

AUTOREFERAT

**Wykorzystanie nanomateriałów (superparamagnetycznych
nanocząstek tlenku żelaza i nanorurek węglowych) w biotechnologii**

Dipl. Ing. Dr.nat.techn. Jakub Rybka



**ADAM MICKIEWICZ
UNIVERSITY
POZNAN**

1. Informacje podstawowe

Imię i Nazwisko: Jakub Rybka

Data urodzenia: 09.11.1984

Miejsce urodzenia: Poznań, Polska

2. Wykształcenie

2009 – 2012 University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń

Biotechnologia, doktorat, Tytuł rozprawy: Novel Aspects of Modular Antibody Engineering: Towards Bispecific Fab Fragments and Engineered Specific Conjugation Sites.

2007 – 2009 University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń

Biotechnologia, studia magisterskie, Tytuł pracy: Development and optimization of a disintegrator western blot assay based on the detection of Amyloid-beta oligomers, a potentially harmful species during Alzheimer's disease.

2005 – 2007 University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń

Biotechnologia, licencjat, Tytuł pracy: A concise survey about fruit and nut allergens.

2003-2005 Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Biotechnologia, licencjat, kontynuowane w Wiedniu.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

05.2013 – Obecnie Adiunkt – Junior Team Leader, Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Zakres obowiązków: Kierowanie zespołem badawczym, składającym się z 1 stażysty podoktorskiego, 3 doktorantów, magistrantów oraz stażystów. Koordynowanie realizacji projektów badawczych, opieka naukowa nad członkami zespołu, przygotowanie publikacji oraz składanie wniosków grantowych

Zadania badawcze: Synteza, funkcjonalizacja i charakteryzacja superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza, zastosowania biologiczne otrzymanych nanocząstek (enkapsydacja nanocząstek białkami wirusowymi oraz obrazowanie kardiomiocytów techniką MRI), synteza nanorurek węglowych, wytwarzanie rusztowań komórkowych z wykorzystaniem nanorurek węglowych

Wykorzystywane techniki: skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, SEM) próbek biologicznych, mikroskopia sił atomowych (AFM), spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX), magnetometria SQUID, spektroskopia FTIR, pomiary dichroizmu kołowego (DC), pomiary potencjału zeta, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), chemiczne osadzanie z fazy gazowej wzmacniane plazmą (PECVD), izolacja chondrocytów z chrząstki, izolacja komórek macierzystych z tłuszczu, hodowla komórkowa

04.2009 – 10.2012 Doktorant - CD Laboratory For Antibody Engineering – Współpraca Firmy F-Star oraz Departmentu Biotechnologii, The University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń.

Zakres obowiązków: Produkcja i charakteryzacja bispecyficznych fragmentów Fab wiążących antygen oraz albuminę serum mysiego, introdukcja cystein w obrębie domeny CH2 celem specyficznej koniugacji, opieka merytoryczna nad magistrantami.

Wykorzystywane techniki: Projektowanie bibliotek genowych, analiza komputerowa FoldX, projektowanie starterów, klonowanie molekularne, ekspresja oczyszczanie i analiza białek (chromatografia rozmiarów wykluczających, skaningowa kalorymetria różnicująca, spektroskopia dichroizmu kołowego), specyficzna biotynylacja, interferometria BioLayer (QK Octet), spektroskopia powierzchniowego rezonansu plazmonowego (BiaCore), ELISA, mikroskopia przyżyciowa, hodowla komórkowa.

08.2008 – 03.2009 Magistrant - Firma Pharmacon Company, The Blood-Brain Barrier Group, Wiedeń

Zakres obowiązków: optymalizacja testu TRIS/Tricine, tworzenie nowych testów na bazie oligomerów.

03.2008 – 07.2008 Pracownik naukowy, The Max F. Perutz Laboratories, Uniwersytet Wiedeński, Laboratorium Prof. M. Baccarini, Wiedeń

Zakres obowiązków: oczyszczanie oraz analiza DNA, opracowanie testów RT PCR, zarządzanie laboratorium.

06.2007 – 02.2008 Pracownik naukowy, Department Biologii Chromosomu, Uniwersytet Wiedeński, Laboratorium Prof. M. Jantsch, Wiedeń

Zakres obowiązków: ekspresja białek w bakteriach E. coli, produkcja, oczyszczanie i analiza produktu, lab management.

12.2006 – 05.2007 Pracownik naukowy, Laboratorium Proteomiczne, Wiedeński Uniwersytet Medyczny

Zakres obowiązków: ogniskowanie izoelektryczne ekstraktów mózgowych i krwi, obsługa Brüker MALDI TOF/TOF.

06.2006 – 11.2006 Pracownik naukowy, Laboratorium Biotechnologii Środowiskowej, The University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń

Zakres obowiązków: fermentacja bakteryjna, analiza parametrów fermentacji.

01.2006 – 05.2006 Licencjusz, Laboratorium Biotechnologii Roślinnej, The University of Natural Resources and Life Sciences, Wiedeń

Zakres obowiązków: hodowla tkanek i komórek roślinnych, Western Blot.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016r. poz. 882 ze zw. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311.):

a. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wykorzystanie nanomateriałów (superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i nanorurek węglowych) w biotechnologii

b. Wykaz publikacji

H1: M. Kręcisz, **J. D. Rybka**, A.J. Strugała, B. Skalski, M. Figlerowicz, M. Kozak* and M. Giersig; Interactions between magnetic nanoparticles and model lipid bilayers – Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) studies of the molecular basis of nanotoxicity; Journal of Applied Physics, 120, 124701 (2016) DOI: 10.1063/1.4962951
IF=2,101 MNiSW=35 pkt

H2: **J. D. Rybka***; Radiosensitizing properties of magnetic hyperthermia mediated by superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) on human cutaneous melanoma cell lines.; Reports of Practical Oncology and Radiotherapy, 24, 152-157 (2019)
DOI: 10.1016/j.rpor.2019.01.003
MNiSW=12 pkt

(* autor korespondencyjny)

H3: T. Trzeciak†*, **J. D. Rybka†**, E. M. Akinoglu, M. Richter, J. Kaczmarczyk and M. Giersig; In Vitro Evaluation of Carbon Nanotube-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering; Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 16, 9022-9025 (2016) DOI: 10.1166/jnn.2016.12732
IF=1,338 MNiSW=20 pkt

(† autor równorzędny)

