

---

# ***ZAŁĄCZNIK 2***

---

Autoreferat  
Opis Dorobku i Osiągnięć  
Naukowych

---

***Dr Sławomir Jaworski***

---

**Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt  
Wydział Nauk o Zwierzętach  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 161  
02-787 Warszawa**

Warszawa, 2019

## Spis treści

---

I.	Życiorys naukowy	3
II.	Działalność naukowa	5
a.	Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16. Ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zmi.): <b>„Biologiczna interakcja pomiędzy grafenem i jego pochodnymi a strukturą żywego organizmu ze szczególnym uwzględnieniem działania toksycznego i terapeutycznego”</b>	5
b.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	29
c.	Sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego	33
III.	Działalność dydaktyczna	37
IV.	Działalność organizacyjna	38
V.	Nagrody i wyróżnienia	39

## 1. Życiorys naukowy

### 1.1. Wykształcenie

2006- 2009	Studia licencjackie na Wydziale Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Absolwent kierunku Biologia, Uzyskany tytuł: licencjat (temat pracy: „Czy komórki graniczne korzenia pomidora przechodzą programowaną śmierć komórki?”), Promotor – dr Sylwia Fudali
2009 - 2011	Studia magisterskie na Wydziale Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Absolwent kierunku Biologia, specjalność: Biologia mikroorganizmów. Uzyskany tytuł: magister biologii (temat pracy: „Charakterystyka drożdży killerowych na przykładzie <i>Willopsis saturnus</i> ”), Promotor - dr hab. prof. SGGW Mieczysław Błaszczuk
2011 - 2015	Studia doktoranckie na Wydziale Nauk o Zwierzętach SGGW „Biotechnologia w produkcji zwierzęcej” w dyscyplinie: zootechnika
2015	Uzyskanie tytułu doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika (temat rozprawy doktorskiej: „Wpływ grafenu na modulację szlaku indukcji apoptozy komórek glejaka wielopostaciowego (Glioblastoma multiforme) dwu linii o różnych genotypach”), Promotor – prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg , praca wyróżniona

### 1.2. Doświadczenie zawodowe, szkolenia i staże

Doświadczenie zawodowe	
2015 – do chwili obecnej	Adiunkt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt, Zakład Nanobiotechnologii

<b>Szkolenia</b>	
22.02.2012	Step One/Step One Plus Real- Time PCR Instrument, Warszawa
18.04.2012	Warsztaty organizowane przez firmę MARS POLSKA z zakresu żywienia małych zwierząt, Sochaczew
10-13.09.2012	Letni Kurs Hodowli Komórek Zwierzęcych, Warszawa, Zakład cytologii, Wydział Biologii, UW.
18.04.2013.	Warsztaty z biologii molekularnej w czasie trwania III Konferencji Studenckiej pn. „Biotechnologia w Nano – wymiarze”; Werynia k. Rzeszowa,
16-19.09.2013	Warsztaty “Nano and Advances Materials Workshop and Fair”, Warszawa
02.12.2013.	Szkolenie na poziomie zaawansowanym z obsługi Malvern Zetasizer Nano ZS90, Warszawa
01.04.2014	Szkolenie „Skuteczna komunikacja z biznesem”, organizowane przez Urząd Marszałka Województwa Mazowieckiego w Warszawie
01.06.2014	Szkolenie „Zasady, regulacje prawne dotyczące własności intelektualnej oraz ochrony patentowej”, organizowane przez Urząd Marszałka Województwa Mazowieckiego w Warszawie
08.07.2014	Szkolenie „Własność intelektualna oraz ochrona patentowa”, organizowane przez Urząd Marszałka Województwa Mazowieckiego w Warszawie
22-28.08.2014	Warsztaty ”WILDLIFE BEAUTY, INSPIRATION, SCIENCE” Marloth and Kruger Park, RPA.
2015	Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie, wykonywanie procedur i doświadczeń na zwierzętach i uśmiercanie. Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach

	Laboratoryjnych (21-25.09.2015) – SGGW w Warszawie
2017	Szkolenie „Program SGGW wobec studentów niepełnosprawnych” w ramach projektu program unowocześniania kształcenia w SGGW
<b>Staż</b>	
01.11.2014 -31.01.2015	Staż naukowy, University of Copenhagen, Dania
01.07.2015 – 07.07.2015	International Summer School of Nanoscience & Nanotechnology ISSON, Saloniki, Grecja
04.03.2019 – 15.03.2019	Staż naukowy, Multiple Myeloma and New Drugs Investigation Unit, at The Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Hiszpania

## II. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA

---

### a. 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. nr. 65, poz. 595 ze zm.)

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl czterech, powiązanych tematycznie, oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w czasopiśmie naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (ICR) o łącznej punktacji **IF: 14,439** i **MNiSW: 125 pkt.**

**P1.** Sawosz E., Jaworski S., Kutwin M., Vadalasetty K.P., Grodzik M., Wierzbicki M., Kurantowicz N., Strojny B., Hotowy A., Lipińska L., Jagiełło J., Chwalibog A. 2015. Graphene Functionalized with Arginine Decreases the Development of Glioblastoma Multiforme Tumor in a Gene-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct; 16(10): 25214–25233. (**IF 3.257; 30pkt. MNiSW**); *liczba cytowań 13*

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował udział w opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu doświadczenia, pobieraniu prób do analiz oraz wykonaniu analiz, współudział w opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku. Swój udział szacuję na 54 %. Oświadczenie pozostałych autorów w Załączniku nr 6.*

**P2.** Jaworski S., Biniecka P., Bugajska Ż., Daniluk K., Dyjak S., Strojny B., Kutwin M., Wierzbicki M., Grodzik M., Chwalibog A. 2017. Analysis of the cytotoxicity of hierarchical nanoporous graphenic carbon against human glioblastoma grade IV cells. *Int J Nanomedicine*. 2017 May 18;12:3839-3849. **(IF 4,37; 35pkt. MNiSW); liczba cytowań 0**

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował udział w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, współudział w opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku. Swój udział szacuję na 70%. Oświadczenie pozostałych autorów w Załączniku nr 6.*

**P3.** Jaworski S., Wierzbicki M., Sawosz E., Jung A., Gielerak G., Biernat J., Jaremek H., Łojkowski W., Woźniak B., Wojnarowicz J., Stobiński L., Małolepszy A., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Łojkowski M., Kurantowicz N., Chwalibog A. 2018. Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent. *Nanoscale Res Lett*. 2018; 13: 116. **(IF 3,125; 30 pkt. MNiSW); liczba cytowań 1**

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował udział w tworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań, opracowaniu metodyki, opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku. Swój udział szacuję na 53%. Oświadczenie pozostałych autorów w Załączniku nr 6.*

**P4.** Jaworski S., Strojny B., Sawosz E., Wierzbicki M., Grodzik M., Kutwin M., Daniluk K., Chwalibog A. 2019. Degradation of Mitochondria and Oxidative Stress as the Main Mechanism of Toxicity of Pristine Graphene on U87 Glioblastoma Cells and Tumors and HS-5 Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20(3), 650. **(IF 3,687 ; 30 pkt. MNiSW); liczba cytowań 0**

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował udział w tworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań, opracowaniu metodyki, opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku, korespondowaniu z redakcją czasopisma. Swój udział szacuję na 80%. Oświadczenie pozostałych autorów w Załączniku nr 6.*

**Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych (P1-P5) wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w Załączniku nr 6.**

Współczynnik Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (ICR) zgodny z rokiem ukazania się pracy. Liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy.

**a. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

**Uzasadnienie badań**

Jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin nauki jest nanobiotechnologia obejmująca dziedziny wiedzy badające i kontrolujące struktury, procesy oraz funkcje systemów biologicznych w nanoskali. Nanomateriały, a w tym i nanocząstki otwierają nowe możliwości badawcze i aplikacyjne w biologii i medycynie. Aktualnie prowadzone badania dotyczące wykorzystania nanostruktur obejmują dostarczanie leków, działanie antynowotworowe, wykorzystanie w budowie biosensorów, jako potencjalnego środka przeciwbakteryjnego czy rusztowania dla inżynierii tkankowej. Nanostruktury zajmują również niezwykle ważną pozycję w wielu gałęziach przemysłu. Według bazy nanoproduktów The Nanodatabase (<http://www.nanodb.dk>) na rynek europejski wprowadzono już ponad 3 tysiące takich produktów. Wymusza to konieczność ewaluacji wpływu nanocząstek i nanomateriałów na organizmy żywe.

Jednym z materiałów cieszących się szczególną uwagą jest grafen oraz jego pochodne. Grafen jest jedną z alotropowych form węgla składającą się z pojedynczej warstwy atomów węgla połączonych wiązaniami  $sp^2$  tworzących heksagonalny układ. Unikalne cechy materiałów opartych na grafenie (m.in. grafen naturalny, tlenek grafenu, zredukowany tlenek grafenu, kropki kwantowe grafenu, nanowstęgi grafenu, trójwymiarowa pianka grafenowa i wiele innych) takie jak duża powierzchnia właściwa, wyjątkowe właściwości elektryczne, termiczne, optyczne oraz wysoka wytrzymałość mechaniczna dają możliwość zastosowania grafenu w nanomedycynie jako środka o działaniu terapeutycznym lub transportera dla leków czy biomolekuł.

Wyniki przeprowadzonych badań dotyczących wpływu różnych form grafenu (grafenu naturalnego, tlenku grafenu, kubicznych sfer grafenowych) na stan morfologiczno-funkcjonalny, z wykorzystaniem trzech modeli: mikroorganizmów (w tym komórek bakteryjnych i drożdży), komórek eukariotycznych prawidłowych (ludzkie komórki zrębu szpiku kostnego linii HS-5 oraz fibroblasty linii L929 i PCS-201-010) i nowotworowych glejaka IV stopnia linii U87 oraz guzów glejaka IV stopnia wyhodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, przedstawiłem w monotematycznym cyklu prac stanowiących osiągnięcie, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.): **„Biologiczna interakcja pomiędzy grafenem i jego pochodnymi a strukturą żywego organizmu ze szczególnym uwzględnieniem działania toksycznego i terapeutycznego”**.

