



UNIWERSYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

***SYNTEZA ORAZ ZASTOSOWANIA  
NANOMATERIAŁÓW FULLERENOWYCH W CHEMII  
MEDYCZNEJ***

**Załącznik nr 3**

**Dr inż. Maciej Serda**

**Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych  
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne**

Instytut Chemii

Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice, 2023

## SPIS TREŚCI

<b>1. Informacje o autorze .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Wykształcenie .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Zatrudnienie i staże zagraniczne.....</b>	<b>3</b>
<b>4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. Zm.) .....</b>	<b>4</b>
<b>4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:.....</b>	<b>4</b>
<b>4.2 Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej składających się na osiągnięcie naukowe 4</b>	
<b>4.3 Opis osiągnięcia naukowego.....</b>	<b>8</b>
<b>5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. ....</b>	<b>33</b>
<b>6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....</b>	<b>34</b>

## 1. Informacje o autorze

**Maciej Serda**

**Data urodzenia:** 18 marzec 1985

**Adres:** Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul Szkolna 9, 40-006 Katowice

**Dane kontaktowe:**

**Telefon:** 323591514

**E-mail:** [maciej.serda@us.edu.pl](mailto:maciej.serda@us.edu.pl)

**ORCID ID:** 0000-0003-4926-5782

## 2. Wykształcenie

- Dyplom magistra inżyniera nauk chemicznych, nadany przez Politechnikę Śląską, Wydział Chemiczny w dniu 07/07/2009 roku. Tytuł pracy dyplomowej: *Badania nad syntezą pochodnych  $\alpha$ -aminokwasów z wiązaniem  $C_{\alpha}$ -P z pochodnych  $\alpha$ -benzotriazolilo- $\alpha$ -aminokwasów*, (promotor: prof. dr hab. inż. Roman Mazurkiewicz) - praca obroniona z wyróżnieniem, indywidualny tok studiów.
- Dyplom doktora nauk chemicznych, nadany przez Uniwersytet Śląski, Instytut Chemii, w dniu 26/11/2013 r. w Katowicach. Tytuł pracy doktorskiej: *Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza* (promotor: prof. dr hab. inż. Jarosław Polański) - praca doktorska obroniona z wyróżnieniem.

## 3. Zatrudnienie i staże zagraniczne

- **Studia doktoranckie** (październik 2009 – wrzesień 2013) – Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Instytut Fizyki.
- **Staż naukowy**, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Karola w Pradze (filia Hradec Kralove, Czechy), październik 2010-luty 2011, grupa prof. Martina Doležala, program Erasmus.
- **Starszy wykładowca** w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, listopad 2013-wrzesień 2014.
- **Adiunkt** w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, Październik 2014- obecnie.
- **Stanowisko typu postdok**, Wydział Chemiczny, The University of Chicago, Stany Zjednoczone Ameryki, luty- listopad 2015, grupa prof. Viresha Rawala.

- **Stanowisko typu *postdok***, Wydział Chemiczny, Rice University, Stany Zjednoczone Ameryki, listopad 2015- luty 2017, grupa prof. Lona Wilsona, stypendium The Welch Foundation.
- **Wizyta naukowa** na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie, czerwiec 2018, grupa prof. Josefa Jampilka, finansowanie z programu Erasmus.
- **Stanowisko typu *visiting scholar***, Wydział Chemiczny, The University of Chicago, Stany Zjednoczone Ameryki, luty- lipiec 2022, grupa badawcza prof. Viresha Rawala, stypendium Fundacji Kościuszkowskiej.

#### **4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. Zm.)**

##### **4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:**

### **SYNTEZA ORAZ ZASTOSOWANIA NANOMATERIAŁÓW FULLERENOWYCH W CHEMII MEDYCZNEJ**

##### **4.2 Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej składających się na osiągnięcie naukowe**

*\*autor korespondujący*

*IF – wskaźnik Impact Factor wg JCR zgodnie z rokiem opublikowania; punkty MNISW – liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych MNISW dla danego okresu.*

H1. **Maciej Serda**, Matthew J. Ware, Jared M. Newton, Sanchit Sachdeva, Martyna Krzykawska-Serda, Lam Nguyen, Justin Law, Andrew O Anderson, Steven A. Curley, Lon J Wilson\*, Stuart J. Corr\*, *Development of photoactive Sweet-C<sub>60</sub> for pancreatic cancer stellate cell therapy*, Nanomedicine, 2018, 13, 23, 2981-2993. DOI: 10.2217/nmm-2018-0239.

**IF<sub>2018</sub>= 4,717; MNISW: 100 punktów (lista 2018)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu oraz wykonaniu syntez i oczyszczaniu nanomateriału fullerenowego wraz z jego charakterystyką fizykochemiczną. Dodatkowo napisałem wersję końcową artykułu wraz z omówieniem i analizą wyników chemicznych i biofizycznych, korespondencją z edytorem i recenzentami, przygotowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów. Ponadto byłem kierownikiem projektu SONATA obejmującym badania opisane w tej pracy, a także gwarantującym finansowanie zadań eksperymentalnych.*

H2. **Maciej Serda\***, Katarzyna Malarz, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Marcin Wojtyniak, Robert Musioł, Steven A Curley, *Glycofullerenes as non-receptor tyrosine kinase inhibitors-towards better nanotherapeutics for pancreatic cancer treatment*, Scientific Reports, 2020, 10, 1, 1-11. DOI: 10.1038/s41598-019-57155-7

**IF<sub>2020</sub>= 4,38; MNISW: 140 punktów (lista 2018)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu głównej hipotezy badawczej dotyczącej inhibicji kinaz tyrozynowych przez nanomateriały fullerenowe. Zaprojektowałem ścieżki syntetyczne otrzymania glikofullerenów, wraz z wykonaniem syntezy, oczyszczania i pełną charakterystyką spektralną. Ponadto byłem kierownikiem projektu SONATA obejmującym badania opisane w tej pracy a także gwarantującym finansowanie zadań eksperymentalnych.*

H3. Paweł Nalepa, Robert Gawecki, Grzegorz Szewczyk, Katarzyna Balin, Mateusz Dulski, Mieczysław Sajewicz, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Robert Musioł, Jarosław Polanski, **Maciej Serda\***, *A [60]fullerene nanoconjugate with gemcitabine: synthesis, biophysical properties and biological evaluation for treating pancreatic cancer*, Cancer Nanotechnology, 2020, 11:2. DOI: 10.1186/s12645-020-00058-4

**IF<sub>2020</sub>=5,095; MNISW: 100 punktów (lista 2020);**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji otrzymania nanokoniugatu fullereny z gemcytabiną, zaplanowaniu eksperymentów, nadzorowaniu prac mgr Pawła Nalepy oraz udziałem w wykonaniu eksperymentów, analizą i interpretacją otrzymanych wyników. Napisałem ostatecznej wersję publikacji, wraz z korespondencją z edytorem i recenzentami, przygotowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów. Kierowałem projektem naukowym SONATA obejmującym wszystkie badania opisane w tej pracy.*

H4 **Maciej Serda\***, Grzegorz Szewczyk, Olga Krzysztyńska-Kuleta, Julia Korzuch, Mateusz Dulski, Robert Musioł, Tadeusz Sarna, *Developing [60]Fullerene Nanomaterials for Better Photodynamic Treatment of Non-Melanoma Skin Cancers*, ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020, 6, 10, 5930–5940. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c00932

**IF<sub>2020</sub>= 4,749; MNISW: 140 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań porównawczych dotyczących fotochemii a także biofizyki wybranych gliko- oraz aminofullerenów oraz ich zastosowania w terapii nowotworów skóry. Byłem odpowiedzialny za opracowanie i wykonanie prac eksperymentalnych, w tym syntezy i analizy fizykochemicznej otrzymanych*

*aminofullerenów oraz sprawowałem opiekę nad doktorantką mgr Julią Korzuch. Przygotowałem wersję finalną manuskryptu, byłem odpowiedzialny za korespondencję z edytorem oraz edytowanie tekstu w czasie i po recenzjach. Kierowałem projektem naukowym SONATA obejmującym wszystkie badania opisane w tej pracy.*

H5. Julia Korzuch, Monika Rak, Katarzyna Balin, Maciej Zubko, Olga Głowacka, Mateusz Dulski, Robert Musioł, Zbigniew Madeja, **Maciej Serda\***, *Towards water-soluble [60]fullerenes for the delivery of siRNA in a prostate cancer model*, Scientific Reports, 2021, 11:10565. DOI: 10.1038/s41598-021-89943-5

**IF<sub>2021</sub>= 4,996; MNISW: 140 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji transfekcji siRNA z użyciem aminofullerenów, syntezie nanomateriałów fullerenowych a także nadzorowaniu prac doktorantki Julii Korzuch. Byłem również odpowiedzialny za napisanie końcowej wersji artykułu, wraz z omówieniem wyników biochemicznych, a także korespondencją z edytorem i przygotowaniem odpowiedzi na recenzje jako autor korespondencyjny. Ponadto, kierowałem projektem naukowym OPUS obejmującym wszystkie badania opisane w tej pracy.*

H6 **Maciej Serda\***, Robert Gawecki, Mateusz Dulski, Mieczysław Sajewicz, Ewa Talik, Magdalena Szubka, Maciej Zubko, Katarzyna Malarz, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Robert Musioł, *Synthesis and applications of [60]fullerene nanoconjugate with 5-aminolevulinic acid and its glycoconjugate as drug delivery vehicles*, RSC Advances, 2022, 12, 6377-6388. DOI: 10.1039/D1RA08499B

**IF<sub>2022</sub>= 3,9; MNISW: 100 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu struktur nanomateriałów fullerenowych, opracowaniu i wykonaniu ich ścieżki syntetycznej, a także metod oczyszczania oraz charakterystyki spektralnej i chromatograficznej. Ponadto byłem odpowiedzialny za przygotowanie wersji ostatecznej manuskryptu, a także prowadziłem korespondencję z edytorem oraz recenzentami jako autor korespondencyjny. Dodatkowo, byłem kierownikiem projektu SONATA obejmującym badania opisane w tej pracy a także gwarantującym finansowanie zadań eksperymentalnych.*

H7 **Maciej Serda\***, Katarzyna Malarz, Julia Korzuch, Magdalena Szubka, Maciej Zubko, Robert Musioł, *In Situ Cellular Localization of Nonfluorescent [60]Fullerene Nanomaterial in MCF-7 Breast Cancer Cells*, ACS Biomaterials Science & Engineering, 2022, 8, 8, 3450–3462. DOI: 10.1021/acsbmaterials.2c00542

**IF<sub>2022</sub>=5,8; MNISW: 140 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań wizualizacji fullerenów w komórkach nowotworowych, zaprojektowaniu partnerów azydkowych oraz pełnej charakterystyki spektralnej otrzymanych związków. Dodatkowo napisałem wprowadzenie do artykułu, wraz z omówieniem i analizą wyników chemicznych i analizy chemicznej, korespondencją z edytorem i recenzentami, przygotowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów jako autor korespondencyjny. Ponadto byłem kierownikiem projektu SONATA obejmującym badania opisane w tej pracy a także gwarantującym finansowanie zadań eksperymentalnych.*

H8. Dominik Dreszer, Grzegorz Szewczyk, Magdalena Szubka, Anna Maroń, Anna Urbisz, Karol Małota, Justyna Sznajder, Magdalena Rost-Roszkowska, Robert Musioł, **Maciej Serda\***, *Uncovering nanotoxicity of a water-soluble and red-fluorescent [70]fullerene nanomaterial*, Science of The Total Environment, **2023**, 879, 163052.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163052

**IF<sub>2022</sub>= 9,8; MNISW: 200 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu fluoroscencyjnego nanomateriału fullerenowego wraz z jego syntezą, metodami oczyszczania oraz analizą fizykochemiczną. Nadzorowałem prace mgr Dominika Dreszera wraz z wykonywaniem eksperymentów. Dodatkowo napisałem ostateczną wersję artykułu, wraz z korespondencją z edytorem i recenzentami, przygotowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów jako autor korespondencyjny.*

H9. **Maciej Serda\***, Julia Korzuch, Dominik Dreszer, Martyna Krzykawska-Serda, Robert Musioł, *Interactions between modified fullerenes and proteins in cancer nanotechnology*, Drug Discovery Today, **2023**, 28, 9, 103704.

DOI:10.1016/j.drudis.2023.103704

**IF<sub>2022</sub>= 7,4; MNISW: 200 punktów**

*Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na zaproponowaniu tematyki badawczej, krytycznej analizie aktualnych doniesień literaturowych dotyczących oddziaływań nanomateriałów fullerenowych z białkami. Zredagowałem wszystkie podrozdziały w pracy, a także przygotowałem wersję końcową artykułu, wraz z odpowiedziami dla recenzentów. Mój wkład polegał również na kierowaniu projektem naukowym OPUS, obejmującym badania opisane w tej pracy.*

### **Podsumowanie cyklu publikacji**

We wszystkich wyżej wymienionych pracach jestem głównym autorem (pierwszym lub/i autorem korespondencyjnym)

Suma IF: **50,837**

Średni IF: **5,65**

Liczba punktów MNISW: **1260**

## 4.3 Opis osiągnięcia naukowego

### 4.3.1 Wprowadzenie

W klasycznym ujęciu naukowym chemia medyczna opisuje problemy badawcze związane z projektowaniem, syntezą oraz badaniem właściwości biologicznych związków małocząsteczkowych, jak również złożonych związków naturalnych oraz biopolimerów. W tym kontekście nanomateriały fullerenowe są bardzo ciekawą grupą związków oraz inspiracją do dalszych badań<sup>1</sup>. Jest to spowodowane tym, że są one doskonałym łącznikiem pomiędzy związkami niskocząsteczkowymi a światem oddziaływań nanometrycznych – niemodyfikowane fullereny są wielkości 0,7 nm ( $C_{60}$ ). Co ciekawe, mogą być one dogodnym substratem do szeregu reakcji chemicznych pozwalających na ich praktycznie dowolną modyfikację strukturalną, a nawet otwarcie klatki fullerenowej i umieszczenie wewnątrz dodatkowych cząsteczek (przykładowo wody)<sup>2, 3</sup>.

**Moje badania naukowe koncentrują się na modyfikacji strukturalnej nanomateriałów fullerenowych tak, aby otrzymać ich nowe, rozpuszczalne w wodzie pochodne wykazujące działanie przeciwnowotworowe.**

Od czasu swojego odkrycia w 1985 roku nanomateriały fullerenowe stanowią obiekt zainteresowania naukowców zajmujących się fizykochemią materiałów, a także chemią syntetyczną. Ich inspirująca, architektoniczna struktura (fulleren  $C_{60}$  to dwudziestościan ścięty o hybrydyzacji wszystkich atomów węgla  $sp^2$ ), a także interesujące właściwości spektroskopowe i elektrochemiczne wydawały się być gwarancją szybkich i atrakcyjnych zastosowań. Jednakże z perspektyw badań biologicznych, główną wadą tych nanomateriałów była skrajnie niska rozpuszczalność w wodzie i brak rozwiniętych metod syntetycznych pozwalających na otrzymanie dużej biblioteki pochodnych<sup>4</sup>. Początkowe problemy syntetyczne zostały dość szybko przezwyciężone poprzez odkrycie trzech głównych typów reakcji, ułatwiających otrzymanie rozpuszczalnych w wodzie nanomateriałów fullerenowych (Rysunek 1):

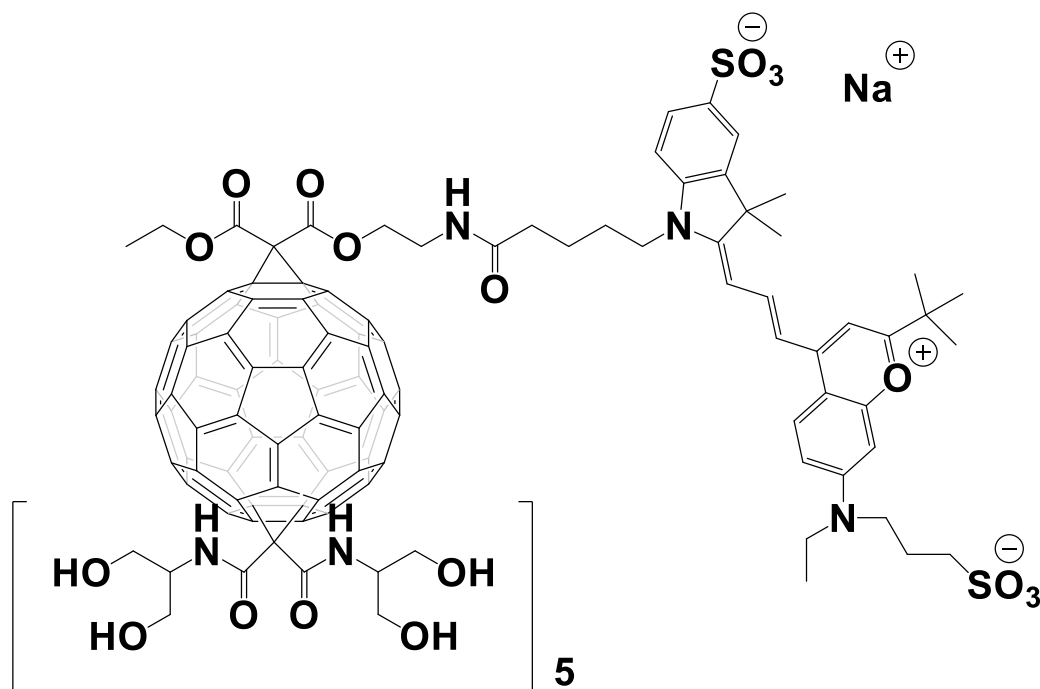
- reakcji substratu fullerenowego z mocną zasadą (NaOH, KOH) lub też kwasem ( $H_2SO_4$ ), często w obecności katalizatora przeniesienia międzyfazowego, pozwalającej na otrzymanie odpowiedniego fullerenolu (związek 1)<sup>5, 6</sup>,
- reakcji Bingela-Hirscha-cyklopropanacji klatki fullerenowej w obecności silnej zasady oraz z użyciem pochodnych kwasu malonowego (związek 2)<sup>7</sup>,
- reakcji Prato- cykloaddycji 1,3-dipolarnej, z użyciem odpowiedniego związku karbonylowego oraz pochodnej *N*-metyloglicyny (związek 3)<sup>8</sup>.