H4: T. Trzeciak†*, **J. D. Rybka†**, M. Richter, J. Kaczmarczyk, M. Ramalingam, and M. Giersig; Cells and Nanomaterial-Based Tissue Engineering Techniques in the Treatment of Bone and Cartilage Injuries; Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 16, 8948-8952 (2016) DOI: 10.1166/jnn.2016.12733
IF=1,338 MNiSW=20 pkt

(† autor równorzędny)

H5: A. Strugała, M. Kręcisz, **J.D. Rybka***, A. Urbanowicz**, K. Szpotkowski, P. Bierwagen, M. Figlerowicz, M. Kozak, C. Boettcher and M. Giersig, Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method, Journal of Chromatography B, 1068-1069, 157-163 (2017)
DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.10.022
IF=2,441 MNiSW=30 pkt

(* autor korespondencyjny)

H6: A.A. Mieloch[†], M. Kręciszt[†], **J.D. Rybka***, A. Strugała, M. Krupiński, A. Urbanowicz, M. Kozak, B. Skalski, M. Figlerowicz and M. Giersig; The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core; AIP ADVANCES, 8, 035005-1 (2018), DOI: 10.1063/1.5011138

IF=1,530 MNiSW=25 pkt

(* autor korespondencyjny)

H7: **J.D. Rybka†***, A.A. Mieloch[†], A. Plis, M. Pyrski, T. Pniewski and M. Giersig; Assembly and characterization of HBc derived virus-like particles with magnetic core, Nanomaterials, 9(2), (2019) DOI: 10.3390/nano902015

IF=3,504 MNiSW=35 pkt

(† autor równorzędny, * autor korespondencyjny)

- c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cel badań

Przedstawianym osiągnięciem naukowym jest charakterystyka i aplikacyjne zastosowanie nanomateriałów w szeroko pojętej biotechnologii. Głównym celem prowadzonych badań była ocena możliwości wykorzystania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i nanorurek węglowych w układach biologicznych różnego typu, w tym obejmujących zastosowanie w biotechnologii, jak i biomedycynie.

Prowadzone przez mnie badania dotyczyły:

1. Syntezy, funkcjonalizacji i charakterystyki superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (*ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles – SPIONs*).
2. Interakcji funkcjonalizowanych SPIONs z błonami biologicznymi w odniesieniu do molekularnych podstaw nanotoksyczności.
3. Potencjalnego wykorzystania SPIONs w magnetycznej hipertermii połączonej z radiouczulanem w terapii ludzkiego czerniaka skóry.
4. Syntezy i charakterystyki cząstek wirusopodobnych (*ang. virus-like particles – VLPs*) z magnetycznym rdzeniem z wykorzystaniem wirusa mozaiki stokłosy (*ang. Brome mosaic virus - BMV*) i antygenu rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (*ang. Hepatitis B virus core antigen – HbcAg*).
5. Potencjalnego wykorzystania technik inżynierii tkankowej w połączeniu z nanomateriałami w leczeniu uszkodzeń kostnych i chrzęstnych oraz ewaluacji *in vitro*

rusztowań wykonanych z nanorurek węglowych do zastosowań w inżynierii tkankowej chrząstki.

Wprowadzenie

Intensywna eksploracja świata *nano* doprowadziła w ostatnich latach do wielu przełomowych odkryć z zakresu nauk biologicznych, medycznych, inżynieryjnych i innych. Nowoczesne techniki syntezy chemicznej dają możliwość precyzyjnego projektowania właściwości fizykochemicznych nanostruktur, co umożliwia tworzenie materiałów hybrydowych o unikalnych właściwościach. Dokładna charakterystyka otrzymanych nanomateriałów jest elementem niezbędnym do zastosowania opracowanych rozwiązań we wszelkich obszarach biotechnologii. Podjęta przeze mnie tematyka badawcza cechuje się wysokim stopniem multidyscyplinarności i obejmuje takie dziedziny nauki jak biologia, chemia, fizyka.

Charakterystyka SPIONs

Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONs) posiadają szereg unikalnych magnetycznych i fizykochemicznych właściwości, które czynią je wielofunkcyjnym i praktycznym materiałem do zastosowań w wielu dziedzinach biotechnologii. SPIONs cechują się niską toksycznością, łatwością zastosowania funkcjonalizacji powierzchniowej oraz wydajnymi metodami produkcji [1–5]. Dzięki temu znalazły one zastosowanie m.in. jako czynnik kontrastujący w obrazowaniu z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego, w magnetycznie celowanym dostarczaniu leków czy w magnetycznej hipertermii [6–8]. Ze względu na niewielkie rozmiary, nanocząstki wykazują zdolność do dyfuzji w głąb tkanek oraz w efekcie komórek, co może potencjalnie prowadzić do wystąpienia efektów cytotoksycznych. Zaobserwowane efekty cytotoksyczne uwzględniają m.in.: upośledzenie funkcji mitochondriów, membranowy wyciek dehydrogenazy mleczanowej, generacja reaktywnych form tlenu [5]. Należy również podkreślić, że efekty cytotoksyczne są w dużym stopniu zależne od rodzaju zastosowanej funkcjonalizacji powierzchniowej, która wpływa na takie parametry jak m.in.: biodystrybucja, adhezja/penetracja błon biologicznych, retencja [9]. Jony żelaza uwalniane podczas biodegradacji SPIONs włączane są do puli fizjologicznej i nie stanowią ryzyka toksyczności wynikającej z nadmiernej podaży [10].

Jednym z kluczowych aspektów wykorzystania nanocząstek w biotechnologii i medycynie jest określenie ich wpływu na struktury komórkowe. Szczególnie istotne jest tutaj badanie cytotoksyczności. Opisywane w literaturze efekty cytotoksyczne obserwowane dla SPIONs to m.in. uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny czy dysfunkcja błony mitochondrialnej [11]. Jednym z mechanizmów potencjalnej cytotoksyczności nanostruktur jest ich interakcja z błonami biologicznymi.

Potencjalne wykorzystanie nanomateriałów w biomedycynie

Jednym z największych wyzwań badań multidyscyplinarnych jest przełożenie osiągnięć badawczych na zastosowanie aplikacyjne. Przykładem wykorzystania osiągnięć za zakresu nanotechnologii w medycynie jest zastosowanie nanomateriałów w terapii nowotworów, np. nowotworu skóry czerniaka. Czerniak jest główną przyczyną zgonów wywołanych nowotworami skóry na całym świecie [12]. Ze względu na szczególnie wysoką radiooporność komórek czerniaka, radioterapia nie jest dostatecznie skuteczną metodą leczenia [13]. Radiooporność komórek nowotworowych można zwalczać z wykorzystaniem związków radiouczulających i hipertermii [14–16].

