

Autoreferat

dr inż. Iwona Lasocka

**Katedra Biologii Środowiska Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach**

SPIS TREŚCI

1. Dane osobowe	- 3 -
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	- 3 -
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.	- 3 -
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).	- 4 -
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:	- 4 -
4.2. Prace oryginalne i pogładowe stanowiące osiągnięcie naukowe:	- 4 -
4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia	- 7 -
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	- 31 -
5.1. Staż w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie	- 31 -
5.2. Współpraca wielośrodkowa krajowa i zagraniczna	- 31 -
5.3. Staż badawczy zagraniczny	- 32 -
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	- 33 -
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	- 33 -
6.2. Działalność organizacyjna i popularyzacja wiedzy	- 36 -
7. Omówienie pozostałych osiągnięć	- 36 -
7.1. Przed doktoratem	- 38 -
7.2. Po doktoracie	- 39 -
8. Plany na przyszłość	- 44 -
9. Piśmiennictwo	- 45 -

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko:

Iwona Lasocka (*de domo* Jesion)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2011 – stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Klimakteryczne owoce egzotyczne jako źródło czynników bioaktywnych i ich oddziaływanie u szczurów żywionych dietą z cholesterolem”.

Promotor: prof. dr hab. Hanna Leontowicz

2007 – tytuł zawodowy: magister inżynier zootechniki (specjalność: hodowla małych zwierząt użytkowych i amatorskich)

Wydział Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa.

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

2012–obecnie: adiunkt, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

2007-2011: uczestniczka dziennego studium doktoranckiego, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe, stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, nosi tytuł:

„Cytokompatybilność monowarstwy grafenu jako rusztowania dla komórek zaangażowanych w proces gojenia ran skóry (badania *in vitro*) – projektowane zastosowania w higienie zwierząt”

4.2. Prace oryginalne i poglądowe stanowiące osiągnięcie naukowe:

PI Jesion Iwona, Skibniewski Michał, Skibniewska Ewa, Strupiński Włodzimierz, Szulc-Dąbrowska Lidia, Krajewska Aleksandra, Pasternak Iwona, Kowalczyk Paweł, Pińkowski Roman, **2015**: Graphene and carbon nanocompounds: biofunctionalization and applications in tissue engineering. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 29, 3, s.415-422. DOI:10.1080/13102818.2015.1009726. (IF2015: 0.373; MNiSW: **15 pkt.**).

Mój udział w powstaniu pracy poglądowej polegał na opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji zgromadzonej literatury oraz przygotowaniu manuskryptu.

PII Lasocka Iwona, Szulc-Dąbrowska Lidia, Skibniewski Michał, Ewa Skibniewska, Włodzimierz Strupinski, Iwona Pasternak, Hubert Kmiec, Paweł Kowalczyk, **2018**: Biocompatibility of pristine graphene monolayer: scaffold for fibroblasts. Toxicology in Vitro, 48, s.276-285. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.01.028. (IF2018: 3,067; MNiSW: **30 pkt.**).

Mój udział w powstaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń (hodowle ustalone, barwienie fluorescencyjne, analiza kolorymetryczna, mikroskopia fluorescencyjna, test rany *in vitro*), analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (napisanie manuskryptu i wykonanie rycin).

PIII Lasocka Iwona, Jastrzębska Elżbieta, Szulc-Dąbrowska Lidia, Skibniewski Michał, Pasternak Iwona, Hubalek Kalbacova Marie, Skibniewska Ewa, **2019**: The effects of graphene and mesenchymal stem cells in cutaneous wound healing and their putative action mechanism. International Journal of Nanomedicine, 14, s.2281-2299. DOI:10.2147/IJN.S190928. (IF2019: 4,471; MNiSW: **140 pkt.**).

Mój udział w powstaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, gromadzeniu literatury oraz jej analizie i interpretacji, przygotowaniu manuskryptu (napisanie manuskryptu i wykonanie rycin).

Praca uzyskała nagrodę I stopnia w kategorii za wyróżniającą się pracę przeglądową ogłoszoną w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie z listy JCR, w języku polskim lub obcym przyznawaną przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych (PTNW) Oddział w Warszawie za rok 2019.

PIV Lasocka Iwona, Szulc-Dąbrowska Lidia, Skibniewski Michał, Skibniewska Ewa, Gregorczyk-Zboroch Karolina, Pasternak Iwona, Hubalek Kalbacova Maria, **2021**: Cytocompatibility of Graphene Monolayer and Its Impact on Focal Cell Adhesion, Mitochondrial Morphology and Activity in BALB/3T3 Fibroblasts. Materials, 14, 3, s.1-16, Numer artykułu:643. DOI:10.3390/ma14030643; (IF2021: 3.623; MNiSW: **140 pkt.**).

Mój udział w powstaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń (hodowle ustalone, cytometria przepływowa, barwienie fluorescencyjne, mikroskopia fluorescencyjna), analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (napisanie manuskryptu i wykonanie rycin).

Praca uzyskała nagrodę III stopnia w kategorii za pracę oryginalną opublikowaną w zespole międzynarodowym w zagranicznym czasopiśmie z listy JCR przyznawaną przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych (PTNW) Oddział w Warszawie za rok 2021.

PV Lasocka Iwona*, Jastrzębska Elżbieta, Zuchowska Agnieszka, Skibniewska Ewa, Skibniewski Michał, Szulc-Dąbrowska Lidia, Pasternak Iwona, Sitek Jakub, Hubalek Kalbacova Maria, **2022**: Graphene 2D platform is safe and cytocompatible for HaCaT cells growing under static and dynamic conditions. Nanotoxicology, 16(5), s.610-628. DOI: 10.1080/17435390.2022.2127128. (IF2021: 5,881; MNiSW: **140 pkt.**)

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń (hodowle komórkowe, barwienie fluorescencyjne, mikroskopia fluorescencyjna, cytometria przepływowa, pomiar apoptozy, test rany in vitro, ocena morfologii mitochondriów), analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (napisanie manuskryptu i wykonanie rycin). Jestem autorem korespondencyjnym pracy (*).

PVI Lasocka Iwona*, Skibniewska Ewa, Skibniewski Michał, Szulc-Dąbrowska Lidia, Jastrzębska Elżbieta, Pasternak Iwona, Sitek Jakub, Hubalek Kalbacova Maria, **2023**: Graphene monolayer as an appropriate substrate for mesenchymal stem cells support in regenerative medicine. Indian Journal of Experimental Biology, 61, s. 235-243. DOI: 10.56042/ijeb.v61i04.174. (IF2021: 0,944; MNiSW: **70 pkt.**)

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń (hodowle komórkowe, barwienie fluorescencyjne, mikroskopia fluorescencyjna), analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (napisanie manuskryptu i wykonanie rycin). Jestem autorem korespondencyjnym pracy (*).

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:
(dla prac opublikowanych w latach 2015 - 2023 przyjęto wskaźniki z roku ich publikacji):

- łączny współczynnik wpływu (IF): **18,359**
- wg listy czasopism punktowanych MNiSW: **535 pkt.**

Wyniki badań przedstawione w artykułach, stanowiących główne osiągnięcie naukowe, zostały uzyskane w ramach grantów dla młodego naukowca SGGW oraz zagranicznego stażu naukowo-badawczego, finansowanego przez Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w ramach Własnego Funduszu Stypendialnego SGGW.

Kopie artykułów, stanowiących główne osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład pięciu Współautorów w powstanie tych publikacji znajdują się w Załącznikach, odpowiednio, 4 i 5 do Wniosku.

4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Współczesna zootechnika w swym przedmiocie dotyka wielu zagadnień z zakresu technologii żywności, biotechnologii, ekologii, toksykologii, inżynierii genetycznej, medycyny weterynaryjnej, ale też ludzkiej, i coraz częściej nanobiotechnologii. Potrzebne są zatem rozwiązania zootechniczne, pozwalające na ocenę zagrożenia, i co ważniejsze, wprowadzające standardy przeciwdziałania i bezpieczeństwa stosowania w higienie zwierząt w związku z wprowadzanymi na rynek produktami „nano”.

Implementacja zasady 3R realizowana poprzez badania przesiewowe w kierunku poszukiwania rozwiązań terapeutycznych, wykorzystując modele badawcze tj. kultury *in vitro* i *lab on a chip* daje odpowiedź co do cytotoksyczności badanego nanozwiązku na wczesnym etapie. Uzyskane w ten sposób wyniki mogą być przenoszone i wykorzystane w badaniach na zwierzętach oraz w praktyce zootechnicznej i weterynaryjnej. Zachowanie dobrostanu i zapewnienie właściwej higieny utrzymania zwierząt oraz zbilansowana dieta to klucz do utrzymania zwierząt w zdrowiu i wysokiej kondycji oraz zapewnienie optymalnej produkcji.

Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO, z *ang.* International Organization for Standardization) oraz Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN, z *fr.* Comité Européen de Normalisation), zdefiniowały w 2011 r. nanoskalę jako wymiar w zakresie $1 \div 100$ nm (Jasiński, 2018). Polski Komitet Normalizacyjny 30 grudnia 2011 r., powołał Komitet Techniczny 314 (KT 314) ds. Nanotechnologii, który przejął odpowiedzialność za prace normalizacyjne prowadzone w tym obszarze. Rozporządzenie Komisji UE 2018/1881 z 3 grudnia 2018 r. wprowadziło do rozporządzenia 1907/2006 z 18 grudnia 2006 (tzw. REACH, z *ang.* Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) określenie nanopostaci substancji (*ang.* nanoform), zobowiązując firmy produkujące i wprowadzające na rynek nanomateriały do przestrzegania zapisów związanych z rejestracją, oceną, udzielaniem zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów oraz wprowadzając obowiązek przeprowadzania oceny ryzyka zdrowotnego stwarzanego przez nanopostacie substancji. Rozporządzenie obowiązuje od 1 stycznia 2020 r. Ponadto w rozporządzeniu nr 528/2012 w sprawie produktów biobójczych (BPR, z *ang.* Biocidal Products Regulation) zawarto szczegółowe postanowienia dotyczące nanomateriałów, które spełniają kryteria określone w rozporządzeniu w sprawie produktów biobójczych.

Potencjalne zastosowanie kliniczne grafenu w medycynie weterynaryjnej i ludzkiej do celów gojenia ran nadal pozostaje dużym wyzwaniem a bezpieczeństwo jego stosowania stanowi nowy obszar badań toksykologicznych i wymaga przyjęcia właściwej strategii w

procesie szacowania ryzyka dla zdrowia ludzi i zwierząt. Intensyfikacja produkcji zwierzęcej wymaga opracowania i wprowadzenia innowacyjnych rozwiązań w higienie zwierząt oraz pomieszczeń, w których zwierzęta są utrzymywane. Aplikacja grafenu na wybrane powierzchnie: skórę, ale i ściany, podłogi, karmidła, poidła itp. jest obecnie istotnym problemem badawczym zarówno w zakresie technologii jego nanoszenia jak i bezpieczeństwa ekologicznego oraz biogodności tkankowej. Niniejsze osiągnięcie naukowe dokumentuje próbę wyjaśnienia ostatniego z powyższych problemów badawczych w warunkach *in vitro* i ma ono charakter badań podstawowych, będących wprowadzeniem do opracowania innowacyjnych rozwiązań z wykorzystaniem monowarstwy grafenu w leczeniu ran, profilaktyce weterynaryjnej i zapewnieniu szeroko pojętego dobrostanu zwierząt. Wobec powyższego prace opublikowano także w czasopismach spoza dziedziny Zootechnika i Rybactwo, właśnie ze względu na charakter badań podstawowych i ich użytkowy status w toksykologii środowiska i biotechnologii, medycynie weterynaryjnej i ludzkiej. Ponadto są to badania modelowe *in vitro*, które mogą być w przyszłości implementowane u zwierząt oraz ostatecznie ekstrapolowane na ludzi.

Intensywny rozwój inżynierii tkankowej sprzyja poszukiwaniu odpowiedniego materiału będącego rusztowaniem dla komórek somatycznych i/lub macierzystych, znajdujących zastosowanie w regeneracji tkanek. Możliwość kompleksowego odtworzenia danej tkanki, struktury lub fragmentu narządu jest w dużej mierze uwarunkowane rodzajem materiału przeznaczonego do inżynierii tkankowej. Musi mieć on zdolność do spełniania funkcji biologicznych w konkretnym zastosowaniu, nie może być cytotoksyczny i mutageny, musi mieć odpowiednie właściwości fizyko-chemiczne, które docelowo zapewnią środowisko sprzyjające adhezji, proliferacji oraz różnicowaniu się komórek (Bacakova i wsp., 2011).

