPs oraz rGO mogą stanowić doskonałe źródło indukujące apoptozę i autofagię w komórkach nowotworowych różnych molekularnych podtypów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że:

- Cytotoksyczność SiNPs, względem komórek glejaka wielopostaciowego mózgu, zależała od ich: wielkości, stężenia oraz czasu ekspozycji. W przeciwieństwie do komórek nowotworowych komórki prawidłowe były mniej wrażliwe na cytotoksyczne działanie SiNPs, o wielkości 5–15 nm. Badane nanocząstki wywoływały stres oksydacyjny oraz indukowały apoptozę i autofagię w komórkach LBC3, podczas gdy w komórkach linii LN-18 – nekrozę.
- SiNPs, o wielkości 5–15 nm, wykazywały cytotoksyczne działanie na komórki raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1, stymulowały w nich wzrost poziomu peroksydacji lipidów i obniżenie stosunku glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego oraz obniżały poziomu grup tiolowych, które pozytywnie korelowały ze wzrostem syntezy RFT. Stwierdzono, że SiNPs w badanych komórkach aktywowały apoptozę drogą wewnątrzpochodną. Ponadto zaobserwowano cytoprotekcyjne działanie N-acetylocysteiny, która chroniła komórki nowotworowe przed toksycznymi skutkami działania SiNPs.
- rGO wykazywał znaczną cytotoksyczność wobec komórek raka sutka linii MDA-MB-231 i ZR-75-1. Nie stwierdzono toksycznego działania badanego nanomateriału na fibroblasty skóry ludzkiej oraz inne komórki nowotworowe linii: Hs 578T, T47D, MCF-7. Wykazano hamowanie proliferacji i indukcję apoptozy oraz nekrozy komórek MDA-MB-231 i ZR-75-1 hodowanych w obecności rGO. Ponadto stwierdzono, że rGO może oddziaływać z błoną komórkową komórek raka sutka.
- N-acetylocysteina redukowała cytotoksyczne działanie rGO na komórki MDA-MB-231 i ZR-75-1. Ponadto rGO aktywował wewnątrzpochodną drogę apoptozy, nasilał autofagię i hamował cykl komórkowy. Przypuszcza się, że mechanizm przeciwnowotworowego działania rGO polegał na aktywacji apoptozy i autofagii.

Piśmiennictwo

Almeida JP, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(5):815-35. doi: 10.2217/nnm.11.79.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987;15;47(4):936-42.

Chen L, Liu J, Zhang Y, Zhang G, Kang Y, Chen A, Feng X, Shao L. The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. *Nanomedicine (Lond)*. 2018;1;13(15):1939-1962. doi: 10.2217/nmm-2018-0076.

Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku. *Krajowy rejestr Nowotworów*, 2009.

Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Abasi M, Hanifehpour Y, Joo SW. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res Lett*. 2014;13;9(1):393. doi: 10.1186/1556-276X-9-393.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009 Jul;16(7):966-75. doi: 10.1038/cdd.2009.33. 2009;27. PMID: 19325568.

Gehr P. Interaction of nanoparticles with biological systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;1;172:395-399. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.023.

Guo S, Wang E. Functional micro/nanostructures: simple synthesis and application in sensors, fuel cells, and gene delivery. *Acc Chem Res*. 2011;19;44(7):491-500. doi: 10.1021/ar200001m.

Hashemi E, Akhavan O, Shamsara M, Ansari Majd S, Sanati MH, Daliri Joupari M, Farmany A. Graphene Oxide Negatively Regulates Cell Cycle in Embryonic Fibroblast Cells. *Int J Nanomedicine*. 2020;19;15:6201-6209. doi: 10.2147/IJN.S260228.

Horie M, Tabei Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radic Res*. 2021;55(4):331-342. doi: 10.1080/10715762.2020.1859108.

Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(6):673-92. doi: 10.2217/nmm.16.5.

Jarosz A, Skoda M, Dudek I, Szukiewicz D. Oxidative Stress and Mitochondrial Activation as the Main Mechanisms Underlying Graphene Toxicity against Human Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5851035. doi: 10.1155/2016/5851035.

Kelley KD, Aronowitz P. Cancer. *Med Clin North Am*. 2022;106(3):411-422. doi: 10.1016/j.mcna.2021.12.006.

Krętowski R, Cechowska-Pasko M. The Reduced Graphene Oxide (rGO) Induces Apoptosis, Autophagy and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;18;23(16):9285. doi: 10.3390/ijms23169285.

Krętowski R, Jabłońska-Trypuć A, Cechowska-Pasko M. The Effect of Silica Nanoparticles (SiNPs) on Cytotoxicity, Induction of Oxidative Stress and Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2023;20;24(3):2037. doi: 10.3390/ijms24032037.

Krętowski R, Jabłońska-Trypuć A, Cechowska-Pasko M. The Preliminary Study on the Proapoptotic Effect of Reduced Graphene Oxide in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2021;22;22(22):12593. doi: 10.3390/ijms222212593.

Krętowski R, Kusaczuk M, Naumowicz M, Kotyńska J, Szynaka B, Cechowska-Pasko M. The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomaterials (Basel).* 2017;21;7(8):230. doi: 10.3390/nano7080230.

Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008;4(1):26-49. doi: 10.1002/smll.200700595.