Wiele nadziei budzi także zastosowanie nanotechnologii w inżynierii tkankowej. Szczególnie ważnym aspektem staje się opracowanie nowoczesnych technik reparatywnych uszkodzeń chrząstek. Nanorurki węglowe (*ang. carbon nanotubes* – CNTs) są cylindrycznymi strukturami zbudowanymi z atomów węgla, które koncepcyjnie można postrzegać jako zrolowane arkusze grafenu. W zależności od struktury CNT, wyróżnić można nanorurki jednościenne (*ang. single-walled CNTs* – SWCNTs), wielościenne (*ang. multi-walled CNTs* – MWCNTs) lub o strukturze bambusa (*ang. bamboo CNTs*). Jednym z parametrów opisującym morfologię CNTs jest „chiralność”, która składa się z dwóch wektorów sieci heksagonalnej. Parametr ten opisuje teoretyczny sposób zwinięcia arkusza grafenu, z którego utworzona została nanorurka. Chiralność nanorurek węglowych determinuje ich własności mechaniczne, optyczne, przewodnictwo cieplne oraz elektryczne itp.[17,18]. CNTs cechują się wysoką biokompatybilnością, łatwością modyfikacji powierzchniowej oraz dużą wytrzymałością mechaniczną [19]. Natywnie, nanorurki węglowe są hydrofobowe. Za pomocą utleniania w mieszaninie kwasów dochodzi do introdukcji grup karboksylowych, hydroksylowych, karbonylowych i pochodnych, dzięki którym CNTs uzyskują właściwości hydrofilowe [20].

Synteza i charakterystyka VLPs z magnetycznym rdzeniem z wykorzystaniem BMV oraz HBcAg

Cząstki wirusopodobne (ang. *virus-like particles* – VLPs) złożone są z elementów strukturalnych wirusa zdolnych do samoorganizacji. Najczęściej jest to natywna forma wirusa pozbawiona materiału genetycznego lub genetycznie zmodyfikowane białko kapsydu. VLPs znalazły zastosowanie m.in. jako mono- i poliwalentne szczepionki, nanobiosensory, fotokatalizatory, nanopojemniki czy nanoreaktory [21–24]. Enkapsydacja magnetycznego rdzenia w strukturę VLPs nadaje szereg nowych właściwości mających potencjalne zastosowanie w produkcji na szeroką skalę. Jedną z nich jest możliwość zastosowania magnetycznej bioseparacji otrzymanych struktur. Obecność magnetycznego rdzenia umożliwia śledzenie biodystrybucji cząstek za pomocą rezonansu magnetycznego. Ponadto, rdzeń w trakcie składania zwiększa wydajność tego procesu. Odpowiednio zaprojektowany rdzeń może również poprawiać takie parametry jak: stabilność, wytrzymałość mechaniczną czy możliwość długoterminowego przechowywania.

Opis osiągnięcia naukowego

Synteza, funkcjonalizacja i charakterystyka SPIONs

W przeprowadzonych przez nas badaniach wykorzystano dwie metody syntezy SPIONs: termiczną dekompozycję pentakarbonylu żelaza $\text{Fe}(\text{CO})_5$ oraz termiczną dekompozycję acetyloacetonianu żelaza (III) $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Obydwie syntezy przebiegają w rozpuszczalniku organicznym w obecności surfaktantu [25,26]. Zaletą wykorzystanych metod jest duża wydajność oraz monodispersja otrzymanych nanocząstek. Do wad należy konieczność przeprowadzenia funkcjonalizacji powierzchniowej celem uzyskania właściwości hydrofilowych. Typy funkcjonalizacji wykorzystanych w badaniach opisane zostaną w kolejnych akapitach [H1, H2, H6, H7].

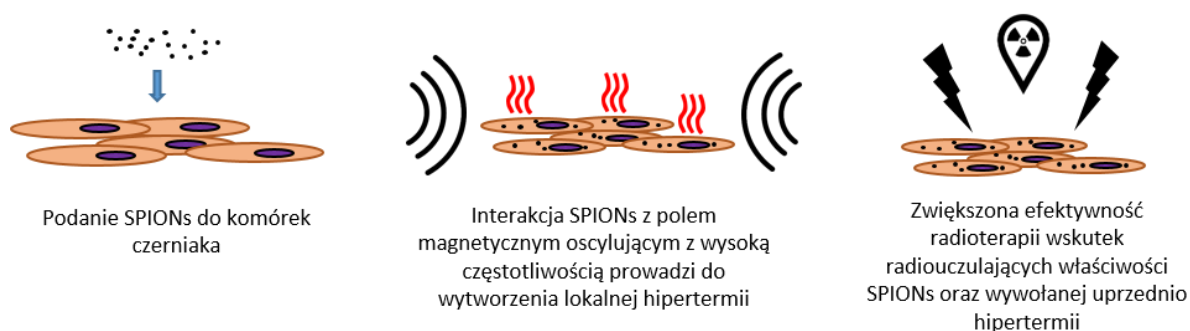
Interakcja funkcjonalizowanych SPIONs z błonami biologicznymi w odniesieniu do molekularnych podstaw nanotoksyczności

Znikoma ilość publikacji dotyczących mechanizmów potencjalnej cytotoksyczności SPIONs, wynikającej z interakcji z błonami biologicznymi, zainspirowała mnie do podjęcia badań w tym

kierunku. W zaprojektowanym przez nas eksperymencie zastosowano dymirystoilofosfatydylocholinę (DMPC) jako model dwuwarstwy lipidowej. SPIONs w rozmiarach 3-13 nm zsyntetyzowano za pomocą termicznej dekompozycji pentakarbonylu żelaza $\text{Fe}(\text{CO})_5$, a następnie sfunkcjonalizowano przy pomocy kwasu poliakrylowego modyfikowanego poliallylaminą lub N-oktylaminą oraz pochodnymi glikolu polietylenowego. Oddziaływania pomiędzy modelem błony dwulipidowej, a funkcjonalizowanymi nanocząstkami zostały zbadane przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera z tłumionym całkowitym współczynnikiem odbicia (*ang. Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – ATR-FTIR). Uzyskane wyniki wykazały wpływ rozmiaru oraz funkcjonalizacji SPIONs na rodzaj i siłę oddziaływań z modelem błony dwulipidowej. Cząstki w rozmiarach 13 nm i 10 nm nie wykazały oznak penetracji do hydrofobowego wnętrza modelu DMPC. Wyniki otrzymane dla 3 nm SPIONs sugerują ich nanotoksyczny potencjał związany z inicjacją zmian strukturalnych DMPC. Zaprezentowana w pracy charakterystyka dynamiki konformacyjnej systemu lipidowego i superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza dostarczyła cennych informacji dotyczących molekularnych mechanizmów nanotoksyczności [25] [H1].