Opracowanie technik (*lab on a chip* np. z monowarstwą grafenu) i standaryzacji wyników *in vitro* bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów (wykorzystywanych w dezynfekcji czy jako produkt leczniczy nie będący lekiem) w kontakcie ze skórą zwierząt stanowić będzie istotny wkład w rozwój zootechniki, która powinna reagować na obecne trendy w zakresie wprowadzanych na rynek produktów „nano”. Obszar stosowania takich nanomateriałów w zakresie wykorzystania ich jako środek dezynfekcyjny obejmuje wszystkie gatunki zwierząt gospodarskich oraz towarzyszących, pośrednio także dzikich, w związku z uwalnianiem nanomateriałów do środowiska naturalnego. Natomiast obszar stosowania nanomateriałów w zakresie wykorzystania ich jako produkt leczniczy – przyspieszający gojenie uszkodzeń skóry czy trudnogojących się ran dotyczyć będzie, przede wszystkim zwierząt stanowiących cenny materiał genetyczny pod względem produktywności, zdrowotności, wyników uzyskiwanych

podczas konkursów sportowych czy prób dzielności (konie wyścigowe) a także zwierząt pochodzących z populacji zagrożonych wyginięciem. Zatem potencjalny obszar zastosowania monowarstwy grafenu jest bardzo szeroki i strategiczny gospodarczo z punktu widzenia kosztów ponoszonych na utrzymanie właściwej higieny zwierząt i pomieszczeń gospodarskich.

Grafen ma wyjątkowe właściwości, które sprawiają, że jest odpowiednim kandydatem do wielu zastosowań biomedycznych. Wysoka przewodność elektryczna, stabilność termiczna, wytrzymałość mechaniczna i działanie antybakteryjne grafenu sprzyja podjęciu badań nad jego wykorzystaniem w zakresie dostarczania leków, inżynierii tkankowej i terapii przeciwnowotworowej. Wykorzystanie grafenu w postaci jednorodnej warstwy o grubości jednego atomu budzi wielkie nadzieje odnośnie jego zastosowania w nowoczesnej medycynie regeneracyjnej. Zanim jednak zostanie on wykorzystany, niezbędne są wcześniejsze testy cytotoksyczności, potwierdzające bądź wykluczające cytozgodność grafenu w postaci monowarstwy.

Celem prac badawczych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego była ocena wpływu monowarstwy grafenu jako podłoża/rusztowania dla komórek zaangażowanych w proces gojenia ran skóry i potencjalnego zastosowania grafenu jako stymulatora prawidłowej odbudowy powłoki skórnej. Modelem badawczym były fibroblasty L929, fibroblasty embrionalne Balb 3T3, mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) oraz keratynocyty HaCaT. Wrażliwość tych modeli komórkowych oraz ich niezawodność i powtarzalność uczyniły je odpowiednimi do badania toksyczności nanocząstek (Coradeghini i wsp., 2013). Cel realizowano poprzez określenie parametrów związanych z oceną cytotoksyczności, zgodnie z normą PL-EN ISO 10993-5, takich jak: żywotność i morfologia komórek, aktywność metaboliczna, jak również potencjał błony mitochondrialnej. Ważnym elementem prac była ocena cytoszkieletu oraz wybranych białek z nim związanych, mających zasadnicze znaczenie w adhezji, połączeniach międzykomórkowych i migracji komórek.

Dotychczas opracowano szereg strategii mających na celu wzmocnienie i przyspieszenie zamykania uszkodzonej tkanki w ranach skórnych, jednak żadna z nich nie otwiera takich perspektyw badawczych jak opracowanie specjalistycznego materiału opatrunkowego z monowarstwą grafenu, mogącego stymulować i modulować aktywność komórek, biorących udział w tym kompleksowym procesie, jednocześnie wykazując działanie bakteriostatyczne lub antybakteryjne.

Do tej pory brak w literaturze jednoznacznej odpowiedzi na temat pozytywnego czy negatywnego wpływu grafenu na komórki, bowiem im więcej różnych postaci grafenu (płatkowy, powierzchniowy), jego pochodnych (tlenek grafenu, zredukowany tlenek grafenu)

oraz różnych wielkości i kształtów arkuszy grafenowych a także ilości warstw tych arkuszy i samych metod jego produkcji, tym więcej różnych i sprzecznych wyników, dotyczących odpowiedzi różnych komórek skóry.

Metody inżynierii tkankowej pozwalają na opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Obserwujemy ogromny postęp w opracowywaniu metod hodowli dużej liczby komórek *in vitro* i syntezy materiałów, służących jako rusztowania dla komórek. Rusztowania wykorzystywane w inżynierii komórkowej mają nie tylko spełniać funkcje podporowe, ale przede wszystkim pobudzać regenerację tkanek w miejscu uszkodzenia. Są one wytwarzane z polimerów syntetycznych (PGA, PLGA), materiałów naturalnych (kolagen, jedwab) oraz ich kompozytów. Zastosowanie grafenu w celach biomedycznych jest stosunkowo nowym problemem badawczym. Liczne publikacje dotyczące wpływu nanozwiązków węgla na hodowlę komórkową nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytania o ich ewentualną cytotoksyczność a także o efekt stymulacji namnażania się i różnicowania poszczególnych typów komórek.

Fundamentalne i niezbadane dotychczas znaczenie dla oddziaływania grafenu na gojenie się ran ma jego zastosowanie w określonej fizycznej i chemicznej postaci. W pracach badawczych niniejszego osiągnięcia naukowego wykorzystano grafen w postaci monowarstwy wytworzonej metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej (ang. CVD – chemical vapour deposition) na folii miedzianej. Źródłem węgla był metan. Charakterystykę grafenu określono przy użyciu: mikroskopii sił atomowych (AFM), spektroskopii ramanowskiej (SR), skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), co pozwoliło na wnikliwą ocenę parametrów strukturalnych tego materiału. Ponadto określono kąt zwilżania wodą oraz chropowatość grafenu (rms - ang. root mean square).

Wiadomym jest, że im większa powierzchnia warstwy grafenu, tym uzyskanie jej bez defektów jest trudniejsze. We wszystkich publikacjach cyklu habilitacyjnego ocenie poddawany był grafen transferowany na szkiełko nakrywkowe metodą delaminacji elektrochemicznej i zbadano jego właściwości strukturalne przy użyciu SR, a mikroskopem optycznym sprawdzono jednorodność wykonanych prób.

Zamieszczone w pracach (**PI, PIII, PIV, PV i PVI**) analizy struktury i powierzchni grafenu wskazują, że szkiełko nakrywkowe pokryte jest:

- głównie jednowarstwowym grafenem o charakterze warstwy ciągłej, z widocznymi „zmarszczkami” i „pofałdowaniami”, o charakterze hydrofobowym o stopniu zwilżania około 70° i szorstkości 0,64-1,42 nm.

- ponadto strukturami przypominającymi „pagórki”, co wynika z materiału będącego matrycą transferową – czyli szkła,

W pracy przeglądowej (**PII**) i pracy oryginalnej (**PV**) cyklu habilitacyjnego przedstawiłam także inne efekty produkcji, mające wpływ na właściwości grafenu a powstałe w trakcie jego wytwarzania oraz podczas jego transferu na podłoża docelowe (m.in. pęknięcia, dodatkowe warstwy grafenu). Grafen wolny od wad nie istnieje. Defekty w strukturze grafenu mogą powstawać samoistnie podczas procesu produkcyjnego lub mogą być wprowadzane poprzez zmianę właściwości materiału i można je zidentyfikować za pomocą spektroskopii ramanowskiej. Należą do nich zmiany strukturalne m.in.: punktowe, zmiana sześciokątów w pięciokąty (defekt Stone-Wales), lub wiele wakansów, defekty wymiarowe (np. dyslokacje – wady liniowe) oraz wady wzdłuż krawędzi. Nie mniej istotne wydają się być zanieczyszczenia - metalami i/lub grupami funkcyjnymi zawierającymi tlen, wpływające na wytrzymałość grafenu i jego właściwości (Bhatt i wsp., 2022). Ponadto wskazałam przewagę metody CVD (**PII**) nad innymi w kontekście tworzenia rozległych, jednorodnych warstw grafenu oraz możliwości odłączenia warstwy metalu z grafenem od głównego podłoża i wykorzystanie ich w badaniach/aplikacjach, które wymagają materiałów przezroczystych.

Zwilżalność materiału to kolejny istotny parametr mający wpływ m.in. na adhezję komórkową. Komórki przyczepiają się do podłoża (warstwy białkowej) za pomocą struktur ogniskowego przylegania, tj. połączeń adhezyjnych zawierających dużą liczbę białek (np. integryny). Zewnątrzkomórkowe części integryn wiążą się z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM – *ang.* extracellular matrix), ich integralne części zakotwiczą integrynę w błonie komórkowej, a ich wewnątrzkomórkowe części wiążą się z ogniskowymi białkami adhezyjnymi (m.in. talina, winkulina, paksylina), tworząc w ten sposób fizyczne połączenie między ECM, a siecią cytoszkieletu. Kompleksy ogniskowe łączące komórki ze środowiskiem zewnętrznym mają kluczowe znaczenie dla procesów i mechanizmów komórkowych, takich jak mechanotransdukcja, migracja i proliferacja komórek. Jakościowa i ilościowa analiza wpływu nanotopografii substratów/rusztowań stosowanych w medycynie regeneracyjnej na zachowanie komórek jest kluczowa przy dalszej ocenie ich potencjalnego zastosowania terapeutycznego.

Podobnie jak inni (Kalbacova i wsp. 2010, 2014), uważamy, że grafen dostosowuje się do powierzchni, na którą jest transferowany, co przekłada się na jego właściwości i oddziaływanie na komórki. Ogólna jakość i chropowatość grafenu, a w konsekwencji

zwilżalność może różnić się w zależności od wielu różnych metod produkcji, a także jego przenoszenia na określone powierzchnie. Dlatego tak ważne jest wnikliwe scharakteryzowanie grafenu bezpośrednio przed jego aplikacją razem z jego nośnikiem, a ponadto utrzymanie kontroli nad grubością warstwy grafenu oraz zapobieganie wtórnym procesom na jego powierzchni.

Należy zaznaczyć, że wykorzystany w doświadczeniach grafen w postaci monowarstwy stanowił powierzchnię będącą podłożem dla komórek, w związku z czym nie występował w stanie wolnym w roztworze, a jedynie oddziaływał na komórkę powierzchniowo. Dlatego, w tym przypadku, nie można mówić o ostrości krawędzi grafenu i niszczącym oddziaływaniu na komórki, czy internalizacji w komórkach, na co wskazują Autorzy prac z wykorzystaniem grafenu zawieszonego w roztworze, w postaci nanoarkuszy/nanopłatków (Szmidt i wsp., 2016). Jednakże nie można całkowicie wykluczyć uwolnienia nanoarkusza grafenu ze sporadycznie występujących obszarów kilkuwarstwowych, powstałych w procesie produkcji monowarstwy grafenu, w wyniku interakcji z komórkami, które na niej rosną i po niej migrują. Z tego powodu badania cytotoksyczności powinny być prowadzone z wykorzystaniem różnych metod i technik, umożliwiających wychwycenie zmian w funkcjonowaniu komórki, także w różnych warunkach. Wykorzystałam zatem metodę „lab on a chip” do oceny cytotoksyczności grafenu (**PV**). Zaprojektowany i stworzony został oryginalny mikroukład z monowarstwą grafenu jako podłoże. W doświadczeniach oceniliśmy reakcję komórek HaCaT na podłoże grafenowe w warunkach dodatkowego stresora - naprężeń ścinających powodowanych przez przepływ medium w mikroukładzie. Okazało się, że połączenie „lab on a chip” i grafenu jako platformy mikroprzepływowej jest obiecującym narzędziem do wieloparametrowych badań przesiewowych w testach nanotoksyczności. Ponadto miniaturowa skala stosowanych systemów wpływa na obniżenie ilości wytwarzanych odpadów biologicznych i chemicznych, a zatem wpływa na mniejsze zanieczyszczenie środowiska. Zastosowano oryginalne rozwiązanie scalające powierzchnię szkła pokrytego monowarstwą grafenu i PDMS (polidimetylosiloksan) w mikro układzie w postaci zacisków, ponieważ plazma tlenowa niszczy grafen.