## Wstęp

Grafen jest płaską warstwą złożoną z pojedynczych atomów węgla tworzących dwuwymiarowe arkusze o sześciokątnym układzie atomów. Wyjątkową cechą grafenu jest to, że jego powierzchnia pokryta jest „chmurą” elektronów poruszających się z ogromną prędkością (Geim i Novoselov, 2007), co predysponuje ten materiał do potencjalnego oddawania elektronów oraz do tworzenia wiązań z innymi molekułami. Dodatkowo jest materiałem ultracienkim, a jednocześnie bardzo wytrzymałym mechanicznie (Ferrari i wsp., 2015). Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości fizykochemiczne nanomateriały grafenowe (GFM, ang. Graphene Family Materials) są szeroko stosowane w wielu dziedzinach, również w badaniach biomedycznych (Reina i wsp., 2017). Obecnie zostało przeprowadzonych wiele badań w celu określenia toksyczności i biokompatybilności GFM na modelach in vivo i in vitro. GFM mogą cechować się różnym stopniem toksyczności zależny od badanego materiału grafenowego, wykorzystywanych modeli czy drogi podania. Rodzina materiałów grafenowych obejmuje m.in. grafen naturalny, tlenek grafenu, zredukowany tlenek grafenu, grafenowe kropki kwantowe i grafenowe (Guo i Mei, 2014). Toksyczność poszczególnych materiałów zależy od rozmiaru, struktury powierzchni, funkcjonalizacji, ładunku, zanieczyszczenia, agregacji i efektu koronowego (Loh i wsp., 2010) Ponadto ujawniono kilka typowych mechanizmów leżących u podstaw toksyczności GFM takich jak fizyczne zniszczenie, stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA, apoptoza, autofagia i nekroza (Ou i wsp., 2016). Badania Zhang i wsp. (2010) wykazały, że warstwy



grafenu wywołują efekty cytotoksyczne i że te efekty są zależne od stężenia i kształtu. Ponadto Chatterjee i wsp. (2014) dowiedli, że nieutlenione formy grafenu są bardziej toksyczne niż tlenek grafenu, na komórki linii HepG2. Modyfikacje powierzchni grafenu (dodatek grup tlenowych, glikolu polietylenowego, biopolimerów) poprawiły rozpuszczalność i znacznie zmniejszyły toksyczność GFM (Sasidharan i wsp., 2011).

Jednym z potencjalnych zastosowań grafenu w medycynie jest terapia antynowotworowa. Konwencjonalne opcje terapeutyczne, w tym chemioterapia i radioterapia, są najczęściej stosowane w leczeniu raka. Jednak te metody dają niskie wskaźniki sukcesu i mają poważne negatywne skutki uboczne. Wymusza to konieczność poszukiwania nowych terapii eksperymentalnych, również z zastosowaniem zdobyczy nanotechnologii.

Grafen może zostać zastosowany jako fotouczulacz w terapii fototermicznej. Badania Hu i wsp. (2015) wykazały silniejsze działanie przeciwnowotworowe, oparte na terapii fototermicznej, w porównaniu do konwencjonalnych fotouczulaczy. Materiały grafenowe mają znaczny potencjał do zastosowania w środkach teranostycznych ze względu na wiele unikalnych właściwości jak wysoka powierzchnia właściwa, odpowiednie właściwości przesyłania energii i/lub elektronów, wysoka wydajność kwantowa fluorescencji, dobra zdolność do dyspergowania w wodzie (formy utlenione), duża skuteczność ładowania leku, selektywny pobór przez nowotwory, minimalne skutki uboczne i wysoka wydajność produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species) (Zhou i wsp., 2011). Za jeden z głównych mechanizmów toksyczności grafenu uważa się uszkodzenie mitochondriów oraz zwiększoną produkcję ROS. Li i wsp. (2012) stwierdzili, że grafen wykazuje działanie cytotoksyczne poprzez depolaryzację mitochondriów i wzrost wewnątrzkomórkowych ROS, aktywując mitochondrialną ścieżkę apoptozy. Takie zaburzenie działania mitochondriów może być związane z oksydacyjnym niszczeniem mitochondrialnych makrocząsteczek takich jak mitochondrialne DNA, lipidy czy białka. W badaniach Zhou i wsp. (2014) na ludzkich komórkach raka sutka linii MDA-MB-231, ludzkich komórek raka prostaty PC3 wykazano ponadto zahamowanie działania kompleksów I, II, III i IV łańcucha przenoszenia elektronów, najprawdopodobniej poprzez zakłócenie transferu elektronów pomiędzy centrami żelazo-siarkowymi, co jest związane z silniejszą zdolnością grafenu do przyjmowania elektronów w porównaniu do centrów żelazo-siarkowych (Zhou i wsp., 2014). Ominięcie mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów powoduje hamowanie fosforylacji oksydacyjnej i nadprodukcję ROS.

W badaniach Szmidta i wsp. (2019) wykazano ponadto, że dodatek tlenku grafenu do pożywki hodowlanej, powodował obniżenie ekspresji genów kodujących kompleksy białkowe odpowiedzialne za transfer elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym.

W badaniach z wykorzystaniem komórek glejaka IV stopnia linii U87 i U118 poddanych działaniu tlenkiem grafenu (GO) i zredukowanego tlenek grafenu (rGO), odnotowano zależną od dawki cytotoksyczność. Oba rodzaje płatków grafenu obniżyły żywotność komórek i proliferację, aczkolwiek rGO był bardziej toksyczny niż GO (Jaworski i wsp., 2015). Pobieranie grafenu przez komórki linii U87 oraz zależny od dawki efekt cytotoksyczny był również obserwowany w badaniach z wykorzystaniem zredukowanego tlenku grafenu funkcjonalizowanego glikolem polietylenowym (Akhavan, Ghaderi i Emamy, 2012). Podanie GO i rGO w formie hydrokoloidów do guzów glejaka wywodzących się z linii U87, hodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, spowodowało zmniejszenie masy i objętości guzów glejaka wielopostaciowego w obu badanych grupach. W grupie GO zaobserwowano spadek masy o 41% i objętości o 43%, natomiast w grupie rGO spadek masy wynosił 35%, a objętości do 42%, w porównaniu do guzów z grupy kontrolnej. Dodatkowo analiza markerów apoptozy wykazała wzrost ekspresji kaspazy 3, co niepodważalnie świadczy o aktywacji procesu apoptozy (Jaworski *et al.*, 2015).

Kolejnym z potencjalnych zastosowań grafenu, wynikającym z indukcji stresu oksydacyjnego, niszczenia błon komórkowych poprzez ostre krawędzie oraz immobilizacji komórek na powierzchni płatków grafenu, jest działanie antybakteryjne. Jednym z najbardziej obiecujących czynników antydrobnoustrojowych, skierowanych przeciwko bakteriom antybiotykoopornym, mogą być modyfikowane powierzchniowo materiały z nanocząstkami i nanokompozytami o działaniu bakteriobójczym. Obecnie niektóre szczepy stały się odporne na praktycznie wszystkie powszechnie dostępne środki: beta-laktamy, tetracykliny i aminoglikozydy (Jang, 2016). Głównymi opornymi patogenami są oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, oporny na wankomycynę *Enterococcus* i *Klebsiella pneumoniae* produkujący beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania i *Escherichia coli* (Mathur i Singh, 2013). Co więcej, bakterie odporne na antybiotyki są w stanie przekazywać geny oporności w wyniku horyzontalnego transferu genów na inne daleko spokrewnione bakterie, które następnie mogą przekazywać geny oporności kolejnym pokoleniom. Tak więc pojawienie się bakterii opornych na antybiotyki stanowi poważny problem, który można przezwyciężyć przez opracowanie nowych środków przeciwdrobnoustrojowych.

Nanomateriały i nanocząstki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, takie jak srebro, miedź, fulereny, jednościenne nanorurki węglowe oraz grafen mogą oferować szereg korzyści ze względu na ich wyjątkowe właściwości fizykochemiczne i dużą powierzchnię właściwą (Chwalibog i wsp., 2010; Lara i wsp., 2011; Dar, Ingle i Rai, 2013). Zgodnie z obecnymi badaniami, głównymi procesami leżącymi u podłoża antybakteryjnego działania nanomateriałów są perforacja komórkowej bakterii, uwalnianie jonów metali, wytwarzanie ROS oraz interakcje z DNA i białkami bakteryjnymi (Nagy *et al.*, 2011; Wang, Hu and Shao, 2017). Grafen, jako materiał posiadający dwie aktywne strefy: krawędzie oraz powierzchnie, może dołączać cząsteczki biologiczne do jego krawędzi i przylegać do powierzchni komórki wykazując plastyczną adhezję do różnych struktur biologicznych, w tym komórek bakteryjnych (Kurantowicz *et al.*, 2015). Utleniona postać grafenu (GO), łatwo dysperguje w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych ze względu na obecność grup tlenowych, co może być dodatkowym atutem w zastosowaniu tej formy grafenu jako czynnika antybakteryjnego. Do tej pory wykazano silne działanie przeciwbakteryjne GO. Aktywność przeciwbakteryjną GO przypisano oddziaływaniu z błonami komórkowymi mechanicznym ich uszkodzeniu (Akhavan i Ghaderi, 2010). Dodatkową zaletą GFM jest łatwość funkcjonalizacji, a dodatek innych substancji może zwiększyć działanie przeciwdrobnoustrojowe. Najnowsze badania wskazują, że kompozyty grafenowe mogą być wykorzystane jako obiecujące materiały przeciwbakteryjne (Seil i Webster, 2012). Nanokompozyty mogą przewyżczyć ograniczenia poszczególnych składników. Nanomateriały przeciwbakteryjne dołączone do płatków grafenu są bardziej stabilne i dobrze zdyspergowane (Halouane i wsp., 2017). Nanokompozyty te mogą zawierać metale, tlenki metali, polimery, antybiotyki.