Udoskonalenie metod produkcji przemysłowej fullerenów  $C_{60}$  oraz  $C_{70}$ , jak i metod ich oczyszczania chromatograficznego, zaowocowało zwiększoną dostępnością syntetyczną oraz przyspieszyło opracowanie nowych pochodnych fullerenów wykazujących aktywność biologiczną np. in. jako inhibitorów wirusa HIV-1 (pochodne *N*-metylopirolidynofullereny) oraz





pochodnej fullerenu C<sub>60</sub>serPF. Podczas przeprowadzonych badań biologicznych udowodniono, że wycieka on efektywnie z naczyń krwionośnych do tkanki guza (nowotwór piersi 4T1), wykorzystując prawdopodobnie zjawisko zwane efektem wzmocnionej przepuszczalności i retencji (*ang. EPR effect, enhanced permeability and retention effect*)<sup>14</sup>. Wykorzystuje on swoistą perforację naczyń krwionośnych nowotworu- w przestrzenie których mogą się dostawać jedynie nanomateriały o odpowiedniej wielkości. Moje dalsze eksperymenty potwierdziły, iż modyfikowane nanomateriały fullerenowe mogą być atrakcyjnymi nośnikami wykorzystywanym do badań biomedycznych związanych z tematyką nanotechnologii chorób nowotworowych.



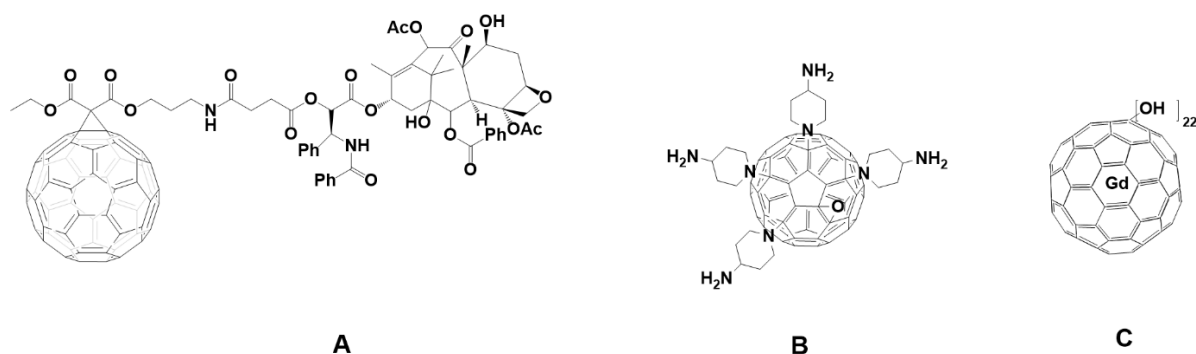
## Rysunek 2

Struktura chemiczna nanomateriału fullerenowego C<sub>60</sub>serPF.

Teoria wzmocnionej przepuszczalności i retencji opisująca wchłanianie oraz biodystrybucję nanomateriałów budzi obecnie wśród naukowców pewne kontrowersje; krytycy przywołują jej ograniczenia tylko do modeli zwierzęcych, jak również i brak zaobserwowanych efektów klinicznych w przypadku terapii celowanych<sup>15, 16</sup>. W związku z tym zaproponowano kilka rozważań teoretycznych pozwalających zaprojektować innowacyjne nośniki leków na poziomie nanometrycznym. Przykładami może być tutaj reguła 2R2SP (*ang. drug retention vs release 2R; surface stealthy vs sticky 2S and tumor penetration P*) lub też tzw. kaskada CAPIR (*ang. circulation in blood, accumulation and penetration into the tumor, cellular internalization, and intracellular drug release*), przypominające w swoich założeniach reguły Lipińskiego znane w chemii medycznej i pozwalające skutecznie projektować biologicznie aktywne nanomateriały celowane, w tym pochodne fullerenów dla zwalczania chorób nowotworowych<sup>17</sup>.

W niedługim czasie po odkryciu i wyizolowaniu fullerenów, udało się zaobserwować że mogą one katalizować powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*), według kilku różnych mechanizmów<sup>18</sup>. Warto tutaj zauważyć, iż, fullereny z ich potrójnie zdegenerowanymi, nisko położonymi orbitalami LUMO są doskonałymi akceptorami elektronów, zdolnymi do przyjęcia aż sześciu elektronów. Klasyczne prace Hamblina i współpracowników udowodniły, iż naświetlanie fullerenów rozpuszczonych w rozpuszczalnikach organicznych i w obecność tlenu prowadzi do wydajnego wytwarzania wysoko reaktywnego tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Ma to miejsce w wyniku procesu transferu energii ze wzbudzonego stanu trypletowego fullerenu<sup>19</sup>. Dodatkowe eksperymenty wykazały, że w rozpuszczalnikach polarnych, zwłaszcza tych zawierających czynniki redukujące (takie jak NADH), naświetlanie nanomateriałów fullerenowych powoduje głównie produkcję anionorodnika ponadtlenkowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )<sup>20</sup>. Przedstawione powyżej obserwacje mają istotne implikacje praktyczne, związane z możliwym wykorzystaniem nowych pochodnych fullerenów jako fotosensybilizatorów w celowanej terapii fotodynamicznej. Możemy tutaj rozróżnić dwa główne kierunki badawcze- terapię przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwnowotworową, przy czym w przedstawionym powyżej cyklu prac skupię się na tej drugiej aktywności biologicznej.

Dopełnieniem opisu działania przeciwnowotworowego pochodnych fullerenów jest ich zastosowanie jako czynników aktywujących układ immunologiczny. W większości przypadków powyższe efekty zostały zaobserwowane dla rodziny fullerenów endohedralnych, zawierających w środku klatki fullerenowej atom gadolinu, tak zwanych gadofullerenów, przykładowo  $\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}$ <sup>21</sup>. Związek ten hamuje wzrost guzów mysiego nowotworu płuc (LLC) wykazując specyficzne działania immunomodulujące na limfocyty T oraz makrofagi M1 oraz M2.



**Rysunek 3**

Wybrane nanomateriały fullerenowe o działaniu przeciwnowotworowym: (A)-nanokoniugat fullerenu  $\text{C}_{60}$  z Paklitakselem; (B) aminofulleren TAPC-4; (C)-gadofulleren  $\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}$ <sup>22-24</sup>.

#### 4.3.2 Omówienie głównych tez osiągnięcia naukowego w świetle istniejącego stanu wiedzy

Choroby nowotworowe są jednym z głównych wyzwań badawczych dla osób zajmujących się chemią medyczną. Aktywność biologiczna pochodnych fullerenów jest tematyką stosunkowo słabo poznaną i opisaną w literaturze, zwłaszcza w porównaniu do klasycznych związków małowcząsteczkowych. Nowe terapie oparte na innowacyjnych strukturach wiodących są obecnie intensywnie poszukiwane, głównie z powodu nasilających się problemów z lekoopornością oraz biodystrybucją substancji bioaktywnych. **Celem prowadzonych przeze mnie badań oraz osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę powyższego wniosku habilitacyjnego było otrzymanie rozpuszczalnych w wodzie nanomateriałów fullerenowych wykazujących działanie przeciwnowotworowe, poprzez inhibicję wybranych celów molekularnych, a także poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Dodatkowym problemem badawczym była próba wizualizacji otrzymanych nanomateriałów fullerenowych w komórkach nowotworowych, kluczowa dla zrozumienia ich interakcji w środowisku komórkowym oraz bardziej skomplikowanych modelach zwierzęcych.** Prowadzone przeze mnie badania naukowe mają charakter interdyscyplinarny, na styku chemii organicznej, biologii molekularnej a także chemii materiałów i wymagają koordynacji działań dużej grupy badawczej z pokrewnych dziedzin nauki. Część eksperymentalna prowadzonych badań została wykonana na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (prace H2-H8), natomiast badania nad syntezą i aktywnością biologiczną glikofullerenu „*SweetC<sub>60</sub>*” zostały przeprowadzone podczas mojego stażu podoktorskiego na Wydziale Chemicznych Uniwersytetu Rice w USA (praca H1). Współpraca z ekspertami z biologii molekularnej, zoologii oraz medycyny (dr hab. Anna Mrozek Wilczkiewicz, dr Katarzyna Malarz, prof. Magdalena Rost-Roszkowska oraz prof. Steven Curley), zaowocowała określeniem aktywności biologicznej dla szeregu nanomateriałów fullerenowych. Dzięki tej współpracy postawiono nowe hipotezy badawcze, opisano podstawy molekularne aktywności biologicznej nanomateriałów fullerenowych, określano ich lokalizację komórkową, a także toksykologię w modelu *Drosophila melanogaster*.

Opisane badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w programie SONATA (*Nowe Glikofullereny Dla Terapii Przeciwnowotworowych*) oraz OPUS (*Środek teranostyczny oparty o strukturę [60]fullerenu dla leczenia i diagnozy nowotworów trzustki*), a także w ramach stypendium Fundacji Welcha (praca H1).

### **Modyfikacje strukturalne nanomateriałów fullerenowych**

Zastosowanie różnych ścieżek syntetycznych do funkcjonalizacji nanomateriałów fullerenowych pozwoliło na otrzymanie szeregu nowych pochodnych o niezwykle interesujących właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Ze względu na sposób otrzymywania można podzielić otrzymane związki na dwie podgrupy:

- Produkty reakcji cyklopropanacji Bingela-Hirscha (prace H1-H5, H7-H8) fullerenów C<sub>60</sub> i C<sub>70</sub>
- Produkty bezpośredniej addycji aminokwasu do klatki fullerenowej w obecności silnej zasady (praca H6).

W trakcie prowadzenia przeze mnie badań nad syntezą rozpuszczalnych w wodzie nanomateriałów fullerenowych otrzymywanych w reakcji Bingela-Hirscha, udało mi się opracować techniki pozwalające na regioselektywne otrzymywanie mono- oraz heksakisadduktów fullerenowych. Przedstawione powyżej nazewnictwo określa ilość pochodnych kwasu malonowego dołączonych w struktury fullereny, w wyniku reakcji cyklopropanacji. Tylko w przypadku monoadduktów oraz heksakisadduktów fullerenowych, możemy mówić o pojedynczych regioizomerach, natomiast w przypadku, *bis-*, *tris-*, *tetrakis-* oraz *pentakis-*adduktów mamy do czynienia ze skomplikowaną mieszalnią regioizomerów, których rozdzielenie chromatograficzne oraz rozróżnienie technikami spektralnymi jest niezwykle trudne<sup>25</sup>. Z punktu widzenia chemii medycznej, obecność tylko jednego regio(stereo)izomeru jest również niezwykle istotna- od dawna jest wiadome, iż różne izomery mogą wywoływać odmienne odpowiedzi biologiczne, co zostało tragicznie potwierdzone na przykładzie talidomidu. W praktyce laboratoryjnej wszystkie monoaddukty fullerenowe otrzymywano stosując ograniczony czas reakcji i odpowiedni stosunek reagentów (wg ogólnej metodyki wynosił on 1/1,25/1,25/2 ekwiwalentów dla układu C<sub>60</sub>/malonian/DBU/CBr<sub>4</sub>). Natomiast w przypadku otrzymywania heksakisadduktów fullerenowych, reakcje prowadzono w wydłużonym czasie (do 72 godzin) oraz przy znacznym nadmiarze substratów w stosunku do fullereny (stosunek C<sub>60</sub>/malonian/DBU/CBr<sub>4</sub>, wynosił 1/12/12/20 ekwiwalentów). Dodatkowym atutem przemawiającym za dalszym wykorzystaniem otrzymanych regioizomerów [60]fullereny jest łatwość ich rozróżniania za pomocą spektroskopii <sup>13</sup>C-NMR. I tak, w przypadku monoadduktu [60]fullerenowego zazwyczaj możemy zaobserwować obecność 16 sygnałów węgla sp<sup>2</sup> klatki fullerenowej w przedziale 150-130 ppm oraz jeden sygnał węgla sp<sup>3</sup> mostku cyklopropanowego, występujący około 70 ppm. Natomiast w przypadku otrzymanych heksakisadduktów fullerenowych, ze względu na ich wysoki stopień symetrii (produkty addycji oktaedralnej, T<sub>h</sub>), można zaobserwować na widmie <sup>13</sup>C-NMR redukcję sygnałów klatki fullerenowej do trzech (dwa sygnały węgla sp<sup>2</sup> w zakresie 150-135 ppm, oraz jeden sygnał węgla sp<sup>3</sup> w okolicy 70 ppm). Przykładowe widma <sup>13</sup>C-NMR otrzymanych pochodnych [60]fullereny przedstawiono na Rysunku 4.

W przypadku nanomateriału fullerenowego otrzymywanego poprzez bezpośrednią addycję aminokwasu (kwasu 5-aminolewulinowego), ilość fragmentów aminokwasu podłączonych do klatki fullerenowej ustalono za pomocą analizy elementarnej (stosunek C/N). Natomiast ilość grup hydroksylowych dołączonych do C<sub>60</sub> została określona analizując widmo spektrometrii masowej (ESI-MS) dla otrzymanego nanokonstrukt, dzięki czemu uniknięto błędnego przypisania struktury, wynikającego z możliwej adsorpcji wody na powierzchni fullereny (publikacja **H6**).

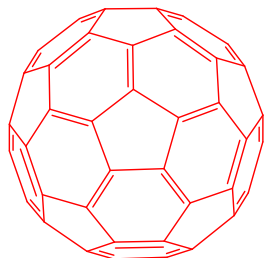
W celu dodatkowego potwierdzenia struktur otrzymywanych pochodnych fullerenów, przeprowadzono analizy spektrometrii masowej typu ESI oraz MALDI, potwierdzające struktury zaprojektowanych związków, a także ukazujące w niektórych przypadkach ich fragmentację. Dalsza analiza spektralna polegała na wykonaniu analiz UV-VIS oraz badaniu możliwej fluorescencji, co było niezwykle ważne w aspekcie terapii fotodynamicznej a także lokalizacji komórkowej. Aby potwierdzić obecność charakterystycznych grup funkcyjnych (NH, OH, COOH, C≡C) w końcowych produktach, przeprowadzono analizy widm spektroskopii w podczerwieni (FT-IR), a także rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów

(XPS). Podczas badania morfologii oraz stabilności w wodzie otrzymanych nanomateriałów węglowych, wykonywano pomiary wielkości cząstek użyciem techniki DLS, mikroskopii skaningowej (SEM) i transmisyjnej (TEM), określając dodatkowo ich potencjał zeta.