Grafen, wraz z komórkami zaangażowanymi w proces gojenia ran skóry, może potencjalnie poprawić zarówno proces gojenia ran, jak i hamować rozwój zakażenia w miejscu urazu (**PIII**). Jednak w większości prac badawczych ocenie poddawany jest grafen w postaci nanoarkuszy/nanopłatków zawieszonych w roztworze i wówczas cechuje go działanie toksyczne w zależności od stężenia (Pelin i in., 2017, 2018, 2020, Salesa i Serrano-Aroca 2021,

Salesa i in. al., 2022), w przeciwieństwie do powłoki grafenowej w postaci monowarstwy (**PII, PIV, PV**, Kalbacova et al., 2010, 2014, Rastogi i wsp., 2017). Należy podkreślić, że oddziaływanie na komórki różnych postaci grafenu (płatki *versus* monowarstwa) zasadniczo się różni i nie sposób automatycznie ich porównywać. Biorąc zatem pod uwagę materiał badawczy (monowarstwa grafenu) i określenie jego toksyczności względem komórek skóry, jest to temat niezbadany i bardzo ważny w kontekście stworzenia opatrunku skórno na bazie monowarstwy grafenu.

W pierwszej pracy przeglądowej (**PI**) niniejszego cyklu i zarazem pierwszej naszego Zespołu badawczego zwrócono uwagę na szeroki zakres zastosowań grafenu w różnych dziedzinach nauki, m.in.: fizyce, elektronice, biotechnologii i medycynie. Podkreślono jego unikalne właściwości: jest ponad 200 razy bardziej wytrzymały niż stal tej samej grubości, pozostaje przy tym elastyczny, wykazuje się dobrym przewodnictwem ciepła, pochłania tylko 2,3% światła. Wymieniono etapy oddziaływań komórek z powierzchnią biomateriału: adsorpcję, adhezję, proliferację, różnicowanie, a w przypadku silnej toksyczności - śmierć komórki. Dyskutowano istotność badań nad zjawiskami zachodzącymi na granicy faz komórka, ECM-biomateriał, a zdeteminowanymi przez właściwości powierzchni biomateriału: chropowatość, ładunek powierzchniowy, ilość i rodzaj grup chemicznych, nanotopografia powierzchni i energia powierzchniowa. Zaproponowano metodykę oceny cytotoxyczności monowarstwy grafenu w oparciu o polską normę PN-EN ISO 10993, na zasadzie bezpośredniego kontaktu z komórkami wysiewanymi na monowarstwę grafenu na powierzchni szkiełka nakrywkowego. Podkreślono, że test MTT w obecności grafenu może powodować fałszywie pozytywne wyniki. Dlatego też w pracach badawczych zdecydowaliśmy się na wykorzystanie błękitu trypanu (TB) i testu WST-8, wskazanych przez Liao i wsp. (2011). Wraz z Zespołem, dokonałam przeglądu oddziaływań różnych postaci i pochodnych grafenu na fibroblasty, pluripotencjalne komórki macierzyste, osteoblasty i komórki nerwowe. Wskazałam na potencjalne wykorzystanie grafenu i jego pochodnych w procesie różnicowania komórek macierzystych lub, przeciwnie, w utrzymaniu ich pluripotencjalności, gojeniu ran, rekonstrukcji kości, w regeneracji uszkodzeń tkanki nerwowej. Przeprowadzona, na podstawie przeglądu literatury, analiza potencjalnego wykorzystania aplikacyjnego grafenu, skłoniła nas do przeprowadzenia doświadczeń z zakresu cytotoxyczności grafenu w postaci monowarstwy i oceny bezpieczeństwa jego stosowania jako biomateriału w przyszłości.

Wykazałam (**PII, PIV**), że podłoże z monowarstwy grafenu nie tylko nie jest toksyczne dla komórek L929 i Balb 3T3, (po 24-godzinnej inkubacji żywotność (TB) wynosiła odpowiednio: 96 i 94%), ale powoduje wzrost aktywności metabolicznej - (WST-8), odpowiednio, o 13,5 i 22% względem grupy kontrolnej. Można wobec tego pośrednio wnioskować, że grafen w postaci monowarstwy sprzyja proliferacji fibroblastów. Ponadto można przypuszczać, że mechanizm działania monowarstwy grafenu wynika z nanotopografii i chropowatości jej powierzchni, które powodują zwiększoną efektywną energię powierzchniową (**PIII**). Liu i in. (2016) zbadali komórki HepG2, A549, MCF-7 i HeLa oraz pierwotne szczurze astrocyty traktowane grafenowymi arkuszami zawieszonymi w roztworze (w różnych stężeniach), i notowali we wszystkich testowanych hodowlach komórkowych zwiększoną proliferację komórek nawet do 60%. Kalbacova i wsp. (2014) wykazali, że monowarstwa grafenu stymuluje proliferację komórek SAOS-2, a wynikać to może z faktu, iż grafen wytwarzany metodą CVD i transferowany na inne powierzchnie (w naszym przypadku na szkło) powoduje powstanie „zmarszczek” i „pofałdowań”, co może wpływać na proliferację, a także adhezję komórek. Wyniki te skłoniły nas do dalszych badań z wykorzystaniem monowarstwy grafenu w kierunku adhezji komórek i, nierozzerwalnie związanych z tym zjawiskiem zmian w cytoszkieletcie komórki oraz jej migracji po podłożu grafenowym.

Zjawisko adhezji do podłoża grafenowego obserwowałam już od 3 godziny inkubacji, zarówno w przypadku fibroblastów, keratynocytów jak i MSC (**PII, PIV, PV, PVI**). Komórki początkowo okrągłe, przylegając do podłoża stawały się bardziej płaskie, z widocznymi, licznymi wypustkami cytoplazmatycznymi (filopodia), i z upływem czasu można było wyróżnić przód i tył komórki (polaryzacja). Morfologia komórek inkubowanych na podłożu grafenowym niczym nie różniła się od morfologii komórek kontrolnych. W obrazie mikroskopu świetlnego wszystkich badanych komórek widoczne było prawidłowych rozmiarów i kształtów jądro komórkowe i jąderka oraz nieliczne ziarnistości. Komórki, bez inhibicji kontaktowej, wykazywały tendencję do wzajemnego przylegania. Keratynocyty z kolei łączyły się w klastry przypominające grona. Wśród MSC wyróżniono komórki o kształcie wrzecionowatym lub wielokątnym. Kalbacova i wsp. (2010) wskazali także dwa fenotypy w populacji MSC, ale rosnących na grafenie CVD na podłożu SiO₂/Si. Oceniłam także rozmiar fibroblastów rosnących na monowarstwie grafenu (**PII, PIV**). Nie wykazano istotnej różnicy w wielkości tych komórek względem fibroblastów z grupy kontrolnej. W przypadku MSC, powierzchnia komórek rosnących na monowarstwie grafenu była nieco większa ($p < 0,05$) niż rosnących na szkle (średnia: 6025 ± 2877 vs $5989 \pm 2983 \mu\text{m}^2$ i mediana: 5227 vs $5011 \mu\text{m}^2$). Co więcej, gdy

komórki stykały się ze sobą, powierzchnia do ich wzrostu także była ograniczona, więc pole powierzchni komórki było również mniejsze w stosunku do komórek nie stykających się z innymi komórkami. Zjawisko to odnotowano zarówno na podłożu z monowarstwą grafenu, jak i kontrolnym (szkle).

Wnikliwej analizie morfologii komórek dokonano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej: filamenty aktynowe wybarwiono znakowaną fluorescencyjnie falloidyną, a mikrotubule i filamenty pośrednie odpowiednio z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko β -tubulinie, i wimentynie, oraz przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym. Informacja o fizycznej i chemicznej budowie podłoża jest przekazywana przez ECM do komórek. Transmisja ta umożliwia komórkom reagowanie na zmiany zachodzące w mikrośrodkowisku (Alonso i Goldmann, 2016; Chubinskiy-Nadezhdin i in., 2017). Interesujące z punktu widzenia tworzenia biokompatybilnego rusztowania dla komórek jest to, że poprzez rusztowanie mamy możliwość precyzyjnego zaprojektowania (np. mikro- i/lub nano-wzorowanie – *ang.* micro-nano-patterning) komórki o pożądanym fenotypie (Pavel i wsp., 2021, Polo i wsp., 2021). Zhang i wsp. (2016b) zasugerowali, że technika mikro-wzorowania z użyciem GO może stanowić odpowiednie podłoże do celów inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej, ze względu na zdolność do ukierunkowanej migracji komórek, szczególnie korzystnej w procesie zasklepiania rany i tworzenia blizny (**PIII**). Zbadanie wpływu monowarstwy grafenu na podstawową strukturę cytoszkieletu, reagującego na nanotopografię podłoża, da odpowiedź o potencjale monowarstwy grafenu jako nanomodulatora komórek.

Cytoszkielek stanowi elastyczny i dynamiczny układ białkowych włókien, które wraz z białkami im towarzyszącymi tworzą sieć łączącą jądro komórkowe, organella oraz błonę cytoplazmatyczną. Cytoszkielek warunkuje utrzymanie kształtu oraz ruch organelli i całej komórki, odgrywa także ważną rolę w podziałach, transporcie, apoptozie i proliferacji (Pikuła i wsp., 2015; Atherton i wsp., 2015). Każda z klas włókien wchodzących w skład cytoszkieletu różni się morfologią oraz składem chemicznym.

Głównymi elementami cytoszkieletu są mikrofilamenty (filamenty aktynowe - MF), filamenty pośrednie (IF) i mikrotubule (MT). MF, IF i MT zapewniają komórce przeżycie a ich morfologia może być wskaźnikiem odpowiedzi komórek na kontakt z podłożem grafenowym. Topografia powierzchni podłoża, na którym rosną komórki wpływa na zmiany kształtu komórki, wynikające z reorganizacji cytoszkieletu. Mikrofilamenty zbudowane są z aktyny. Aktyna jest wszechobecnym białkiem, występującym w formie monomerycznej (G) lub

spolimeryzowanej (F). MF tworzą sieć zlokalizowaną w warstwie korowej cytoplazmy. Struktury te mogą tworzyć złożone układy przestrzenne: włókna naprężeniowe, pierścien kurczliwy podczas cytokinezy czy wypustki powierzchniowe. Filamenty aktynowe są spolaryzowane, podobnie jak mikrotubule. Mikrotubule zbudowane są z białka globuliny, a w okolicy jądra komórkowego tworzą centrum organizacji mikrotubul (MTOC *ang.* microtubule organizing centre). Odpowiadają, przede wszystkim, za transport wewnątrzkomórkowy i rozmieszczenie organelli, utrzymanie kształtu komórki, budują także wrzeciono kariokinetyczne (Tvorogova et al., 2018). Filamenty pośrednie to struktury wytrzymałe na rozciąganie i w przeciwieństwie do wyżej wymienionych MF i MT są bardzo stabilne. IF umożliwiają komórce przeciwstawienie się mechanicznym stresom, w komórkach niemięśniowych pochodzenia mezodermalnego są to struktury wimentynowe. Interesujący jest fakt, że zmiany w organizacji powyższych filamentów mogą być związane ze zmianą funkcjonowania komórki, połączeniami między nimi oraz stanem chorobowym.

Przeprowadziłam analizę struktur tworzonych przez następujące białka cytoszkieletu w wybranych komórkach hodowanych na monowarstwie grafenu:

- F-aktynę: pęczki kurczliwe i włókna naprężeniowe w cytoplazmie, płytkowate (lamellipodia) i palczaste (filopodia) wypustki wiodące końca poruszającej się komórki,
- α -tubulinę: centrum organizacji mikrotubul (MTOC), mikrotubule cytoplazmatyczne,
- wimentynę: włókna pośrednie,
- i białek towarzyszących cytoszkieletowi:
 - winkulinę: (adhezja ogniskowa – płytka adhezyjna),
 - plektynę,
 - koneksynę 43,
 - E-kadherynę,
 - FAK.