Liao C, Li Y, Tjong SC. Graphene Nanomaterials: Synthesis, Biocompatibility, and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 12;19(11):3564. doi: 10.3390/ijms19113564.

Licznarska B, Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. *Biologia Molekularna dla Farmaceutów.* Poznań 2012.

Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health.* 2019;9(4):217-222. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.

Nune SK, Gunda P, Thallapally PK, Lin YY, Forrest ML, Berkland CJ. Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(11):1175-94. doi: 10.1517/17425240903229031.

Rahimi S, Chen Y, Zareian M, Pandit S, Mijakovic I. Cellular and subcellular interactions of graphene-based materials with cancerous and non-cancerous cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;189:114467. doi: 10.1016/j.addr.2022.114467.

Raj S, Khurana S, Choudhari R, Kesari KK, Kamal MA, Garg N, Ruokolainen J, Das BC, Kumar D. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2021;69:166-177. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.11.002.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(12):2977-2992. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.

Sasidharan A, Monteiro-Riviere NA. Biomedical applications of gold nanomaterials: opportunities and challenges. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015;7(6):779-96. doi: 10.1002/wnan.1341.

Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol.* 2021;11(1):200358. doi: 10.1098/rsob.200358.

Stokłosowa S. *Hodowla komórek i tkanek.* Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2006.
Villalpando-Rodriguez GE, Gibson SB. Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;14;2021:9912436. doi: 10.1155/2021/9912436.

Wang, Y.; Xu, J. Funcjonalized graphene oxide triggers cell cycle checkpoint control through both the ATM and the ATR signalling pathway. *Carbon* 2018, 129, 495–503. doi:10.1016/j.carbon.2017.12.012.

Xi H, Wang S, Wang B, Hong X, Liu X, Li M, Shen R, Dong Q. The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (Review). *Oncol Rep.* 2022;48(6):208. doi: 10.3892/or.2022.8423.

Zhang B, Wei P, Zhou Z, Wei T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Oct 1;105(Pt B):145-162. doi: 10.1016/j.addr.2016.08.009.

Zhang J, Cao HY, Wang JQ, Wu GD, Wang L. Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Exhibit Cardiotoxicity Through the Regulation of Lipid Peroxidation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;18;9:616888. doi: 10.3389/fcell.2021.616888.

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

W mojej pracy naukowej uczestniczyłem w wielu badaniach mających na celu określenie zmian molekularnych w komórkach nowotworowych wywołanych różnymi nanocząstkami. W ramach współpracy z prof. dr hab. Agnieszką Zofią Wilczewską, kierownikiem Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku, otrzymaliśmy do badań nanocząstki magnetyczne z powłoką aminosiloksanową (MNP@NH₂) oraz ich pochodne sfunkcjonalizowane kwasem foliowym (MNP@NH-FA). Nanosystemy MNP@NH₂ i MNP@NH-FA zostały zbadane pod kątem potencjalnego zastosowania w projektowaniu nowych narzędzi diagnostycznych oraz terapeutycznych raka jelita grubego w warunkach *in vitro* oraz ksenograftów. W hodowli komórek raka jelita grubego linii DLD-1 obserwowaliśmy internalizację MNP@NH-FA i MNP@NH₂ oraz ich jądrową lokalizację, a także obniżoną żywotność powiązaną z indukcją apoptozy w badanych komórkach. Obecność kwasu foliowego na powierzchni nanosystemu skutkowałą szybką eliminacją nanostruktur z organizmu myszy. Ponadto zaobserwowaliśmy: nasiloną retencję MNP@FA, redukcję masy

guza i nasiloną ekspresję aktywnej formy kaspazy-3 w mysim modelu ksenoprzeszczepu raka jelita grubego. Uzyskane wyniki pozwoliły potwierdzić wysoką aktywność przeciwnowotworową badanych nanosystemów. Efektem tych badań jest praca opublikowana w periodyku o zasięgu międzynarodowym (**załącznik 4, pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P13**).

Dodatkowo współpraca z prof. dr hab. Agnieszką Zofią Wilczewską zaowocowała otrzymaniem patentu. Przedmiotem wynalazku był sposób otrzymywania multifunkcjonalnego nanosystemu z rdzeniem z materiału magnetycznego i powłoką z polimeru. Metoda ta polegała na syntezie nanostruktury magnetycznej z materiału magnetycznego, a następnie pokryciu jej polimerem z terminalnymi grupami aminowymi, przy czym przeprowadzono funkcjonalizację wyżej wspomnianych grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem oraz solami propidyny. Zgodnie z wynalazkiem wytworzone nanostruktury magnetyczne pokryto poliaminopropylotrimetoksylanem, następnie przeprowadzono funkcjonalizację grup aminowych kwasem foliowym, dialdehydem oraz zaczepiono na powierzchni sole propidyny w wyniku reakcji z grupami aldehydowymi.

Otrzymane multifunkcjonalne nanocząstki miały dualistyczny charakter, magnetyczny oraz fluorescencyjny. Wnikały one do komórek i lokalizowały się w jądrach komórkowych. Otrzymany multifunkcjonalny nanosystem umożliwia terapię celowaną lub detekcję komórek, w szczególności tych zmienionych nowotworowo (**załącznik 4, pkt 3, ppkt 3**).