Analizując cykl publikacji opisujących moje osiągnięcie naukowe, można je podzielić na trzy podgrupy:

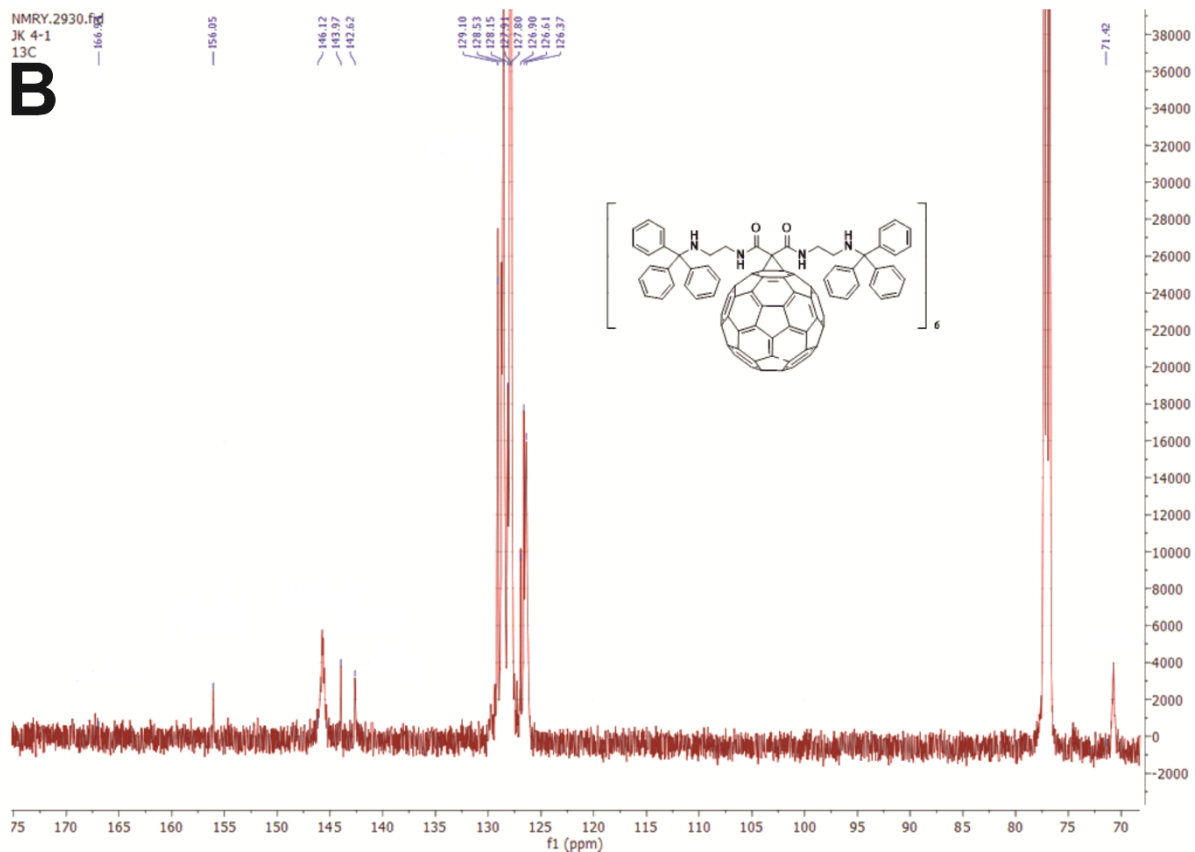
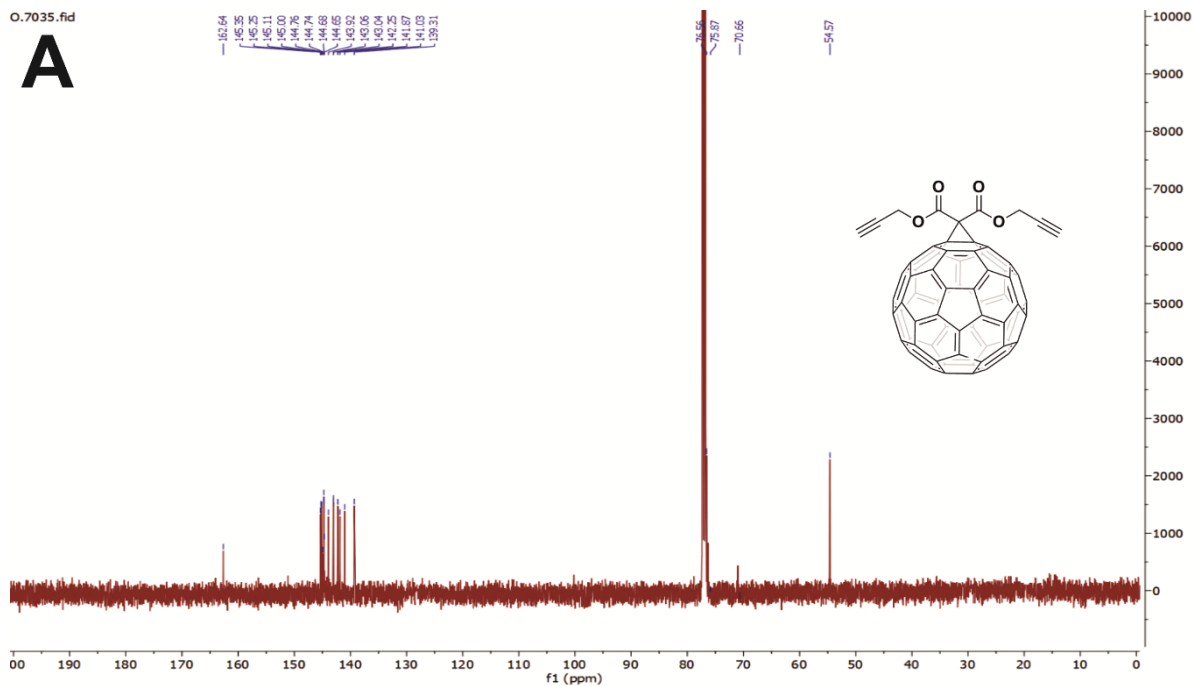
1. **Fullereny jako fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej nowotworów** (obejmuje artykuły H1, H3, H4, oraz H6).
2. **Fullereny jako inhibitory enzymów oraz nośniki siRNA** (obejmuje artykuły H2, H5 oraz H9).
3. **Opracowanie metod pozwalających na lokalizację komórkową nanomateriałów fullerenowych** (obejmuje artykuły H1, H7 oraz H8).

#### TERAPIA FOTODYNAMICZNA NOWOTWORÓW



### Fullereny jako fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej nowotworów

Terapia fotodynamiczna nowotworów (*ang. photodynamic therapy of tumors*) to szybko rozwijająca się metoda walki z guzami nowotworowymi, polegająca na podawaniu do komórek lub tkanek nietoksycznego związku chemicznego zwanego fotosensybilizatorem (PS). Następnie są one naświetlane światłem o odpowiedniej długości fali, co skutkuje wytworzeniem reaktywnych form tlenu (RTF) i dalszą aktywacją procesów śmierci komórkowej (apoptoza, nekroza, autofagia)<sup>26</sup>. Światło użyte podczas terapii jest pochłaniane przez fotosensybilizator, którego stany elektronowe wzbudzone są do pierwszego stanu singletowego, mogącego dalej (zgodnie z Diagramem Jabłońskiego) przechodzić do długotrwałego stanu trypletowego, w wyniku przejścia międzysystemowego. Wzbudzony stan trypletowy fotosensybilizatora może następnie oddziaływać z tlenem cząsteczkowym w stanie podstawowym, tworząc w konsekwencji reaktywne formy tlenu (RFT), takie jak tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oraz rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ). Rozważając szczegółowe mechanizmy kierujące procesami biofizycznymi w trakcie terapii PDT, można wyróżnić dwa rodzaje utleniania fotosensybilizowanego: Typ I (generowanie rodników) oraz Typ II (generowanie tlenu singletowego). Mechanizm Typu I polega na transferze elektronu ze stanu trypletowego fotosensybilizatora na cząsteczkę substratu i utworzeniu tzw. wolnych rodników tlenowych, w wyniku oddziaływania z tlenem cząsteczkowym. W przypadku reakcji Typu II, następuje transfer energii ze stanu wzbudzonego PS bezpośrednio na cząsteczkę tlenu, co wiąże się z wytworzeniem tlenu singletowego<sup>19</sup>.



#### Rysunek 4

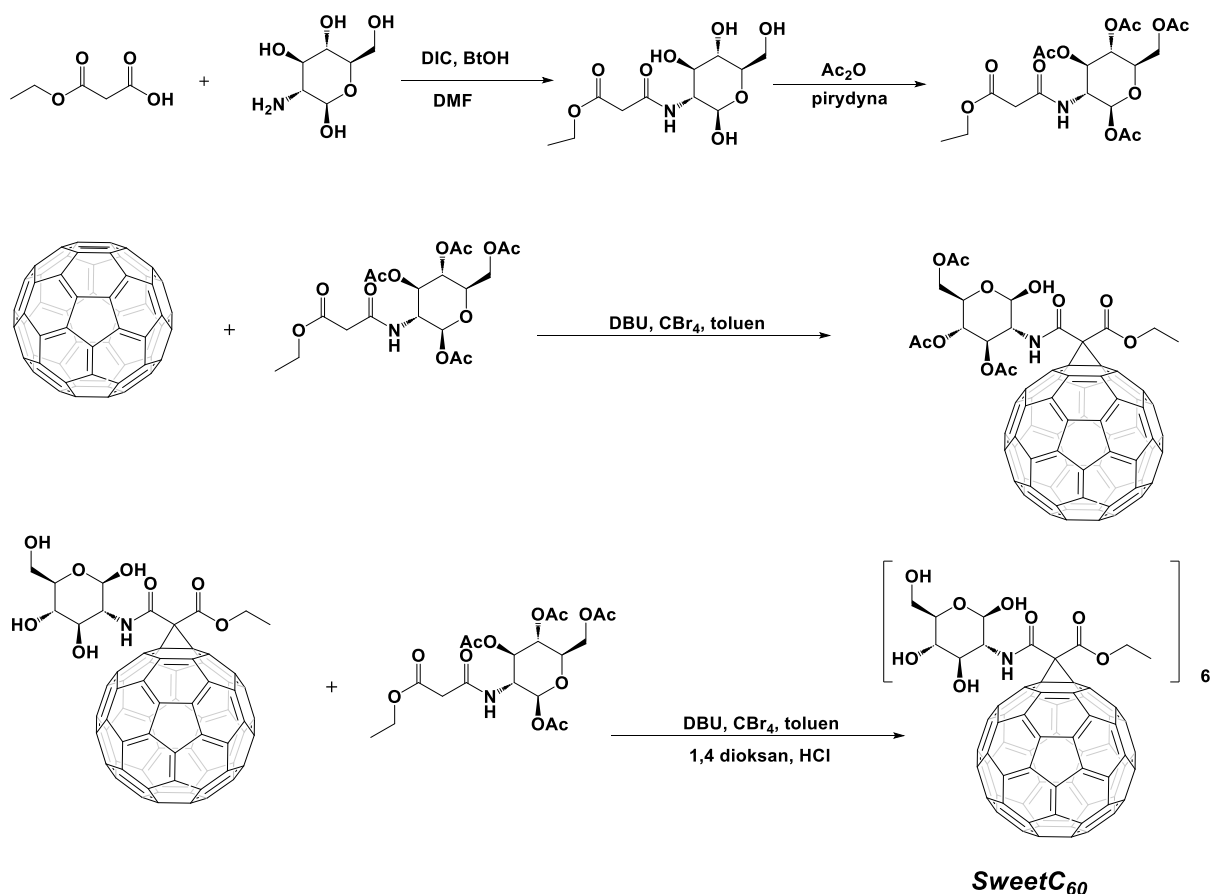
Widma  $^{13}\text{C}$ -NMR dla wybranych monoadduktów (A) oraz heksakisadduktów [60]fullerenowych.

W powyższym kontekście modyfikowane nanomateriały fullerenowe są ciekawym przykładem fotosensybilizatora w skali nanometrycznej. Obserwacja ta wynika bezpośrednio z ich unikalnych właściwości fotochemicznych. Analizując strukturę elektronową fullerenu, można zaobserwować, że posiada on potrójnie zdegenerowane i nisko położone orbitale LUMO, będące doskonałymi akceptorami, zdolnymi do przyjęcia aż sześciu elektronów. Co ciekawe, niemodyfikowany fulleren C<sub>60</sub> charakteryzuje się wysoką wydajnością generowania stanów trypletowych, o stosunkowo długich czasach życia (50-100 μs) oraz wysoką odpornością na proces fotowysyblania<sup>27</sup>. Klasyczne prace Hamblina oraz Wilsona opisują syntezę oraz zastosowania nanomateriałów fullerenowych (głównie tzw. aminofullerenów), o silnym działaniu przeciwnowotworowym oraz przeciwdrobnoustrojowym (bakterie Gram dodatnie/ujemne oraz grzyby)<sup>28, 29</sup>. Przeprowadzone w grupie profesora Hamblina badania mechanistyczne, potwierdzają fakt wytwarzania tlenu singletowego podczas naświetlania roztworów fullerenu w rozpuszczalnikach niepolarnych. Natomiast w przypadku użycia rozpuszczalników takich jak woda oraz alkohole, zaobserwowano wytwarzanie form rodnikowych (anionorodnik ponadtlenkowy oraz rodnik hydroksylowy)<sup>19</sup>. Najczęściej, w przypadku użycia rozpuszczalnych w wodzie nanomateriałów fullerenowych możemy mówić o mieszanym mechanizmie generowania RTF, w którym możemy zaobserwować zarówno formy rodnikowe tlenu, jak też tlen singletowy. W warunkach laboratoryjnych obecność tych form jest zazwyczaj potwierdzana przy użyciu techniki pułapkowania spinowego EPR jak również poprzez detekcję fosforescencji tlenu singletowego.

Swoją pracę badawczą nad fotosensybilizatorami fullerenowymi rozpocząłem projektując rozpuszczalny w wodzie glikofulleren (nazywany tutaj wg pracy **H1** jako *SweetC<sub>60</sub>*). Jego synteza (patrz Schemat 1), charakterystyka fizykochemiczna wraz z badaniem jego fotoaktywności na poziomie komórkowym zostały opisane w pracy **H1**. Na etapie projektowania celowanego fotosensybilizatora [60]fullerenowego, wykorzystano doniesienia literaturowe, wskazujące iż komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na glukozę, w celu wygenerowania energii niezbędnej do szybkiej proliferacji<sup>30</sup>. Ponadto, bazując na wcześniejszych raportach dotyczących wysokiej aktywności biologicznej cukrowych pochodnych fullerenu, zaproponowano użycie *D*-glukozaminy jako fragmentu wiodącego, obecnego w strukturze glikofullerenu *SweetC<sub>60</sub>*<sup>31</sup>. Dodatkowa hipoteza badawcza zakładała, iż dzięki zwiększonej obecności transporterów glukozy (*ang. GLUTs, glucose transporters*) w nowotworach trzustki, otrzymany nanomateriał węglowy będzie wychwytywany przez komórki nowotworowe w większym stopniu.

Zaproponowana ścieżka otrzymywania glikofullerenu zakładała wykorzystanie malonianu *D*-glukozaminy w reakcji cyklopropanacji Bingela-Hirscha, otrzymując końcowy heksakisaddukt o wysokiej rozpuszczalności w wodzie (obecność 24 grup hydroksylowych w końcowym nanomateriale).





## Schemat 1

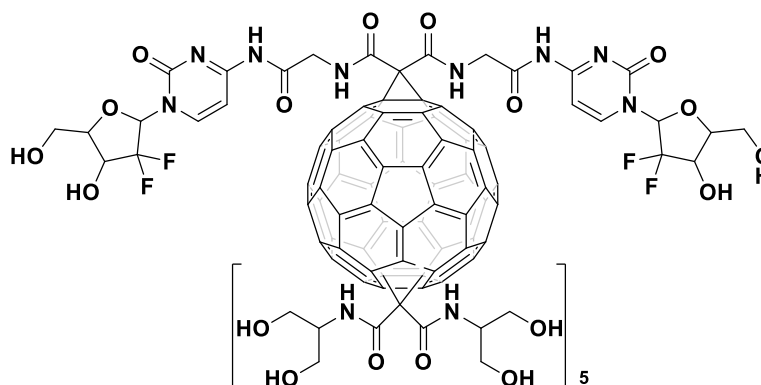
Synteza glikofullerenu *SweetC<sub>60</sub>*, według pracy [H1].