Na podstawie barwienia fluorescencyjnego F-aktyny nie stwierdzono nieprawidłowości w morfologii fibroblastów, MSC i keratynocytów rosnących na podłożu grafenowym. W fibroblastach obu grup (kontrolnej i z monowarstwą grafenu) włókna aktynowe były silnie skoncentrowane na obrzeżach komórki i tworzyły warstwę kory komórkowej. Dodatkowo wyraźnie widoczne były pęczki kurczliwe, włókna naprężeniowe składające się z dużych

wiązek filamentów aktynowych. Włókna stresowe i przyczepy ogniskowe (barwienie oparte na winkulinie) były bardziej zaznaczone w komórkach rosnących na monowarstwie grafenu (**PII**, **PIV**). Z kolei wielokątne MSC prezentowały grube, krzyżujące się włókna naprężeniowe, zarówno na podłożu grafenowym, jak i szklanym (**PVI**). We wrzecionowatych MSC notowano także dobrze zaznaczone włókna naprężeniowe, ale ułożone wzdłuż osi głównej komórki (**PVI**). Włókna stresowe możemy podzielić na: grzbietowe, które są zakotwiczone w ogniskowych przyczepach na przedniej krawędzi komórki, poprzeczne łuki aktynowe, brzuszne i okołojądrowe. Wszystkie wymienione powyżej struktury zostały wyróżnione w MSC rosnących na monowarstwie grafenu i szkle, co świadczy o aktywacji, polimeryzacji i dynamicznej rearanżacji MF jako siły napędowej ruchu komórki, odpowiadającej za jej zdolność do zmiany kształtu i formowania wypustek migracyjnych (lamellipodia i filopodia) (**PVI**). Różnica w obrazie włókien stresowych i liczbie FA komórek rosnących na grafenie była już wyraźnie widoczna po 24 godzinach w fibroblastach L929 (**PII**), które są terminalnie zróżnicowaną linią komórkową, w porównaniu do pierwotnych niezróżnicowanych MSC rosnących na grafenie przez 48 godzin (**PVI**). Dalby i wsp. (2018) zauważyli, że zarówno MSC, jak i fibroblasty są fenotypami o pośrednim napięciu wewnątrzkomórkowym, w przeciwieństwie do osteoblastów o wysokim czy adipocytów o niskim napięciu wewnątrzkomórkowym, a różnice w adhezji między nimi są bardzo subtelne: MSC mają niższe napięcie wewnątrzkomórkowe i słabiej przylegają do macierzy niż fibroblasty. Stąd fibroblasty mogą reagować na topografię podłoża w sposób bardziej wyrazisty oraz dynamiczny i wobec tego szybciej dokonywać transdukcji sygnału skutkującej wyraźnymi zmianami w cytoszkieście w kontakcie z monowarstwą grafenu. W keratynocytach hodowanych zarówno na podłożu grafenowym i szklanym MF były równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie, a ich większe zagęszczenie notowano w błonie przylegającej do błony sąsiadującej komórki (międzykomórkowe połączenia przylegania – obwódka zwierająca) (**PV**). Nie wykazano natomiast zorganizowanych struktur, takich jak wiązki MF czy włókna naprężeniowe w przypadku obu podłoży (**PV**).

W zmiany architektury cytoszkieletu aktynowego oraz równowagi pomiędzy aktyną monomeryczną a filamentarną zaangażowane są białka adaptorowe (m.in. a-aktynina, paksylina, talina i winkulina) służące jako miejsce zakotwiczenia dla filamentów aktyny, i pośredniczące w przekazywaniu sygnałów z udziałem kinaz Src i FAK (Dalby i wsp., 2018). Kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK) jest dziś uznawana za centrum w interakcie adhezji ogniskowej (Martinez et al., 2020). Nadrzędną funkcją FAK jest przekazywanie sygnału

pochodzącego z receptorów integrynowych, biorących udział w adhezji, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek. Brak FAK negatywnie wpływa na wytwarzanie lamellipodiów przez komórki na krawędzi rany, a fibroblasty pozbawione FAK nie reagują na zmiany w sztywności podłoża. Ponadto białko to jest zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, migrację, fosforylację białek cytoszkieletu oraz apoptozę. Po 3 godzinach inkubacji na monowarstwie grafenu i podłożu szklanym notowano ekspresję FAK w keratynocytach, z intensywną fluorescencją na obrzeżach komórek (**PV**). Po 24 godzinach inkubacji na podłożu grafenowym i szklanym wokół skupisk keratynocytów pojawia się wyraźnie zaznaczone „obramowanie” wyznakowanej fluorescencyjnie FAK, które kolokalizuje z MF (**PV**). Ponadto wizualizacja FAK w różnych czasach inkubacji ukazała powstawanie i dojrzewanie przyczepów ogniskowych w komórkach HaCaT (**PV**).

Białka mechanosensoryczne obecne w kontaktach ogniskowych uczestniczą w determinowaniu reakcji komórek na zmiany równowagi mechanicznej otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej lub sąsiednich komórek. Równowagę mechanochemiczną komórek można analizować za pomocą technik statycznych, np. wizualizacja architektury ich cytoszkieletu, jak i dynamicznych, tj. wywierając na komórki stres mechaniczny („lab on a chip”).

Wizualizacja winkuliny jest jedną z metod oceny adhezji komórkowej do różnego rodzaju podłoża (Furuhashi i wsp., 2012; Tan i wsp., 2015; Wytrwal i wsp., 2016). Winkulina to polipeptyd, który wiąże białka błonowe do aktynowego cytoszkieletu części korowej cytoplazmy w miejscach współdziałania komórka–komórka oraz komórka–macierz zewnątrzkomórkowa (Atherton i wsp., 2015). Winkulina oraz aktyna współdziałają w celu utworzenia głównego mechanosensorycznego modułu ogniskowej adhezji. F-aktyna łączy się z ogonem winkuliny, a głowa winkuliny łączy się z taliną, która łączy się z integrynami, penetrującymi błonę komórkową i wiążącymi się z ECM (Furuhashi i wsp., 2012; Atherton i wsp., 2015; Yao i in., 2014). Wiązania między F-aktyną a winkuliną regulują dynamikę aktyny i rekrutują filamenty aktynowe do rosnących przyczepów ogniskowych. Analiza statystyczna wykazała, że fibroblasty L929 hodowane na grafenie wytwarzały więcej ognisk adhezji, głównie w obszarach obwodowych komórki względem grupy kontrolnej (**PII**). Przyczepy ogniskowe miały kształt elipsoidalny i były wydłużone w tym samym kierunku co odpowiadające im aktynowe włókna naprężające. Wśród przyczepów ogniskowych możemy wyróżnić:

- dojrzałe - duże płytki adhezyjne mające tendencję do wydłużania się;

- prawdopodobnie dopiero powstające kompleksy ogniskowe – małe;
- okrągłe płytki adhezyjne (Dalby i wsp., 2018).

W przypadku fibroblastów BALB 3T3 większy obszar kontaktu ogniskowego odnotowano na podłożu grafenowym (**PIV**). Ponadto kształt przypominał kombinację kilku elips, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, w której dominowały pojedyncze elipsy. Stwierdzono również istotną różnicę w liczbie ogniskowych kontaktów komórek rosnących na szkło i grafenie. Na podłożu grafenowym było mniej kontaktów ogniskowych, ale z większym rozmiarem pojedynczego kontaktu ogniskowego w porównaniu z podłożem ze szkła kontrolnego. W przypadku MSC nie wykazano istotnych różnic dotyczących liczby przyczepów ogniskowych (~60/komórkę) między podłożami (**PVI**). Stwierdzono dwa rodzaje płytek adhezyjnych w postaci okrągłych punktów i elips zarówno wśród MSC rosnących na grafenie jak i na szkło (**PVI**). Dalby i wsp. (2018) sugerują, że adhezja odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek macierzystych i przypisali określonej linii ukierunkowanego różnicowania określone postaci FA, m.in. duże, super dojrzałe FAs wskazują na osteogenezę, a mniejsze, niedojrzałe FA adipogenezę. Kalbacowa i wsp. (2010, 2014) w doświadczeniu *in vitro* z ludzkimi osteoblastami (SAOS-2) i MSC wykazali brak działania toksycznego i pozytywny wpływ adhezję komórek do monowarstwy grafenu CVD na podłożu SiO₂/Si a także na proliferację komórek. Z kolei Kim i wsp. (2015) wykazali, że na początkowym etapie hodowli adhezja MSC do monowarstwy grafenu CVD jest niska, lecz po 7 dniach inkubacji notuje się istotny wzrost liczby FA w porównaniu do podłoża szklanego: odpowiednio około 150 i 100 FA/komórkę. Po tym okresie inkubacji Autorzy stwierdzili także wzrost interakcji komórka-komórka na podstawie ekspresji koneksyny 43 (Cx43). Koneksyny (CX) odgrywają ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej podczas gojenia ran. Są to białka połączeń szczelinowych, a w skórze najczęściej występującym typem jest Cx43 (Zhang i Cui, 2017). Cx43 umożliwia wymianę informacji biologicznej między komórkami, które są fizycznie połączone i między komórkami rozdzielonymi (Riberio-Rodrigues i wsp. 2017). Cx43 integruje wiele sygnałów regulujących gojenie ran skóry, w tym przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, proliferację i migrację komórek skóry, reakcję zapalną i angiogenezę (Zhang i Cui, 2017). Analiza własna Cx43 w MSC rosnących na grafenie i na podłożu szklanym, oparta na obrazach immunofluorescencyjnych, wykazała obecność Cx43 w cytoplazmie i błonie komórkowej, ale nie w formie typowych plakoidów (**PVI**). Były to drobnoziarniste struktury przeważnie równomiernie rozmieszczone w komórce. Należy podkreślić, że wykryta obecność Cx43 nie wskazuje jednoznacznie na tworzenie funkcjonalnie

aktywnych połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami MSC. Różnice w uzyskanych wynikach można tłumaczyć zbliżoną średnią chropowatością podłoży: szkła i monowarstwy grafenu powlekającej szkło oraz krótszym okresem inkubacji (48 godzin) w porównaniu do wyników analiz Kim i wsp. (2015) uzyskanych po 7 dniach inkubacji. Wobec powyższego czas inkubacji, liczba pasaży, gęstość wysiewanych komórek MSC na podłoże grafenowe będzie miało wpływ na interakcje komórek z podłożem oraz na proliferację i różnicowanie komórek (PIII). Komórki progenitorowe pochodzenia mezodermalnego, zwane również mezenchymalnymi komórkami macierzystymi - MSC stanowią istotny wkład w terapię leczenia ran. Jednak ekspansja MSC bez utraty multipotencji nie jest prosta, ponieważ kultury MSC zazwyczaj przechodzą spontaniczne różnicowanie w fenotypy fibroblastyczne *in vitro* (Dalby i wsp. 2018). Zatem kluczowe jest ustalenie warunków sprzyjających uzyskiwaniu komórek MSC o określonym/oczekiwanym fenotypie. Jednocześnie daje to możliwość wyhodowania komórek przeznaczonych do określonych zastosowań klinicznych, m.in. gojenie ran skóry (PIII).

Korzyści wynikające z hodowli komórek MSC na monowarstwie grafenu i z ich synergistycznego działania w procesie gojenia ran skóry przedstawiono w pracy przeglądowej niniejszego cyklu (PIII). Wiedza na temat mechanizmów gojenia ran jest niezwykle istotna z klinicznego punktu widzenia. Proces gojenia się rany skórnej jest złożony i skomplikowany, obejmuje cztery fazy, tj. hemostazę, zapalenie, proliferację i przebudowę tkanek. Biorą w nich udział płytki krwi, komórki zapalne, komórki nabłonkowe, keratynocyty, fibroblasty, MSC oraz szereg cytokin, czynników wzrostu i innych cząsteczek bioaktywnych, a także cząsteczki adhezyjne i receptory integryn odpowiedzialne za interakcje ze składnikami ECM (PIII). Obecność MSC w skórze ludzi oraz zwierząt i ich kluczowa rola w gojeniu ran sugeruje, że zastosowanie egzogennych MSC jest obiecującą strategią leczenia ran powstałych w wyniku urazu oraz tych trudno gojących się w przebiegu cukrzycy, niewydolności naczyniowej i wielu innych stanów chorobowych (Latifi-Pupovci i wsp., 2015). MSC podane w postaci bezpośredniej aplikacji na ranę na rusztowaniu z grafenu może stanowić alternatywę dla materiałów opatrunkowych w leczeniu miejscowym. Efekt synergiczny tej strategii może pomóc w gojeniu ran ostrych i przewlekłych, stanowiących poważny problem kliniczny zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej, ze względu na zwiększającą się oporność bakterii. W pracy przedstawiono własne konstatacje oparte na badaniach *in vitro* i *in vivo*, prezentowanych na łamach renomowanych czasopism naukowych, dotyczących zastosowania grafenu i/lub MSC w leczeniu ran i ich przypuszczalnego mechanizmu działania.