Na podstawie przedstawionego wyżej przeglądu dostępnej literatury naukowej oraz własnych badań realizowanych we wcześniejszych doświadczeniach badawczych, podjąłem się realizacji eksperymentów, których **celem było określenie wpływu wybranych form nanomateriałów grafenowych - GFM (grafenu naturalnego, tlenku grafenu, kubicznych sfer grafenowych) na stan morfologiczno-funkcjonalny struktur biologicznych, z wykorzystaniem trzech modeli o różnym stopniu organizacji, w celu weryfikacji przydatności GFM w badaniach biomedycznych oraz w celu określenia mechanizmów generowanych przez GFM w komórkach i tkankach.**

W monotematycznym cyklu czterech publikacji naukowych składających się na główne osiągnięcie mojego dorobku naukowego dokonano analizy:

- toksyczności grafenu naturalnego (GPs) i kubicznych sfer grafenowych (HNC) poprzez zbadanie żywotność i zmian w metabolizmie komórek prawidłowych (fibroblasty linii L929 i PCS-201-010 oraz mezenchymalne komórki zrębu szpiku kostnego linii HS-5) i nowotworowych (komórki glejaka IV stopnia linii U87)
- toksyczności grafenu naturalnego na guzy glejaka wielopostaciowego linii U87, wyhodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury
- wpływu funkcjonalizacji grafenu (poprzez aminokwasy i/lub nanocząstki srebra) na wzmocnienie efektu terapeutycznego
- antybakteryjnego działania tlenku grafenu oraz nanokompozytów tlenku grafenu dekorowanych nanocząstkami srebra

Podstawowym celem zrealizowanych badań była ocena przydatności grafenu jako materiału, który może zostać wykorzystany w nanomedycynie.

## **Material i Metody**

### **GFM**

W badaniach wykorzystano cztery rodzaje płatków grafenu: naturalny (pristine, GPs), tlenek grafenu (GO), zredukowany tlenek grafenu (rGO), kubiczne sfery grafenowe (HNC). Badane GFM wykazywały istotne różnice fizyko-chemiczne (tabela 1). GPs zakupiono w firmie Skyspring Nanomaterials (Houston, Stany Zjednoczone), GO pozyskano z Laboratorium Grafenowego Politechniki Warszawskiej, rGO pozyskano z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych (ITME) w Warszawie a HNCs z Wojskowej Akademii Technicznej. Wszystkie rodzaju grafenu miały formę proszków. Proszki zawieszano w wodzie (o przewodności 18,3 MΩ x cm) oraz poddawano sonikacji w celu utworzenia roztworów koloidalnych. Wielkość oraz kształt płatków określono poprzez wizualizację z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JOEL Ltd., Tokio, Japonia) transmisyjnego mikroskopu skaningowego (FEI, Hillsboro, USA) oraz mikroskopu sił atomowych (Asylum MFP-3D Bio AFM, Oxford Instruments, UK). Dodatkowo zbadano potencjał Zeta koloidów GFM z użyciem Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Wielka Brytania). Analizę spektroskopową FT-IR przeprowadzono przy wykorzystaniu

spektrometru Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, USA) Podstawowe właściwości fizykochemiczne zastosowanych nanopłatków grafenu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości fizykochemicznych nanopłatków grafenu zastosowanych w badaniach.

	Grafen naturalny GPs	Tlenek grafenu GO	Zredukowany tlenek grafenu rGO	Kubiczne sfery grafenowe HNC
<b>Czystość</b>	> 99,5 %	> 99%	> 99%	> 99 %
<b>Wielkość</b>	450 nm - 1,5 µm	263 nm - 2,0 µm	100 nm - 1,5 µm; aglomeraty od 5 µm	100-150 nm
<b>Potencjał Zeta</b>	-9,61 mV	-41,0 mV	-19,3 mV	-26,8 mV
<b>Metoda produkcji</b>	eksfoliacja	zmodyfikowana metoda Hummersa	redukcja chemiczna tlenku grafenu	metoda wg. Dyjak i wsp. (2016)
<b>Konfiguracja atomów</b>	sp2	sp2 i sp3	sp2	sp2
<b>Zachowanie w wodnym roztworze</b>	hydrofobowy	hydrofilowy	hydrofobowy	hydrofobowy

## Modele badawcze

W pracy wykorzystano trzy modele biologiczne, o różnym stopniu organizacji

1. mikrobiologiczny, w tym bakterie *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), oraz *Escherichia coli* (ATCC 25922) oraz drożdże *Candida albicans* (ATCC 90028) pozyskano z firmy LGC Standards (Lomianki, Poland). Mikroorganizmy hodowano na podłożach hodowlanych (Merck

Millipore, Darmstadt, Germany): tryptic soy agar dla *S. aureus* i *E. coli*, brain heart agar dla *S. epidermidis*) oraz Sabouraud's agar dla *C. albicans*, w temperaturze 37°C.

2. model in vitro – linie komórek prawidłowych (ludzkie komórki zrębu szpiku kostnego linii HS-5 oraz fibroblasty linii L929 i PCS-201–010) i nowotworowych glejaka IV stopnia linii U87. Linie komórkowe hodowano w plastikowych naczyniach przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych, z wykorzystaniem pożywki Dulbecco zmodyfikowanej przez Eagle'a (ang. Dulbecco's modified Eagle's culture medium; DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), wzbogaconej 10% bydlęcą surowicą płodową (Sigma-Aldrich®) z dodatkiem 1% penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich®). Hodowle prowadzone były w inkubatorze do hodowli komórkowych (NuAir; Minnessota, USA) zapewniającym stałe warunki temperatury i dwutlenku węgla (temp.37°C, CO2 5%).
3. model guzów glejaka IV stopnia hodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Do hodowli guzów wykorzystane zostały zapłodnione jaja kurze linii Ross 308. W siódmym dniu rozwoju zarodka na CAM został nałożony silikonowy krążek, do wnętrza którego naniesiono 30 µl zawiesiny zawierającej  $3 \times 10^6$  komórek glejaka IV stopnia linii U87. Rozwijające się zarodki przeniesiono do inkubatora. Po 10 dniach dalszej inkubacji wyhodowane guzy zostały losowo podzielone na trzy grupy badawcze po 40 osobników każda.

### **Metody analityczne**

W pracy zastosowano następujące metody analityczne:

- Analiza potencjału Zeta badanych GFM z użyciem Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Malvern, Worcestershire, Wielka Brytania).
- Analiza spektroskopowa FT-IR z wykorzystaniem spektroskopu Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Wizualizacja GFM z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JOEL Ltd., Tokio, Japonia), skaningowego mikroskopu elektronowego (FEI, Hillsboro, USA) i mikroskopu sił atomowych (Asylum MFP-3D Bio AFM, Oxford Instruments, UK)

- Analiza morfologii komórek poddanych działaniu wybranych GFM oraz mikrostruktury guzów glejaka wielopostaciowego linii U87 z zastosowaniem mikroskopu świetlnego (Leica, Wetzlar, Niemcy).
- Analiza makrostruktury guzów glejaka wielopostaciowego linii U87 z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego (Olympus, Tokio, Japonia).
- Analiza śmierci komórki (apoptoza/nekroza) z użyciem cytometru przepływowego (Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy; SimulSet soft-ware).
- Analiza ekspresji wybranych genów z wykorzystaniem Light Cycler® 480 system (Roche Applied Science, Penzberg, Niemcy).
- Izolacja białka całkowitego przy użyciu Tissue Lyser LT (Qiagen, Hilden, Niemcy). Oznaczenie ilościowe białek metodą Western blott oraz protein arrays (System Mini Protein Gel, Bio-Rad Laboratories, Munich, Niemcy) z użyciem kamery do wizualizacji GelDoc (Bio-Rad Laboratories) oraz za pomocą testów ELISA z wykorzystaniem spektrofotometru płytkowego Infinite M200 (Tecan Group AG, Mannedorf, Niemcy) .
- Analiza toksyczności wybranych GFM na badane komórki (śmiertelność, integralność błon, produkcja ROS, polaryzacja błon mitochondrium) z wykorzystaniem spektrofotometru płytkowego Infinite M200 (Tecan Group AG, Mannedorf, Niemcy)
- Analiza ultrastruktury komórek i guzów glejaka wielopostaciowego z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JOEL Ltd., Tokio, Japonia).
- Analiza statystyczna - wyniki analizowano w układzie analizy wariancji jednoczynnikowej i dwuczynnikowej z zastosowaniem programu Statgraphics Centurion (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Stany Zjednoczone, 2009). Różnice o  $P < 0,05$  uznawano za istotne statystycznie.

## **Układ doświadczeń**

Przeprowadzono trzy panele doświadczeń (ryc. 1), których celem były:

I. ocena toksyczności nanopłatków grafenu naturalnego, zredukowanego tlenku grafenu, zredukowanego tlenku grafenu funkcjonalizowanego arginina, zredukowanego tlenku grafenu

sfunkcjonalizowanego proliną na komórki glejaka IV stopnia linii U87 oraz komórki nienowotworowe: fibroblasty linii L929 i PCS-201-010 oraz ludzkie komórki zrębu szpiku kostnego linii HS-5 (**P 1: Sawosz, Jaworski i wsp., 2015, P2: Jaworski i wsp., 2017, P4: Jaworski i wsp., 2019**);

II. ocena morfologii, struktury guzów, wywodzących się z linii komórkowej U87, wyhodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, poddanych działaniu wybranych GFM (grafenu naturalnego, zredukowanego tlenku grafenu, zredukowanego tlenku grafenu sfunkcjonalizowanego arginina, zredukowanego tlenku grafenu sfunkcjonalizowanego proliną). W badania dokonano analizy toksyczności badanych GFM na guzy glejaka IV ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów typu śmierci komórki (**P1: Sawosz, Jaworski i i wsp., 2015; P4: Jaworski i wsp., 2019**);