Syntezę pochodnej [60]fullerenu rozpoczęto od otrzymania peracetylowanego malonianu zawierającego fragment *D*-glukozaminy. W kolejnym etapie opracowano syntezę monoadduktu [60]fullerenowego, który następnie reagował dalej z tym samym malonianem w kolejnej reakcji Bingela-Hirscha, doprowadzając finalnie do otrzymania odpowiedniego heksakisadduktu fullerenu (**Schemat 1**). Zaproponowana procedura syntetyczna (podwójna cyklopropanacja) zagwarantowała wyższą wydajność otrzymania finalnego heksakisadduktu, co związane jest z wyższą reaktywnością monoadduktu [60]fullerenowego w reakcji Bingela-Hirscha, w porównaniu z niemodyfikowanym fullerenem C<sub>60</sub>.

Dalsze badanie fotoaktywności nanomateriału *SweetC<sub>60</sub>* zostały przeprowadzone na komórkach gwiazdzystych trzustki (ang. PCS, *pancreatic stellate cells*), będących dobrym modelem klinicznym do badania gruczolaka przewodowego trzustki (próbki pobrane od pacjentów kliniki *MD Anderson, USA*). W tym celu określono profil cytotoksyczności ciemniej (warunki bez naświetlania) fullerenu *Sweet-C<sub>60</sub>* (w zakresie stężeń 0,01–1 mg/mL), używając komórek linii PSC oraz Panc-1. Następne badania fototoksyczność z użyciem specjalnie zaprojektowanego naświetlacza LED, ujawniły silny efekt fotodynamiczny glikofullerenu przy naświetlaniu komórek linii PSC zarówno światłem niebieskim (450 nm) jaki i zielonym (530 nm). Podobny, ale nieznacznie zmniejszony efekt zaobserwowano również dla komórek Panc-1, co mogło być spowodowane podwyższonym poziomem białek szoku ciepłego (HSP) w

badanej linii komórkowej. Co ciekawe, dalsze badania biochemiczne glikofullerenu *SweetC<sub>60</sub>* prowadzone we współpracy z dr Krzykawką-Serda (UJ), potwierdziły, że powodował on nadekpresję receptora GLUT-1 oraz wpływał na aktywację procesu glikolizy w komórkach Panc-1.

Kolejnym etapem w syntezie nowej generacji fotosensybilizatorów fullerenowych było stworzenie nanokoniugatu [60]fullerenu z chemoterapeutyką gemcytabiną, w celu otrzymania hybrydowego nanomateriału fullerenowego. Jego synteza i aktywność biologiczna na komórkach nowotworu piersi (MCF-7) oraz trzustki (PAN02) zostały opisane w pracy **H3**. Jako związek modelowy w powyższych badaniach została użyta gemcytabina- antymetabolit stosowany w leczeniu nowotworów trzustki. Niestety jego skuteczność jest ograniczona, ze względu na procesy chemoodporności oraz niekorzystny profil farmakologiczny. Na etapie projektowania hybrydowego nanomateriału fullerenowego założono, że powinien on uwalniać gemcytabinę po przeniknięciu do komórek nowotworowych (koniugacja poprzez wiązanie amidowe hydrolyzowane przez peptydazy), aby następnie mógł być aktywowany światłem działając jako fotosensybilizator.



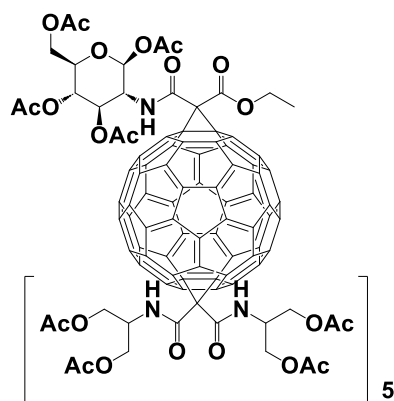
### Rysunek 5

Struktura nanokoniugatu (nanoC<sub>60</sub>GEM) [60]fullerenu z gemcytabiną [praca **H3**].

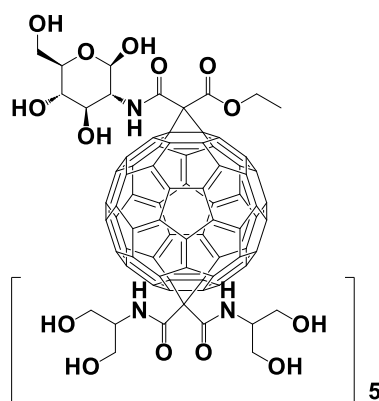
W trakcie opracowywania ścieżki syntetycznej fullerenu nanoC<sub>60</sub>GEM zaproponowano przedłużenie łańcucha kwasu malonowego fragmentem glicyny, tworząc odpowiedni malonian, będący substratem do reakcji cyklopropanacji (Schemat 1, praca **H3**). Postulowano, iż grupy karboksylowe w tak utworzonym malonianie, będą znacznie bardziej reaktywne względem amin aromatycznych (takich jak fragment cytozyny w gemcytabinie). Pomysł ten bazował na wcześniejszych doniesieniach literaturowych opisujących proste kwasy metanofullerenowe, których grupy karboksylowe wykazywały niską zdolność do dalszej koniugacji<sup>32</sup>. Zaprojektowany heksakisaddukt [60]fullerenowy, otrzymano dwuetapowo: początkowy diglicynowy monoaddukt [60]fullerenowy poddano kolejnej reakcji Bingela-Hirscha z użyciem peracetylowanego malonianu diserinolu, w celu zapewnienia wysokiej rozpuszczalności fullerenu w wodzie. Proces odbezpieczania grup etylowych oraz acetylowych przeprowadzono wg procedury dwuetapowej, poprzez hydrogenolizę z zużyciem wodoru sodu z następczą hydrolizą grup acetylowych w 1,4-dioksanie i w obecności HCl. Ostatni etap koniugacji z gemcytabiną przeprowadzono przy użyciu rozpuszczalnego w wodzie karbodiimidu EDCI w roztworze buforowym MES (kwas 2-etanosulfonowy).

Badania biofizyczne dotyczące generowania RFT przez fulleren nanoC<sub>60</sub>GEM potwierdziły jego zdolność produkcji tlenu singletowego (naświetlanie z użyciem diody LED o długości światła 440 nm), natomiast sama wydajność kwantowa generacji tlenu singletowego wynosiła 5%. Dodatkowo zaobserwowano, iż w obecności białka BSA (roztwór 100 mM) proces ten jest obniżony, co sugeruje ścisłą interakcję między fullerenem a wytworzoną otoczką białkową. Podczas gdy sam nanomateriał fullerenowy wykazywał znikomy sygnał aniorodnika ponadtlennowego podczas eksperymentów pułapkowania spinowego, to obecność donora elektronów (NADH) wzmacniała jego sygnał o rząd wielkości. Wyniki cytotoksyczności ciemnej (parametry IC<sub>50</sub>) dla dwóch linii nowotworowych (MCF-7 i PAN02) wynosiły odpowiednio  $2,07 \pm 0,64$  i  $7,35 \pm 1,13$   $\mu\text{M}$ , zaś sam nanokoniugat hamował cykl komórkowy w fazie S. W porównaniu z samą gemcytabiną działanie cytotoksyczne było zmniejszone. Przyczyną tego zjawiska mógł być nieefektywny transport fullereny nanoC<sub>60</sub>GEM do jądra komórkowego lub też problemy z uwalnianiem gemcytabiny. Analiza wyników fototoksyczności fullereny nanoC<sub>60</sub>GEM wskazuje, iż komórkowe efekty fototoksyczne były umiarkowane (przeżywalność komórek na poziomie 65 %, przy stężeniu nanokoniugatu 37  $\mu\text{M}$ ).

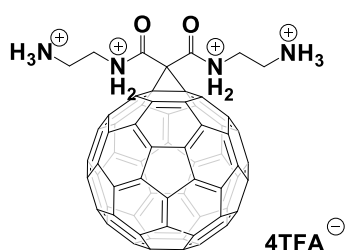
Badania mechanistyczne dotyczące generowania reaktywnych form tlenu przez wybrane nanomateriały fullerenowe (glikofullereny oraz aminofullereny) oraz ich zastosowanie w walce z rakiem kolczystokomórkowym skóry, zostały opisane w pracy **H4**. W powyższej pracy zbadano właściwości biofizyczne neutralnego (polihydroksylogowego) glikofullereny MMS49 (modyfikowana pochodna fullereny *SweetC<sub>60</sub>* z dodatkowymi fragmentami malonianem diserinolu) i jego peracetylowanym i hydrofobowym analogiem MMS48. Otrzymane glikofullereny porównywano pod względem właściwości biofizycznych z dwoma aminofullerenami MonoaminoC<sub>60</sub> oraz HexakisaminoC<sub>60</sub> (**Rysunek 6**). Opracowane w powyższej pracy ścieżki syntetyczne pozwoliły na otrzymanie nowych aminofullerenów (monoadduktów oraz heksakisadduktów) z zadowalającą wydajnością, a ich struktury zostały potwierdzone spektralnie. Cenne informacją dotyczące rodzaju generowanych RFT po naświetlaniu nanomateriałów fullerenowych uzyskano w eksperymentach polegających na monitorowaniu produktów utleniania cholesterolu oraz lipidów, za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) połączonej z detekcją elektrochemiczną. Metoda ta umożliwiła identyfikację i oznaczenie ilościowe wodoronadtlenków cholesterolu, co pozwoliło na określenie głównego mechanizmu utleniania cholesterolu. I tak, wodoronadtlenek (7 $\alpha$ -OOH)cholesterolu powstawał w wyniku reakcji utleniania cholesterolu z rodnikami tlenowymi, podczas gdy zaobserwowane wodoronadtlenki cholesterolu (5 $\alpha$ -OOH i 6 $\alpha$ -OOH) świadczyły o reakcji z tlenem singletowym. Dodatkowo, w celu sprawdzenia możliwości utleniania białek podczas terapii fotodynamicznej z otrzymanymi fullerenami, zastosowano test CBA (ang. *coumarin boronic acid test*), w którym produkty utleniania białek (wodoronadtlenki) przez fullereny reagowały z CBA tworząc fluorescencyjną 7-hydroksykumarynę.



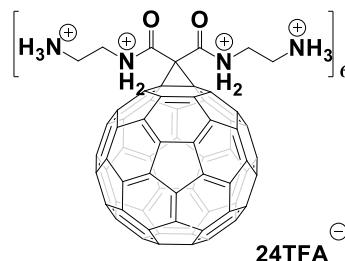
**MMS48**



**MMS49**



**MONOAMINO-C<sub>60</sub>**



**HEXAKISAMINO-C<sub>60</sub>**

**Ac=acyl**  
**TFA= trifluoroacetic acid**

## Rysunek 6

Struktury chemiczne badanych nanomateriałów fullerenowych poddanych analizie dotyczącej zdolności generowania przez nie reaktywnych form tlenu (praca **H4**).

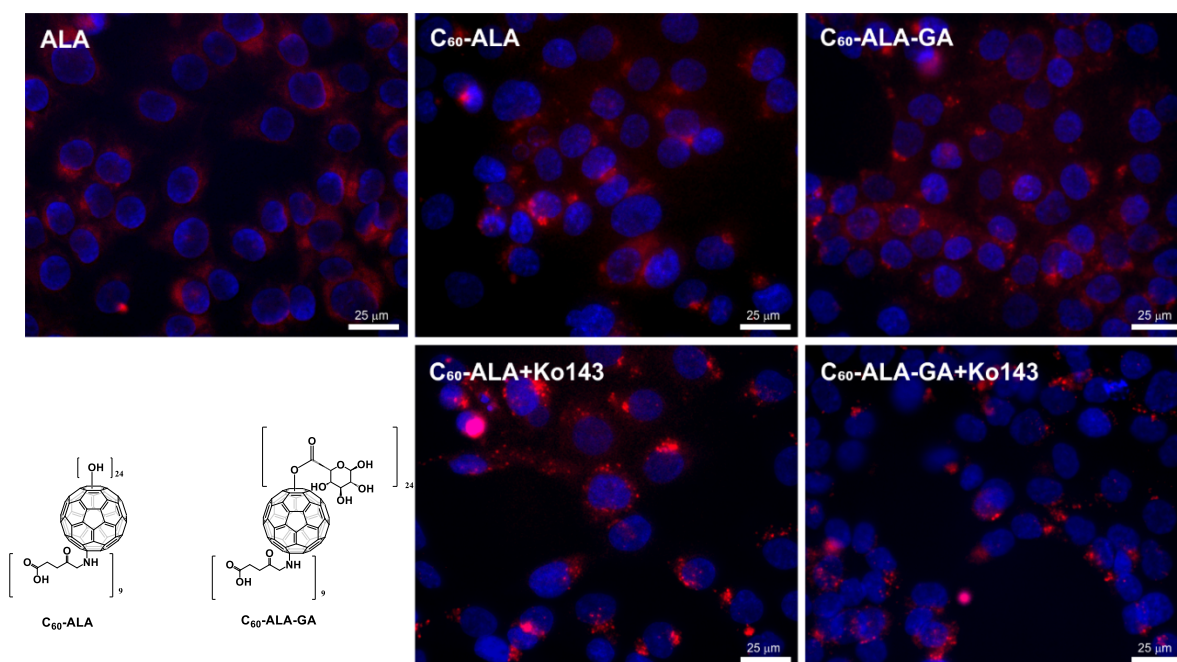
Przeprowadzone eksperymenty biofizyczne wykazały, że wszystkie cztery pochodne [60]fullerenu były w stanie wytwarzać reaktywne formy tlenu po naświetlaniu (Rysunek 3, praca **H4**). Wydajność procesu generowania anionorodnika ponadtlenkowego została znacznie zwiększona przez dodanie zewnętrznego donora elektronów- NADH. Wydajność kwantowa generacji tlenu singletowego dla obu aminofullerenów wynosiła odpowiednio 10 % (HexakisaminoC<sub>60</sub>) i 6,2% (MonoaminoC<sub>60</sub>). Bardzo ciekawą obserwacją dokonaną w trakcie przeprowadzania opisanych eksperymentów było zaobserwowanie, iż tylko w przypadku fullerenu HexakisaminoC<sub>60</sub> obecność albuminy zwiększała wydajność tworzenia tlenu singletowego (Rysunki 3B oraz S22, praca **H4**). Ponadto, najnowsze doniesienia literaturowe grupy prof. Calvaresiego wskazują, iż w przypadku kompleksów fullerenów z białkami (np. C<sub>60</sub>@lizozym), zaobserwowano również wzrost w wytwarzaniu tlenu singletowego<sup>33</sup>. Analiza

produktów peroksydacji cholesterolu przez nanomateriały fullerenowe wykazała, iż jego głównym utleniaczem jest tlen singletowy (Rysunek 4ABCD, praca **H4**). Pewnym dopełnieniem przeprowadzonych badań biofizycznych była analiza wyników w teście CBA, która potwierdziła, iż fulleren HexakisaminoC<sub>60</sub> może z sukcesem utleniać białka, co ma duże znaczenie praktyczne. Bazując na wynikach z badań biofizycznych, określono profil fototoksyczność fullerenu HexakisaminoC<sub>60</sub> względem komórek linii A431 (rak kolczystokomórkowy skóry). Badania cytotoksyczności ciemniej fullerenu HexakisaminoC<sub>60</sub> wykazały praktyczny brak jego toksyczności, zaś terapia fotodynamiczna przeprowadzona z użyciem światła niebieskiego (445 nm) oraz zielonego (500-580 nm) wykazała już znaczną fototoksyczność, zwłaszcza dla światła niebieskiego.