Oczekiwana rolą grafenu w procesie gojenia rany jest naśladowanie architektury natywnej macierzy zewnątrzkomórkowej w taki sposób, aby proliferacja, migracja i organizacja przestrzenna komórek zaangażowanych w ten proces prowadziły do efektywnego zasklepienia rany, wzrostu wytrzymałości nowej tkanki i zmniejszenia rozmiaru blizny. W pracach oryginalnych niniejszego cyklu habilitacyjnego (**PII, IV**) wykazałam wpływ monowarstwy grafenu na wzrost aktywności mitochondrialnej (cechujący komórki proliferujące) fibroblastów (WST-8) i na uporządkowaną migrację fibroblastów L929 w “sztucznie wytworzonej ranie”. Ponadto wykazano, że grafen cechuje samoistna aktywność przeciwbakteryjna (Zou i wsp., 2016). Uważa się, że przeciwbakteryjna aktywność materiałów grafenowych jest związana ze stresem błonowym, któremu może towarzyszyć zależny lub niezależny od ROS stres oksydacyjny (**PIII**). Inni Autorzy wskazują także na uszkodzenie integralności ściany komórkowej bakterii na skutek kontaktu z ostrymi krawędziami grafenu oraz izolowaniu bakterii poprzez uwięzienie ich w arkuszu grafenowym, ograniczając w ten sposób dostęp bakterii do składników odżywczych (**PIII**). Barbolina i wsp. (2016) uważają z kolei, że to zanieczyszczenia obecne w wytwarzanym grafenie i jego pochodnych są odpowiedzialne za opisywane przez innych Autorów właściwości przeciwbakteryjne. Dlatego też wskazują, że oczyszczanie tlenku grafenu ma kluczowe znaczenie i zapewnia właściwą ocenę efektu biologicznego tego nanomateriału. Mukherjee i wsp. (2015) wykazali proangiogenną aktywność tlenku grafenu i zaproponowali mechanizm oparty na wewnątrzkomórkowym tworzeniu ROS i RNS oraz aktywacji/fosforylacji syntazy śródbłonkowej tlenku azotu przez kinazę Akt. Grafen i jego pochodne mogą także oddziaływać na neutrofile, indukując powstawanie pozakomórkowych pułapek neutrofili (NETs). Ponadto grafen indukuje zależną od TLR aktywację szlaku sygnałowego NF- κ B w makrofagach, powodując polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M1 i stymulację wydzielania cytokin i chemokin typu Th1/Th2 (**PIII**). Pochodne grafenu modulują również dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz ich zdolność do przetwarzania i prezentacji antygeny. Wykazano także aktywność przeciwwirusową grafenu wynikającą z inaktywacji cząstek wirusa przed jego wnikiem do komórek, a polegającej prawdopodobnie na elektrostatycznym oddziaływaniu ujemnie naładowanych krawędzi tlenku grafenu z dodatnio naładowanymi cząstkami wirusa (**PIII**).

Nanotopografia grafenu wywiera efekt na komórki reagujące na zmiany w miejscowym mikrośrodowisku poprzez nanotransdukcję i adaptację, generując określone siły mechaniczne umożliwiające migrację, proliferację i różnicowanie (**PIII**). Nanotopografia to ważny element

w projektowaniu biomateriałów przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkankowej, ponieważ warunkuje zwilżalność, a ona z kolei determinuje adhezję komórkową. Dai i wsp. (2015) podsumowali, że zwilżalność grafenu zależy od liczby warstw, podłoża, na którym grafen jest osadzany i składu chemicznego jego powierzchni. Właściwości mechaniczne rusztowania grafenowego powodują uruchomienie szeregu wewnątrzkomórkowych kaskad sygnalizacyjnych, w tym GPT-azy z rodziny Rho (Rho, Rac i Cdc42) i jej aktywatory. Białka te biorą udział w translacji sygnałów regulujących różne procesy komórkowe, takie jak adhezja komórek, reorganizacja cytoszkieletu aktynowego, polaryzacja, wzrost komórek, proliferacja i chemotaksja (**PIII**). Bodźce płynące z rusztowania grafenowego prowadzą do naprężeń rozciągających, ściskających i ścinających, które wywołują zmiany w strukturze komórki, możliwe do wychwycenia podczas barwienia immunofluorescencyjnego poszczególnych elementów cytoszkieletu i białek z nim związanych.

Mechanizm działania grafenu i jego pochodnych na skutek wiązania lub interakcji z molekułami komórki i ECM można podsumować jako odpowiedź komórek na stres, prowadzący do różnych i skrajnych reakcji (zależnych od fizycznych i chemicznych postaci grafenu), tj. zwiększenia produkcji ROS i RSN, modulacji adhezji komórkowej, proliferacji, różnicowania, apoptozy, nekrozy, genotoksyczności, dysfunkcji lub przebudowy cytoszkieletu (**PIII**). Poza bezsprzecznym wpływem grafenu na komórki, istotne jest także samo strukturalne wzmocnienie warunkowane przez rusztowanie grafenowe, umożliwiające zachowanie określonej formy istotnej w aplikacyjnym zastosowaniu grafenu (**PIII**).

Obecnie MSC uważa się za terapeutyczną alternatywę w leczeniu różnych schorzeń. Cenne właściwości MSC zależą głównie od czynników, które wydzielają lub pakowane są do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych lub egzosomów, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu keratynocytów (KGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF), TGF- β , prostaglandyna E2 (PGE2), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α), interferon λ (IFN λ) i interleukiny (ILs), takie jak IL-4, IL-6 i IL-10 (**PIII**). Wszystkie te czynniki wzrostu i cytokiny odgrywają ważną rolę w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, rekrutacji komórek, immunomodulacji i zasklepianiu rany (**PIII**). Ponadto MSC promują bezpośrednie różnicowanie komórek, proliferację i przebudowę ECM. MSC mają także zdolność do gromadzenia się w rejonie naprawy tkanek. Wykazano, że hBM-*MSC* (*ang.* human bone

marrow) zwiększają stopień zasklepienia rany poprzez przyspieszenie migracji *in vitro* fibroblastów i keratynocytów (Walter i wsp. 2010).

Synergistyczne oddziaływanie grafenu i MSC skłania do dalszych badań nad stworzeniem opatrunku z MSC na rusztowaniu grafenowym. Terapia ta polegałaby na zmianie środowiska rany za pomocą bodźców mechanicznych i chemicznych, wynikających ze wzmacnianych za pomocą rusztowań grafenowych funkcji troficznych MSCs regulowanych przez dynamiczne interakcje ECM-cytoszkielec, kontakty komórka-komórka i sygnalizację czynników transkrypcyjnych oraz cenne właściwości samego grafenu jako immunoadiuwanta, materiału przeciwbakteryjnego, przeciwwirusowego, o aktywności angiogennej i strukturalnego wzmocnienia.

Ważna jest także kompleksowa kontrola dla utrzymania potencjału naprawczego MSC, którego skuteczność polega na parakrynnym działaniu i zdolnościach immunomodulacyjnych oraz regeneracyjnych w uszkodzonej tkance. Istotne zatem są takie czynniki, jak źródło komórek, metoda izolacji, proces ekspansji *in vitro*, stężenie tlenu, liczba pasaży. Dążyć należy do standaryzacji i wypracowania szczegółowych kryteriów stosowania, zarówno monowarstwy grafenu, jak i MSC.

Innym białkiem będącym w centrum moich badań, służącym jako łącznik strukturalny i łączącym błony sąsiednich keratynocytów jest E-kadheryna. Zewnątrzkomórkowa domena E-kadheryny uczestniczy w adhezji międzykomórkowej, natomiast domena wewnątrzkomórkowa E-kadheryny łączy się z cytoszkieletem aktyny za pośrednictwem katenin. To białko ma kluczowe znaczenie dla integralności tkanki, migracji komórek i gojenia ran (van Roy i Berx, 2008, Ekanem i Udoh, 2018). Zlokalizowane jest głównie w punktach przylegania. Przeanalizowałam skupiska składające się z 2, 3, 4, 6, 10 i więcej komórek. Żadne z nich nie wykazało nieprawidłowości w wizualizacji E-kadheryny na podłożu z monowarstwą grafenu (**PV**). Im więcej komórek stykało się ze sobą, tym klastry stawały się gęstsze, a połączenia E-kadheryny były wyraźnie zaznaczone wokół całej komórki, zarówno na podłożu grafenowym, jak i szklanym. Nie wykazano także żadnych uszkodzeń lub powstawania porów/dziur/wnęk w błonie keratynocytów, zarówno na szkiełkach nakrywkowych pokrytych grafenem, jak i kontrolnych. Analiza z użyciem fluorescencyjnej aglutyniny kielków pszenicy (WGA) wykazała, że błona keratynocytów pozostała nienaruszona (**PV**). Pelin i wsp. (2018) pokazali, że nanoarkusze tlenku grafenu zawieszone w medium hodowlanym powodowały zaburzenia w integralności błony komórkowej keratynocytów, oceniane w teście wychwyty PI (jodku propidyny). Duan i wsp. (2017) oraz Li i wsp. (2018) wykazali na przykładzie makrofagów

uszkodzenia w błonie i tworzenie porów na skutek kontaktu z nonopłatkami grafenu i tlenku grafenu, wpływających jednocześnie na obniżenie żywotności komórek. W badaniach własnych ocena żywotności keratynocytów dokonana na podstawie oznaczenia aktywności kaspazy (*ang.* Caspase-3/7 Green Detection Reagent), oznaczenia substratu rozszczepionego przez kaspazę (test M30) i oznaczenia zmian błonowych (*ang.* Annexin V/PI Assay) nie wykazała wpływu na wzrost śmiertelności keratynocytów rosnących na podłożu z monowarstwą grafenu po 48 godzinach inkubacji (**PV**). Po raz kolejny wskazuje to na istnienie istotnych różnic w oddziaływaniu tych dwóch postaci grafenu – nanopłatków/nanoarkuszy i monowarstwy grafenu na komórki.

Filamenty pośrednie są najbardziej wytrzymałe ze wszystkich trzech typów filamentów tworzących cytoszkielet i zabezpieczają komórki przed stresem mechanicznym. Tworzą sieć wewnątrz cytoplazmy, otaczając jądro komórkowe i rozciągając się aż do krańców komórki. IF poprzez napinanie się i rozkładanie efektu miejscowo przyłożonych sił, zapobiegają rozerwaniu komórek i ich błon w odpowiedzi na rozciąganie (Alberts i wsp., 2005). Większość IF jest dodatkowo stabilizowana przez białka pomocnicze a jednym z nich jest plektyna. Białko to jest łącznikiem MF, MT i IF. Zdolność plektyny do tworzenia połączeń krzyżowych jest niezbędna do nadania komórkom wytrzymałości, by sprostać stresom mechanicznym (Alberts i wsp., 2005, Wiche i Winter, 2011; Karashima i in., 2012; Winter i in., 2016). Ponadto ma kluczowe znaczenie dla nadania kształtu, polaryzacji, organizacji włókien cytoszkieletu komórki i w konsekwencji dla gojenia ran skórnych. Myszy nie mające aktywnego genu plektyny (*PLEC*) giną w ciągu kilku dni po urodzeniu ze skórą pokrytą pęcherzami oraz z nieprawidłowymi mięśniami szkieletowymi i mięśniem sercowym.

W różnych komórkach pochodzenia mezenchymalnego rozmieszczenie i organizacja IF zależą od MT (Mendez i wsp., 2010) oraz MF (Costigliola i wsp., 2017). Wykazano, że sieci MF i IF w komórkach wpływają na siebie nawzajem: przerwanie ciągłości łuku aktomiozynowego prowadzi do rozprzestrzeniania się sieci IF w kierunku krawędzi komórki (Jiu i wsp., 2017). Ponadto Autorzy wskazują, że plektyna jest wymagana do interakcji między łukami aktomiozyny i włóknami wimentyny, a wyczerpanie tego białka prowadzi do podobnych nieprawidłowości, co niedobór wimentyny, takich jak: upośledzona migracja komórek z wyraźnie zaznaczonymi włóknami naprężeniowymi łączącymi się z przyczepami ogniskowymi. Uzyskane przez mnie wyniki nie wykazały anomalii w architekturze MF i IF hBM-MSCs oraz obecności plektyny na podłożu grafenowym (**PVI**). Barwienie immunofluorescencyjne przeciwko wimentynie zastosowałam do oceny ogólnej morfologii

(kształtu) MSCs oraz do szczegółowej analizy struktury IF. Wizualizacja wimentyny ukazała delikatną sieć nitkowatych włókien IF rozciągającą się w kierunku krawędzi komórki bez żadnych nieprawidłowości i przerw w ich ciągłości. Wykazałam także, że plektyna była równomiernie rozmieszczona w hBM-MSC, a także kolokalizowała z włóknami naprężeniowymi aktyny na podłożu z monowarstwą grafenu i bez niej (**PVI**). Na przedniej krawędzi komórki plektyna kształtem przypominała przyczepy ogniskowe i obecna była zarówno w lamellipodiach jak i filopodiach. Co więcej, białko to ulegało obfitej ekspresji w każdej komórce na badanych podłożach (**PVI**). Pacjenci cierpiący na „plektynopatie” mają drastycznie zmniejszoną intensywność fluorescencji plektyny w badaniu histopatologicznym takich narządów jak skóra i mięśnie (Kyrova i in., 2016; Winter i in., 2016). Inni Autorzy wskazali również, że niedobór plektyny sprzyja tworzeniu włókien stresowych, a także zmniejsza dynamikę MT w komórkach (Castañón i in., 2013).