Podczas mojej pracy naukowej współpracowałem również z prof. dr hab. Beatą Kolesińską, kierownik Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. W ramach współpracy otrzymaliśmy do badań nowe pochodne 1,3,5-triazyny o potencjalnym przeciwnowotworowym mechanizmie działania. Badania były prowadzone na komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu linii LBC3, LN-18 oraz LN-229. Największą cytotoksyczną aktywność zaobserwowaliśmy w grupie 1,3,5-triazyny z trzema grupami 2-chloroetyloaminowymi (związek f12). Wykazaliśmy, że f12 indukował zależną od czasu i dawki cytotoksyczność oraz apoptozę we wszystkich trzech liniach glejaka wielopostaciowego mózgu. Sugerujemy, że związek f12 może być potencjalnym kandydatem do dalszych badań jako środek o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Efektem wyżej opisanych badań jest praca opublikowana w periodyku z listy Filadelfijskiej (**załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P19**).

Opisane powyżej osiągnięcie naukowe powstało podczas współpracy z dr hab. Agatą Jabłońską-Trypuć z Katedry Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej. Współpraca ta polegała na ocenie parametrów stresu oksydacyjnego w komórkach glejaka wielopostaciowego oraz raka sutka inkubowanych w obecności SiNPs oraz rGO (**załącznik 4, pkt I, ppkt 2, publikacja H-2 i H-4**). Ponadto razem z dr hab. Agatą Jabłońską-Trypuć badałem wpływ nowych pochodnych, kompleksów doksorubicyny (DOX) z metalami (Mg, Mn, Co, Ni, Fe, Cu, Zn) na apoptozę, cykl komórkowy, żywotność, proliferację i cytotoksyczność w komórkach raka sutka linii MCF-7. Wykazaliśmy, że wybrane kompleksy metal-DOX (Mg-DOX, Mn-DOX oraz Ni-DOX) w stężeniu 0,5 μM istotnie redukowały żywotność i hamowały proliferację, indukowały apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego oraz nasilały aktywność kaspazy-7 w komórkach linii MCF-7. Uzyskane wyniki sugerują, że doksorubicynę skompleksowaną z określonymi metalami można uznać za potencjalny lek przeciwnowotworowy, który charakteryzuje się wyższą skutecznością niż związek

macierzysty. Efektem wyżej opisanych badań jest publikacja z listy Filadelfijskiej (**załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P14**).

W kolejnym etapie badań oceniliśmy wpływ doksorubicyny na stres oksydacyjny w fibroblastach skóry ludzkiej. Wykazaliśmy, że DOX indukowała stres oksydacyjny oraz prowadziła do apoptozy w badanych komórkach. Niekorzystne działanie DOX może być zredukowane poprzez inkubację komórek z polifenolowymi związkami, np. kwasem cykoriowym (CA). Uzyskane wyniki badań dowodzą, że połączenie DOX z CA wykazywało działanie cytoprotekcyjne, hamowało apoptozę oraz redukowało oksydacyjne uszkodzenia wywołane DOX. Obecne badania wskazują, że CA może służyć jako środek chroniący komórki przed zgubnymi skutkami stresu oksydacyjnego indukowanego chemioterapeutykami. Efektem wyżej opisanych badań jest publikacja z listy Filadelfijskiej (**załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P17**).

Kolejnym nurtem badań we współpracy z dr hab. Agatą Jabłońską-Trypuć była ocena wpływu kwasu traumatynowego (TA) – na parametry stresu oksydacyjnego oraz apoptozę w komórkach raka sutka linii MCF-7. Wykazaliśmy, że TA hamował proliferację i obniżał żywotność komórek, powodował uszkodzenia oksydacyjne struktur komórkowych oraz nasilał aktywność kaspazy-7. Efektem wyżej opisanych badań jest publikacja z listy Filadelfijskiej (**załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P20**).

Kolejne badania prowadzone we współpracy z dr hab. Agatą Jabłońską-Trypuć były związane z oceną wpływu CA na możliwość eliminacji stymulującego działania pestycydów na komórki czerniaka linii A-375 oraz toksyczny wpływ herbicydów na komórki prawidłowe skóry ludzkiej – fibroblasty (CRL-1474). Wykazaliśmy, że mezotrion stymulował żywotność komórek czerniaka linii A-375, jednak połączenie dwóch badanych związków ujawniło, że preinkubacja komórek czerniaka z CA znacznie zmniejszała żywotność komórek traktowanych mezotrionem. Ponadto wykazaliśmy, że CA hamował prooksydacyjną i proapoptotyczną aktywność mezotrionu w fibroblastach. Efektem wyżej opisanych badań jest publikacja z listy Filadelfijskiej (**załącznik 4 pkt II, ppkt 4B, publikacja nr P21**).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

a) Informacje o osiągnięciach dydaktycznych

- Prowadzenie ćwiczeń z Biochemii dla studentów III roku kierunku Farmacja Apteczna, II roku kierunku Analityka Medyczna, II roku kierunku Kosmetologia oraz I roku kierunku Dietetyka.
- Opracowanie programu oraz prowadzenie zajęć fakultatywnych dla studentów V roku Analityki Medycznej pt.: „Techniki zakładania i prowadzenia hodowli komórkowych”.
- Opracowanie programu oraz prowadzenie seminariów dla studentów II roku kierunku Kosmetologia pt.: „Budowa i organizacja macierzy pozakomórkowej: kolagen”, oraz „Budowa, transport i transdukcja sygnału przez błony biologiczne”.