Potencjalne wykorzystanie SPIONs w magnetycznej hipertermii połączonej z radiouczulaniami w terapii ludzkiego czerniaka skóry

Potencjalne zastosowanie SPIONs w terapii czerniaka skóry z wykorzystaniem bimodalnej procedury hipertermiczno-radiouczulającej opisuję w przygotowanej przeze mnie pracy przeglądowej (Rys. 1).



Rysunek 1: Zastosowanie radiouczulających właściwości SPIONs w połączeniu z magnetyczną hipertermią

Magnetyczne właściwości nanocząstek tlenku żelaza umożliwiają ich zdeponowanie w obrębie zmiany nowotworowej przy wykorzystaniu źródła pola magnetycznego.

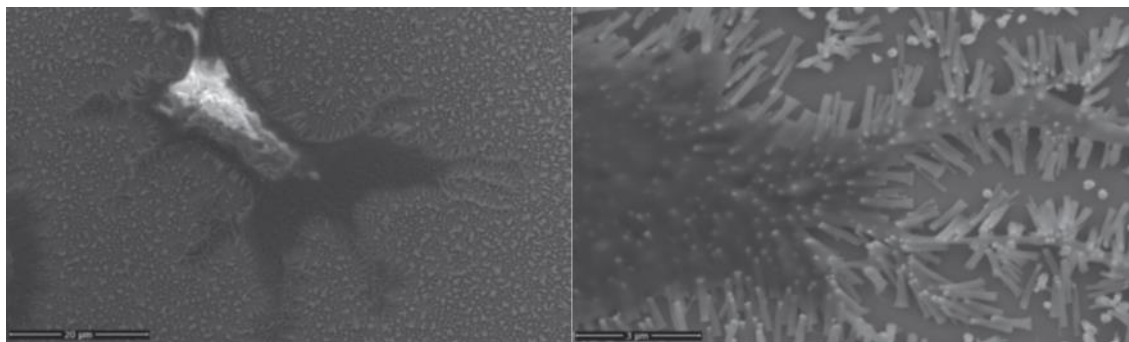
Mechanizm radiouczulania zdeterminowany jest przez rodzaj promieniowania jonizującego oraz typ użytej cząstki metalicznej. Interakcja promieniowania jonizującego z powierzchnią cząstki powoduje takie efekty jak: rozpraszanie fotonu, emisję fotoelektronu, rozpraszanie Comptona, emisję Augera, emisję fluorescencyjną. Efekty biologiczne tej interakcji to generacja reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenia DNA [27]. Głównym typem uszkodzeń DNA wynikających z bezpośredniego działania promieniowania jonizującego oraz wolnych rodników są pęknięcia dwuniciowe, które wymagają inicjacji naprawy rekombinacyjnej lub niehomologicznego łączenia końców. Tego typu uszkodzenia są szczególnie niebezpieczne dla komórki i mogą prowadzić m.in. do apoptozy lub mutacji [28]. Warto również zaznaczyć, że główny efekt radiotoksyczny wynika z radiolizy wody generującej wolne rodniki (głównie reaktywne formy tlenu), a nie bezpośredniego oddziaływania promieniowania jonizującego na kwas nukleinowy [29]. Zastosowanie magnetycznej hipertermii wymaga umieszczenia SPIONs wewnątrz zmiennego pola magnetycznego o dużej częstotliwości. Generacja ciepła odbywa się na drodze trzech mechanizmów: relaksacji Browna, relaksacji Néela oraz utraty histerezy. Efektywność generacji ciepła zależy od takich parametrów jak m.in.: amplituda i częstotliwość pola magnetycznego, rozmiar, kształt, budowa krystaliczna i stężenie nanocząstek, lepkość środowiska. W zależności od uzyskanej temperatury, efekty biologiczne hipertermii obejmują zmiany w strukturze fosfolipidów, białek, kwasów nukleinowych dla temperatur ok. 40°C. Denaturacja białek i termalna ablacja następują w temp. ok. 45°C. Zastosowanie hipertermii wiąże się również ze zwiększonym poziomem reaktywnych form tlenu, co działa synergistycznie z efektami radiolizy wody [24,30,31].

Podsumowując, przygotowana przeze mnie praca opisuje innowacyjne podejście do terapii czerniaka skóry z wykorzystaniem SPIONs w magnetycznej hipertermii oraz indukcji efektu radiouczulającego [H2].

Potencjalne wykorzystanie technik inżynierii tkankowej w połączeniu z nanomateriałami w leczeniu uszkodzeń kostnych i chrzęstnych

Pierwsze przeprowadzone przez nas doświadczenie w opisanej tematyce dotyczyło ewaluacji *in vitro* rusztowań wykonanych z nanorurek węglowych do zastosowań w inżynierii tkankowej chrząstki. Rusztowanie pionowo ułożonych MWCNTs otrzymane zostało przy pomocy chemicznego osadzania z fazy gazowej wzmacnianego plazmą (*ang. plasma enhanced chemical vapour deposition* – PECVD) przy współpracy z Helmholtz-Zentrum w Berlinie.

Otrzymane rusztowanie zostało scharakteryzowane przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego z przystawką do spektroskopii dyspersyjnej promieniowania-X (*ang. scanning electron microscopy /energy dispersive x-ray spectroscopy — SEM/EDX*). Przeprowadzona analiza wykazała obecność czap niklowych na zakończeniach MWCNTs, będących pozostałościami katalizy niezbędnej w trakcie syntezy.