Mikrotubule są bardzo dynamicznym strukturalnym składnikiem cytoszkieletu, złożonym z dwóch podjednostek białkowych: α -tubuliny i β -tubuliny, które ulegają zwielokrotnieniu i wyglądają jak długie włókna rozciągające się od centrum organizacji mikrotubul (MTOC) do krawędzi komórki (Zwetsloot et al., 2018). Taką morfologię MT wykazano w rosnących na grafenie i szkle fibroblastach (**PII**), MSC (**PVI**) i keratynocytach (**PV**). W badaniach własnych wykazano, że α/β -tubulina ulegała ekspresji w typowym dla komórek pochodzenia mezenchymalnego wzorze, była równomiernie rozmieszczona w cytoplazmie a sieci mikrotubul były utrzymywane. Zachowana była integralność mikrotubul i nie stwierdzono żadnych zaburzeń w ich organizacji. Zatem monowarstwa grafenu nie zmieniała organizacji sieci mikrotubul w badanych komórkach. Ponadto barwienie immunofluorescencyjne przeciwko β -tubulinie uchwyciło dzielące się keratynocyty rosnące zarówno na monowarstwie grafenu, jak i samym szkle (**PV**). Morfologia wrzeciona kariokinetycznego i mostka (ciałka środkowego) wskazuje na prawidłowy przebieg mitozy i to, że podłoże grafenowe nie zaburza podziałów komórkowych (**PV**).

Proces gojenia rany zależy od migracji i proliferacji komórek (Liang i wsp., 2007). Fibroblasty to kluczowe komórki odpowiedzialne za inicjowanie angiogenezy, epitelializacji i produkcji kolagenu. Prócz keratynocytów odgrywają jedną z ważniejszych ról w procesie gojenia rany. Dynamiczna reorganizacja cytoszkieletu aktomiozynowego w odpowiedzi na różnorodne bodźce leży u podstaw wszystkich zjawisk związanych z ruchliwością komórek. Jednym z nich jest migracja komórek pełzających. Komórki adherentne przemieszczają się, będąc stale w ścisłym kontakcie z podłożem. Siłę niezbędną dla ruchu komórki generują dzięki

procesom zachodzącym w cytoszkielecie korykalnym, znajdującym się pod błoną komórkową. Podstawowym składnikiem tego cytoszkieletu są filamenty aktynowe, które formują wiązki albo sieci, a organizacja cytoszkieletu korykalnego zależy z kolei od ww. białek regulujących i wiążących aktynę (Furuhashi i wsp., 2012). Test gojenia ran *in vitro* (*ang.* scratch wound assay) to stosunkowo prosta i niedroga metoda, dająca odpowiedź, czy badany materiał wpływa na ruchliwość komórek (Liang i wsp., 2007). Przeprowadzono próby gojenia rany na hodowlach *in vitro* fibroblastów i keratynocytów na podłożu grafenowym i na szkle. Proces migracji/gojenia dokumentowano w określonych interwałach czasowych pod mikroskopem świetlnym. Próba gojenia na podłożu z monowarstwą grafenu i szkła trwała 48 h w przypadku fibroblastów i 38 h w przypadku keratynocytów. Szerokość wykonanej „rany” w monowarstwie fibroblastów i keratynocytów nie była identyczna, mimo użytego tego samego rozmiaru mikropipety, dlatego też wyniki nie będą dyskutowane. Prawdopodobnie keratynocyty ze względu na silne połączenie międzykomórkowe trudniej ulegały zdrapaniu – brzegi „rany” nie były równe, co świadczy o odrywaniu całych grup komórek (**PV**) a nie pojedynczych jak miało to miejsce w przypadku fibroblastów (**PII**). Fibroblasty przygotowujące się do ruchu wykazywały fenotyp spolaryzowany, ustaliły swój przód i tył względem kierunku ruchu (**PII**). W przypadku keratynocytów pojawia się dodatkowy wymiar połączeń związany z oddziaływaniami międzykomórkowymi. Komórki migrujące kolektywnie utrzymują między sobą fizyczne i funkcjonalne połączenia, migrują wspólnie a spójność zapewniają im połączenia przylegające (*ang.* adherens junctions), złożone z kadheryn (**PV**). Połączenia te są dynamiczne i mogą być szybko remodelowane, pozwalając na zmianę położenia komórki w obrębie grupy. Ta wspólna migracja sugeruje koordynację pracy cytoszkieletu pomiędzy wieloma komórkami w klastrze.

Podłoże z monowarstwą grafenu nie powodowało opóźnienia reakcji fibroblastów i keratynocytów na wytworzony ubytek ich monowarstwy względem podłoża szklanego (**PII**, **PV**). Ponadto zamknięcie „rany” w grupie z monowarstwą grafenu następowało w wyniku uporządkowanej migracji fibroblastów z obu brzegów uszkodzenia (**PII**). Migracja fibroblastów w grupie kontrolnej następowała w sposób mniej regularny. Wskazuje to, że monowarstwa grafenu stwarza korzystne warunki dla migracji komórek oraz prawdopodobnie poprzez nanotopografię wpływa na uporządkowany charakter tego procesu. Potencjalnie może mieć to wpływ na wytrzymałość i elastyczność odtwarzanej tkanki *in vivo*.

Mitochondria to dynamiczne organella tworzące sieci stale ulegające przebudowie, przez co zmienia się ich liczba, morfologia i rozmieszczenie w komórce. Fuzja, czyli łączenie się

mitochondriów, oraz ich rozszczepianie związane jest ze stanem energetycznym komórki, ale także działaniem różnych czynników zewnętrznych. Wykazano, że tlenek grafenu w postaci nanopłatków może przenikać do cytozolu, gdzie może oddziaływać z mitochondriami i wpływać na ich morfologię, funkcję oraz potencjał błonowy (Zhang i wsp., 2016.; Jaworski i wsp., 2019). Należy jednak pamiętać, że oddziaływanie między grafenem a błoną komórkową jest ściśle związane z właściwościami fizykochemicznymi grafenu, w tym wielkością, kształtem i formami chemicznymi. Morfologia sieci mitochondrialnej dostarcza ważnych informacji o kondycji komórki i cyklu komórkowym. Mimo nieustannej przebudowy sieci mitochondrialnej można ją opisać jako rozwidloną lub pofragmentowaną z mitochondriami w kształcie sferoidalnym lub w postaci rozgałęzionej. Wyróżnić możemy kilka kategorii kształtów mitochondriów: punktowe, pręcikowe, rozgałęzione oraz duże i okrągłe (Leonard i wsp., 2015). Odpowiednia proporcja pomiędzy poszczególnymi fenotypami mitochondriów jest równie ważna, by wnioskować o ich stanie i funkcjonowaniu. Objawami uszkodzeń lub defektów w morfologii mitochondriów mogą być: obrzęk mitochondriów (średnia grubość $\sim 0,5 \mu\text{m}$) i olbrzymie mitochondria określane jako „donut” (Rafelski i wsp., 2013). Kształt mitochondriów może zmieniać się wielokrotnie w czasie i pod wpływem czynników stresowych. Do wizualizacji morfologii mitochondriów w fibroblastach (**PIV**) i keratynocytach (**PV**) rosnących na podłożu z monowarstwą grafenu użyto dwóch barwników — Mito Tracker Green FM (w żywych komórkach) i Mito Red (w komórkach utrwalonych). Mitochondria w komórkach BALB/3T3 rosnących na szkiełkach pokrytych grafenem lub niepowlekanych stanowiły rozgałęzioną sieć bez wyraźnych dysfunkcji morfologicznych, w przeciwieństwie do silnie rozdrobnionych i obrzmiałych mitochondriów w fibroblastach traktowanych H_2O_2 (kontrola pozytywna) (**PIV**). Ten odczynnik warunkujący wystąpienie stresu oksydacyjnego w komórce, spowodował rozszczepienie mitochondriów i ich fragmentację. Ta fragmentacja znalazła także odzwierciedlenie w istotnie obniżonym błonowym potencjale mitochondrialnym. Zmiany morfologii mitochondriów z silnie rozgałęzionych do fragmentarycznych są regulowane przez szybkość rozszczepiania i fuzji, które zostają zakłócone, gdy komórka jest narażona na stres (Rastogi i wsp., 2017). W badaniach własnych nie stwierdzono zmian w morfologii i rozmieszczeniu sieci mitochondrialnej w fibroblastach (**PIV**) i keratynocytach (**PV**) hodowanych na monowarstwie grafenu. Analiza morfometryczna sieci mitochondrialnych z wykorzystaniem programu ImageJ wykazała, że rozkład sieci był równomierny i charakteryzował się dobrymi połączeniami. Sieć mitochondrialna nie była nadmiernie pofragmentowana, ani wydłużona, nie wykazano także obrzmiałych ani olbrzymich sferycznych mitochondriów („donut”). Mitochondria były zorientowane równolegle do osi

długiej komórki. Mitochondria komórek rosnących na podłożu kontrolnym i monowarstwie grafenu można opisać jako dobrze usieciowane i tworzące pręciki o różnych fenotypach: pręciki proste, pręciki skręcone, pręciki rozgałęzione i pętle. Zmiany powstałe w sieci mitochondrialnej związane są na ogół z równoczesnym zaburzeniem funkcjonowania tych organelli. Wobec tego określony został także błonowy potencjał mitochondrialny w fibroblastach metodą cytometrii przepływowej przy użyciu barwnika JC-1 (**PIV**). Mitochondria zbudowane są z dwóch błon białkowo-lipidowych (zewnętrznej i wewnętrznej), oddzielonych przestrzenią międzybłonową. Pomiedzy przestrzenią międzybłonową a macierzą mitochondrialną istnieje różnica potencjału elektrochemicznego, która zapewnia siłę napędową dla syntezy ATP, umożliwia transport jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej oraz jest miarą prawidłowej funkcjonalności mitochondriów. W warunkach patologicznych dochodzi do utraty mitochondrialnego potencjału błonowego, a w konsekwencji spadku poziomu ATP, wzrostu poziomu wolnych rodników mitochondrialnych i śmierci komórki (Rastogi i wsp., 2017). JC-1 jest czułym markerem zmian potencjału błony mitochondrialnej, a stosunek fluorescencji agregatów i monomerów odzwierciedla poziom uszkodzenia błon mitochondriów komórek (Nuydens i wsp., 1999).

Ocena potencjału błony mitochondrialnej wykazała, że monowarstwa grafenu nie powoduje obniżenia tego parametru w fibroblastach, a odsetek komórek o niskim i wysokim potencjale błonowym w grupie kontrolnej i grupie z monowarstwą grafenu był porównywalny (**PIV**). Obserwacje te dostarczają kolejnych dowodów, że grafen w postaci monowarstwy nie wywołuje stresu komórkowego. Potwierdzają to także badania Rastogi i wsp. (2017), który wykazał, że monowarstwa grafenu nie wpływa negatywnie na morfologię mitochondriów i błonowy potencjał mitochondrialny komórek, zarówno nieneuronalnych (fibroblastów), jak i neuronalnych, oraz promuje ich adhezję i proliferację.

Współpraca naukowa między ośrodkami krajowymi i zagranicznymi poparta powyższymi publikacjami i deklaracjami na dalszą kooperację, daje możliwość zaplanowania i gwarancję wykonania kolejnych badań w ramach odrębnych dziedzin: inżynierii materiałowej, bioinżynierii i biomedycyny.