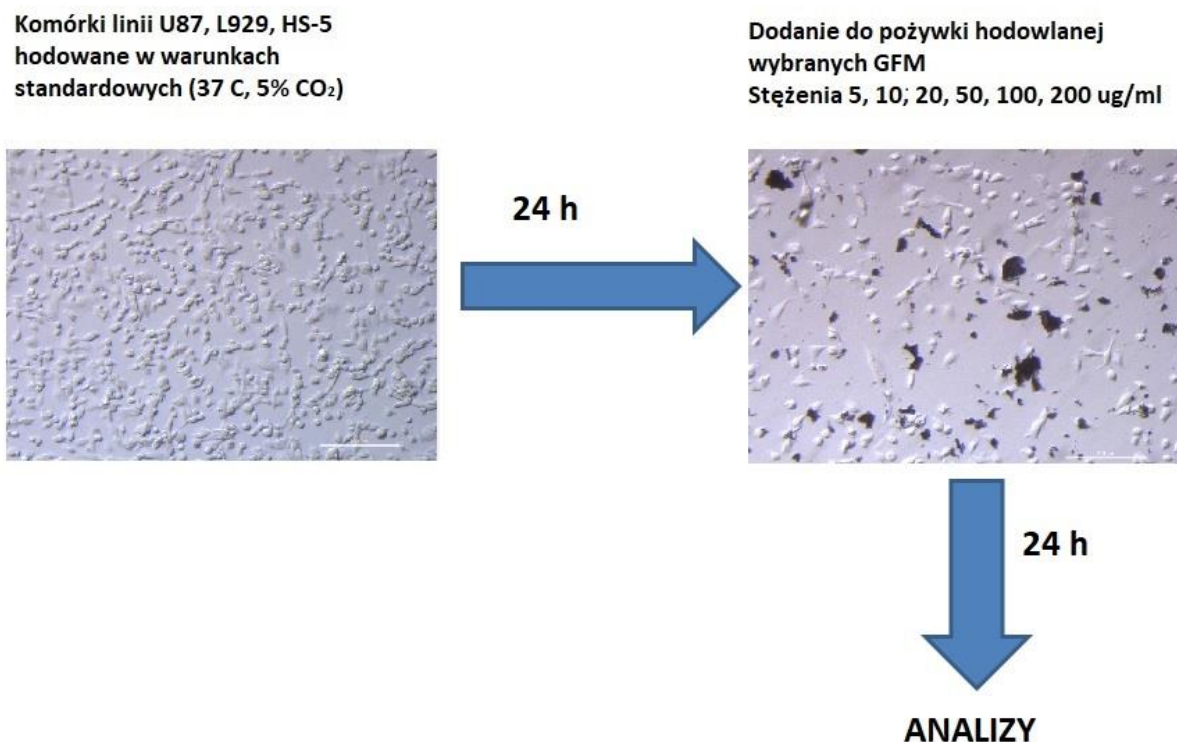
III. ocena antydrobnoustrojowego działania powierzchni pokrytych tlenkiem grafenu oraz tlenkiem grafenu dekorowanego nanocząstkami srebra (**P3: Jaworski i wsp., 2018**).

Celem panelu I (ryc. 1) było określenie toksyczności i dawkozależności nanopłatków grafenu naturalnego, tlenku grafenu i zredukowanego tlenku grafenu na komórki glejaka wielopostaciowego linii U87 i U118 w badaniach in vitro poprzez zbadanie: morfologii, żywotności, śmiertelności, produkcji ROS, typu śmierci komórki.

Hodowle komórkowe glejaka IV stopnia linii U87, mysich fibroblastów linii L929 oraz komórek mezenchymalnych zrębu szpiku kostnego linii HS-5 prowadzono w butelkach hodowlanych o pojemności 75 ml, do uzyskania 70 - 80% pokrycia podłoża. Po trypsynizacji komórek zawartość butelki nanoszono na sześciodołkową płytkę hodowlaną, po 300  $\mu$ l na dołek (w przypadku oceny morfologii komórek, analizy potencjału mitochondriów analizy Real-time PCR, dopełniając następnie płynem hodowlanym DMEM do 3 ml) lub na płytkę 96-dołkową, po 100  $\mu$ l na dołek (w przypadku pozostałych testów: oceny żywotności, śmiertelności, produkcji ROS ). Naczynia hodowlane przechowywano w inkubatorze (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przez 24 godziny. Po tym czasie płyn hodowlany znad komórek podmieniono na DMEM z dodatkiem wybranych GFM w stężeniach 5, 10, 20, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml. Na tak przygotowanych komórkach wykonano: test żywotności XTT (Life Technologies, Taastrup, Dania), analizę produkcji reaktywnych form tlenu za pomocą odczynnika DCF-DA (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), analizę potencjału mitochondriów za pomocą testu JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). Zbadano również



morfologię komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy) i mikroskopu holograficznego Nanolive 3D Cell Explorer STEVE Software (Nanolive, Ecublens, Switzerland) oraz ultrastrukturę z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JOEL Ltd., Tokio, Japonia). Schematyczny układ doświadczenia 1 przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat doświadczeń przeprowadzonych na komórkach w ramach panelu I.

Celem panelu II była ocena toksyczności grafenu naturalnego, zredukowanego tlenku grafenu, zredukowanego tlenku grafenu sfunkcjonalizowanego arginina, zredukowanego tlenku grafenu sfunkcjonalizowanego proliną na guzy glejaka wielopostaciowego linii U87, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów śmierci komórki.

Doświadczenia zostały przeprowadzone na zarodkach kury linii Ross 308. Siódmego dnia rozwoju zarodkowego na błonę kosmówkowo-omoczniową naniesiono 30 µl zawiesiny zawierającej  $3 \times 10^6$  komórek glejaka wielopostaciowego linii U87. Po 10 dniach inkubacji w 37°C wyhodowane guzy zostały podzielone na grupy badawcze po 40 osobników każda. Po trzech dniach guzy poddano resekcji i przeprowadzono analizy (ryc. 2). Wyhodowane

guzy obserwowano i fotografowano mikroskopem stereoskopowym (SZX10, Olympus, Tokio, Japonia). Objętość guza została wyznaczona poprzez analizę powierzchni z użyciem programu CellSens Dimension Deskop wersja 1,3 (Olympus, Tokio, Japonia). Analizy histologiczne po uprzednim wykonaniu barwienia hematoksylina-eozyna (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) przeprowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego (Leica Microsystems GmbH, Wetlar, Niemcy). Ultrastruktura guzów została zbadana przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (Ltd., Tokio, Japonia). Analizę markerów apoptozy, nekrozy, stanu zapalnego oraz białkowych kompleksów mitochondrialnych wykonano z wykorzystaniem technik Real-Time PCR, ELISA, Western Blot oraz z wykorzystaniem membran do analizy białek (Protein Array, Abcam, Cambridge, UK) Schematyczny układ doświadczenia 2 przedstawiono na rycinie 2.

### **Nałożenie komórek linii U87 na CAM**



**Inkubacja 10 dni**



### **Iniekcja GFM do guzów**



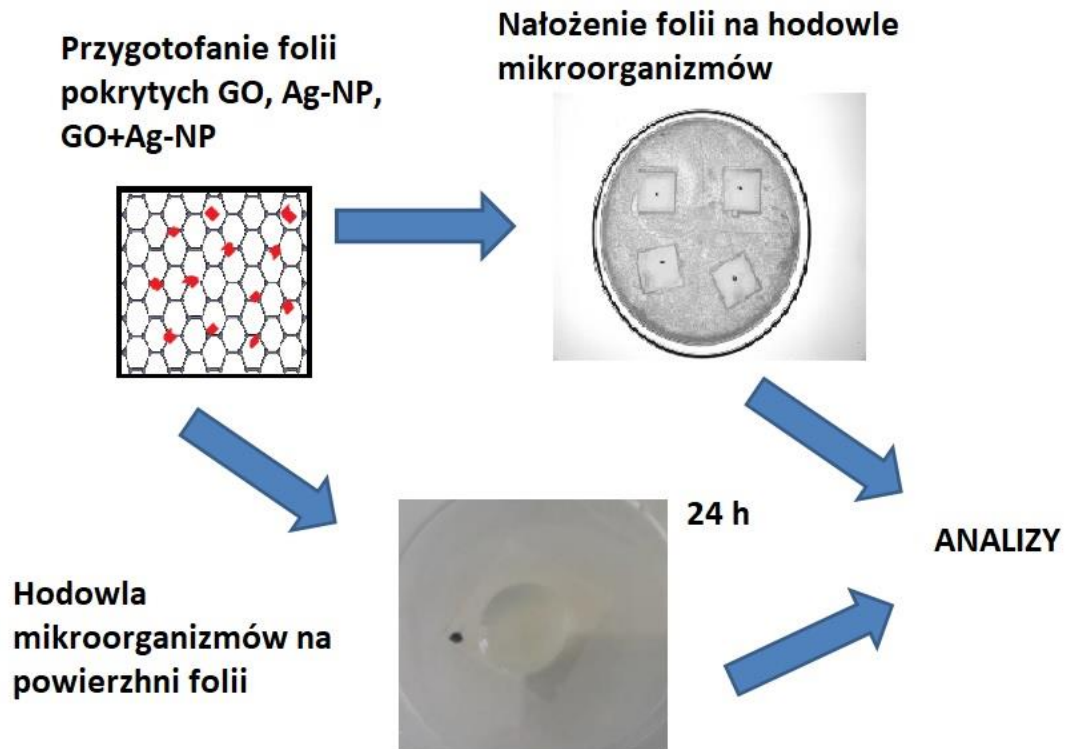
**Inkubacja 3 dni**

**ANALIZY**



Rycina 2. Schemat doświadczeń przeprowadzonych na komórkach w ramach panelu II.