Rysunek 2: Zdjęcia SEM. Widoczne filopodia chondrocytu oraz naginanie wielościennych nanorurek węglowych przez filopodium

Na otrzymane rusztowanie wysiano chondrocyty królicze wyizolowane z powierzchni stawowej części dystalnej kości udowej i umieszczono w standardowych warunkach hodowli komórkowej. Chondrocyty umieszczone na rusztowaniu wytworzyły uwytłuszczone filopodia, wykazując adaptację do podłoża. Zaobserwowano również naginanie nanorurek pod kształt powstałych filopodiów (Rys. 2). Obecność niklu w hodowli nie przyczyniła się do zwiększonej cytotoksyczności. Ilość chondrocytów hodowanych na rusztowaniach była trzykrotnie wyższa w porównaniu do hodowli w standardowych naczyniach hodowlanych z tworzywa sztucznego. Zastosowanie nanorurek węglowych dostarcza stabilizacji mechanicznej transplantu oraz zapewnia optymalne środowisko do wzrostu komórek i regeneracji uszkodzonej tkanki. Ze względu na łatwość modyfikacji powierzchniowej, CNTs mogą zostać wzbogacone o dodatkowe biokomponenty tworząc struktury hybrydowe o specyficznych właściwościach. Przeprowadzone prace ukazały bezprecedensowy potencjał wielościennych nanorurek węglowych do stosowania w roli rusztowania w inżynierii tkankowej chrząstki stawowej [32] [H3].

Satysfakcjonujące wyniki badań z wykorzystaniem tego typu nanomateriałów stały się dla nas inspiracją i zachętą do dalszych działań. Po analizie dostępnej literatury, stwierdziliśmy, iż brakuje szerokiego przeglądu dotyczącego wykorzystania rusztowań zawierających CNTs w leczeniu uszkodzeń chrząstki i kostnych, dlatego też przygotowaliśmy publikację

przeglądową. Podsumowuje ona dotychczasową wiedzę na temat strategii terapeutycznych z wykorzystaniem rusztowań CNT, ale przede wszystkim wskazuje na ogromny potencjał aplikacyjny wspomnianych nanomateriałów.

Tematyka nanostruktur w inżynierii tkankowej jest obecnie najszerzej rozwijanym przez mnie obszarem badawczym [33] [H4].

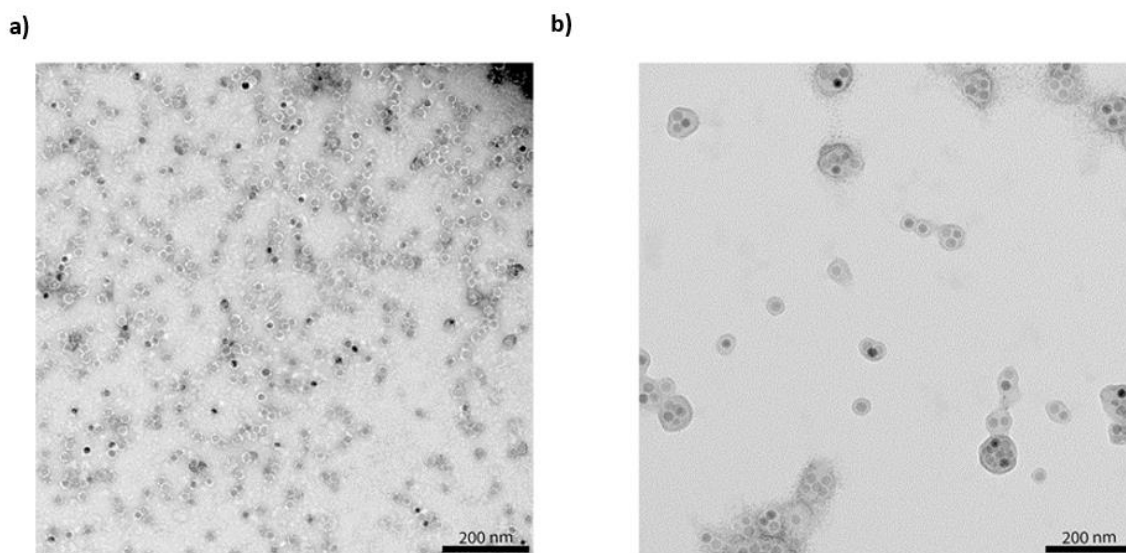
Przy współpracy z Kliniką Ortopedii i Traumatologii Szpitala Klinicznego im. Wiktora Degi Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, podjęty został temat badawczy dotyczący zastosowania rusztowań na bazie nanorurek węglowych do regeneracji uszkodzeń chrząstnych. Konsekwencją podjętej współpracy jest realizowany obecnie projekt LIDER „MeniScaff 3D - biodrukowane, trójwymiarowe rusztowania wzmacniane nanorurkami węglowymi, stymulujące chondrogenezę macierzystych komórek mezenchymalnych do regeneracji łąkotki”.

Synteza i charakterystyka VLPs z magnetycznym rdzeniem z wykorzystaniem BMV oraz HBcAg

Podjęte przez nas prace badawcze składały się z kilku etapów. Pierwszym etapem było opracowanie metody wydajnego otrzymywania i oczyszczania wirusa mozaiki stokłosa (ang. *Brome mosaic virus* – BMV). Propagacja wirusa została przeprowadzona z wykorzystaniem jęczmienia zwyczajnego (łac. *Hordeum vulgare*). Po homogenizacji liści oraz ekstrakcji wirionów, przeprowadzono oczyszczanie z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej oraz chromatografii rozmiarów wykluczających. Otrzymany w ten sposób wirus został scharakteryzowany z użyciem takich metod jak: spektroskopia elektronowego dichroizmu kołowego (ang. *electron circular dichroism* – ECD), dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering* – DLS), kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *cryogenic transmission electron microscopy* – cryo-TEM), ATR-FTIR. Opracowany protokół namnażania i oczyszczania wirusa BMV cechuje się wysoką wydajnością oraz potencjałem do zwiększenia skali produkcji wraz z zachowaniem integralności strukturalnej [34] [H5].

Drugim etapem zadania badawczego było stworzenie VLPs złożonych z magnetycznego rdzenia w postaci sfunkcjonalizowanych SPIONs oraz otoczki białkowej będącej kapsydem wirusa BMV (Rys. 3).