Wnioski wynikające z badań opisanych w publikacjach wchodzących w skład dzieła to:

1. **Grafen w postaci monowarstwy** naniesiony na szkiełko nakrywkowe, jako podłoże do hodowli komórek **nie jest toksyczny** w kontakcie bezpośrednim dla fibroblastów L929 i fibroblastów embrionalnych Balb3T3 po 24-godzinnej ekspozycji oraz dla keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych po 48-godzinnej ekspozycji.
2. W doświadczeniach z fibroblastami wykazano, że zastosowanie monowarstwy grafenu jako podłoża/rusztowania wywiera wpływ na komórki poprzez jego nanotopografię, na którą komórki reagują poprzez nanotransdukcję i adaptację. Wniosek ten sformułowano na podstawie zmian zachodzących w cytoszkieletcie i adhezji fibroblastów L929 i Balb 3T3 migrujących po monowarstwie grafenu.
3. Sztywność i nanotopografia rusztowań do hodowli komórkowych, takich jak monowarstwa grafenu, generują mechaniczne sygnały wymagane do regulacji sygnalizacji komórkowej, która wyzwala odpowiedź komórkową: migrację, proliferację i różnicowanie.
4. Kontakty komórki z podłożem (przyczepy ogniskowe) są dynamicznymi tworami, rozwijającymi się etapowo. Wykazałam, że podłoże grafenowe wpływa na adhezję i migrację komórek adherentnych. Liczba przyczepów ogniskowych w fibroblastach L292 hodowanych na monowarstwie grafenu była większa względem kontroli, a w przypadku fibroblastów Balb3T3 ich liczba była mniejsza, ale powierzchnia pojedynczego przyczepu ogniskowego była większa względem kontroli, co według Dalby i wsp. (2018) świadczy o dojrzałości przyczepu ogniskowego.
5. Wykazano istotny wzrost aktywności mitochondrialnej (test WST-8) fibroblastów L929 i Balb 3T3 rosnących na grafenie względem kontroli. Jednak wzrost ten nie był efektem zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego (Balb 3T3) określonego cytometrycznie przy użyciu barwnika fluorescencyjnego JC-1. Uważamy, że wzrost ten jest wynikiem transdukcji sygnału nanopodłoża – monowarstwy grafenu.
6. Analiza mikroskopowa wybarwionych struktur, utworzonych przez białko: aktynę [pęczki kurczliwe i włókna naprężeniowe w cytoplazmie, płytkowate (lamellipodia) i palczaste (filopodia) wypustki wiodącego końca poruszającej się komórki], tubulinę (centrosom, mikrotubule cytoplazmatyczne, wrzeciono kariokinetyczne), winkulinę i FAK (przyczepy ogniskowe), wimentynę (włókna pośrednie), plectynę, E-kadherynę i koneksynę 43 nie wykazała nieprawidłowości

w budowie cytoszkieletu fibroblastów, MSC i keratynocytów i ich adhezji do podłoża grafenowego oraz nie indukowała ich uszkodzeń.

7. Wykazałam na przykładzie fibroblastów L929 i keratynocytów, że monowarstwa grafenu nie opóźnia zasklepiania rany wytworzonej *in vitro* (*ang.* scratch wound assay). W przypadku fibroblastów L929 **migracja komórek była bardziej uporządkowana względem grupy kontrolnej, co może mieć wpływ na wytrzymałość i elastyczność rany *in vivo*.**
8. Morfologia mitochondriów fibroblastów Balb 3T3 i keratynocytów rosnących na grafenie była prawidłowa. Zidentyfikowano następujące fenotypy sieci mitochondrialnej: pręciki proste, pręciki skręcone, pręciki rozgałęzione i pętle. Nie stwierdzono olbrzymich sferycznych mitochondriów „donut”, będących objawem uszkodzenia mitochondriów.
9. System „lab on a chip”, będący implementacją zasady 3R, gwarantuje efektywniejsze wykorzystanie odczynników, materiału biologicznego i jednocześnie umożliwia monitorowanie morfologii komórek przy wykorzystaniu mikroskopu oraz wykonanie analiz. Zastosowanie mikroukładu, powleczonego monowarstwą grafenu, do hodowli komórkowej może w prosty, szybki i łatwy sposób ocenić reakcję komórek na nanopodłoże oraz modulować siłę adhezji komórek i przebudowę ich cytoszkieletu poprzez działanie innego stresora – naprężeń ścinających wywieranych przez przepływające w układzie medium. Takie modulowanie stresorami (naprężenia ścinające i nanotopografia) może pomóc uzyskać komórki o określonym fenotypie, oczekiwanym w konkretnym zastosowaniu w medycynie regeneracyjnej. Pozostaje pytanie jak takie zmiany utrwalić?
10. Uzyskane wyniki badań dają nadzieję na skuteczne zastosowanie monowarstwy grafenu w terapii miejscowej. Brak cytotoksycznego oddziaływania monowarstwy grafenu w warunkach *in vitro* pozwala na planowanie dalszych badań, standaryzacji technik i metod, celem opracowania bioopatrunku o szerokim potencjale zastosowania. Wyniki uzyskane dzięki niniejszym badaniom pomogą w **stworzeniu nowych rozwiązań biomedycznych służących przyspieszeniu procesu leczenia ran skóry u zwierząt**, zarówno gospodarskich, towarzyszących, użytkowanych sportowo, jak i zwierząt egzotycznych oraz możliwych do wykorzystania także **w profilaktyce ochrony skóry podczas różnych zabiegów pielęgnacyjnych i codziennych związanych z użytkowaniem zwierząt**. Staną się

również podstawą do poprawy dobrostanu i zdrowotności zwierząt, wykorzystując najnowsze rozwiązania nanobiotechnologiczne wkraczające w dziedzinę zootechniki.

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

5.1. Staż w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie

W 2012 roku, po uzyskaniu stopnia doktora w październiku 2011 roku, zostałam przyjęta na sześciomiesięczny staż w Zakładzie Farmakologii w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie. Pod kierunkiem dr hab. Zenona Jastrzębskiego prof. NIL., ówczesnego kierownika Zakładu Farmakologii, zapoznałam się z metodami i technikami (HPLC, TLC, spektrofotometria UV-Vis w kontroli jakości) stosowanymi w ocenie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania produktów leczniczych i wyrobów medycznych. Nabyłam praktyczne umiejętności i doświadczenie w obszarze badań aktywności leków *in vitro* i *in vivo*, tolerancji miejscowej, działania uczulającego wg ISO z uwzględnieniem oceny histopatologicznej tkanek pobranych z miejsca aplikacji produktów leczniczych i wyrobów medycznych, obecności substancji gorączkotwórczych i endotoksyn bakteryjnych. Ponadto uczestniczyłam w analizie wielkości cząstek metodą dyfrakcji światła laserowego w preparatach farmaceutycznych (proszki, płyny, emulsje, zawiesiny), badaniu aktywności leków wpływających na układ krążenia (glikozydy kardenolidowe). W trakcie trwania stażu przygotowałam wspólnie z dr hab. Zenona Jastrzębskiego prof. NIL. wniosek grantowy do Narodowego Centrum Nauki w konkursie Opus o tytule „Badania skuteczności i bezpieczeństwa stosowania piwa bezalkoholowego w profilaktyce i terapii doświadczalnej kamicy moczowej u szczurów” oraz materiały do wielośrodkowych badań nad terapią jaskry w ramach konkursu „Strategmed – profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” NCBiR.

5.2. Współpraca wielośrodkowa krajowa i zagraniczna

W 2014 roku nawiązałam współpracę z Instytutem Technologii Materiałów Elektronicznych oraz Instytutem Optoelektroniki, Wojskowej Akademii Technicznej w

Warszawie w zakresie wykorzystania monowarstwy grafenu w badaniach *in vitro*, co dokumentuje praca przeglądowa, pierwsza w ramach Zespołu, opublikowana w 2015 na łamach czasopisma *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Kolejnymi etapami powyższej współpracy było rozpoczęcie badań *in vitro* z wykorzystaniem monowarstwy grafenu w początkowym ujęciu w zakresie jego cytokompatybilności a następnie jego zastosowania w procesie gojenia ran *in vitro*. Kolejne prace oryginalne i przeglądowa ukazywały się w latach późniejszych, w 2018, 2019 i 2021 oraz 2022. W tych latach współpraca prowadzona była z Wydziałem Fizyki Politechniki Warszawskiej, w której zatrudnieni zostali dr inż. Włodzimierz Strupiński oraz dr Iwona Pasternak.

Pozostałymi członkami mojego zespołu badawczego, z którymi ściśle współpracuję, są pracownicy Zakładu Immunologii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej (SGGW) – dr hab. Lidia Szulc-Dąbrowska prof. SGGW i dr Karolina Gregorczyk-Zboroch oraz dr hab. Michał Skibniewski z Zakładu Anatomii Porównawczej i Klinicznej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej (SGGW) i dr hab. Ewa Skibniewska prof. SGGW z mojej macierzystej jednostki i Katedry (SGGW). Ponadto kontynuuję współpracę krajową: z prof. dr hab. Hanną Leontowicz, dr Marią Leontowicz, prof. dr hab. Mikołajem Gralakiem z Instytutu Medycyny Weterynaryjnej (SGGW) w zakresie badania profilu lipidowego i mineralnego zwierząt modelowych (szczur) żywionych dietami z dodatkiem owoców egzotycznych, owoców morza itp., dr hab. Zenonem Jastrzębskim – emerytowanym już kierownikiem Zakładu Farmakologii Narodowego Instytutu Leków w Warszawie w zakresie badania działania przeciwmiażdżycowego substancji pochodzenia naturalnego, z dr hab. Elżbietą Jastrzębską z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej w zakresie hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych i kardiomiocytów z wykorzystaniem systemu „lab on a chip” oraz międzynarodową, z prof. Shelą Gorinstein z Uniwersytetu Hebrajskiego w Jerozolimie (Izrael) w zakresie oznaczania potencjału przeciwutleniającego i związków biologicznie czynnych w owocach egzotycznych. Od 2018 roku ściśle współpracuję z prof. dr hab. Marie Hubalek-Kalbacova z Uniwersytetu Karola w Pradze Czeskiej, w zakresie cytokompatybilności monowarstwy grafenu.

5.3. Staż badawczy zagraniczny

W 2018 roku uzyskałam finansowanie w ramach Własnego Funduszu Stypendialnego SGGW, które umożliwiło mi odbycie trzymiesięcznego stażu zagranicznego na

Uniwersytecie Karola w Pradze Czeskiej. Pracowałam tam w Laboratorium Oddziaływania Komórek z Nanomateriałami w Instytucie Fizjologii Patologicznej na I Wydział Lekarskim w zespole pod kierunkiem Pani dr hab. Marie Hubalek-Kalbacovej. Grupa badawcza pod kierunkiem obecnie już prof. dr hab. Marie Hubálek Kalbáčovej zajmuje się badaniem różnych nanomateriałów: nanorurki węglowe (SWCNT - single walled carbon nanotubes), grafen, diamenty nanokrystaliczne (NCD - nano-crystalline diamond), stopy tytanu. Celem badań zespołu jest ocena wpływu nanomateriałów na żywotność komórek, ich adhezję, wzrost i różnicowanie. Badania skupiają się przede wszystkim na interakcjach pomiędzy ludzkimi komórkami (linia komórek SAOS-2, linia komórek HeLaG, mezenchymalne komórki macierzyste) z podłożami wykonanymi z różnych biokompatybilnych materiałów, z kontrolowaną ich topografią. Grupa poszukuje odpowiedniej nanostruktury dla powłok implantologicznych w ortopedii. Współpraca z prof. dr hab. Marie Hubálek Kalbáčová zaowocowała kilkoma pracami badawczymi oraz planowanym do złożenia projektem w ramach współpracy bilateralnej między Polską a Czechami, dotyczącym badań na zwierzętach pod kątem skuteczności monowarstwy grafenu w leczeniu ran skóry i potencjalnego jego zastosowania jako opatrunku dla zwierząt gospodarskich, towarzyszących, egzotycznych i użytkowanych sportowo.

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Jestem autorką i współautorką opracowań przedmiotów realizowanych dla studentów Wydziału Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt SGGW w Warszawie, dla trzech różnych kierunków: Zootechnika, Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich (HiOZTiD) oraz Bioinżynieria zwierząt.