- Prowadzenie zajęć praktycznych pt.: „Cytometria przepływowa - możliwości zastosowania w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych” dla studentów III roku Szkoły Doktorskiej UMB.
- Pełnienie roli opiekuna naukowego doktorantki mgr Wiktorii Piskorz (II rok Szkoły Doktorskiej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku).
- Pełnienie roli promotora prac magisterskich:
 - Agnieszka Pałasz, tytuł pracy: „Wpływ bortezomibu na apoptozę komórek raka jelita grubego linii DLD-1”, 2016.
 - Luiza Chorchiel, tytuł pracy: „Wpływ nanocząstek krzemu (SiNPs) na autofagową śmierć komórek glejaka linii LBC3 i U-87MG, 2019.
 - Justyna Alicja Kapelewska, tytuł pracy: Wpływ nanocząstek krzemu (SiNPs) na migrację i inwazyjność komórek glejaka linii LBC3, 2019.
 - Justyna Pociask, tytuł pracy: „Wpływ grafenu na apoptozę komórek raka sutka linii MDA-MB-231”, 2020.
 - Małgorzata Purwin, tytuł pracy: „Wpływ grafenu na stres oksydacyjny komórek raka sutka linii MDA-MB-231”, 2020.
- Kursy podnoszące kwalifikacja dydaktyczne:
 - Kurs Pedagogiki i Dydaktyki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2010.

b) Informacje o osiągnięciach organizacyjnych

- Byłem członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w latach: 2010/2011; 2011/2012; 2012/2013; 2013/2014; 2014/2015; 2015/2016; 2016/2017.
- Razem z prof. dr. hab. Marzanną Cechowską-Pasko zorganizowaliśmy Pracownię Hodowli Komórkowych i Mikroskopii Fluorescencyjnej.

c) Udział w popularyzacji nauki

- Prowadziłem warsztaty „Metody hodowli i immunofluorescencyjnej analizy komórek nowotworowych” w ramach XV i XVI Podlaskiego Festiwalu Nauki i Sztuki, w latach 2017 i 2018.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

a) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Biologia nowotworów jest głównym nurtem prowadzonych przeze mnie badań od początku mojej pracy naukowej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Moja działalność naukowa wyraźnie wykracza poza główny nurt badań i wiąże się z zaangażowaniem w liczne współprace opisane w punkcie 5. Kooperacje pozwoliły mi rozwinąć liczne umiejętności interdyscyplinarne, które przenieśliem na płaszczyznę Zakładu Biochemii Farmaceutycznej.

Praca w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej umożliwiła mi poznanie licznych technik badawczych, m.in.: hodowli komórkowych, technik radioizotopowych, cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej oraz wielu innych służących do oceny ekspresji białek. Metody te wykorzystałem podczas wykonywania eksperymentów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Przeprowadzone badania przyczyniły się do poznania molekularnych mechanizmów promujących śmierć komórek nowotworowych w warunkach stresu oksydacyjnego i stresu siateczki śródplazmatycznej (stres ER) oraz wzbogaciły dotychczasową wiedzę na temat możliwości adaptacyjnych komórek nowotworowych do niekorzystnych warunków panujących w mikrośrodkowisku. Ponadto innowacyjne kierunki badań z wykorzystaniem nanotechnologii (SiNPs oraz rGO) mogą stanowić nowoczesną strategię terapeutyczną w nowotworach, których leczenie do tej pory stwarza duże trudności, wynikające z oporności wielolekowej lub aktywacji dróg adaptacyjnych promujących przeżycie oraz proliferację komórek nowotworowych.

W mojej działalności naukowej można wyróżnić następujące kierunki badań:
→ Ocena wpływu stresu siateczki śródplazmatycznej na wybrane linie komórkowe.

Niedobór glukozy jest czynnikiem wywołującym stres siateczki śródplazmatycznej (stres ER). W procesie tym dochodzi do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, w ER, co pobudza ekspresję genów białek opiekuńczych siateczki śródplazmatycznej. W związku z powyższym oceniono syntezę i degradację kolagenu, mechanizm obniżonej apoptozy oraz starzenia w komórkach raka sutka linii MCF-7 podczas stresu ER indukowanego niedoborem glukozy.

- W ramach prac badawczych prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wykazaliśmy, że stres ER wywołany niedoborem glukozy prowadził do upośledzenia biosyntezy kolagenu w komórkach raka sutka linii MCF-7.
- Stwierdziliśmy, że niedobór glukozy indukował syntezę białka opiekuńczego ORP150 w komórkach raka sutka linii MCF-7.
- Zaobserwowaliśmy, że białko opiekuńcze ORP150 chroniło nowo syntetyzowany kolagen przed nadmierną degradacją stymulowaną niedoborem glukozy.
- W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że w komórkach linii MCF-7 adaptujących się do stresu ER dochodziło do aktywacji szeregu procesów promujących proliferację, m.in.: indukcję ekspresji antyapoptotycznego białka opiekuńczego ORP150, nasilenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, aktywacji autofagii oraz zahamowania procesu starzenia.
- Ponadto w przeciwieństwie do komórek MCF-7, fibroblasty skóry ludzkiej ulegały starzeniu w warunkach niedoboru glukozy.