Realizacja tego etapu zaowocowała opracowaniem nowatorskiej metody funkcjonalizacji SPIONs z wykorzystaniem diheksadecylofosforanu (DHP). Obecnie prowadzimy pracę nad ewaluacją biologiczną *in vitro* otrzymanych nanocząstek. W opisanym eksperymencie wykorzystane zostały 15 nm SPIONs otrzymane metodą termicznej dekompozycji acetyloacetonianu żelaza (III) $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Do funkcjonalizacji wykorzystano następujące związki: diheksadecylofosforan (DHP) oraz distearoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamino-N-[karboksy-(PEG)2000] (HOOC-PEG-PL). Właściwości magnetyczne otrzymanych nanocząstek zostały określone przy pomocy magnetometrii nadprzewodnikowej interferencji kwantowej (*ang. superconducting quantum interference device* – SQUID). Pozostałe techniki badawcze wykorzystane w pracy to pomiar potencjału zeta, DLS, FTIR, TEM.



Rysunek 3: Zdjęcia TEM. **a)** BMV-pochodnych VLPs z rdzeniem z SPIONs funkcjonalizowanych za pomocą COOH-PEG-PL **b)** BMV-pochodnych VLPs z rdzeniem z SPIONs funkcjonalizowanych za pomocą DHP.

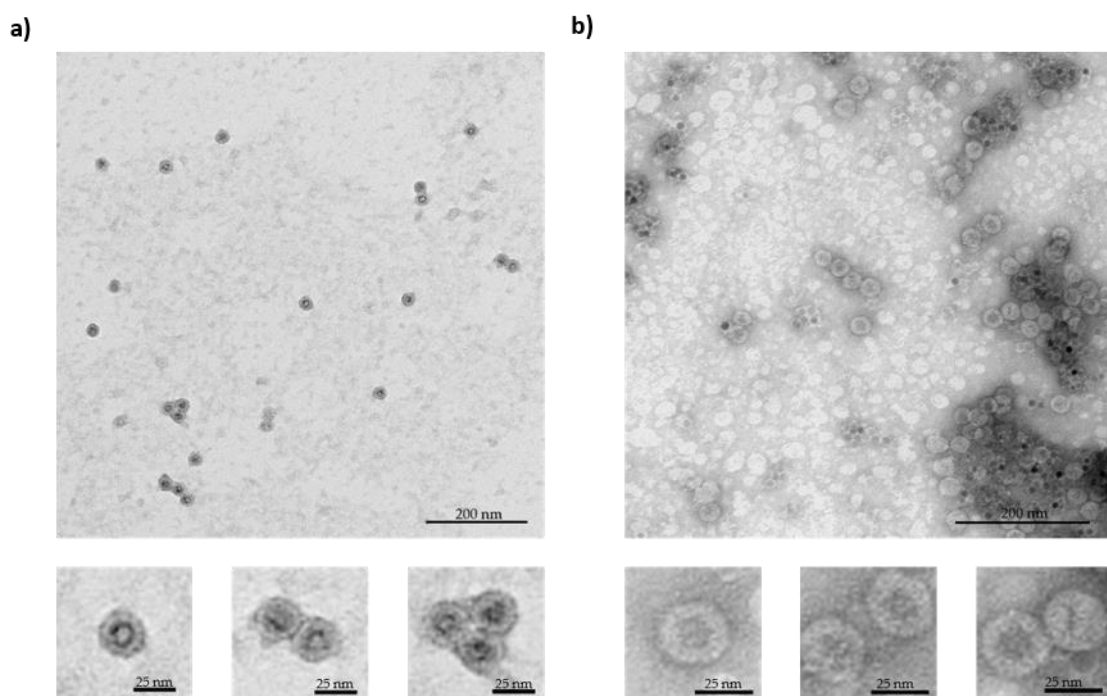
Główny ciężar merytoryczny położony został na wpływ zastosowanych funkcjonalizacji na proces składania BMV-pochodnych VLPs z magnetycznym rdzeniem. Otrzymane wyniki ukazują elektrostatyczne i steryczne parametry zastosowanych funkcjonalizacji jako kluczowe dla procesu składania uwzględniając morfologię otrzymanych VLPs, stabilność koloidalną oraz efektywność enkapsydacji rdzenia [26] [H6].

Trzecim etapem prac związanych z syntezą cząstek wirusopodobnych było wykorzystanie zdobytego doświadczenia z poprzednich prac do otrzymania VLPs na bazie białka kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu B (*ang. hepatitis B capsid* – HBc) (Rys. 4). W roli rdzenia

wykorzystano SPIONs opisane w etapie drugim. Białko HBc otrzymane zostało w systemie ekspresji przejściowej opartej na agroinfiltracji tytoniu (*fac. Nicotiana benthamiana*).

Zastosowana metodologia pozwoliła na otrzymanie VLPs złożonych z HBc i magnetycznego rdzenia. W pracy przedstawiona została zależność pomiędzy promieniem hydrodynamicznym i potencjałem zeta rdzenia, a wydajnością składania oraz morfologią otrzymanych VLPs. Bardziej ujemny potencjał powierzchniowy SPIONs zaowocował większą wydajnością enkapsydacji rdzenia. Antygenowość otrzymanych VLPs w odniesieniu do pustych kapsydów została porównana za pomocą testu immunoenzymatycznego (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA). Przedstawiona praca ukazuje interesującą i kluczową, z aplikacyjnego punktu widzenia, zależność pomiędzy fizykochemicznymi właściwościami magnetycznego rdzenia, a antygenowością otrzymanych nanostruktur [H7].

Podsumowując, podjęta tematyka badawcza dotyczyła syntezy oraz charakterystyki cząstek wirusopodobnych z magnetycznym rdzeniem z wykorzystaniem sfunkcjonalizowanych SPIONs oraz wirusa BMV i białka kapsydu wirusa HBV.



Rysunek 4: Zdjęcia TEM. **a)** HBc-pochodnych VLPs z rdzeniem z SPIONs sfunkcjonalizowanych za pomocą DHP **b)** HBc-pochodnych VLPs z rdzeniem z SPIONs sfunkcjonalizowanych za pomocą COOH-PEG-PL

Podsumowanie i dalsze perspektywy

W toku mojej pracy naukowej opracowano nowe metody opłaszczania nanocząstek i wykazano ich biologiczną użyteczność. Po przebadaniu nanotoksyczności na modelu błony biologicznej udało się przełożyć tę wiedzę na model składania wirusa o magnetycznym rdzeniu. Jednocześnie, teoretycznie sprawdzono przydatność nanocząstek w terapii ludzkiego czerniaka skóry.