Celem panelu III była ocena antydrobnoustrojowego działania materiałów (folii poliuretanowej) pokrytych tlenkiem grafenu i kompozytem tlenku grafenu dekorowanego nanocząstkami srebra, w odniesieniu do samych nanocząstek srebra (Ag-NPs). Do pokrywania folii poliuretanowych stosowano zawiesiny Ag-NPs (HydroSilver1000, Amepox, Łódź, Polska) i GO. Zawiesiny GO-Ag (GO (200  $\mu\text{g}$  / ml), Ag-NPs (100  $\mu\text{g}$  / ml), GO (200  $\mu\text{g}$  / ml) + Ag-NP (100  $\mu\text{g}$  / ml) były przygotowane w wodzie dejonizowanej (przewodnictwo 0,09  $\mu\text{S}$  / cm). Proces powlekania folii poliuretanowej przeprowadzono za pomocą sondy ultradźwiękowej (Ti Horn,  $\text{\O}$  13 mm, 60% wydajności, 20 kHz, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA). Temperatura procesu wynosiła  $30 \pm 1$  ° C. Pokryte próbki przepłukano w dejonizowanej wodzie i wysuszono w komorze laminarnej, a następnie zapakowano w sterylne opakowania. Zawiesiny bakterii i drożdży przygotowano z nocnych hodowli i rozcieńczono do  $10^6$  CFU/ ml. Inokulum zaszczerpiono równomiernie na powierzchni agaru Mueller-Hinton (MH) na płytkach Petriego metodą posiewu powierzchniowego. Sterylne folie pokryte GO, Ag-NP i GO-Ag zostały naniesione na powierzchni agaru. Folie bez nanocząstek były używane jako grupa kontrolna. Wzrost bakterii i drożdży pod foliami analizowano po 24 godzinach inkubacji w 37 ° C. W celu analizy żywołności (PrestoBlue Cell Viability Reagent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), integralności błon (In Vitro Toxicology Assay Kit, lactic dehydrogenase based, Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), produkcji ROS (Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) zawiesiny bakterii i drożdży hodowano na foliach powleczonych GO, Ag-NP i GO-Ag umieszczonych na wstawkach wprowadzonych do 6-studzienkowych płytek (200  $\mu\text{L}$  bulionu MH zawierającego  $5 \times 10^3$  komórek na folię) i inkubowano przez 24 godziny (rycina 3). Wzrost bakterii na foliach analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, FEI Quanta 200, Tokyo, Japonia).



Rycina 3. Schemat doświadczeń przeprowadzonych na komórkach w ramach panelu III.

### Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe

**P1. Sawosz E., Jaworski S., Kutwin M, Vadalasetty K.P., Grodzik M, Wierzbicki M., Kurantowicz N., Strojny B., Hotowy A., Lipińska L., Jagiello J., Chwalibog A. 2015. Graphene Functionalized with Arginine Decreases the Development of Glioblastoma Multiforme Tumor in a Gene-Dependent Manner. Int J Mol Sci. 2015 Oct; 16(10): 25214–25233.**

Postawiliśmy hipotezę, że przeciwdziałanie aglomeracji grafenu w tkance / komórkach może zwiększyć zakres aktywności grafenu. Dlatego zbadaliśmy inny trend w stosowaniu grafenu przeciwnowotworowego, w którym grafen jako lek przeciwnowotworowy jest dostarczany i rozprowadzany przez związki organiczne (aminokwasy), które również wspierają działanie przeciwnowotworowe grafenu. Doświadczenia przeprowadzono na modelach: in vitro z komórkami glejaka linii U87 i in vivo z guzami glejaka hodowanymi na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Pomiary obejmowały morfologię komórek,

śmiertelność, żywotność, morfologię guza, histologię i ekspresję genów. We wstępnych eksperymentach z komórkami glejaka IV stopnia linii U87 oraz fibroblastami linii L929 odnotowano zmienioną morfologię komórek poddanych działaniu rGO, w odniesieniu do grup kontrolnych (dla każdej linii). Zauważono mniejszą liczbę komórek, a komórki do których dołączyły się aglomeraty grafenu cechowały się obkurczonym ciałem i mniejszą liczbą wypustek. rGO znacząco ( $p < 0,05$ ) zmniejszył żywotność obu linii komórkowych w porównaniu z grupami kontrolnymi. Jednak obniżenie żywotności było bardziej widoczne dla komórek U87. Pomiarы śmiertelności wykazały, że rGO istotnie ( $p < 0,05$ ) zwiększyły liczbę martwych komórek w porównaniu z grupą kontrolną. Po dodaniu rGO do pożywki hodowlanej, żywotność komórek U87 została zmniejszona, ale funkcjonalizacja grafenu za pomocą argininy (Arg) i proliny (Pro) zmniejszyła efekt cytotoksyczny.

rGO i rGO funkcjonalizowane arginina i prolina znacząco zmniejszały masę guzów. Objętość guzów po iniekcji hydrokoloidami rGO, rGO+Arg i rGO+Pro zmniejszyła się w porównaniu z kontrolą; jednak największą redukcję zaobserwowano w przypadku rGO. Mikrostruktura guzów poddanych działaniu rGO wskazywała obecność aglomeratów grafenu w tkance. rGO był losowo dystrybuowany w centralnym obszarze guza. Mikrostruktura guzów po iniekcji rGO+Arg i rGO+Pro wyglądała inaczej. W grupie rGO + Arg grafen został ulokowany w zewnętrznej warstwie nowotworu, często zlokalizowany w pobliżu małych naczyń krwionośnych i komórek mikrogleju. W guzach poddanych działaniu rGO + Pro agregacja cząstek grafenu została znacznie zmniejszona, a płatki grafenu zostały równomiernie rozlokowane na obszarze guza. W guzach poddanych działaniu rGO odnotowano istotnie statystyczny wzrost ekspresji TP53, MDM2, COX6, NQO1, CASP3 na poziomie mRNA. Niewątpliwie aminokwasy ukierunkowały rozkład grafenu w obrębie guza. Ponadto arginina, ale nie prolina, wzmacniała aktywność przeciwnowotworową rGO na poziomie molekularnym. Jednak rGO+Arg nie zwiększyła ekspresji TP53 i MDM2 (kluczowego białka wiążącego i dezaktywującego p53). Ponadto iniekcja rGO+Arg spowodowała wzrost ekspresji na poziomie mRNA COX6 i CASP3 (odpowiedzialnej za proces apoptozy) nawet w porównaniu do guzów poddanych działaniu samego rGO. Najważniejszym wynikiem było to, że rGO+Arg silnie zwiększyła ekspresję NQO1 w tkance nowotworowej, co mogło zmniejszyć wytwarzanie wolnych rodników.

**P2. Jaworski S., Binińska P., Bugajska Ż., Daniluk K., Dyjak S., Strojny B., Kutwin M., Wierzbicki M., Grodzik M., Chwalibog A. 2017. Analysis of the cytotoxicity of hierarchical nanoporous graphenic carbon against human glioblastoma grade IV cells. Int J Nanomedicine. 2017 May 18;12:3839-3849.**

Celem było przetestowanie aktywności biologicznej HNC w hodowli komórkowej *in vitro* poprzez zbadanie zmian w morfologii i żywotności komórek oraz określenie ilościowej śmierci komórek. Nowo wyprodukowane, kubicznych sfer grafenowe, zbadane zostały po raz pierwszy w modelu biologicznym. W eksperymentach z fibroblastami linii PCS-201-010 i komórkami glejaka IV stopnia linii U87 odnotowano, że morfologia komórek po podaniu do pożywki hodowlanej kubicznych sfer grafenowych (HNC) różniła się od morfologii grupy kontrolnej. Zaobserwowano mniejszą liczbę komórek z przylegającymi do ciała komórek aglomeratami HNC. Analiza ultrastruktury komórek poddanych działaniu HNC wykazała różnice w morfologii struktur komórkowych: retikulum endoplazmatyczne było mniej widoczne, a grzebienie mitochondrialne uległy degradacji. Ujawniono również aglomeraty HNC wewnątrz komórek w cytoplazmie i w endosomach. Analiza żywotności, z wykorzystaniem testu Presto Blue, wykazała odmienny wpływ HNC na żywotność komórek glejaka IV stopnia linii U87 i fibroblastów linii PCS-201-010. Wzrost stężenia HNC w pożywce skutkowałam spadkiem żywotności obu badanych linii. Jednak zmniejszenie żywotności komórek glejaka było znacznie wyższe niż komórek fibroblastów. Najniższą żywotność zaobserwowano przy stężeniu 100 µg/ml: 56% ± 3,4% dla komórek linii U87 i 82% ± 2,4% dla komórek linii PCS-201-010. Analiza typu śmierci komórki wykazała, że HNC indukuje proces apoptozy. W linii U87 traktowanej procentowy udział komórek apoptotycznych wynosił ok 38%, podczas gdy procentowy udział komórek nekrotycznych nie przekraczał 1%. Analiza zmian potencjału mitochondriów z wykorzystaniem wskazywała na depolaryzację mitochondriów. Analiza dwóch genów zaangażowanych w proces apoptozy: CASP3 i CASP9 wykazała istotnie statystyczny wzrost ekspresji na poziomie mRNA. Otrzymane wyniki wskazują, że cytotoksyczność cząstek HNC wzrasta wraz ze stężeniem. Kontakt między HNC a wewnętrznymi i zewnętrznymi błonami komórkowymi komórek glejaka może być główną przyczyną toksyczności. Co więcej, aktywują one tylko apoptozę poprzez szlak mitochondrialny, bez wywoływania martwicy. Przeprowadzone badania wskazują na potencjalną możliwość zastosowania HNC w terapii nowotworowej.