Kontynuując badania dotyczące zastosowań nanomateriałów fullerenowych w terapii fotodynamicznej nowotworów, zaproponowałem syntezę pochodnych [60]fullerenu zawierających fragmenty kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA). Związek ten jest prolekiem przemienianym w cyklu biochemicznym w aktywny fotosensybilizator- protoporfirynę IX (PpIX). Kwas 5-ALA jest szeroko stosowany w praktyce klinicznej, głównie w leczeniu raka skóry oraz do wizualizacji guzów mózgu w operacjach neurochirurgicznych. Niestety zastosowania 5-ALA są ograniczone przez niekorzystne właściwości farmakologiczne, zwłaszcza niską lipofilowość. Zaprojektowany nanomateriał fullerenowy (C<sub>60</sub>-ALA) otrzymano w wyniku bezpośredniej addycji kwasu 5-aminolewulinowego w środowisku zasadowym (utworzenie wiązania C<sub>60</sub>-NH<sub>aminokwas</sub>). Jego struktura została określona za pomocą analizy elementarnej (stosunek C/N pozwolił określić liczbę dołączonych cząsteczek aminokwasów do fullerenu) w połączeniu ze spektrometrią mas (określenie liczby dołączonych grup -OH) i analizą widm <sup>13</sup>C-NMR. Związek C<sub>60</sub>-ALA zawierał w swojej strukturze wolne grupy hydroksylowe, które zostały wykorzystane do połączenia z kwasem D-glukuronowym za pomocą rozpuszczalnego w wodzie karbodiimidu (EDCI) i w obecności DMAP. Głównym celem otrzymania glikokoniugatu fullerenu C<sub>60</sub>-ALA było poprawianie jego właściwości farmakologicznych oraz biodostępności, co w naszym przypadku zostało dodatkowo zaobserwowane podczas analizy wyników pomiarów wielkości cząstek, ich stopnia dyspersyjności, a także potencjału zeta. Badając zachowanie glikokoniugatu C<sub>60</sub>-ALA w roztworach wodnych, można było zauważyć zmianę wielkości tworzonych przez niego agregatów (tylko jeden rodzaj agregatów przy około 230 nm, zwiększona monodispersyjność) oraz większą stabilność (potencjał zeta utworzonego glikokoniugatu wynosił -38.9 mV w porównaniu do -26.2 mV dla wyjściowego fullerenu C<sub>60</sub>-ALA).

Efektywność uwalniania kwasu 5-aminolewulinowego z otrzymanych nanomateriałów fullerenowych określano poprzez detekcję jego metabolitu, protoporfiryny IX na poziomie komórkowym (użyto linii nowotworowych: HCT 116, MCF-7 i A549). Opisane w pracy **H6** doświadczenia przeprowadzono przy użyciu dwóch różnych technik eksperymentalnych: bezpośredniego oznaczania fluorescencji komórkowej protoporfiryny IX (638 nm), a także przy użyciu techniki HPLC (detekcja tzw. pasm Soreta, przy około 400 nm) z użyciem lizatów komórkowych. Powyższe badania potwierdziły zdolność do uwalniania 5-ALA z obydwóch nanomateriałów fullerenowych, jednakże bezpośrednie określenie enzymu odpowiedzialnego za ten proces (hydroliza wiązania C-N, prowadzona jest w komórkach przez liazy) wymaga dalszych prac eksperymentalnych. Badania z zakresu biologii molekularnej przeprowadzone

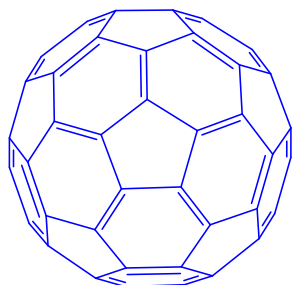
techniką qRT-PCR na badanych trzech liniach komórkowych, dostarczyły informacji na temat aktywacji/dezaktywacji genów biorących udział w przemianie 5-ALA do hemu (badane geny: *PEPT1*, *ABCG2*, *HO-1* i *FECH*). Ze względu na dramatyczny wzrost poziomu genu *ABCG2* po inkubacji z nanomateriałami fullerenowymi (odpowiedzialnego za wydalanie nadmiaru PpIX z komórek) zaproponowałem użycie selektywnego inhibitora białka ABCG2- związku Ko143 w dalszej terapii fotodynamicznej. Przeprowadzone badanie potwierdziły możliwość wytwarzania protoporfiryny IX przez otrzymane nanomateriały fullerenowe w cyklu biochemicznym, jednakże ze względu na umiarkowane wyniki z terapii fotodynamicznej dalsze prace badawcze powinny będą prowadzone pod kątem obrazowania nowotworów.



**Rysunek 7**

Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego dla linii komórkowej MCF-7 inkubowanej z nanomateriałami fullerenowymi i w obecności inhibitora Ko143 (Rysunek 7, praca **H6**).

#### INHIBICJA ENZYMÓW ORAZ TRANSFEKCJA siRNA



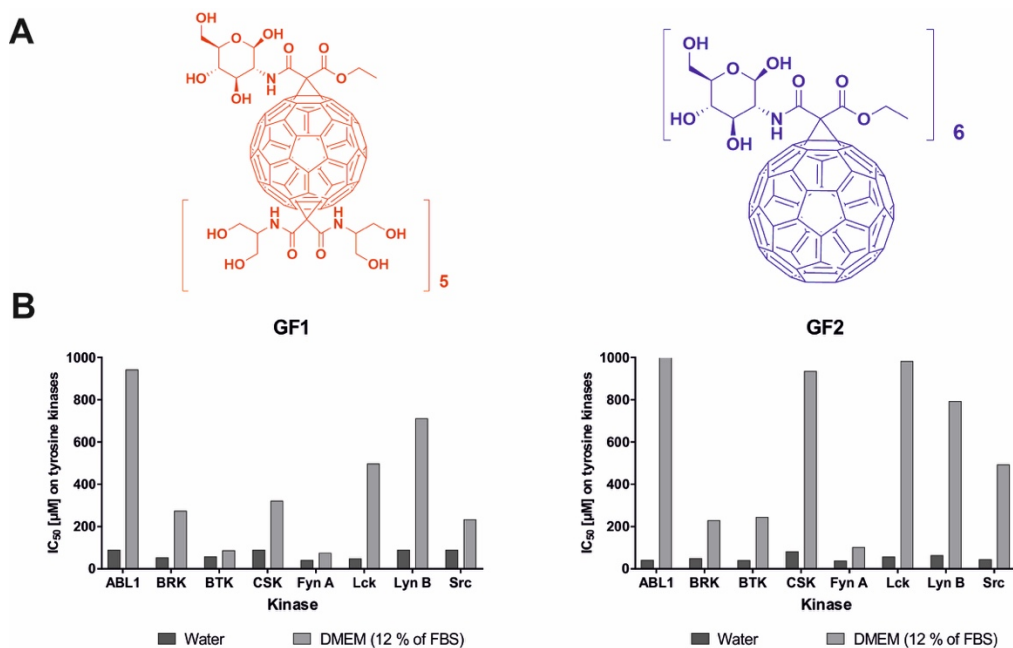
### Fullereny jako inhibitory enzymów oraz nośniki siRNA

Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące inhibicji enzymów poprzez rozpuszczalne w wodzie nanomateriały fullerenowe zostały opisane w latach 1993-2010 (np. proteaza czy odwrotna transkryptaza HIV-1, anhidraza węglanowa czy acetylocholinoesteraza)<sup>9, 34, 35</sup>. Warto zauważyć, iż dalsza krytyczna analiza piśmiennictwa nie wskazała przykładów

opisujących oddziaływanie fullerenów z kinazami tyrozynowymi- grupą enzymów, których inhibitory są obecnie intensywnie wykorzystywane w praktyce klinicznej do walki m.in. chorobami nowotworowymi. W ciągu prac badawczych nad aktywnością biologiczną pochodnych [60]fullerenu zaproponowałem zbadanie ich aktywności enzymatycznej względem szeregu niereceptorowych kinaz tyrozynowych, co zostało opisane w pracy **H2**. W tym celu zsyntezowano dwa rozpuszczalne w wodzie glikofullereny GF1 i GF2 (heksakisaddukty [60]fullerenowe z fragmentami *D*-glukozaminy), używając dwuetapowej metodyki cyklopropanacji Biengela-Hirscha. Otrzymane nanomateriały fullerenowe wykazywały bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie, a nowopowstały związek GF1 tworzył stabilne agregaty o rozmiarach około 100 nm, wykazując potencjał zeta o wartości -26,7 mV.

Przeprowadzone badania enzymatyczne (Rysunek 8) potwierdziły działanie hamujące glikofullerenów względem niereceptorowych kinaz tyrozynowych. Badane związki okazały się hamować działanie białek Fyn A oraz BTK z wartościami parametru IC<sub>50</sub> w niskim zakresie mikromolowym- przy najbardziej aktywnym związku na poziomie 39 μM. Co więcej, wykazano, iż tworzenie otoczki białkowej na powierzchni pochodnych [60]fullerenu (potwierdzone za pomocą techniki SDS-PAGE), zmieniało profil ich aktywności, zwiększając selektywność działania uzyskanych nanomateriałów węglowych w kierunku kinaz Fyn A oraz BTK. Dalsze eksperymenty z zakresu biologii molekularnej (techniki PCR oraz Western Blot) nie wykazały znaczącej cytotoksyczności fullerenów ani ich wpływu na cykl komórkowy komórek nowotworu trzustki PANC-1 oraz AsPC-1. W celu zbadania procesu inhibicji wybranych kinaz tyrozynowych na poziomie komórkowym, przeprowadzono analizę transkryptu oraz poziomu białka Fyn i Lck w dwóch liniach komórkowych nowotworu trzustki (PANC-1 oraz ASPC-1) traktowanych glikofullerenami. Dodatkowo, przebadano wpływ otrzymanych nanomateriałów na białka p21, p51 oraz oksygenazę hemową HO-1- w celu określenia ich dokładnych mechanizmów działania. Analizując proces inhibicji białka Fyn A na poziomie komórkowym, zaobserwowano prawie 3-krotny wzrost ekspresji Fyn w komórkach PANC-1 i AsPC-1 po 24-godzinnej inkubacji z glikofullerem GF2, zaś po 48 godzinach, poziomy białka Fyn A w linii PANC-1 gwałtownie spadały. Dla linii AsPC-1 zaobserwowaliśmy podobne efekty, ale w mniejszym stopniu. Podobnie, obniżoną ekspresję Fyn zarejestrowano również dla związku GF1 w komórkach PANC-1. Zależne od czasu zmiany w ekspresji Fyn na poziomie komórkowym mogą być wyjaśniane przez kilka czynników. Intensywniejsze gromadzenie się powyższego białka może być wynikiem wzmożonej transkrypcji genu FYN. Dodatkowo, zaobserwowany efekt mógł wynikać z interakcji glikofullerenów z kinazą, co mogło przyczynić się do hamowania jej aktywności i blokowania fosforylacji białka.

Ciekawą kontynuacją powyższych badań był kolejny artykuł naszej grupy badający proces inhibicji kinazy BTK (kinazy tyrozynowej Brutona) poprzez cytotoksyczną, glicynową pochodną [60]fullerenu. Warto podkreślić, iż podczas przeprowadzania symulacji komputerowych zaproponowano model wyjaśniający wysoką aktywność biologiczną otrzymanego fullereny. Dokow się on do białka BTK dokładnie w tym sam miejscu w którym ibrutinib- klinicznie stosowany lek przeciwko białaczce limfocytowej<sup>36</sup>.



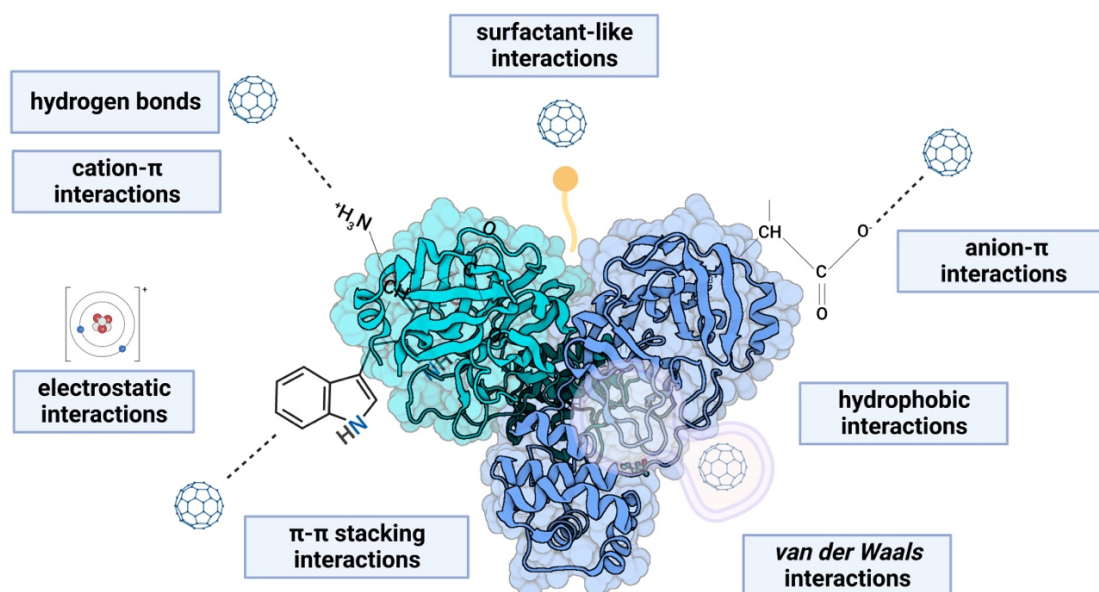
## Rysunek 8

(A) Struktury glikofullerenów GF1 i GF2; (B) Aktywność hamująca glikofullerenów względem panelu kinaz tyrozynowych (Rysunek 1, praca **H2**).

Krytyczny przegląd bieżącej literatury naukowej (2010-2023) opisujący oddziaływania nanomateriałów fullerenowych z białkami został przedstawiony w pracy przeglądowej **H9**. W powyższym artykule zaproponowano opis interakcji pomiędzy nanomateriałami fullerenowymi oraz białkami przedstawiony z perspektywy chemii medycznej nowotworów. Podczas analizy źródeł literaturowych zauważono istotną potrzebę bardziej dogłębnego rozpatrzenia tych oddziaływań, gdyż autorzy ograniczyli się jedynie do opisu samej cytotoksyczności fullerenów, pomijając dokładne określenie ich konkretnych celów molekularnych oraz mechanizmów działania. W świetle przeprowadzonych badań, zaproponowano podział oddziaływań pomiędzy nanomateriałami fullerenowymi a białkami na trzy oddzielne podkategorie: (1): tworzenie kompleksów fullerenów z wybranymi białkami (albumina, lizozym) w celu poprawienia ich rozpuszczalności w wodzie oraz profilu farmakologicznego; (2): tworzenie otoczki białkowej (ang. *protein corona*), zaadsorbowanej na powierzchni fullerenów i determinującej ich biodystrybucję; (3): bezpośrednią inhibicję wybranych enzymów odpowiedzialnych za proces nowotworzenia.

Odchodząc od klasycznego paradygmatu chemii medycznej związanego z poszukiwaniem nowych i coraz bardziej efektywnych inhibitorów enzymów, zaproponowałem użycie kationowych pochodnych [60]fullerenu jako nośników wykorzystywanych w procesie interferencji RNA. Co ciekawe, fullerenowe czynniki transfekcyjne pozwalają na wyciszenie dowolnie wybranych przez nas białek, poprzez zablokowanie syntezy mRNA<sup>37</sup>. Aby zaspokoić rygorystyczne kryteria transfekcji kwasów nukleinowych, efektywny nanomateriał powinien dostarczać skutecznie specyficzne siRNA do cytoplazmy, zapewniając jednocześnie jego ochronę przed nukleazami.



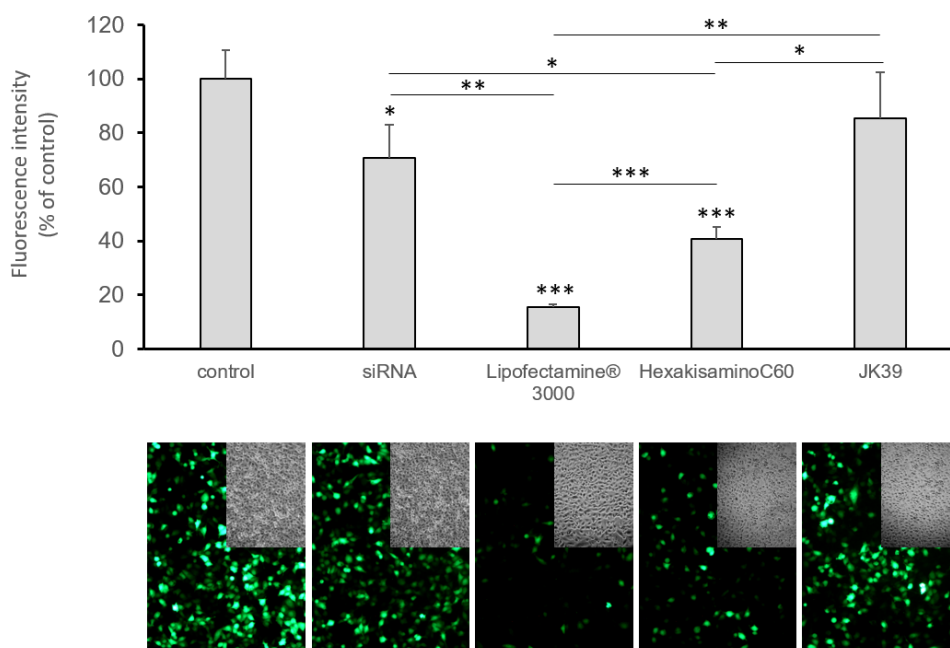


**Rysunek 9**

Schemat oddziaływań nanomateriałów fullerenowych z białkami (Rysunek 3, praca **H9**).