Wykorzystanie nanorurek węglowych jako podłoża dla hodowli komórkowej zaowocowało publikacjami ukazującymi ich potencjalne zastosowanie. Interesujące wyniki uzyskane w powyższych eksperymentach skłoniły mnie do dalszej eksploracji potencjalnego zastosowania nanorurek węglowych w inżynierii tkankowej. W efekcie złożyłem oraz **otrzymałem projekt LIDER** zatytułowany „MeniScaff 3D - biodrukowane, trójwymiarowe rusztowania wzmacniane nanorurkami węglowymi, stymulujące chondrogenezę macierzystych komórek mezenchymalnych do regeneracji łąkotki”. Moje dalsze badania skupiać się będą wokół praktycznych zastosowań nanomateriałów w połączeniu z biodrukiem 3D w obszarach inżynierii tkankowej, biotechnologii medycznej oraz biomateriałów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz organizacyjnych.

Po doktoracie na Bodenkultur Universität, Wien moja kariera naukowa związana jest ze współpracą z prof. Michaeliem Giersig oraz Centrum Zaawansowanych Technologii (CZT), Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Nasza współpraca rozpoczęła się od projektu **MAESTRO** „Ukierunkowane nanocząstki o magnetycznym rdzeniu i wirusowej powłoce” pod kierownictwem prof. Giersig, którego byłem **głównym wykonawcą oraz pełnomocnikiem kierownika**. W ramach projektu opracowane zostały nowe metody enkapsydacji nanocząstek wirusem BMV [H1, H6, H7]. W początkowej fazie wydane zostały dwie publikacje w których opisane zostały metody syntezy oraz funkcjonalizacji superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza [35,36].

W ramach Wydziału Chemii, UAM i współpracy z prof. Stefanem Lisem opublikowana została praca, w której opisane zostały metody przygotowania oraz biologicznej charakteryzacji biokompatybilnych nanocząstek typu core/shell opartych na lantanowcach oraz złocie [37].

Współpraca z Kliniką Ortopedii oraz Traumatologii, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu zaowocowała nie tylko publikacjami [H3, H4], ale również pracą dotyczącą korelacji

koncentracji adipocytokin, zaawansowania choroby, statusu radiologicznego jak i całkowitej ilości tłuszczu u pacjentów ze schorzeniami kolana [38]. W wyniku tej współpracy udało się otrzymać w 2017 r. finansowanie projektu **OPUS** „Synteza, badanie toksyczności i funkcjonalności wielościennych nanorurek węglowych - podłoża dla inżynierii tkankowej - chrząstki stawowej”, którego jestem **głównym wykonawcą oraz pełnomocnikiem kierownika**.

Wspólnie realizowany projekt PBS „Molekularne obrazowanie (z zastosowaniem nanotechnologii) dla monitorowania implantowanych komórek macierzystych i ich funkcji regeneracyjnych – STEMNanoT” pod kierownictwem prof. Macieja Kurpisza z Instytutu Genetyki Człowieka PAN, zaowocowało publikacją opisującą potencjalne użycie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w bioobrazowaniu ludzkich mioblastów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [39].

Od 2014 roku współpraca z grupą prof. Andrzeja Mackiewicza przyniosła kilka doniesień konferencyjnych w postaci posterów, jak również niedawno wysłaną do druku publikację (PLOS ONE), która opisuje kompozycję bioinżynierowanego jedwabiu oraz nanocząstek tlenku żelaza jako potencjalnego narzędzia teranostycznego.

W 2014 odpowiedzialny byłem za **zorganizowanie Intensywnego Kursu ERASMUS** pt. „PLASMAG” w Berlinie. Program ten obejmował letni dwutygodniowy intensywny kurs dotyczący plazmonicznych oraz magnetycznych nanomateriałów. Uczestnicy byli studentami Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Freie Universität Berlin, Universität Duisburg-Essen oraz Université Joseph Fourier Grenoble I.

Nasze laboratorium często wybierane jest przez studentów Wydziału Biologii, UAM jako miejsce odbycia letnich praktyk zawodowych, obowiązkowych w ramach studiów. Plan stażu zakłada naukę produkcji nanomateriałów oraz wykorzystania ich w aplikacjach biotechnologicznych. Byłem również promotorem licencjatu oraz pracy magisterskiej. Obecnie w ramach pracy dydaktycznej opiekuję się trojgiem doktorantami w naszym laboratorium. W roku akademickim 2018/2019 prowadzę również wykład monograficzny o nazwie Nanotechnologia dla studentów Wydziału Biologii, UAM.

Od początku 2018 roku jestem **Koordynatorem Części Biotechnologicznej** (wraz ze Szklarnią i Zwierzętarnią) **Centrum Zaawansowanych Technologii, UAM** w Poznaniu. Do moich obowiązków należą: koordynacja pracy zespołów badawczych działających w obszarze biotechnologii, zarządzanie infrastrukturą badawczą, nawiązywanie współpracy z firmami

zainteresowanymi infrastrukturą CZT, współpraca z administracją centralną UAM. W ramach Części Biotechnologicznej CZT zorganizowałem w listopadzie 2018r Seminarium Biotechnologiczne, w którym uczestniczyli przedstawiciele wielu poznańskich uczelni oraz firm biotechnologicznych.

Od maja 2018 jestem również **pełnomocnikiem Rektora UAM** ds. utworzenia Banku Tkanek i Komórek CZT. Podczas nieobecności Dyrektora CZT prof. dr hab. Bronisława Marciniaka, czasowo na podstawie **pełnomocnictwa pełnię jego obowiązki.**

Bibliografia

1. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16*, 023501.
2. Gu, L.; Fang, R.H.; Sailor, M.J.; Park, J. In Vivo Clearance and Toxicity of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals. **2012**, 4947–4954.
3. Silva, a; Silva-Freitas, É.; Carvalho, J. Magnetic Particles in Biotechnology: From Drug Targeting to Tissue Engineering. *Adv. Appl. Biotechnol.* **2012**, 237–256.
4. Amstad, E.; Textor, M.; Reimhult, E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale* **2011**, *3*, 2819.
5. Singh, N.; Jenkins, G.J.S.; Asadi, R.; Doak, S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **2010**, *1*, 1–16.
6. Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.O.; Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 8–23.
7. Ulbrich, K.; Holá, K.; Šubr, V.; Bakandritsos, A.; Tuček, J.; Zbořil, R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem. Rev.* 2016.
8. Yue-Jian, C.; Juan, T.; Fei, X.; Jia-Bi, Z.; Ning, G.; Yi-Hua, Z.; Ye, D.; Liang, G. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2010**, *36*, 1235–1244.
9. Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Veverka, P.; Goglio, G.; Demourgues, A.; Portier, J.; Pollert, E.; Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Prog. Solid State Chem.* **2006**.
10. Schlachter, E.K.; Widmer, H.R.; Bregy, A.; Lönnfors-Weitzel, T.; Vajtai, I.; Corazza, N.; Bernau, V.J.P.; Weitzel, T.; Mordasini, P.; Slotboom, J.; et al. Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1793–800.
11. V., V.; G., K.; C., C.; N., F.-B.; E., P.; J.P., T.; B., L. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.*

2015.

12. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30.
13. Strojan, P. Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiol. Oncol.* **2010**, *44*, 1–12.
14. Brys, A.K.; Gowda, R.; Loriaux, D.B.; Robertson, G.P.; Mosca, P.J. Nanotechnology-Based Strategies for Combating Toxicity and Resistance in Melanoma Therapy. *Biotechnol. Adv.* **2016**.
15. Klein, S.; Sommer, A.; Distel, L.V.R.; Neuhuber, W.; Kryschi, C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 393–397.
16. Thapa, R.; Galoforo, S.; Kandel, S.M.; El-Dakdouki, M.H.; Wilson, T.G.; Huang, X.; Roth, B.J.; Wilson, G.D. Radiosensitizing and Hyperthermic Properties of Hyaluronan Conjugated, Dextran-Coated Ferric Oxide Nanoparticles: Implications for Cancer Stem Cell Therapy. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 1–11.
17. Spitalsky, Z.; Tasis, D.; Papagelis, K.; Galiotis, C. Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Prog. Polym. Sci.* **2010**.
18. Zhang, Y.; Bai, Y.; Yan, B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discov. Today* **2010**.
19. Xue, Y. Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. In *Industrial Applications of Carbon Nanotubes*; 2016 ISBN 9780323415316.
20. Firkowska, I.; Olek, M.; Pazos-Peréz, N.; Rojas-Chapana, J.; Giersig, M. Highly ordered MWNT-based matrixes: Topography at the nanoscale conceived for tissue engineering. *Langmuir* **2006**, *22*, 5427–5434.
21. Mohsen, M.O.; Zha, L.; Cabral-Miranda, G.; Bachmann, M.F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* **2017**, *34*, 123–132.
22. Park, J.-S.; Cho, M.K.; Lee, E.J.; Ahn, K.-Y.; Lee, K.E.; Jung, J.H.; Cho, Y.; Han, S.-S.; Kim, Y.K.; Lee, J. A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 259–264.
23. de la Escosura, A.; Nolte, R.J.M.; Cornelissen, J.J.L.M. Viruses and protein cages as nanocontainers and nanoreactors. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2274.
24. Deatsch, A.E.; Evans, B.A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **2014**, *354*, 163–172.
25. Kręcisz, M.; Rybka, J.D.; Strugała, A.J.; Skalski, B.; Figlerowicz, M.; Kozak, M.; Giersig, M. Interactions between magnetic nanoparticles and model lipid bilayers - Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) studies of the molecular basis of nanotoxicity. *J. Appl. Phys.* **2016**, *120*, 124701.
26. Mieloch, A.A.; Kręcisz, M.; Rybka, J.D.; Strugała, A.; Krupiński, M.; Urbanowicz, A.; Kozak, M.; Skalski, B.; Figlerowicz, M.; Giersig, M. The influence of ligand charge and length on the assembly of *Brome mosaic virus* derived virus-like particles with magnetic core. *AIP Adv.* **2018**, *8*, 035005.
27. Kwatra, D.; Venugopal, A.; Anant, S. Nanoparticles in radiation therapy : a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl. Cancer Res.* **2013**, *2*, 330–342.

28. Mahaney, B.L.; Meek, K.; Lees-Miller, S.P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* **2009**.
29. Reisz, J.A.; Bansal, N.; Qian, J.; Zhao, W.; Furdui, C.M. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 260–92.
30. Torres-lugo, M.; Rinaldi, C.; Creixell, M.; Boh, A.C. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a. **2011**, 7124–7129.
31. Hilger, I. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. **2013**, 6736, 828–834.
32. Trzeciak, T.; Rybka, J.D.; Akinoglu, E.M.; Richter, M.; Kaczmarczyk, J.; Giersig, M. In Vitro Evaluation of Carbon Nanotube-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*, 9022–9025.
33. Trzeciak, T.; Rybka, J.D.; Richter, M.; Kaczmarczyk, J.; Ramalingam, M.; Giersig, M. Cells and Nanomaterial-Based Tissue Engineering Techniques in the Treatment of Bone and Cartilage Injuries. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*, 8948–8952.
34. Strugała, A.; Kręcisz, M.; Rybka, J.D.; Urbanowicz, A.; Szpotkowski, K.; Bierwagen, P.; Figlerowicz, M.; Kozak, M.; Böttcher, C.; Giersig, M. Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1068–1069, 157–163.
35. Haracz, S.; Mróz, B.; Rybka, J.D.; Giersig, M. Magnetic behaviour of non-interacting colloidal iron oxide nanoparticles in physiological solutions. *Cryst. Res. Technol.* **2015**, 50.
36. Haracz, S.; Hilgendorff, M.; Rybka, J.D.; Giersig, M. Effect of surfactant for magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2015**, 364.
37. Runowski, M.; Goderski, S.; Paczesny, J.; Ksiezopolska-Gocalska, M.; Ekner-Grzyb, A.; Grzyb, T.; Rybka, J.D.; Giersig, M.; Lis, S. Preparation of Biocompatible, Luminescent-Plasmonic Core/Shell Nanomaterials Based on Lanthanide and Gold Nanoparticles Exhibiting SERS Effects. *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120.
38. Richter, M.; Trzeciak, T.; Rybka, J.D.; Suchorska, W.; Augustyniak, E.; Lach, M.; Kaczmarek, M.; Kaczmarczyk, J. Correlations between serum adipocytokine concentrations, disease stage, radiological status and total body fat content in the patients with primary knee osteoarthritis. *Int. Orthop.* **2017**, 41.
39. Wierzbinski, K.R.; Szymanski, T.; Rozwadowska, N.; Rybka, J.D.; Zimna, A.; Zalewski, T.; Nowicka-Bauer, K.; Malcher, A.; Nowaczyk, M.; Krupinski, M.; et al. Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. *Sci. Rep.* **2018**, 8.

Jakub Rybka