[P8] *Cechowska-Pasko M, **Krętowski R**. The effect of glucose deficiency on collagen synthesis and degradation in breast cancer MCF7 cells. *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*: 2010; 6, s. 36-41.

[P1] *Cechowska-Pasko M, **Krętowski R**, Bańkowski E. Glucose deficiency reduces collagen synthesis in breast cancer MCF7 cells. *Cell Biol Int.* 2011;35(2):141-5. doi: 10.1042/CBI20090383.

[P3] ***Krętowski R**, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Low-glucose medium induces ORP150 expression and exerts inhibitory effect on apoptosis and senescence of human breast MCF7 cells. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(2):167-73.

[P11] **Krętowski R**, Borzym-Kluczyk M, Stypułkowska A, Brańska-Januszewska J, Ostrowska H, Cechowska-Pasko M. Low glucose dependent decrease of apoptosis and induction of autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem.* 2016;417(1-2):35-47. doi: 10.1007/s11010-016-2711-4.

**Prace przed uzyskaniem stopnia doktora*

Niedobór glukozy czy hipoksja nasilają gromadzenie niesfaldowanych białek w świetle ER. Białka te ulegają retrotranslokacji do cytoplazmy, a następnie są degradowane przez proteasom 26S w szlaku ERAD. Zaburzenia w funkcjonowaniu proteasomów mają szczególne znaczenie w progresji oraz przerzutowaniu nowotworów jelita grubego. Wiadomo, że bortezomib wywołuje selektywnie apoptozę w komórkach szpiczaka, jednak mechanizm jego działania w nowotworach innych typów (rak jelita grubego, rak sutka) jest nadal nieznan. W związku z powyższym zbadano mechanizm apoptozy, indukowanej przez selektywny inhibitor proteasomów – bortezomibu, w komórkach raka jelita grubego linii DLD-1.

- W ramach realizacji kolejnego zadania badawczego prowadzonego w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wykazaliśmy, że bortezomib powodował śmierć komórek raka jelita grubego linii DLD-1 na drodze apoptozy i nekrozy.
- Stwierdziliśmy, że mechanizm cytotoksycznego działania polegał na osłabieniu głównych dróg transdukcji sygnału związanych z hamowaniem ekspresji białka opiekuńczego GRP170 oraz obniżeniem ekspresji czynnika transkrypcyjnego: HIF-1 α i NF- κ B.

[P9] **Krętowski R**, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line. *Mol Cell Biochem.* 2015;398(1-2):165-73. doi: 10.1007/s11010-014-2216-y.

Silne cytotoksyczne działanie bortezomibu na komórki DLD-1 skłoniło nas do zbadania jego wpływu na apoptozę komórek raka sutka linii MDA-MB-231 oraz fibroblastów skóry ludzkiej (CRL-1474). Badania prowadzone były również w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

- Stwierdziliśmy, że bortezomib wykazywał silne proapoptotyczne działanie wyłącznie na komórki raka sutka linii MDA-MB-231.
- Ponadto wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do komórek raka sutka fibroblasty skóry ludzkiej inkubowane w obecności bortezomibu nie ulegały apoptozie, ale wykazywały indukowany proces starzenia oraz silną ekspresję białka opiekuńczego ORP150 o działaniu antyapoptotycznym.

[P5] ***Krętowski R**, Borzym-Kluczyk M, Cechowska-Pasko M. Hypoxia enhances the senescence effect of bortezomib-the proteasome inhibitor-on human skin fibroblasts. *Biomed Res Int.* 2014;2014:196249. doi: 10.1155/2014/196249.

[P6] ***Krętowski R**, Borzym-Kluczyk M, Cechowska-Pasko M. Efficient induction of apoptosis by proteasome inhibitor: bortezomib in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Mol Cell Biochem.* 2014;389(1-2):177-85. doi: 10.1007/s11010-013-1939-5.

**Prace przed uzyskaniem stopnia doktora*

Rozregulowanie szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR powszechnie występuje w glejaku wielopostaciowym mózgu oraz stanowi cele manipulacji terapeutycznych. Biorąc pod uwagę, że aktywacja PI3K/AKT/mTOR sprzyja wzrostowi guza, przerzutom i oporności na terapię przeciwnowotworowe, inhibitory mTOR są obiecującymi środkami w leczeniu glejaka wielopostaciowego mózgu na drodze stresu ER.

- W ramach prac badawczych prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdziliśmy, że apitolisib (GDC-0980) indukował zależną od czasu i dawki cytotoksyczność i apoptozę w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu linii A-172.
- Najsilniejszą indukcję apoptozy zaobserwowaliśmy w linii A-172 po 48 h inkubacji z 20 μ M GDC-0980.
- Podwójna blokada PI3K/mTOR, przez GDC-0980, znacznie hamowała przeżywalność ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego mózgu i indukowała apoptozę, niezależnie od aktywacji DR5, za pośrednictwem stresu ER.
- Sugerujemy, że GDC-0980 wywierając hamujący wpływ na ekspresję PERK, blokował jego hamujący wpływ na syntezę białek, prowadząc do nasilenia translacji i indukcji apoptozy.
- Ponadto czynnik transkrypcyjny CHOP stymulował syntezę białek i nasilał apoptozę.
- Badania te sugerują, że GDC-0980 może stać się kandydatem do dalszych analiz, jako chemioterapeutyk w walce z glejakiem wielopostaciowym mózgu.