Po dostarczeniu do komórki, siRNA łączy się z białkami z rodziny Argonaute (AGO), prowadząc do degradacji celowanego mRNA. W konsekwencji dochodzi do stworzenia kompleksu RISC (*ang. RNA-induced silencing complex*), który indukuje inhibicję ekspresji wybranych genów.

Szczegółowy opis syntezy rozpuszczalnych w wodzie aminofullerenów (związki HexakisaminoC<sub>60</sub> oraz JK39), jako nośników do transfekcji siRNA został opisany w pracy **H5**. Efektywność procesu transfekcji siRNA za pomocą fullerenu została przetestowana na modelu komórkowym, przy użyciu modyfikowanej adenowirusami linii nowotworu prostaty DU145, kodującej białko eGFP. Był to wygodny model eksperymentalny do analizy nowych nośników transfekcyjnych, gdyż stosunkowo łatwo można monitorować zanik fluorescencji białka eGFP za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej. Opisane w publikacji **H5** badania wskazują, iż pochodna HexakisaminoC<sub>60</sub> okazała się efektywnym nanomateriałem do transfekcji siRNA i znacząco zmniejszyła sygnał fluorescencji białka eGFP w komórkach DU145. Dodatkowo, otrzymane aminofullereny (rozpuszczalne w wodzie heksakisaddukty o symetrii T<sub>h</sub>) różniły się znacząco właściwościami fizykochemicznymi, a zwłaszcza jeśli chodzi o zeta potencjał otrzymanych nanokompleksów (siRNA-aminofulleren). Miało to znaczący wpływ na modulację wydajności procesu transfekcji- glikofulleren JK39 okazał się być nieaktywny w powyższych eksperymentach, prawdopodobnie z powodu jego wysokiego potencjału zeta oraz tworzenia zbyt stabilnego kompleksu z siRNA. Przedstawione wyniki są mają wysoki poziom aplikacyjności, ze względu na gwałtowny rozwój technik transfekcji RNA używanych w terapiach przeciwwirusowych oraz nowoczesnych metodach modyfikacji genomu (CRISPR/Cas9).

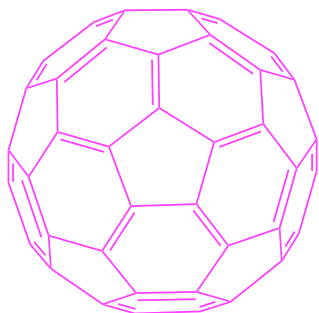


## Rysunek 10

Badanie efektywności transfekcji siRNA przy użyciu aminofullerenów HeksakisaminoC<sub>60</sub> oraz JK39. Komórki nowotworu prostaty DU145 zostały wcześniej zmodyfikowane plazmidem kodującym białą EGFP (Rysunek 4, praca H5).

### WIZUALIZACJA KOMÓRKOWA I TKANKOWA

### Opracowanie nowych metod pozwalających na lokalizację komórkową i tkankową nanomateriałów fullerenowych



Lokalizacja komórkowa sfunekjonalizowanych nanomateriałów jest jedną z kluczowych informacji pozwalających na lepsze zrozumienie ich interakcji z układami biologicznymi- zarówno na poziomie komórkowym jak i zwierzęcym. Głównym wyzwaniem związanym z badaniem efektów komórkowych pochodnych fullerenów jest brak skutecznych metod ich wizualizacji jak i określania biodystrubucji tkankowej- głównie z powodu braku ich fluorescencji. Prace wstępne w tym projekcie dotyczyły kowalencyjnego dołączenia czerwonego barwnika fluorescencyjnego (PromoFluor-633) do fragmentu rozpuszczalnego w wodzie fullerenu-C<sub>60</sub>ser<sup>14</sup>. Tak otrzymany nanomateriał, wykazywał silną fluorescencję w zakresie światła czerwonego, pozwalającą na obserwację jego wyciekania do przestrzeni intratumorlanych mysiego nowotworu piersi (4T1).

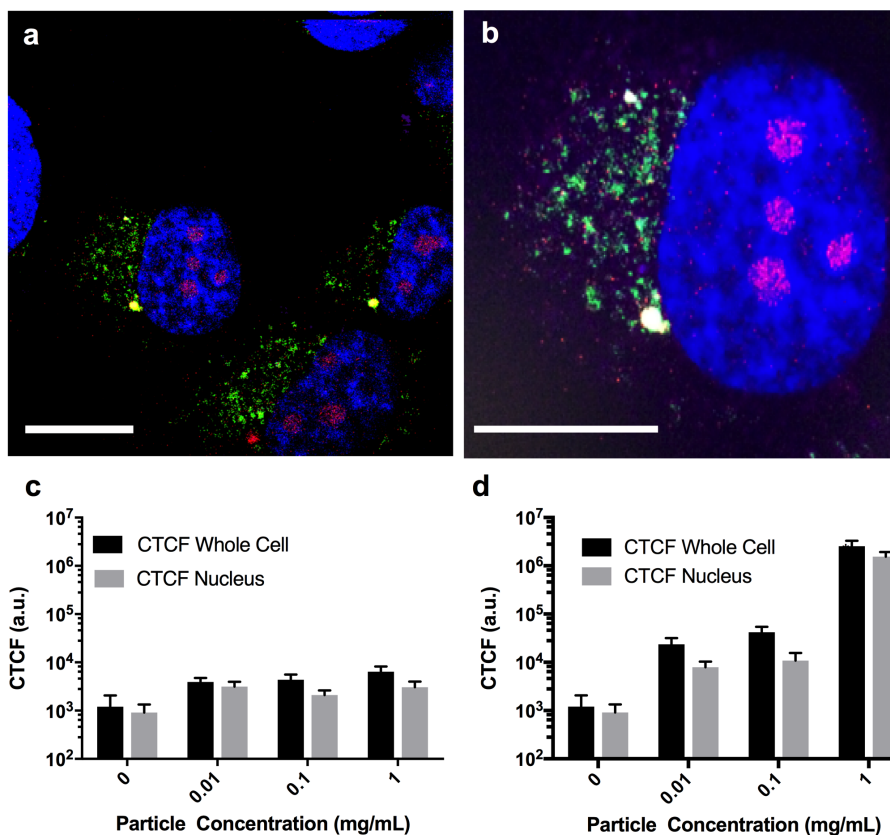
W ciągu realizacji prac badawczych nad biologiczną aktywnością pochodnych fullerenów zaproponowałem następujące rozwiązania problemu wizualizacji komórkowej i tkankowej nanomateriałów fullerenowych:

- Użycie dedykowanego przeciwciała anty-fullerenowego (praca **H1**),
- Przeprowadzenie reakcji w komórce nowotworowej z wytworzeniem *in situ* fluorescencyjnego nanomateriału fullerenowego (praca **H7**),
- Otrzymanie rozpuszczalnej w wodzie fluorescencyjnej pochodnej [70]fullerenu (praca **H8**)

W pracy **H1** podjęto z sukcesem próbę wizualizacji niefluorescencyjnego glikofullerenu (*SweetC<sub>60</sub>*), w komórkach gwieździstych trzustki (klinicznie uzyskana hodowla komórek PSC). Kluczowym etapem w opisanych eksperymentach było wcześniejsze wyznaczenie przeciwciała monoklonalnego specyficznego dla fullerenów (1-10F-A8) barwnikiem fluorescencyjnym (*Alexa Fluor 647*), przy użyciu mieszaniny koniugacyjnej (NHS/EDCI). Analizując Rysunek 11 (Rysunek 2, praca **H1**) można było zaobserwować, iż badany glikofulleren był nietoksyczny dla komórek i lokalizował się preferencyjnie w jądrze komórkowym linii PSC. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi raportami dotyczącymi hydroksyfullerenów i wskazującymi, że fulleren C<sub>60</sub>serPF lokalizował się również w jądrze komórkowym badanych komórek nowotworowych. Jak pokazano na Rysunku 11 (Rysunek 2D, praca **H1**) po 24 godzinach inkubacji komórek z pochodną fullerenową, można zaobserwować znaczący wzrost sygnału fluorescencyjnego z obszaru komórkowego w porównaniu z kontrolą. Porównanie rozkładu sygnału fluorescencyjnego w obszarze całej komórki wskazało na dominującą lokalizację glikofullerenu w jądrach komórkowych. Słaby sygnał fluorescencyjny był obecny również w regionach cytoplazmy, co jest jednak najprawdopodobniej wynikiem ciągle zachodzącego procesu biotransportu badanego nanomateriału.

Kolejną próbą określenia lokalizacji komórkowej sfunkcjonalizowanych fullerenów był szereg doświadczeń z użyciem pochodnej [60]fullerenowej zawierającej w swojej strukturze dwa wiązania potrójne (TBC<sub>60</sub>ser). Związek ten był substratem użytym do reakcji typu *click* (cykloaddycja 1,3-dipolarna) z dedykowanymi azydkami organicznymi, prowadzącej do powstania fluorescencyjnych triazoli fullerenowych. Powyższe eksperymenty zostały opisane w pracy **H7** i zawierały opis metodyki wizualizacji nanomateriału fullerenowego TBC<sub>60</sub>ser w komórkach nowotworu piersi linii MCF-7. Główną ideą projektu było stworzenie rozpuszczalnego w wodzie fullerenu zawierającego w swojej strukturze wiązania potrójne, który reagowałby dalej „w komórce” z niefluorescencyjnym azydkiem organicznym (3-azydo-7-hydroksykumaryną) tworząc odpowiedni fluorescencyjny triazol fullerenowy (HCC<sub>60</sub>serTRIAZOLE). Plan syntetyczny dla powyższych doświadczeń umieszczono na **Rysunku 12**. W celu dodatkowego potwierdzenia lokalizacji komórkowej nanomateriału fullerenowego użyto komercyjnie dostępnego barwnika fluorescencyjnego w formie azydku (azydek sulfocjaniny 5), który tworzył również fluorescencyjny triazol fullerenowy. Co ciekawe, przeprowadzone eksperymenty z użyciem azydkowego analogu fullerenu TBC<sub>60</sub>ser oraz barwnika fluorescencyjnego opartego na fragmencie cyklooktynu (układ bioortogonalny, aktywowany bez dodatku soli miedzi) zakończyły się niepowodzeniem. Udowodniono, iż

azydek fullerenny (analog TBC<sub>60</sub>ser) nie wnikał przez błonę komórek MCF-7 pozostając w medium hodowlanym, stąd próby jego lokalizacji komórkowej były nieskuteczne.

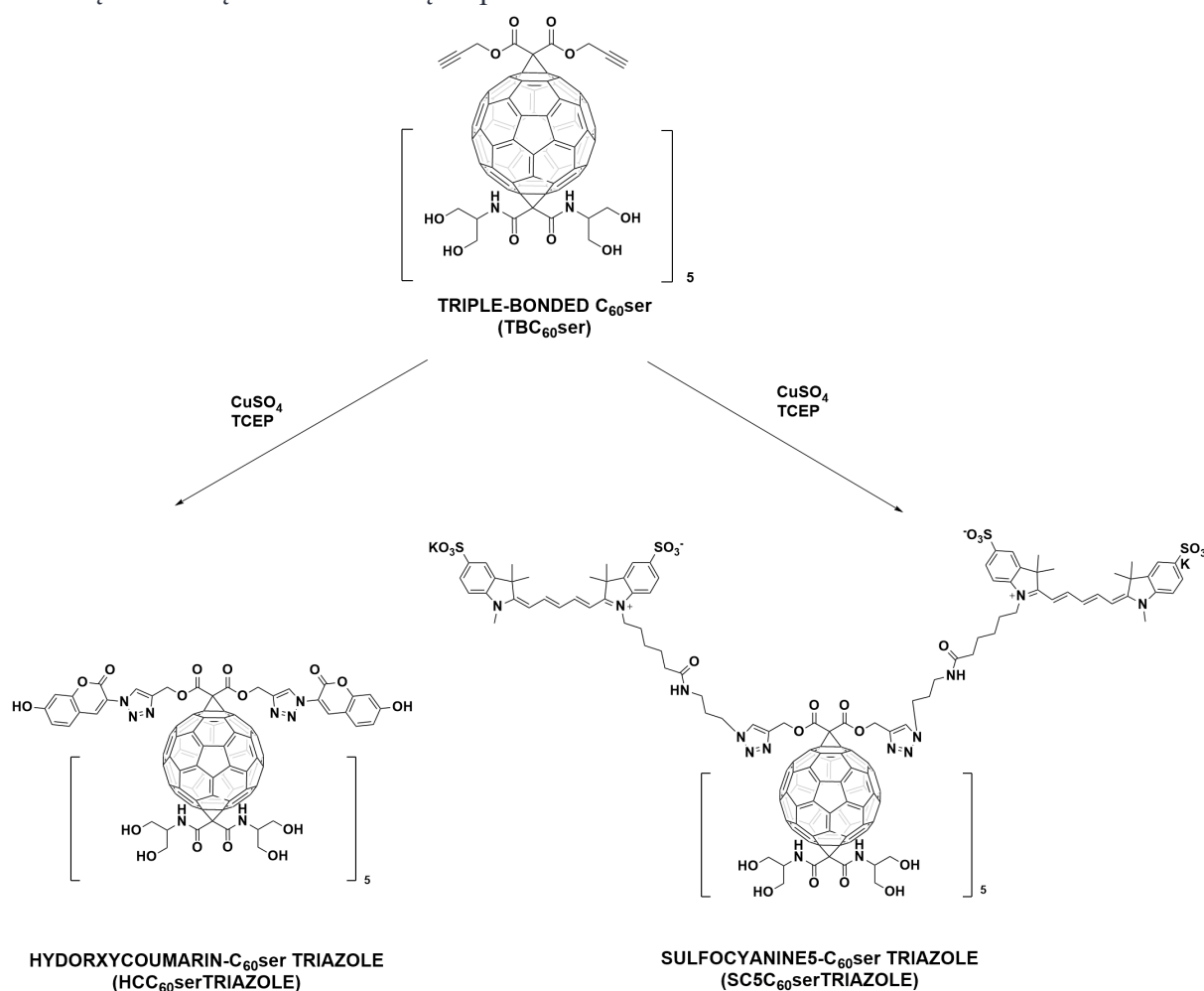


**Rysunek 11**

A, B-lokalizacja komórkowa glikofullerenu *SweetC<sub>60</sub>* (1 mg/mL) w komórkach gwiaździstych trzustki, przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Nanomateriały fullerenne zostały oznaczone kolorem fioletowym (magenta), jądro komórkowe wybarwione na kolor niebieski (barwnik DAPI), kolor zielony wskazuje na mitochondria (wybarwione barwnikiem FITC), zaś obszary czerwone wskazują na lizosomy (wybarwione tetrametylorodaminą); C-skorygowany całkowity sygnał fluorescencji komórek PSC traktowanych glikofullerem w czasie 3 lub 24 godzin (Rysunek 2, praca **H1**).