**P3. Jaworski S., Wierzbicki M., Sawosz E., Jung A., Gielerak G., Biernat J., Jaremek H., Łojkowski W., Woźniak B., Wojnarowicz J., Stobiński L., Małolepszy A., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Łojkowski M., Kurantowicz N., Chwalibog A. 2018. Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent. *Nanoscale Res Lett.* 2018; 13: 116.**

Celem przeprowadzonych doświadczeń była analiza antydrobnoustrojowego działania GO oraz kompozytu tlenku grafenu i nanocząstek srebra (GO+Ag-NP.) w porównaniu do samych nanocząstek srebra (Ag-NP). W prezentowanej publikacji GO, Ag-NP, oraz kompozyt GO+Ag-NP. naniesiono na folie poliuretanowe, a następnie zbadano działanie antydrobnoustrojowe tak przygotowanych nanomateriałów. Analiza SEM i AFM wykazała pokrycie powierzchni folii prawie w całości przez GO. Morfologia folii pokrytej Ag-NP wykazała niejednorodną powierzchnię folii, wynikającą z dużej agregacji nanocząstek srebra. Folia pokryta nanokompozytem GO+Ag-NP cechowała się bardziej jednolitą powierzchnią w porównaniu do folii pokrytej Ag-NP. Świadczy to o równomiernym rozlokowaniu nanocząstek srebra na płatkach tlenku grafenu, co jednocześnie zapobiega agregacji nanocząstek. Aktywność przeciwdrobnoustrojową folii pokrytych GO, Ag-NP i GO-Ag badano z wykorzystaniem następujących mikroorganizmów: *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* i *C. albicans*. Wyniki wykazały, że po inkubacji z mikroorganizmami, w temperaturze 37°C przez 24 godziny, folie hamowały wzrost wszystkich badanych mikroorganizmów, ale w różnym stopniu. Najlepszy efekt przeciwdrobnoustrojowy, w stosunku do wszystkich badanych drobnoustrojów, wykazała folia pokryta nanokompozytem GO+Ag-NP. Wzrost drobnoustrojów na foliach pokrytych GO i Ag-NP był nieco niższy w porównaniu do grupy kontrolnej (niepokryta folia poliuretanowa). Śmiertelność komórek rosnących na folii pokrytej GO-Ag-NP wynosiła odpowiednio 88,6% dla *E. coli*, 79,6% dla *S. aureus*, 76,5% dla *S. epidermidis* i 77,5% dla *C. albicans*. Wykazano również, że folie pokryte GO, Ag-NP i GO-Ag zakłócały funkcjonowanie i integralność błony komórkowej ze znaczącymi różnicami między grupami kontrolnymi a grupami Ag-NP i GO+Ag-NP. Największe uszkodzenie błon komórkowych obserwowano w grupach GO-Ag-NP: 66,3% dla *E. coli*, 59,4% dla *S. aureus*, 54,8% dla *S. epidermidis* i 48,5% dla *C. albicans*. Analiza produkcji ROS, za pomocą testu DCF-DA, wykazała, że folie pokryte Ag-NP i GO-Ag zwiększyły produkcję ROS wszystkich testowanych mikroorganizmów w porównaniu do grupy kontrolnej. Folia pokryta GO zwiększyła produkcję ROS tylko w przypadku *C. albicans*.

Najwyższą produkcję ROS zaobserwowano w grupie GO+Ag-NP. Nanokompozyty Ag-NP, GO i Ag-GO wykazały działanie przeciwdrobnoustrojowe, które jest silniejsze wobec bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*) w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *S. epidermidis*) i drożdży (*C. albicans*).

**P4. Jaworski S., Strojny B., Sawosz E., Wierzbicki M., Grodzik M., Kutwin M., Daniluk K., Chwalibog A. 2019. Degradation of Mitochondria and Oxidative Stress as the Main Mechanism of Toxicity of Pristine Graphene on U87 Glioblastoma Cells and Tumors and HS-5 Cells. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20(3), 650.**

Celem prowadzonych obserwacji było określenie toksyczności i dawkozależności grafenu naturalnego (GPs) na komórki glejaka IV stopnia linii U87 oraz ludzkich komórek mezenchymalnych zrębu szpiku kostnego linii HS-5 w badaniach in vitro poprzez zbadanie: morfologii, żywotności, produkcji ROS, potencjału mitochondrialnego oraz określenie toksyczności grafenu naturalnego na guzy glejaka IV stopnia linii U87, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów śmierci komórki. Analiza morfologii komórek wykazała zmiany w morfologii po dodaniu grafenu naturalnego do pożywki hodowlanej. Hodowle poddane działaniu grafenu charakteryzowały się mniejszą liczbą komórek oraz mniejszą liczbą wypustek komórkowych. W grupach traktowanych grafenem zauważono również komórki apoptotyczne. Żywotność komórek oceniano po 1, 4, 12 i 24 godzinach po ekspozycji. Po 1 h nie zaobserwowano wyraźnego efektu cytotoksycznego. Po dłuższym okresie ekspozycji wyższe stężenia grafenu w pożywce hodowlanej powodowały spadek żywotności. Najniższą żywotność po 24 h ekspozycji obserwowano przy stężeniu GP 200 µg/ml: 46% dla linii U87 i 40% dla linii HS-5. GPs istotnie ( $P < 0,05$ ) zwiększyło produkcję ROS komórek U87 i HS-5 w porównaniu z grupą kontrolną. Zwiększone stężenia GPs spowodowały zwiększenie produkcji ROS w obu liniach komórkowych. Analiza zmian potencjału mitochondriów wskazywała na depolaryzację mitochondriów po podaniu GPs do pożywki hodowlanej.

W guzach poddanych działaniu hydrokoloidu GPs na drodze iniekcji bezpośredniej odnotowano spadek masy i objętości guzów. Badanie ultrastruktury komórek guzów U87 ujawniło, że GP były zlokalizowane wewnątrz komórek, głównie w cytozolu. Komórki traktowane GPs wykazały umiarkowaną kondensację chromatyny, pęcznienie cytoplazmy oraz przerwanie ciągłości błony plazmatycznej. Odnotowano deformacje błon



mitochondrialnych i obrzęk mitochondriów. Ekspresja kaspazy-9 i kaspazy-3 w guzach po iniekcji GPs wzrosła odpowiednio o 67% i 84% w porównaniu z grupą kontrolną. Poziom białek zaangażowanych w metabolizm mitochondrialny (kompleks mitochondrialnego łańcucha oddechowego I-V: dehydrogenaza NADH, dehydrogenaza bursztynianowa, reduktaza ubichinolu-cytochromu-c, oksydoreduktaza cytochromu c i syntaza ATP) był istotnie niższy w guzach poddanych działaniu GPs. Zaobserwowano również istotny wzrost ekspresji genów na poziomie białka następujących cytokin: IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) i MCP-1.

Wyniki *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej glejaka U87 i prawidłowych komórek HS-5 wykazały, że GPs powoduje zależną od dawki cytotoksyczność poprzez nadprodukcję ROS i zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej. Dodatkowo poziom markerów apoptotycznych i nekrotycznych wzrósł w guzach poddanych działaniu GPs. Wyniki wskazują na potencjalną przydatność GP w leczeniu nowotworów, ale skutki uboczne dla normalnych komórek muszą być rozważane dalej.

## Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że cytotoksyczność GFM wzrasta wraz z ich stężeniem. Badane materiały grafenowe, podane do pożywki hodowlanej, wykazują dawkozależne działanie cytotoksyczne powodując zwiększenie śmiertelności komórek, obniżenie tempa proliferacji i zakłócenie integralności błon komórkowych oraz produkcję reaktywnych form tlenu. Kontakt między GFM a wewnętrznymi i zewnętrznymi błonami komórkowymi może być kluczową przyczyną toksyczności. Kubiczne sfery grafenowe i płatki zredukowanego tlenku grafenu wpływają na aktywację apoptozy, nie indukując jednocześnie nekrozy w komórkach glejaka IV stopnia linii U87. Płatki grafenu naturalnego, zredukowanego tlenku grafenu w ilości 500  $\mu\text{g/ml}$ , podawane do guzów glejaka IV stopnia linii U87 hodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, wpływają na regresję guzów, obserwowaną jako zmniejszenie ich masy i objętości. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są pierwszymi opisującymi wpływ wybranych materiałów grafenowych na komórki i guzy glejaka IV stopnia.

Postać fizyko-chemiczna grafenu (grafen naturalny, tlenek grafenu, zredukowany tlenek grafenu, kubiczne sfery grafenowe) wpływa na zróżnicowanie biologicznej reakcji komórek i tkanek poddanych jego działaniu. Modyfikacje powierzchni grafenu (grupy tlenowe, aminokwasy) zwiększają jego dyspersję i ułatwiają penetrację tkanek.

Tlenek grafenu, dzięki wysokiej rozpuszczalności jaką wykazuje w roztworach wodnych i fizjologicznych, jest użyteczną platformą do transportu/utrzymania na swojej powierzchni substancji o działaniu terapeutycznym. Nanokompozyty tlenku grafenu dekorowane nanocząstkami srebra wykazują działanie antydrobnoustrojowe. Nanokompozyty zawierające tlenek grafenu mogą pokonać ograniczenia poszczególnych składników, antybakteryjne nanomateriały przyłączone do substratu grafenowego są bardziej stabilne i lepiej rozproszone.

## Piśmiennictwo

Akhavan, O. and Ghaderi, E. (2010) 'Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria.', *ACS nano*. United States, 4(10), pp. 5731–5736. doi: 10.1021/nn101390x.

Akhavan, O., Ghaderi, E. and Emamy, H. (2012) 'Nontoxic concentrations of PEGylated graphene nanoribbons for selective cancer cell imaging and photothermal therapy', *Journal of Materials Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 22(38), pp. 20626–20633. doi: 10.1039/C2JM34330D.

Chatterjee, N., Eom, H.-J. and Choi, J. (2014) 'A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions.', *Biomaterials*. Netherlands, 35(4), pp. 1109–1127. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.108.

Chwalibog, A. i wsp. (2010) 'Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi.', *International journal of nanomedicine*, 5, pp. 1085–94. doi: 10.2147/IJN.S13532.

Dar, M. A., Ingle, A. and Rai, M. (2013) 'Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics.', *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. United States, 9(1), pp. 105–110. doi: 10.1016/j.nano.2012.04.007.

- Ferrari, A. C. i wsp. (2015) 'Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems.', *Nanoscale*. England, 7(11), pp. 4598–4810. doi: 10.1039/c4nr01600a.
- Geim, a K. and Novoselov, K. S. (2007) 'The rise of graphene.', *Nature materials*, 6(3), pp. 183–91. doi: 10.1038/nmat1849.
- Guo, X. and Mei, N. (2014) 'Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials.', *Journal of food and drug analysis*, 22(1), pp. 105–15. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.009.
- Halouane, F. i wsp. (2017) 'Magnetic reduced graphene oxide loaded hydrogels: Highly versatile and efficient adsorbents for dyes and selective Cr(VI) ions removal.', *Journal of colloid and interface science*. United States, 507, pp. 360–369. doi: 10.1016/j.jcis.2017.07.075.
- Hu, Z. i wsp. (2015) 'Functionalized graphene/C60 nanohybrid for targeting photothermally enhanced photodynamic therapy', *RSC Advances*. The Royal Society of Chemistry, 5(1), pp. 654–664. doi: 10.1039/C4RA13427C.
- Jang, S. (2016) 'Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus and their clinical implications.', *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. Korea (South), 54(1), pp. 1–8. doi: 10.1007/s12275-016-5159-z.
- Jaworski, S. i wsp. (2015) 'In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma.', *International journal of nanomedicine*. New Zealand, 10, pp. 1585–1596. doi: 10.2147/IJN.S77591.
- Kurantowicz, N. i wsp. (2015) 'Interaction of graphene family materials with Listeria monocytogenes and Salmonella enterica.', *Nanoscale research letters*. United States, 10, p. 23. doi: 10.1186/s11671-015-0749-y.
- Lara, H. H. i wsp. (2011) 'Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds.', *Journal of nanobiotechnology*. England, 9, p. 30. doi: 10.1186/1477-3155-9-30.
- Li, Y. i wsp. (2012) 'The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways.', *Biomaterials*, 33(2), pp. 402–11. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.091.