[P22] Omeljaniuk WJ, **Krętowski R**, Ratajczak-Wrona W, Jabłońska E, Cechowska-Pasko M. Novel Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Apitolisib (GDC-0980), Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;26;22(21):11511. doi: 10.3390/ijms222111511.

→ Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na fibroblasty skóry ludzkiej.

Kolejny nurt badań dotyczył wpływu naturalnych związków, do których należy anetol, na metabolizm kolagenu oraz apoptozę fibroblastów skóry ludzkiej inkubowanych w obecności nadtlenu wodoru – czynnika generującego stres oksydacyjny. Oprócz tego zbadano starzenie replikacyjne oraz profil aktywności egzoglikozydaz, indukowanych stresem wywołanym przez tert-butyl w fibroblastach skóry ludzkiej.

- W ramach współpracy z Zakładem Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdziliśmy, że fibroblasty inkubowane w obecności 300 μ M H₂O₂ syntetyzowały znacznie mniej białek kolagenowych oraz wykazywały wzrost apoptozy w porównaniu do hodowli kontrolnej.

- Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że preinkubacja fibroblastów z 0,5 μ M anetolem chroniła je przed zgubnymi skutkami stresu oksydacyjnego, a tym samym nasilała syntezę kolagenu oraz przeciwdziałała apoptozie.
- Zmiany na poziomie syntezy kolagenu, a także wbudowywanie radioaktywnej proliny do białek kolagenowych pozytywnie korelowały z ekspresją genu dla kolagenu typu I.
- Wykazaliśmy, że H_2O_2 nasilał aktywność MMP-2 i MMP-9. Wzrost aktywności MMP-2 mogło przyczynić się do zmniejszenia wydzielania kolagenu przez fibroblasty do medium hodowlanego.
- Ponadto w ramach współpracy z Samodzielną Pracownią Kosmetologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdziliśmy, że aktywność badanych egzoglikozydaz, z wyjątkiem β -glukuronidazy, wykazywała istotny wzrost aktywności zarówno w hodowli fibroblastów z tert-butylem, jak i bez.
- Zaobserwowaliśmy korelację między barwieniem SA- β -Gal a aktywnością β -galaktozydazy w poszczególnych przedziałach czasowych, zarówno w hodowlach komórkowych fibroblastów niepoddanych stresowi, jak i tych inkubowanych z tert-butylem.

[P2] *Knaś M, Zalewska A, **Krętowski R**, Niczyporuk M, Waszkiewicz N, Cechowska-Pasko M, Waszkiel D, Zwierz K. The profile of lysosomal exoglycosidases in replicative and stress-induced senescence in early passage human fibroblasts. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 5;50(2):220-7. doi: 10.5603/fhc.2012.0031.

[P7] *Galicka A, **Krętowski R**, Nazaruk J, Cechowska-Pasko M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2014;394(1-2):217-24. doi: 10.1007/s11010-014-2097-0.

**Prace przed uzyskaniem stopnia doktora*

→ Ocena wpływu deacetylaz histonów na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu.

Inhibitory deacetylaz histonów odgrywają kluczową rolę w epigenetyce. Uczestniczą one w regulacji ekspresji genów związanej z procesem nowotworzenia. Inhibitory te są badane jako leki przeciwnowotworowe nowej generacji, prowadzą do nasilonej acetylacji histonów. Związki te modulują strukturę chromatyny, co prowadzi do zmian w ekspresji genów mających wpływ na szlaki sygnałowe, hamowanie przebiegu cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Fenylomaślan (PBA) i belinostat (Bel) należą do inhibitorów deacetylaz histonów znanych z hamowania cyklu komórkowego i aktywacji apoptozy w różnych liniach nowotworowych. Oceniliśmy wpływ deacetylaz histonów, PBA i Bel na przeżywalność komórek glejaka wielopostaciowego mózgu.

- W ramach prac badawczych prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdziliśmy, że w przeciwieństwie do komórek glejaka linii LN 229, komórki LN-18 były niewrażliwe na cytotoksyczne działanie PBA.
- Wykazaliśmy, że PBA hamował wzrost, proliferację oraz indukował apoptozę w komórkach LN-229, głównie na drodze zmian w ich morfologii i zatrzymaniu cyklu komórkowego.

- Ponadto stwierdziliśmy, że PBA zwiększał ekspresję białka P21, podczas gdy poziom ekspresji P53 pozostał niezmienny.
- Wykazaliśmy również, że PBA obniżał ekspresję genów antyapoptotycznych *Bcl-2*, *Bcl-XL*, jednak bez większego wpływu na ekspresję proapoptotycznych genów *Bax* i *Bim*.
- Wykazaliśmy, że Bel indukował apoptozę oraz nasilał ekspresję proapoptotycznych genów *Puma*, *Bim*, *Chop* i *p21* w komórkach LN-229. W komórkach linii LN-18 jedynie *p21* ulegało wyraźnej nadekspresji.
- Jednocześnie stwierdziliśmy, że komórki LN-229 traktowane Bel wykazywały nasiloną ekspresję białek opiekuńczych z rodziny GRP78 i GRP94.
- W związku z zauważalną nasiloną ekspresją p21 w obu liniach komórkowych LN-18 i LN-229 inkubowanych w obecności Bel wykazaliśmy zmniejszenie liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego.