W pracy **H7** scharakteryzowano strukturalnie heksakisaddukt fullerenny (TBC<sub>60</sub>ser) i potwierdzono otrzymanie triazoli fullerennych za pomocą technik spektroskopowych. Jednym z kluczowych parametrów, pozwalających na przeprowadzenie reakcji *click* w komórce nowotworowej było określenie cytotoksyczności reagentów: substratu (TBC<sub>60</sub>ser), układu katalitycznego (siarczan (VI) miedzi(II) oraz tris(2-karboksyetylo)fosfina), a także użytych azydków organicznych. Badany fulleren TBC<sub>60</sub>ser użyty w stężeniu 1 mg/mL nie wpływał na żywotność komórek nowotworowych, a podobne wyniki uzyskano dla obu testowanych barwników, gdzie stężenie (25 μM) nie indukowało efektu cytotoksycznego. Wyniki obrazowania komórkowego z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej przedstawiono na

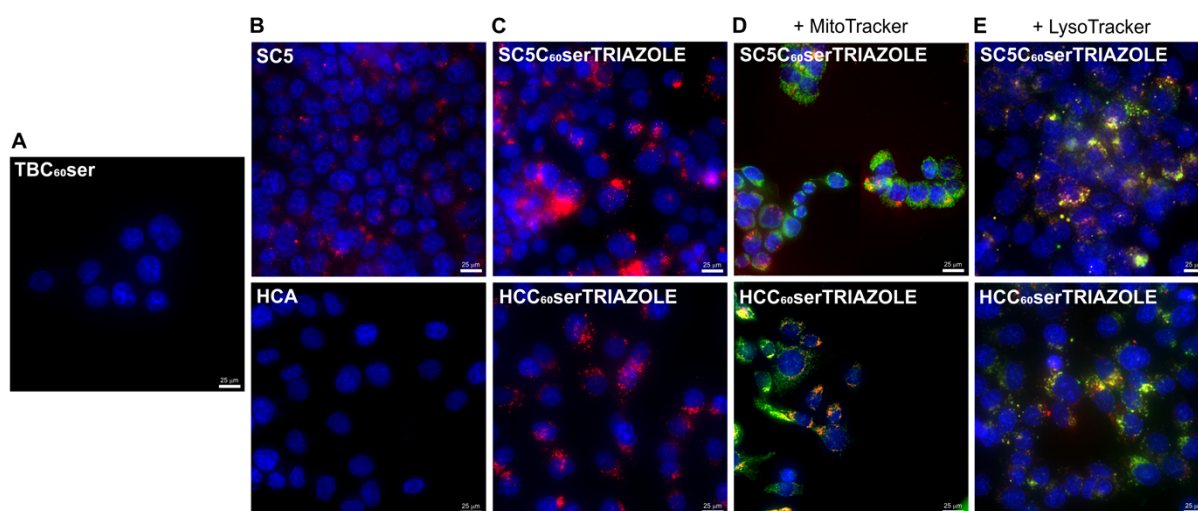
Rysunku 13 (Rysunek 6, praca **H7**). Zgodnie z oczekiwaniami, fulleren TBC<sub>60</sub>ser jak i azydek hydroksykumaryny wykazywały brak fluorescencji (**Rysunek 13**). Z kolei dla azydku sulfocjaniny 5 (wzbudzenie 650 nm) zaobserwowano fluorescencję w obszarze przylegającym do jądra komórkowego. Kluczowe reakcje cykloaddycji przeprowadzono inkubując komórki MCF-7 z badanym fullerenem w czasie 24 godzin, po czym przez kolejne 2 godziny inkubowano je z 3-hydroksykumaryną lub barwnikiem SC5, w obecności układu katalitycznego (CuSO<sub>4</sub>/TCEP). Lokalizację triazoli fullerennowych w komórkach nowotworu piersi MCF-7 określono przez ich współbarwienie z barwnikami znakującymi mitochondria (Mitotracker) oraz lizosomy (LysoTracker). Zaobserwowano, iż oba triazole fullerennowe (SC5C<sub>60</sub>serTRIAZOLE oraz HCC<sub>60</sub>serTRIAZOLE) wykazywały skłonność do akumulacji w lizosomach. Co ważne, opisany protokół eksperymentalny pozwolił na obrazowanie pochodnych [60]fullerenu w obecności białek FBS w medium hodowlanym i tworzących otoczkę białkową zaadsorbowaną na powierzchni nanomateriałów.



## Rysunek 12

Schemat reakcji 1,3-cykloaddycji dipolarnej pomiędzy pochodną fullerenu z wiązaniem potrójnym (TBC<sub>60</sub>ser) a azydkami organicznymi prowadzącą do powstania fluorescencyjnych triazoli fullerennowych (Schemat 2, praca **H7**).

Kontynuacją podjętych badań nad lokalizacją nanomateriałów fullerenowych w komórkach i tkankach zwierzęcych było opracowanie syntezy fluorescencyjnej i rozpuszczalnej w wodzie pochodnej [70]fullerenu-  $C_{70}OMe-ser$ . W pracy **H8** syntezowano i scharakteryzowano spektralnie fulleren ( $C_{70}OMe-ser$ ), który fluoryzował przy 693 nm, z wydajnością kwantową 0,065 oraz niespodziewanie dużym przesunięciem Stokesa (około 300 nm). Warto podkreślić, iż dzięki swojej strukturze elektronowej oraz znacząco różnej symetrii fullerenu  $C_{70}$ , można zaobserwować zwiększoną wydajność jego fluorescencji w porównaniu z fullerenem  $C_{60}$ . Ścieżkę syntetyczną pozwalającą otrzymać fluorescencyjną pochodną [70]fullerenu przedstawiono na **Rysunku 14**. Jako substrat do reakcji Biengela-Hirscha wybrano fulleren  $C_{70}(OMe)_8$ , zaś malonian diserinolu został użyty w celu zwiększenia rozpuszczalności zaprojektowanego nanomateriału. Wstępne prace Gan i współpracowników sugerowały, że produkty cyklopropanacji fullerenu  $C_{70}(OMe)_8$  wykazywały właściwości fluorescencyjne- nie były one jednak rozpuszczalne w wodzie, a ich biodystrybucja i toksykologia nie zostały zbadane<sup>38</sup>. Opisany w pracy **H8** protokół syntetyczny polegał na traktowaniu fullerenu  $C_{70}$  chlorkiem jodu (ICl) w celu wytworzenia oktakischlorofullerenu ( $C_{70}Cl_8$ ); tak otrzymany nanomateriał traktowano dalej metanolem w obecności niekoordynującego ligandu  $AgClO_4$ , uzyskując analog zawierający osiem grup metoksyłowych przyłączonych do klatki fullerenowej  $C_{70}$ . Oktakismetoksy[70]fulleren ulegał następnie reakcji cyklopropanacji, w wyniku której otrzymano odpowiedni trisaddukt [ $C_{70}(OMe)_8(malonian)_3$ ], poddawany dalszej hydrolizie w środowisku kwaśnym (1,4-dioksan/HCl) w celu odbezpieczenia grup hydroksyłowych.



**Rysunek 13**

Lokalizacja komórkowej nanomateriału fullerenowego  $TBC_{60}ser$  (A) oraz barwników: SC5 i HCA (B) i jego pochodnych triazolowych (C–E) w linii komórkowej nowotworu piersi (MCF-7). Jądra komórkowe wybarwiono kolorem niebieskim, mitochondria/lizosomy-zielonym, a triazole fullerenowe ( $SC5C_{60}serTRIAZOLE$  i  $HCC_{60}serTRIAZOLE$ ) w kolorze czerwonym (Rysunek 6, praca **H7**).

Analizując widmo  $^{13}\text{C}$ -NMR badanego nanomateriału fullerenowego  $\text{C}_{70}\text{OMe-ser}$  (Rysunek 2, praca **H8**), można zaobserwować obecność 29 sygnałów ( $2\text{C}$ ) węgla  $\text{sp}^2$  pochodzących do klatki  $[\text{70}]$ fullerenowej, a także cztery pojedyncze sygnały węgla  $\text{sp}^2$ , wszystkie w zakresie od 155 do 132 ppm. Obecność ośmiu węgla  $\text{C}_{70}$  połączonych z grupami metoksyłowymi można zaobserwować w zakresie od 81 do 79 ppm, zaprezentowanymi na widmie w postaci czterech sygnałów. W trakcie reakcji cyklopropanacji fullerenu  $\text{C}_{70}(\text{OMe})_8$  możliwe były dwa typu addycji malonianu: w obszary bieguna (*ang. pole regions*) lub też pasa (*ang. belt regions*) klatki  $[\text{70}]$ fullerenu, które zostały rozróżnione używając spektroskopii  $^{13}\text{C}$ -NMR. W przypadku analizowanego nanomateriału ( $\text{C}_{70}\text{OMe-ser}$ ), widoczne były trzy sygnały węgla  $\text{sp}^3$  w obszarze około 56 ppm, które wskazywały na addycję malonianu w regionie pasa (*belt region*) i sugerując powstanie produktu o symetrii  $\text{C}_s$ . Podczas naświetlania związku  $\text{C}_{70}\text{OMe-ser}$  światłem o długości fali 440 nm zaobserwowano fosforescencję tlenu singletowego (pomiar w  $\text{D}_2\text{O}$ , a kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego wyniosła 0.0877); natomiast nie zaobserwowano tworzenia się anionorodnika ponadtlenkowego w eksperymentach pułapkowania spinowego EPR.

Lokalizację tkankową badanego nanomateriału fullerenowego badano na modelu muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), wykorzystując do jego obrazowania techniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz elektronowej (**Rysunek 14**). Badania toksykologiczne wskazały iż pochodna  $[\text{70}]$ fullerenu przedostaje się do cytoplazmy komórek jelita środkowego oraz organelli komórkowych *Drosophila melanogaster* na drodze endocytozy. Badany nanomateriał fullerenowy był obserwowany na terenie regionu apikalnego, około jądrowego oraz bazalnego komórek trawiennych, a także blaszki podstawnej nabłonka układu pokarmowego- co sugeruje jego przemieszczanie się w kierunku jam ciała i narządów wewnętrznych. Zastosowane stężenie pochodnej  $[\text{70}]$ fullerenu oraz czas ekspozycji były obojętne dla komórek- nie dochodziło do uszkodzania organelli komórkowych, a także nie zaobserwowano aktywacji procesów degeneracyjnych i śmierci komórkowej.

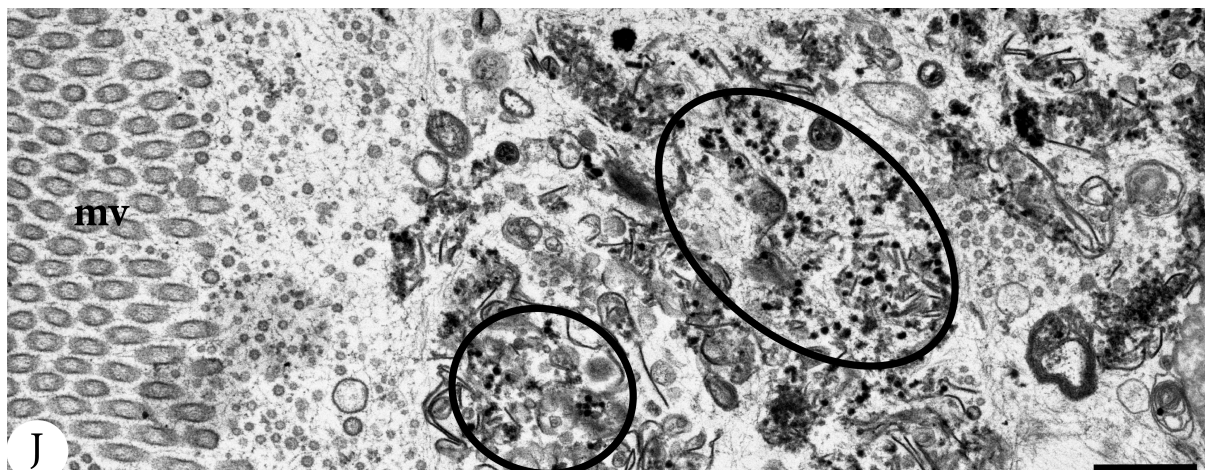
**Podsumowując, przedstawione w osiągnięciu badawczym badania pozwoliły na opracowanie metod syntezy rozpuszczalnych w wodzie nanomateriałów fullerenowych o istotnej aktywności przeciwnowotworowej. Opisana powyżej aktywność biologiczna była spowodowana poprzez inhibicję określonych celów molekularnych (m.in. kinaz tyrozynowych), bądź też w wyniku przeprowadzenia terapii fotodynamicznej i produkcji reaktywnych form tlenu. W ciągu przeprowadzonych prac badawczych udało się również opracować metodykę określania lokalizacji komórkowej wybranych pochodnych fullerenów, zarówno na poziomie komórkowym (przeciwciała antyfullerenowe/reakcje typu *click*), jak również na modelu *Drosophila melanogaster*.**

### Dalsze plany badawcze

W swojej najbliższej pracy naukowej planuję rozwijanie następujących obszarów badawczych związanych z chemią medyczną nanomateriałów fullerenowych jak również ich zastosowaniem w chemii analitycznej jako nanoadsorbentów:

- Otrzymywanie nanomateriałów fullerenowych służących do fotoaktywacji drobnoustrojów (współpraca z dr. Szewczykiem oraz dr. Kwiecińskim, UJ). Planowane są

badania biologiczne nowych pochodnych fullerenów działających na lekoodporne szczepy bakterii oraz grzybów. Wstępne wyniki badań pozwalają wskazywać na silne działanie bakteriobójcze względem szczepów gronkowca złocistego- MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) oraz enterokoków opornych na wankomycyne VRE (ang. *Vancomycin-Resistant Enterococcus*).



#### Rysunek 14

Komórki jelita środkowego *D.melanogaster* traktowane fullerenem C<sub>70</sub>OMe-ser przez miesiąc. Zaznaczone obszary wskazują na lokalizację granulek gęstych elektronowo (nanomateriał fullerenowy, Rysunek 10J, praca H8).

- Synteza oraz analiza oddziaływań białek z fullerenami (współpraca z prof. Calvaresim, University of Bologna, Włochy oraz prof. Wheeler, Santa Clara University, USA). W trakcie prowadzonych badań używane będą techniki solubilizacji monoadduktów fullerenowych z wybranymi białkami, a także symulacje komputerowe. Dodatkowo, przeprowadzane badania skupiają się na określeniu składu otoczki białkowej zaadsorbowanej na wybranych nanomateriałach fullerenowych z użyciem spektrometrii masowej (Q-TOF).
- Synteza pochodnych fullerenów wykorzystywanych do degradacji białek w technice PROTAC (współpraca z prof. Tao, Fudan University, Chiny). Planowane jest tutaj wykorzystanie faktu, iż otrzymane przez mnie nanomateriały fullerenowe wykazują silne oddziaływanie z kinazami tyrozynowymi. Obecnie trwają prace nad przygotowaniem odpowiednich nanoformulacji fullerenowych zawierających ligandy wiążące się z ligazami E3.
- Synteza i badanie aktywności enzymatycznej nanomateriałów fullerenowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich oddziaływań z kinazami tyrozynowymi (współpraca z dr hab. Anną Mrozek-Wilczkiewicz oraz dr Katarzyną Malarz, UŚ).



- Synteza oraz zastosowania hybrydowych nanomateriałów fullerenowych (tlenek grafenu-fulleren) jako nanoadsorbentów stosowanych w chemii analitycznej (współpraca z prof. Sitko, UŚ). Prowadzone są badania dotyczące selektywnej adsorpcji metali (chrom, rtęć, ołów) na otrzymanych nanoadsorbentach oraz ich dalszym wykorzystaniu w analizie skomplikowanych matryc metodą XRF.

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

W trakcie prowadzenia działalności naukowej podjąłem współpracę z szeregiem jednostek naukowych w kraju i za granicą. Część z tych aktywności została przeprowadzona podczas odbywania przeze mnie trzech staży podoktorskich w USA. Ponadto, przedstawione poniżej tematy badawcze nie wchodzą w skład dzieła będącego podstawą do uzyskania stopnia doktora habilitowanego:

1. *Badanie biotransformacji oraz farmakokinetyki rodników tritylowych, mających zastosowanie w obrazowaniu EPR.* Prace badawcze polegały na opracowaniu metodyki oczyszczania sondy spinowej OX063 oraz ustaleniu jej metabolitów. Badania zostały finansowane w ramach projektu NIH (P41 EB002034 oraz R01 CA098575), a wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Chemical Research in Toxicology*<sup>39</sup>. Doświadczenia zostały wykonane w laboratoriach prof. Rawala oraz prof. Halperna (University of Chicago).
2. *Wpływ hipertermii na biodystrybucję oraz farmakokinetykę leków przeciwnowotworowych oraz nanomateriałów węglowych.* Prace badawcze dotyczyły badania interakcji fal radiowych o wysokiej częstotliwości (RF) z tkankami biologicznymi i ich wykorzystania jako platformy terapeutycznej w nieinwazyjnej hipertermii nowotworów. Badania zostały sfinansowane przez Kanzius Cancer Research Foundation oraz NIH (U54CA143837). Powyższe doświadczenia zostały wykonane w laboratoriach prof. Curleya (Baylor College of Medicine) oraz prof. Wilsona (Rice University), a wyniki opisane w czasopismach *Scientific Reports* oraz *Journal of Controlled Release*.<sup>14, 40</sup>
3. *Badanie zdolności przechodzenia przez barierę krew-mózg nanokoniugatów rodników tritylowych z nanomateriałami fullerenowymi.* Prace badawcze dotyczyły otrzymywania nanomateriałów fullerenowych połączonych z rodnikami tritylowymi w celu obrazowania ciśnienia parcjalnego tlenu w mózgu. Doświadczenia były finansowane przez Kosciuszko Foundation oraz we współpracy z firmą O2M. Opisane

eksperymenty zostały wykonane w laboratoriach prof. Rawala oraz prof. Halperna (University of Chicago).