Loh, K. P. i wsp. (2010) 'Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications', *Nature Chemistry*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 2, p. 1015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nchem.907>.

Mathur, P. and Singh, S. (2013) 'Multidrug Resistance in Bacteria: A Serious Patient Safety Challenge for India', *Journal of Laboratory Physicians*. India: Medknow Publications & Media Pvt Ltd, 5(1), pp. 5–10. doi: 10.4103/0974-2727.115898.

Nagy, A. i wsp. (2011) 'Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action.', *International journal of nanomedicine*. New Zealand, 6, pp. 1833–1852. doi: 10.2147/IJN.S24019.

Ou, L. i wsp. (2016) 'Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms.', *Particle and fibre toxicology*. England, 13(1), p. 57. doi: 10.1186/s12989-016-0168-y.

Reina, G. i wsp. (2017) 'Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications.', *Chemical Society reviews*. England, 46(15), pp. 4400–4416. doi: 10.1039/c7cs00363c.

Sasidharan, A. i wsp. (2011) 'Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene.', *Nanoscale*. England, 3(6), pp. 2461–2464. doi: 10.1039/c1nr10172b.

Seil, J. T. and Webster, T. J. (2012) 'Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature', *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press, 7, pp. 2767–2781. doi: 10.2147/IJN.S24805.

Szmidt, M. i wsp. (2019) 'Graphene oxide down-regulates genes of the oxidative phosphorylation complexes in a glioblastoma.', *BMC molecular biology*. England, 20(1), p. 2. doi: 10.1186/s12867-018-0119-2.

Wang, L., Hu, C. and Shao, L. (2017) 'The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future', *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press, 12, pp. 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956.

Zhang, Y. i wsp. (2010) 'Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in

neural pheochromocytoma-derived PC12 cells.’, *ACS nano*. United States, 4(6), pp. 3181–3186. doi: 10.1021/nn1007176.

Zhou, H. i wsp. (2014) ‘The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration.’, *Biomaterials*. Netherlands, 35(5), pp. 1597–1607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.020.

Zhou, L. i wsp. (2011) ‘Graphene oxide noncovalent photosensitizer and its anticancer activity in vitro.’, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. Germany, 17(43), pp. 12084–12091. doi: 10.1002/chem.201003078.

## **b. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Od początku mojej pracy naukowej jestem związany z zespołem badawczym prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg realizującym badania w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt SGGW w Warszawie. W trakcie realizacji projektów badawczych, miałem okazję również współpracować z innymi zespołami badawczymi kierowanymi przez: prof. dr hab. Ande Chwaliboga z University of Copenhagen, prof. dr hab. Jana Niemca z Katedry Szczegółowej Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie, prof. dr hab. Teresę Ostaszewską z Samodzielnego Zakładu Ichtibiologii, Rybactwa i Biotechnologii Akwakultury SGGW w Warszawie, prof. dr hab. Grzegorzem Gierelakiem z Wojskowego Instytutu Medycznego. Pozostałe obszary prowadzonych przeze mnie badań, poza wyżej opisanym osiągnięciem dzielą się na trzy kierunki badawcze. Ich charakterystyka bibliometryczna przedstawia się następująco: IF = 91,031; MNiSW = 1123.

### **1. Określenie toksyczności/biozgodności wybranych nanocząstek i nanomateriałów (poza przedstawionymi w dziele)**

Rozwijająca się na świecie i w Polsce nanotechnologia w błyskawicznym tempie tworzy nowe unikalne materiały, które mogą zrewolucjonizować otaczający nas świat. Fizyka, chemia, materiałoznawstwo, elektronika i inne nauki pokrewne stosując nanometody i nanomateriały tworzą nowe środowisko, w którym człowiek, zwierzęta, rośliny czy mikroorganizmy nieuchronnie będą egzystować. Zainteresowanie nanomateriałami wynika głównie z ich wyjątkowych właściwości, które nie występują w makroskali. Polska myśl naukowa w zakresie nanotechnologii jest wysoce zaawansowana, a polskie wynalazki

i opracowania należą do wiodących na świecie. Z drugiej strony zagadnienia związane z biologiczną odpowiedzią żywych organizmów i abiotyczną odpowiedzią środowiska na nowej generacji rozwiązania technologiczne są realizowane w stosunkowo wąskim zakresie zarówno w Polsce i na świecie. Zasadniczą właściwością, która umożliwia szerokie zastosowanie nanocząstek w biomedycynie jest, oprócz ich małego rozmiaru, możliwość dołączenia do nich różnych substancji. Fakt ten w połączeniu z naturalną tendencją komórek zwierzęcych do internalizacji małych molekuł powoduje, że nanocząstki mogą stanowić również doskonałe nośniki różnych molekuł. Niezależnie jednak od celu badań w zakresie szeroko pojętej nanobiotechnologii podstawowym zjawiskiem leżącym u podstawy wszystkich badań jest określenie interakcji i potencjalnej samo-organizacji jaka zachodzi pomiędzy nanomateriałami a strukturami (molekułami) badanego modelu biologicznego czy środowiskowego. Pomimo licznych badań nad toksycznością czy biogodnością mechanizmy interakcji nanocząstek i nanomateriałów ze strukturami biologicznymi nie są do końca poznane i wymagają dalszych badań.

Celem prowadzonych badań była toksyczności/biogodności wybranych nanomateriałów w wykorzystaniu modeli komórkowych i zwierzęcych (szczury, myszy, zarodek kury). Badania obejmowały analizę fizyko-chemiczną nanomateriałów, testy toksyczności (określenie żywotności, śmiertelności, proliferacji, produkcję ROS, analizę typu śmierci komórki), analizę markerów śmierci komórki, stanu zapalnego i angiogenezy. Wykazano dawkozależny toksyczny efekt nanocząstek węgla (grafitu, diamentu, nanorurek węglowych i fulerenów) oraz metali (miedź, srebro, platyna) w stosunku do wybranych linii komórkowych. W badaniach z wykorzystaniem modelu CAM wykazano antyangiogenne działanie nanodiamentu i nanorurek węglowych. Odnotowano antynowotworowe działanie nanocząstek platyny w stosunku do komórek glejaka IV stopnia oraz komórek nowotworowych wątroby.

Opisywane badania prowadzone były w ramach projektów wymienionych w załączniku nr. 5: I1, I3, I4, I5, I7.

Otrzymane wyniki przedstawiono w publikacjach:

Lista A: A1, A15, A2, A8, A6, A10, A12, A16, A9, A17, A20, A19, A22, A25, A21, A24, A23, A27, A30, A26, A7, A31,

Lista B: D1.3, D1.4, D1.5, D1.6, D1.7

**Otrzymane wyniki posłużyły również do przygotowania niżej wymienionych zgłoszeń patentowych/patentów: B4, B1, B5.**

## **2. Antybakteryjne właściwości nanocząstek i nanomateriałów**

Rozwój antybiotyków odegrał znaczącą rolę w zwalczaniu groźnych chorób zakaźnych, jednak ich niewłaściwe stosowanie doprowadziło do powstania oporności bakterii i podwyższenia globalnego problemu zdrowia publicznego w XXI wieku. Bakterie – organizmy charakteryzujące się dużymi populacjami oraz szybkim czasem podwojenia, po ekspozycji na antybiotyki mogą stosunkowo szybko wytworzyć różne mechanizmy oporności na podane substancje. W związku ze stale rosnącą liczbą drobnoustrojów opornych na współcześnie stosowane antybiotyki oraz obserwowane niekiedy ich działania niepożądane, konieczne jest poszukiwanie nowych, rozwiązań w zakresie profilaktyki i leczenia zakażeń bakteryjnych. Dynamiczny rozwój nanotechnologii umożliwił wytwarzanie innowacyjnych rozwiązań w zakresie biochemii, farmacji, techniki i medycyny. Takie materiały charakteryzują się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi niż ich odpowiedniki nie tylko w skali makro, ale także w mikroskali. W ostatnich latach dyskutowana jest potencjalna przydatność nanocząstek metali w profilaktyce zakażeń bakteryjnych. Ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest tłumaczona wysoką reaktywnością wynikającą z małego rozmiaru cząstek oraz dużej powierzchni oddziaływania z komórką bakteryjną.

Celem prowadzonych badań była charakterystyka interakcji i wyjaśnienie mechanizmu toksycznego działania wybranych nanomateriałów na komórki bakterii. Badania przeprowadzono na wybranych gatunkach bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*. Odnotowano, że niektóre nanocząstki metali tj.: Ag, Au, Pt, Cu, ZnO oraz wybrane nanomateriały węglowe (grafen, grafit, diament, fulereny) niszczą mechanicznie błonę i/lub ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, doprowadzając do indukcji stresu oksydacyjnego i ostatecznie śmierci

komórek bakteryjnych. Badania prowadzone były m.in. w ramach dwóch projektów wymienionych w załączniku nr 5: I12, I 13.

Otrzymane wyniki przedstawiono w publikacjach:

Lista A: A11, A29

### **3. Nano-odżywianie**

Badania polegały na opracowaniu kompleksowych, innowacyjnych technologii produkcji pasz, a co za tym idzie również technologii odchowu i żywienia kurcząt oraz indyków rzeźnych. Polska jest wiodącym producentem i eksporterem mięsa kurcząt rzeźnych i indyków, jednak należy pamiętać, że pozostające w kraju odpady poprodukcyjne, jak i sam proces odchowu ma negatywny wpływ na biosferę Polski.