[P10] Kusaczuk M, **Krętowski R**, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report. *Invest New Drugs*. 2016;34(5):552-64. doi: 10.1007/s10637-016-0372-5.

[P12] Kusaczuk M, **Krętowski R**, Bartoszewicz M, Cechowska-Pasko M. Phenylbutyrate-a pan-HDAC inhibitor-suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line. *Tumour Biol*. 2016;37(1):931-42. doi: 10.1007/s13277-015-3781-8.

→ Ocena wpływu nanocząstek krzemionki na komórki nowotworowe.

Badania z zakresu onkologii doświadczalnej koncentrują się na optymalizacji nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na innowacyjne środki lecznicze. SiNPs wykorzystywane w nanomedycynie to jeden z innowacyjnych kierunków badań w obszarze diagnostyki, obrazowania oraz przyszłościowej terapii przeciwnowotworowej. Pomimo intensywnych badań, ukierunkowanych na interakcje SiNPs z komórkami nowotworowymi, ciągle brak jest wystarczających przesłanek zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu ich działania.

- W ramach projektów naukowych prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku stwierdziliśmy, że SiNPs działają cytotoksycznie na glejaka wielopostaciowego mózgu na drodze indukcji apoptozy i nekrozy.
- Efekt cytotoksycznego działania zależał od: czasu ekspozycji, wielkości i zastosowanej dawki SiNPs.
- Aktywacja apoptozy w badanych komórkach była związana z generowaniem RFT.
- W przeciwieństwie do komórek linii LBC3 i LN-229 w komórkach LN-18 inkubowanych z SiNPs, o wielkości 5–15 nm, wykazaliśmy wyłącznie nekrozę oraz obniżoną syntezę RFT.
- Stwierdziliśmy nasiloną ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych oraz zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej i obniżenie produkcji ATP w komórkach linii LN-229.

- Ponadto wykazaliśmy, w komórkach linii LN-229, nasilenie stresu siateczki śródplazmatycznej oraz odpowiedź prozapalną na SiNPs.
- Sugerujemy, że SiNPs, o wielkości 5–15 nm, mogą wyzwać różne efekty komórkowe/molekularne, w zależności od: warunków ekspozycji, wielkości i dawki, a także typu komórek glejaka wielopostaciowego mózgu.

[P16] Kusaczuk M, **Krętowski R**, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2018;12;13:2279-2294. doi: 10.2147/IJN.S158393.

[P23] **Krętowski R**, Kusaczuk M, Naumowicz M, Cechowska-Pasko M. The Pro-Apoptotic Effect of Silica Nanoparticles Depends on Their Size and Dose, as Well as the Type of Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;30;22(7):3564. doi: 10.3390/ijms22073564.

→ **Związki naturalne o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.**

Choroby nowotworowe są częstą przyczyną śmierci wśród populacji ludzkiej. W terapii przeciwnowotworowej badane są różne związki o potencjalnym działaniu hamującym rozwój raka. W ostatnich latach zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych znalazły związki pochodzenia naturalnego, takie jak flawonoid kwercetyna oraz pochodna kwasu cynamonowego, kwas p-kumarowy.

- W ramach badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Katedry Chemii Fizycznej, Pracowni Bioelektrochemii Uniwersytetu w Białymstoku wykazaliśmy cytotoksyczne działanie kwercetyny oraz kwasu p-kumarowego na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu.
- Stwierdziliśmy, że kwercetyna oraz kwas p-kumarowy indukowały stres oksydacyjny i prowadziły do apoptozy. W przypadku kwercetyny była to droga związana ze stresem ER.
- Ponadto wykazaliśmy, że kwercetyna i kwas p-kumarowy wpływały na zmiany przepuszczalności oraz ładunku powierzchniowego błony komórkowej glejaka wielopostaciowego mózgu.

[P15] Kruszewski M, Kusaczuk M, Kotyńska J, Gál M, **Krętowski R**, Cechowska-Pasko M, Naumowicz M. The effect of quercetin on the electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells. *Bioelectrochemistry*. 2018;124:133-141. doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.07.010.

[P18] Naumowicz M, Kusaczuk M, Kruszewski MA, Gál M, **Krętowski R**, Cechowska-Pasko M, Kotyńska J. The modulating effect of lipid bilayer/p-coumaric acid interactions on electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells. *Bioorg Chem*. 2019;92:103242. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103242.

[P25] Kusaczuk M, **Krętowski R**, Naumowicz M, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. A Preliminary Study of the Effect of Quercetin on Cytotoxicity, Apoptosis, and Stress Responses in Glioblastoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2022;25;23(3):1345. doi: 10.3390/ijms23031345.