4. *Synteza nanoprętów złota dołączonych do leków przeciwnowotworowych.* Prace badawcze dotyczyły syntezy i charakterystyki fizykochemicznej nanoprętów złota połączonych z lekiem gemcytabiną. Doświadczenia były finansowane w ramach grantu OPUS (Narodowe Centrum Nauki) i wykonywane w laboratorium prof. Elas (Uniwersytet Jagielloński).

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

W latach 2013-2023 opracowywałem materiały dydaktyczne oraz prowadziłem zajęcia związane z szeroko pojętą chemią organiczną, medyczną oraz nanomedycyną dla kierunków: chemia, technologia chemiczna oraz biotechnologia (Wydział Biologii UŚ). Omawiane zajęcia dydaktyczne przedstawiono w poniższej tabeli:

LABORATORIUM	SEMINARIUM	WARSZTATY
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chemia organiczna A i B</i></li> <li>• <i>Laboratorium specjalizacyjne</i></li> <li>• <i>Poszerzona chemia organiczna</i></li> <li>• <i>Podstawy farmakologii</i></li> <li>• <i>Chemia leków</i></li> <li>• <i>Tutoring ekspercki (Szkoła Doktorska UŚ)</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chemia organiczna*</i></li> <li>• <i>Introduction to organic synthesis</i></li> <li>• <i>Kataliza w chemii organicznej i nieorganicznej</i></li> <li>• <i>Mechanizmy w chemii organicznej</i></li> <li>• <i>Nowoczesne metody syntezy organicznej</i></li> <li>• <i>Wstęp do projektowania leków</i></li> <li>• <i>Selected topics in general chemistry</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Nanofarmakologia*</i></li> </ul>

\*główny koordynator przedmiotu

W latach 2017-2020 ze względu na kierowanie projektem SONATA, prowadziłem jedynie 105 godzin dydaktycznych/rok. W roku 2019 prowadziłem trzy wykłady z kursu Chemii Organicznej. Ponadto w roku 2023 byłem opiekunem studenta zagranicznego, wykonującego eksperymenty w ramach projektu VINCI. W latach 2013-2023 prowadziłem seminaria licencjackie oraz magisterskie. Jestem promotorem poniższych prac dyplomowych:

1. *Synteza wybranych aminowych pochodnych [60]fullerenu i ich zastosowanie w biologii molekularnej* (Kamila Byra, praca magisterska, 2018).

2. *Synteza pochodnych [60]fullerenu zawierających wiązania potrójne* (Dominika Waleriańska, praca licencjacka, 2018).
3. *Synteza pochodnych [60] fullerenu zawierających fragment kwasu 5-aminolewulinowego dla terapii fotodynamicznej nowotworów* (Dominik Dreszer, praca licencjacka, 2019).
4. *Synteza i obrazowanie pochodnych [60]fulerenów w układach biologicznych za pomocą reakcji cykloaddycji 1,3-dipolarnej* (Patrycjusz Cieślak, praca licencjacka, 2019).
5. *Synteza aminowych pochodnych [60]fullerenu jako nośników sond spinowych przeznaczonych do obrazowania EPR* (Dominik Dreszer, praca magisterska, 2021).
6. *Synteza pochodnych [60]fullerenu używanych do transfekcji siRNA* (Aleksandra Tuszyńska, praca licencjacka, 2021).
7. *Synteza rozpuszczalnych w wodzie nanokompozytów [60] fullerenu z superparamagnetycznym tlenkiem żelaza* (Daria Polakowska, praca licencjacka 2021).
8. *Synteza nanokoniugatów nanoprętów złota z wybranymi lekami nowotworowymi* (Patrycja Fraś, praca licencjacka, 2021).

Ponadto byłem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim dr Pawła Nalepy (*Wybrane nanotechnologie dla syntezy nowych terapeutyków o znaczeniu przeciwnowotworowym*, 2023), promotor: prof. dr. hab. Jarosław Polański.

#### **Aktywność organizacyjna:**

1. Organizacja konferencji naukowej *Chemistry Towards Biology*, 2014 rok
2. Członek komisji ds. zapewniania jakości kształcenia, 2013-14

#### **Aktywność popularyzująca naukę**

1. Byłem wykonawcą w szeregu projektów edukacyjnych dla szkół podstawowych oraz liceów/techników w formie laboratoriów oraz wykładów. W tym:
  - *Kreatywny eksperymentator (2017-2018)*
  - *Kreatywny odkrywca (2020-21)*
  - *ChemiK= Chemia+Kompetencje*
  - *Popularyzacja i Nauka: PIN UŚ - kod do przyszłości*
2. Współautor rozdziału w książce *'Chemia w badaniach naukowych i nauczaniu. O różnych zastosowaniach węgla'* przeznaczonym jako materiał wspierający dla nauczycieli chemii i fizyki w województwie śląskim.
3. Udział w organizowaniu Konkursu Chemicznego dla uczniów szkół średnich w latach 2009-14 oraz w roku 2018.
4. Recenzent Olimpiady Chemicznej dla szkół ponadgimnazjalnych w województwie śląskim (2013-2014, 2017-2023).

#### **Członkostwo w Towarzystwach Naukowych**

1. *Polskie Towarzystwo Chemii Medycznej (od 2012)*
2. *American Chemical Society (od 2023)*

## Stypendia oraz Nagrody

1. Nagroda dla najlepszego absolwenta kierunku chemia (Gliwice, 2009)
2. Stypendium doktoranckie TWING (Katowice, 2012-14).
3. Stypendium fundacji Welcha (Houston, 2016)
4. Stypendium ministra dla wybitnych młodych naukowców (Warszawa, 2018)
5. Stypendium fundacji Kościuszkowskiej (Chicago, 2021)

## LITERATURA

### Uncategorized References

- (1) Kazemzadeh, H.; Mozafari, M. Fullerene-based Delivery Systems. *Drug Discovery Today* **2019**, *24* (3), 898-905.
- (2) Nakamura, E.; Isobe, H. Functionalized Fullerenes in Water. The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience. *Accounts of Chemical Research* **2003**, *36* (11), 807-815. DOI: 10.1021/ar030027y.
- (3) Zhang, R.; Murata, M.; Aharen, T.; Wakamiya, A.; Shimoaka, T.; Hasegawa, T.; Murata, Y. Synthesis of a distinct water dimer inside fullerene C70. *Nature Chemistry* **2016**, *8* (5), 435-441.
- (4) Steve F. A. Acquah, A. V. P., Denis A. Markelov, Anna S. Semisalov, Branden E. Leonhardt, and James M. Magi. The Beautiful Molecule: 30 Years of C60 and Its Derivatives. *ECS J. Solid State Sci. Technol* **2017**, *6* (6), M3155-M3162. DOI: 10.1149/2.0271706jss.
- (5) Chiang, L. Y.; Swirczewski, J. W.; Hsu, C. S.; Chowdhury, S.; Cameron, S.; Cregan, K. Multi-hydroxy additions onto C 60 fullerene molecules. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, (24), 1791-1793.
- (6) Pinteala, M.; Dascalu, A.; Ungurenasu, C. Binding fullereneol C60 (OH) 24 to dsDNA. *International Journal of Nanomedicine* **2009**, *4*, 193.
- (7) Hirsch, A.; Lamparth, I.; Grösser, T.; Karfunkel, H. R. Regiochemistry Of Multiple Additions To The Fullerene Core: Synthesis Of A Th-Symmetric Hexakis Adduct Of C60 With Bis (ethoxycarbonyl) Methylene. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (20), 9385-9386.
- (8) Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (21), 9798-9799.
- (9) Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Castoro, J.; Wilkins, C.; Friedman, S. H.; DeCamp, D. L.; Kenyon, G. L. Synthesis Of A Fullerene Derivative For The Inhibition Of HIV Enzymes. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (15), 6510-6512.
- (10) Sayes, C. M.; Fortner, J. D.; Guo, W.; Lyon, D.; Boyd, A. M.; Ausman, K. D.; Tao, Y. J.; Sitharaman, B.; Wilson, L. J.; Hughes, J. B.; et al. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. *Nano Letters* **2004**, *4* (10), 1881-1887. DOI: 10.1021/nl0489586.
- (11) Tatiana Y. Zakharian, A. S., Balaji Sitharaman, Brian E. Gilbert, Vernon Knight, and Lon J. Wilson. A Fullerene–Paclitaxel Chemotherapeutic: Synthesis, Characterization, and Study of Biological Activity in Tissue Culture. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (36), 12508-12509. DOI: 10.1021/ja0546525.
- (12) Ashcroft, J. M.; Tsyboulski, D. A.; Hartman, K. B.; Zakharian, T. Y.; Marks, J. W.; Weisman, R. B.; Rosenblum, M. G.; Wilson, L. J. Fullerene (C60) immunoconjugates: interaction of

water-soluble C60 derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody. *Chemical Communications* **2006**, (28), 3004-3006, 10.1039/B601717G. DOI: 10.1039/B601717G.

(13) Raoof, M.; Mackeyev, Y.; Cheney, M. A.; Wilson, L. J.; Curley, S. A. Internalization of C60 fullerenes into cancer cells with accumulation in the nucleus via the nuclear pore complex. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2952-2960. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.043.

(14) Lapin, N. A.; Krzykawska-Serda, M.; Dilliard, S.; Mackeyev, Y.; Serda, M.; Wilson, L. J.; Curley, S. A.; Corr, S. J. The effects of non-invasive radiofrequency electric field hyperthermia on biotransport and biodistribution of fluorescent [60]fullerene derivative in a murine orthotopic model of breast adenocarcinoma. *Journal of Controlled Release* **2017**, *260*, 92-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.022>.

(15) Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release* **2016**, *244*, 108-121.

(16) Fang, J.; Islam, W.; Maeda, H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Advanced drug delivery reviews* **2020**, *157*, 142-160.

(17) Sun, Q.; Zhou, Z.; Qiu, N.; Shen, Y. Rational design of cancer nanomedicine: nanoproperty integration and synchronization. *Advanced materials* **2017**, *29* (14), 1606628.

(18) Foote, C. S. Photophysical and photochemical properties of fullerenes. In *Electron Transfer I*, Springer, 2005; pp 347-363.

(19) Mroz, P.; Tegos, G. P.; Gali, H.; Wharton, T.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6* (11), 1139-1149, 10.1039/B711141J. DOI: 10.1039/B711141J.

(20) Mroz, P.; Pawlak, A.; Satti, M.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free radical biology & medicine* **2007**, *43* (5), 711-719. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.005 PMC.

(21) Liu, Y.; Jiao, F.; Qiu, Y.; Li, W.; Lao, F.; Zhou, G.; Sun, B.; Xing, G.; Dong, J.; Zhao, Y. The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF- $\alpha$  mediated cellular immunity. *Biomaterials* **2009**, *30* (23-24), 3934-3945.

(22) Zakharian, T. Y.; Seryshev, A.; Sitharaman, B.; Gilbert, B. E.; Knight, V.; Wilson, L. J. A Fullerene-Paclitaxel Chemotherapeutic: Synthesis, Characterization, and Study of Biological Activity in Tissue Culture. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (36), 12508-12509. DOI: 10.1021/ja0546525.

(23) Huo, J.; Li, J.; Liu, Y.; Yang, L.; Cao, X.; Zhao, C.; Lu, Y.; Zhou, W.; Li, S.; Liu, J. Amphiphilic aminated derivatives of [60] fullerene as potent inhibitors of tumor growth and metastasis. *Advanced Science* **2022**, *9* (29), 2201541.

(24) Kang, S.-g.; Zhou, G.; Yang, P.; Liu, Y.; Sun, B.; Huynh, T.; Meng, H.; Zhao, L.; Xing, G.; Chen, C.; et al. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C<sub>82</sub>(OH)<sub>22</sub> and its implication for de novo design of nanomedicine. **2012**, *109* (38), 15431-15436. DOI: 10.1073/pnas.1204600109 %J Proceedings of the National Academy of Sciences.

(25) Shi, W.; Salerno, F.; Ward, M. D.; Santana-Bonilla, A.; Wade, J.; Hou, X.; Liu, T.; Dennis, T. J. S.; Campbell, A. J.; Jelfs, K. E. Fullerene Desymmetrization as a Means to Achieve Single-Enantiomer Electron Acceptors with Maximized Chiroptical Responsiveness. *Advanced Materials* **2021**, *33* (1), 2004115.

- (26) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, *61* (4), 250-281.
- (27) Sharma, S. K.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? *Nanomedicine (London, England)* **2011**, *6* (10), 1813-1825. DOI: 10.2217/nnm.11.144 PMC.
- (28) Tegos, G. P.; Demidova, T. N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M. R. Cationic Fullerenes Are Effective and Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Chemistry & biology* **2005**, *12* (10), 1127-1135. DOI: 10.1016/j.chembiol.2005.08.014 PMC.
- (29) Lee, J.; Mackeyev, Y.; Cho, M.; Li, D.; Kim, J.-H.; Wilson, L. J.; Alvarez, P. J. Photochemical and antimicrobial properties of novel C60 derivatives in aqueous systems. *Environmental science & technology* **2009**, *43* (17), 6604-6610.
- (30) Tekade, R. K.; Sun, X. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug discovery today* **2017**, *22* (11), 1637-1653.
- (31) Zhou, S.; Trochimczyk, P.; Sun, L.; Hou, S.; Li, H. Sugar-functionalized fullerenes. *Current Organic Chemistry* **2016**, *20* (14), 1490-1501.
- (32) Wang, L.; Zhu, X.; Tang, X.; Wu, C.; Zhou, Z.; Sun, C.; Deng, S.-L.; Ai, H.; Gao, J. A multiple gadolinium complex decorated fullerene as a highly sensitive T1 contrast agent. *Chemical Communications* **2015**, *51* (21), 4390-4393.
- (33) Soldà, A.; Cantelli, A.; Di Giosia, M.; Montalti, M.; Zerbetto, F.; Rapino, S.; Calvaresi, M. C60@ lysozyme: a new photosensitizing agent for photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, *5* (32), 6608-6615.
- (34) Innocenti, A.; Durdagi, S.; Doostdar, N.; Strom, T. A.; Barron, A. R.; Supuran, C. T. Nanoscale enzyme inhibitors: fullerenes inhibit carbonic anhydrase by occluding the active site entrance. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18* (8), 2822-2828.
- (35) Pastorin, G.; Marchesan, S.; Hoebeke, J.; Da Ros, T.; Ehret-Sabatier, L.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A. Design and activity of cationic fullerene derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase. *Organic & biomolecular chemistry* **2006**, *4* (13), 2556-2562.
- (36) Malarz, K.; Korzuch, J.; Marforio, T. D.; Balin, K.; Calvaresi, M.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musiol, R.; Serda, M. Identification and Biological Evaluation of a Water-Soluble Fullerene Nanomaterial as BTK Kinase Inhibitor. *International Journal of Nanomedicine* **2023**, 1709-1724.
- (37) Liu, S.; Sun, X.; Lu, H.; Chen, D.; Li, X.; Li, L.; Su, S.; Zhao, Z.; Cao, X.; Liu, L. Fullerene-based nanocomplex assists pulmonary delivery of siRNA for treating metastatic lung cancer. *Nano Today* **2023**, *50*, 101878.
- (38) Lou, N.; Li, Y.; Gan, L. Synthesis of C70-Based Fluorophores through Sequential Functionalization to Form Isomerically Pure Multiadducts. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (9), 2403-2407.
- (39) Serda, M.; Wu, Y.-K.; Barth, E. D.; Halpern, H. J.; Rawal, V. H. EPR imaging spin probe trityl radical OX063: a method for its isolation from animal effluent, redox chemistry of its quinone methide oxidation product, and in vivo application in a mouse. *Chemical research in toxicology* **2016**, *29* (12), 2153-2156.
- (40) Ware, M. J.; Krzykawska-Serda, M.; Chak-Shing Ho, J.; Newton, J.; Suki, S.; Law, J.; Nguyen, L.; Keshishian, V.; Serda, M.; Taylor, K. Optimizing non-invasive radiofrequency hyperthermia treatment for improving drug delivery in 4T1 mouse breast cancer model. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 43961.

..... (podpis wnioskodawcy)