Nadrzędnym celem badań było zmniejszenie negatywnego wpływu produkcji drobiu na środowisko naturalne poprzez ograniczenie emisji pierwiastków biogenych oraz gazów cieplarnianych do środowiska naturalnego, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej efektywności produkcji i jakości produktu-mięsa drobiowego, a tym samym poprawie bezpieczeństwa konsumentów i konkurencyjności krajowych producentów.

Mając na uwadze, że układ pokarmowy stanowi pierwszą - najważniejszą linię obrony przed czynnikami zakaźnymi, celem realizacji badań była poprawa homeostazy mikroekosystemu układu pokarmowego poprzez zastosowanie synergizmu innowacyjnych technologii uszlachetniania alternatywnych źródeł białka, eubiotyków i mikroelementów w formie nanocząsteczek. Zadaniem Instytutu Zootechniki PIB jest analiza efektywności wybranych technologii i eubiotyków w żywieniu kurcząt rzeźnych w warunkach zaburzonej równowagi mikroekosystemu układu pokarmowego.

Badania prowadzono m.in. w ramach projektów: I 2, I 14

Otrzymane wyniki przedstawiono w publikacjach:

Lista A: A3, A5, A18, A13, A4, A28 oraz

Lista B: D1.1, D1.2.



Otrzymane wyniki posłużyły również do przygotowania niżej wymienionych zgłoszeń patentowych/patentów: B6.

### c. Sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego

Tabela 2. Sumaryczne zestawienie **całkowitego dorobku publikacyjnego przed uzyskaniem stopnia doktora.**

Lp.	Rodzaj Publikacji	Liczba prac	Zgodnie z datą publikacji	
			Punty MNiSW	IF
1	Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	15	490	42,092
2	Monografie i publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w punkcie II.A. (JCR)	2	4	Nie dotyczy
3	Doniesienia i abstrakty	20	Nie dotyczy	
4	Publikacje popularno-naukowe w czasopismach nie znajdujących się na liście MNiSW	1	Nie dotyczy	
5	<u>Łącznie</u>	17	494	42,092

Tabela 3. Sumaryczne zestawienie **całkowitego dorobku** publikacyjnego **po uzyskaniu stopnia doktora**.

Lp.	Rodzaj Publikacji	Liczba prac	Zgodnie z datą publikacji	
			Punty MNiSW	IF
1	Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) stanowiące <u>główne osiągnięcie naukowe</u>	4	125	14,439
2	Pozostałe publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	18	580	48,939
3	Monografie i publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w punkcie II.A. (JCR)	9	49	Nie dotyczy
4	Doniesienia i abstrakty	27	Nie dotyczy	
5	Publikacje popularno-naukowe w czasopismach nie znajdujących się na liście MNiSW	0	Nie dotyczy	
6	<u>Łącznie</u>	27	754	63,378

Tabela 4. Sumaryczne zestawienie **całkowitego dorobku publikacyjnego**

Lp.	Rodzaj Publikacji	Liczba prac	Zgodnie z datą publikacji	
			Punty MNiSW	IF
1	Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	37	1195	105,47
2	Monografie i publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w punkcie II.A. (JCR)	11	53	Nie dotyczy
3	Doniesienia i abstrakty	47	Nie dotyczy	
4	Publikacje popularno-naukowe w czasopismach nie znajdujących się na liście MNiSW	1	Nie dotyczy	
5	<b><u>Łącznie</u></b>	<b>48</b>	<b>1248</b>	<b>105,47</b>

**Podsumowanie działalności naukowej:**

**Sumaryczny impact factor: 103,6944**

**Liczba cytowań: 463**

**Liczba cytowań bez autocytowań: 275**

**Indeks H: 13**

**Całkowita liczba publikacji łącznie z listy A i B MNiSW: 48 (1248 pkt. MNiSW):**

**- liczba publikacji po uzyskaniu stopnia doktora: 31 (629 pkt. MNiSW),**

**- liczba publikacji po uzyskaniu stopnia doktora z wyłączeniem prac stanowiących osiągnięcie naukowe: 27 (580 pkt. MNiSW).**

**Liczba publikacji z listy Web of Science: 34 (460 pkt. MNiSW):**

**- liczba publikacji po uzyskaniu stopnia doktora: 17 (510 pkt. MNiSW),**

**- liczba publikacji po uzyskaniu stopnia doktora z wyłączeniem prac stanowiących osiągnięcie naukowe: 14 (415 pkt. MNiSW).**

**Sumaryczny IF: 103,6944:**

**- IF po uzyskaniu stopnia doktora: 63,382,**

**- IF po uzyskaniu stopnia doktora z wyłączeniem prac stanowiących osiągnięcie naukowe: 48,939.**

**Indeks Hirscha według bazy Web of Science: 13 (stan na dzień 18.02.2018)**

**Liczba publikacji z listy B MNiSW = 11 (53 pkt. MNiSW)**

**Ekspertyzy: 4**

**Doniesienia i abstrakty: 47 (po uzyskaniu stopnia doktora 27)**

**Referaty wygłoszone na konferencjach: 12 (po uzyskaniu stopnia doktora 9)**

**W 8 pracach oryginalnych jestem pierwszym autorem odpowiedzialnym za stworzenie koncepcji badań, dobór metod badawczych, realizację badań oraz opracowanie.**

**Po wyłączeniu czterech prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe**

**(120 pkt. MNiSW, IF = 14,439), oraz prac z okresu przed uzyskaniem stopnia doktora (490 pkt. MNiSW, IF = 42,092) mój dorobek naukowy wynosi 580 pkt. MNiSW, IF = 48,939.**

### **III. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA**

---

Pracę na stanowisku nauczyciela akademickiego podjąłem na Wydziale Nauk o Zwierzętach w październiku 2015 roku. W czasie studiów doktoranckich w latach 2011-2015 opracowałem program i prowadziłem ćwiczenia w ramach przedmiotów: Podstawy mikrobiologii na kierunku Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzystwujących i Dzikich, Mikrobiologia dla kierunku Zootechnika oraz Hodowle in vitro i Technologie Fermentacyjne dla kierunku Bioinżynieria Zwierząt. W latach 2016 – 2017 opracowałem tematykę wykładów i ćwiczeń z przedmiotu Fizjologia Prokaryota. Do tego przedmiotu opracowałem również skrypt do zajęć, będący obecnie w recenzji wydawniczej (Wydawnictwo SGGW). Jako członek Zespołu ds. Kształcenia dla kierunku Bioinżynieria Zwierząt uczestniczyłem w układaniu i modyfikacji programu studiów magisterskich.

Zajęcia dydaktyczne prowadziłam również dla studentów Wydziału: Medycyny Weterynaryjnej oraz Rolnictwa i Biologii.

W ramach przedmiotu Technologie Fermentacyjne współpracowałem z interesariuszami zewnętrznymi w celu przeprowadzenia praktycznych zajęć dydaktycznych.

Uczestniczyłem również w 12 szkoleniach podnoszących kwalifikacje zawodowe m.in. SGGW wobec studentów niepełnosprawnych, Zwiększenie dostępności uczelni wyższych dla osób niepełnosprawnych, Letni Kurs Hodowli komórek zwierzęcych.

Od 2017 roku do chwili obecnej jestem opiekunem Międzywydziałowego Koła Naukowego Nanobiotechnologii. W ramach działalności Koła co roku razem ze studentami współorganizujemy Dni SGGW, uczestniczymy w przeglądzie kół naukowych oraz współpracujemy z firmami wykorzystującymi pokazy biologiczno-chemiczne (m.in. Kamienica Zagadek).

W czasie pracy na Wydziale Nauk o Zwierzętach byłem promotorem 6 prac magisterskich i 15 prac inżynierskich. Wykonałem recenzję 4 prac inżynierskich. Od 2017 roku pełnię funkcję opiekuna roku na studiach stacjonarnych pierwszego stopnia na kierunku Bioinżynieria Zwierząt..

## **IV. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA**

---

Jestem aktywnym członkiem dwóch towarzystw naukowych: Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów oraz członkiem Stowarzyszenia Biotechnologicznego Symbioza.

Na Wydziale Nauk o Zwierzętach pełnię funkcję Pełnomocnika Dziekana ds. Promocji Wydziału.

Jako pracownik Wydziału nauk o Zwierzętach byłem organizatorem i współorganizatorem 10 konferencji naukowych, z czego 8 miało charakter międzynarodowy (m.in. Nanomedicine, Vth Intercollegiate Biotechnology Symposium, Young Research Symposium). Od 2018 roku jestem członkiem Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach oraz 2 komisji pracujących na rzecz Wydziału Nauk o Zwierzętach. Realizując zadania badawcze współpracuję z partnerami z branży nanobiotechnologicznej. Byłem kierownikiem pięciu grantów naukowych (NCN: Preludium i Sonata oraz 3 grantów wewnętrznych SGGW) oraz wykonawcą w 8 grantach .

## **V. Nagrody i wyróżnienia**

---

W czasie zatrudnienia na Wydziale Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie otrzymałem następujące nagrody:

- 1) Stypendium Ministra dla Młodych Wybitnych Naukowców (2018)
- 2) Nagroda zespołowa Rektora SGGW II stopnia za osiągnięcia naukowe (2016)
- 3) Nagroda zespołowa Rektora SGGW II stopnia za osiągnięcia naukowe (2017)
- 4) III miejsce za wynalazek: „Zawiesina nanopłatków tlenku grafenu w wodzie, jej zastosowanie i sposób otrzymywania" w konkursie "Eureka! DGP", Dziennik Gazeta Prawna (22.06.2017)
- 5) Nagroda indywidualna Rektora SGGW II stopnia za osiągnięcia dydaktyczne (2017)

6) Wyróżnienie w konkursie Innowator Mazowsza organizowanego przez Urząd Marszałkowski Województwa Mazowieckiego w Warszawie (2016)

Warszawa 20.04.2019

Jarosław Stawomir