→ **Związki syntetyczne o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.**

Szybki postęp w dziedzinie chemioterapii nowotworów zaowocował wprowadzeniem do badań eksperymentalnych syntetycznych związków o działaniu przeciwnowotworowym. Metronidazol należący do chemioterapeutyków z grupy syntetycznych pochodnych nitroimidazolu. Wykazuje działanie pierwotniakobójcze oraz bakterioobójcze wobec drobnoustrojów beztlenowych.

- W ramach badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oraz Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wykazaliśmy, że metronidazol obniżał żywotność komórek raka jelita grubego linii DLD-1.
- Stwierdziliśmy, że metronidazol indukował apoptozę w badanych komórkach.
- W badaniu ultrastrukturalnym zaobserwowaliśmy komórki zmienione apoptotycznie i nekrotycznie.

[P4] *Sadowska A, **Krętowski R**, Szynaka B, Cechowska-Pasko M, Car H. Metronidazole decreases viability of DLD-1 colorectal cancer cell line. *Cancer Biother Radiopharm.* 2013;28(8):615-22. doi: 10.1089/cbr.2013.1485.

**Prace przed uzyskaniem stopnia doktora*

b) Nagrody naukowe:

- Zespołowa nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2012r.
- Nagroda naukowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2013r.
- Nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2014r.
- Nagroda naukowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2015r.
- Nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2017r.
- Nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2018r.
- Nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2019r.
- Nagroda naukowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, za uzyskanie w roku 2018 finansowania projektu pt.: „Zredukowany tlenek grafenu (rGO) jako czynnik indukujący hipoksję oraz modulator apoptozy w komórkach raka sutka inkubowanych w obecności inhibitora proteasomów”, 2019r.
- Nagroda naukowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2021r.

c) Stypendia naukowe:

- W roku 2012 zostałem stypendystą w ramach Europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki: „Studiuje, badam, komercjalizuję - program wsparcia doktorantów UMB”. Stypendium współfinansowane przez Unię Europejską, w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Od 1.10.2012r. do 30.09.2013r.

d) Udział w kursach, seminariach, szkoleniach i warsztatach

- Szkolenie z zakresu technik mikroskopowych i mikrofotografii w mikroskopach świetlnych, 2009.
- Warsztaty mikroskopii wraz z cyfrową analizą obrazu, 2010.
- Seminaria z zakresu Western Blotting, 2010.
- Szkolenie organizowane przez Beckton Dickinson Polska z cytometrii przepływowej, 2010.
- Warsztaty mikroskopii fluorescencyjnej i hybrydyzacji in situ, 2011.
- Szkolenie z zakresu wymagań i procedur akredytacji, 2011.
- Kurs Biostatystyki, 2012.
- Seminarium z zakresu Hodowli Komórkowych, 2013.
- Szkolenie w ramach projektu pn. „Studiuje, badam, komercjalizuję – program wsparcia doktorantów UMB”, 2013.
- Letni Kurs Hodowli Komórek, Komórki macierzyste – zrób to sam, 2013.
- Kurs z zakresu cytometrii przepływowej, 2014.
- Szkolenie z zakresu technik Real-Time PCR w oznaczeniach jakościowych i ilościowych, 2016.
- Seminaria i warsztaty z zakresu skaningowego mikroskopu elektronowego, 2016.
- Szkolenie z zakresu nowoczesnych technik obrazowania i analizy obrazów w badaniach przeżyciowych, 2017.
- Innowacyjne technologie do analizy komórek, 2017.
- Szkolenie z zakresu innowacyjnych rozwiązań do hodowli komórek ssaczy, 2019.
- Szkolenie e-lerningowe – Przeciwdziałanie korupcji, 2020.
- Szkolenie z zakresu zasad ochrony danych osobowych w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku zgodnie z RODO, 2020.
- Szkolenie w zakresie nowoczesnych technik laboratoryjnych, 2023.
- Szkolenie w zakresie hodowli guzów nowotworowych – badania na modelu *in ovo*, 2023.

e) Informacje o recenzowanych pracach naukowych.

Zostałem zaproszony do recenzowania manuskryptów dla następujących czasopism:

- Antioxidants, IF=7,657
- Biomolecules, IF=6,064
- Cancers, IF=6,575

- Cells, IF=7,666
- International Journal of Nanomedicine, IF=7,033
- Nanomaterials, IF=5,719
- Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, IF=0,878
- Veterinari Science, IF=2,518

f) Podsumowanie osiągnięcia naukowego

- 28 prac oryginalnych, opublikowanych w periodykach z listy Filadelfijskiej, w 11 publikacjach jestem pierwszym autorem.
- Udział w dwóch projektach finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki. W jednym przypadku byłem wykonawcą, natomiast w drugim przypadku byłem kierownikiem projektu.
- Jeden uzyskany patent.
- Współwykonawca i kierownik projektów finansowanych ze źródeł w ramach dotacji statutowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.
- 41 streszczeń zjazdowych.
- Sumaryczny IF= **106,963**.
- Łączna wartość punktów MEiN = **1796/2900***; * *punktacja MNiSW z 2021r.*
- Index Hirscha wg. bazy Web of Science Core Collection: **13 (na dzień 13.02.23r.)**.
- Liczba cytowań wg. bazy Web of Science Core Collection: **424 (380 bez autocytowań), (na dzień 13.02.23r.)**.

Rafał Krętowski

.....
(podpis wnioskodawcy)