Przygotowałam i prowadziłam następujące przedmioty:

Fizjologia zwierząt dla kierunku HiOZTiD, studia stacjonarne i niestacjonarne I°. Prowadzę całość przedmiotu: ćwiczenia oraz wykłady od 2015 roku. Jestem autorką sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu. Od 2021 roku także dla kierunku Zootechnika na studiach niestacjonarnych I°.

Toksykologia środowiska dla kierunku Bioinżynieria zwierząt, studia stacjonarne I°. Od 2015 roku prowadzę ćwiczenia audytoryjne i część wykładów. Jestem współautorką sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu.

Substancje biobójcze dla kierunku Bioinżynieria zwierząt, studia stacjonarne II°, przedmiot fakultatywny. Jestem współautorką sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu. Realizuję większość wykładów od 2017 roku.

Higiena utrzymania zwierząt amatorskich i dzikich w niewoli dla kierunku HiOZTiD, studia niestacjonarne I°. Jestem współautorką sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu. Realizuję część wykładów od 2015 roku.

Bioasekuracja w hodowli zwierząt dla kierunku HiOZTiD, studia niestacjonarne II°. Jestem autorką obecnie obowiązującego sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu. Realizuję wszystkie wykłady od 2021.

Dobrostan zwierząt dla kierunku Zootechnika, studia niestacjonarne I°. Jestem autorką sylabusu do przedmiotu i koordynatorem tego przedmiotu. Realizuję część wykładów od 2019 roku.

Dodatkowo prowadziłam zajęcia (wykłady i/lub ćwiczenia) w ramach następujących przedmiotów w latach 2013-2021:

Higiena zwierząt dla kierunku Zootechnika, studia stacjonarne i niestacjonarne I°.

Prewencja weterynaryjna jednolite studia na kierunku Medycyna Weterynaryjna, studia stacjonarne.

Ekotoksykologia i waloryzacja środowiska, kierunek HiOZTiD, studia stacjonarne, II°

Prewencja i bioasekuracja w produkcji zwierzęcej, Zootechnika, studia stacjonarne, I°

Analiza instrumentalna z zakresu higieny i dobrostanu zwierząt, studia doktoranckie Zootechnika.

Zanieczyszczenie środowiska a dobrostan zwierząt. Zootechnika II°, studia stacjonarne.

Dobrostan zwierząt, dla kierunku Zootechnika, studia stacjonarne I°.

Współczesne trendy badawcze w genetyce, żywieniu i środowisku bytowania zwierząt, Zootechnika, studia doktoranckie.

Higiena i prewencja w hodowli zwierząt amatorskich. Kierunek Biologia Wydział Biologii, studia stacjonarne, I°

Bioasekuracja w hodowli zwierząt. Kierunek HiOZTiD, studia stacjonarne, II°.

Byłam opiekunem 17 prac dyplomowych, w tym 15 prac inżynierskich oraz 2 prac magisterskich. Moi magistranci: mgr inż. Marta Kołnierzak oraz mgr inż. Hubert Kmieć zostali przyjęci na studia doktoranckie przy Wydziale Nauk o Zwierzętach w dyscyplinie zootechnika, w zakresie biologii zwierząt oraz zatrudnieni w Katedrze Biologii Środowiska Zwierząt jako asystenci. Pełnię funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Pani mgr inż. Marty Kołnierzak. Przewidywany termin obrony pracy doktorskiej pt. „Wpływ wieku oraz współistniejących zaburzeń homeostazy na zawartość wybranych metali biogennych oraz metali toksycznych w narządach rozrodczych psa domowego (*Canis lupus f. familiaris*)” – to listopad 2023 roku. Pełniłam również funkcję recenzenta, oceniając łącznie 64 prace dyplomowe, w tym 1 pracę licencjacką, 52 inżynierskie i 11 magisterskich.

Byłam również opiekunem praktyk studenckich realizowanych w 2014 roku przez studentów Wydziału Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt w Katedrze Biologii Środowiska Zwierząt – 2 osoby.

Prowadziłam wykłady i/lub ćwiczenia pt. „Higiena kurników i środowiska ferm drobiu” na Specjalizacyjnych Studiach Podyplomowych „Choroby drobiu oraz ptaków ozdobnych” SGGW w 2018 i 2021 roku.

W 2013 roku brałam także czynny udział w opracowaniu zasad rekrutacji, kosztorysu, programu i planu studiów podyplomowych pt.: „Dobrostan zwierząt” na Wydziale Nauk o Zwierzętach. Wśród 20 zaproponowanych przedmiotów, byłam autorem 4 sylabusów. W styczniu 2014 roku na podstawie uchwały Rady Wydziału (protokół 1094 z dnia 21 stycznia 2014r.) pozytywnie zaopiniowano wniosek o otwarciu studiów podyplomowych: „Dobrostan zwierząt” pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Kośli.

Podejmowałam także działania mające na celu poprawę jakości kształcenia poprzez uczestnictwo w następujących szkoleniach i kursach:

- Wdrażanie technologii e-learning (styczeń-luty 2013),
- Regionalne Forum Tutoringu w Warszawie (7 listopad 2014),
- Celem zaktualizowana wiedzy i doskonalenia procesu dydaktycznego (na kierunku Bioinżynieria zwierząt – przedmiot: Toksykologia środowiska oraz Substancje biobójcze) brałam udział *on line* jako wolny słuchacz w cyklu wykładów podczas spotkania naukowego pt.: „Farmakologia Przyszłości”, które odbyło się w Krakowie w dniach 16-19.11.2021. Poruszane tematy: nowoczesne laboratorium

mikroskopowe, laboratorium farmakokinetyki i wstępnych badań toksykologicznych, laboratorium obrazowania, laboratorium badań izotopowych.

6.2. Działalność organizacyjna i popularyzacja wiedzy

- Członek Senackiej Komisji ds. Współpracy Międzynarodowej SGGW (2020-2024)
- Komisja ds. oceny nauczycieli akademickich – sekretarz (2019, 2020-2024)
- Zespół ds. hospitacji zajęć przy Radzie Wydziału Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt - członek (2020-2024)
- Komisja ds. Promocji i Współpracy z otoczeniem społeczno-gospodarczym – Zespół ds. Współpracy ze Szkołami Średnimi – członek (2021-2024)
- Opiekun roku dla studentów stacjonarnych I° i II° na kierunku Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich, w latach 2017-2021
- Koordynator międzynarodowej wymiany studentów (2017-2024)
- Pełnomocnik Dziekana ds. Wymiany Studentów Wydziału Nauk o Zwierzętach (2016)
- Członek komisji ds. Oceny programów kształcenia dla kierunku Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich I° i II° - 2016
- Udział w realizacji Uczelnianego Konkursu „START PO INDEKS SGGW” - edycja 2015

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

- W 2014 roku brałam udział w organizacji Dni SGGW, przygotowałam i zaprezentowałam uczniom gimnazjum metodykę badań mikroklimatu pomieszczeń, w których utrzymywane są zwierzęta oraz praktyczną ocenę parametrów, takich jak temperatura, wilgotność względna, ruch powietrza, hałas, natężenie oświetlenia.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć

Uzyskałam dotacje w ramach **Grantów wewnętrznych SGGW dla Młodego Naukowca:**

- 2014/2015: „Ocena morfologii dojrzałych i zarodkowych mysich fibroblastów hodowanych na grafenie”, nr. 505-10-072500-L00221-99
- 2015/2016: „Zastosowanie testu leczenia ran *in vitro* do oceny przydatności grafenu jako podłoża w regeneracji tkanek”, nr. 505-10-072500-M00320-99
- 2016/2017: „Wpływ podłoża grafenowego na organizację cytoszkieletu fibroblastów”, nr. 505-10-072500-N00266-99
- 2017/2018: „Wpływ podłoża grafenowego na adhezję, migrację i organizację cytoszkieletu mezenchymalnych komórek macierzystych”, nr. 505-10-072500-P00191-99
- 2018/2019: „Wpływ podłoża grafenowego na sieć mitochondrialną mysich komórek BALB 3T3”, nr. 505-10-072500-Q00396-99 dla Młodego naukowca w ramach

Przygotowanie i opracowanie merytoryczne do realizacji powyższych grantów pozwoliło na opublikowanie dwóch prac przeglądowych, będących częścią niniejszego cyklu habilitacyjnego. A uzyskane wyniki w ramach realizacji powyższych grantów zostały zaprezentowane w czasopismach zagranicznych z listy A i także stanowią wkład w cykl prac przedstawionych jako dorobek habilitacyjny.

Podjęmowałam działania w zakresie samokształcenia:

- Ukończyłam kurs kwalifikacyjny pedagogiczny wrzesień 2009 – luty 2010: w wymiarze 270 godzin organizowany przez Instytut Doskonalenia Kadr Pedagogicznych „Edukacja” w Warszawie,
- Uzyskałam Certyfikat Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych Nr 442/2015 (doświadczenia na zwierzętach), wrzesień 2015, Warszawa
- Uczestniczyłam w konferencjach i kursach/szkoleniach/warsztatach podnoszących kwalifikacje i dostarczające wiedzy na temat aktualnych dostępnych rozwiązań w pracy w laboratorium, ze zwierzętami, technikami *in vitro* oraz pozyskiwania funduszy na pracę badawczą oraz mobilności zagranicznej wśród pracowników Uczelni i studentów:
 - konferencja pt. „Rozwiązania dla diagnostyki laboratoryjnej” (12 czerwca 2012)

- XII konferencja naukowa pt. „Etyczne i prawne aspekty ochrony dobrostanu zwierząt” (4 października, 2013), Wrocław,
- warsztaty: „Na styku nauki i biznesu. Jak skutecznie i bezpiecznie prezentować wyniki prac naukowych przed inwestorami?” (7 luty, 2014), Warszawa,
- kurs pt. „Zastosowanie technik hodowli komórek zwierzęcych *in vitro* do badań biomedycznych” (29-31 maj 2014), Warszawa,
- szkolenie: „Praktyczne sposoby komercjalizacji wyników badań w naukach przyrodniczych, aspekty międzynarodowe” (19-20 listopad, 2014), Warszawa,
- konferencja naukowa: „Warunki utrzymania a dobrostan zwierząt laboratoryjnych” organizowanej przez Wydział Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie, Koło Naukowe Zwierząt Doświadczalnych i Laboratoryjnych, Polskie Towarzystwo Zootechniczne – Koło Warszawskie, 17 maja 2019.
- XXIV Warsztaty Zootechniczne pt.: „Aktualne zagrożenia epidemiologiczne w produkcji zwierzęcej”, (3 listopada 2021), Warszawa
- Konferencja Inauguracyjna UNiGreen, II sesja Warsztatów: „Mobilność studentów i pracowników”. 31 stycznia 2023 r. SGGW w Warszawie.

7.1. Przed doktorem

W trakcie 4-letniego studium doktoranckiego nabywałam i rozwijałam zdolności oraz umiejętności analityczne w zakresie oznaczania pierwiastków i technik histologicznych.

Zapoznałam się z płomieniową absorpcyjną spektrometrią atomową (F-AAS), która opiera się na zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez swobodne atomy. Wykonywałam oznaczenia zawartości wybranych pierwiastków (Se, Mn, Cu, Zn, Fe, Mg, Ca) w materiale roślinnym i zwierzęcym.

Wykonywałam preparaty do badań histopatologicznych. Ponieważ tkanki zwierzęce są stosunkowo miękkie, ich skrawanie może odbywać się jedynie po przepojeniu i zatopieniu w twardszym materiale - parafinie. Inną metodą jest utwardzenie, do którego dochodzi w wyniku zamrożenia, czyli przekształcenia zawartej w tkankach wody w kryształki lodu.

Zapoznałam się także z podstawowymi metodami barwienia, z których wykorzystuje się najczęściej barwienie hematoksyliną i eozyną (HE). Wykonywałam analizy ilościowe

materiału biologicznego na komputerowym systemie skanującym (Multi Scan Base 14.02). Określałam zawartość tłuszczu ($\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$) w hepatocytach i mierzyłam całkowitą gęstość tłuszczu za pomocą programu komputerowego Lucia v.4x. (Nikson). Wszystkie nabyte umiejętności i doświadczenie pozwoliły mi realizować powierzone zadania badawcze w ramach późniejszych grantów.

7.2. Po doktoracie

Równolegle do głównej ścieżki badawczej uczestniczyłam w badaniach w ramach **trzech pobocznych wątków tematycznych**, lecz wzajemnie ze sobą powiązanych:

1. **Pierwszy** z nich to kontynuacja badań rozpoczętych na studium doktoranckim, a dotyczących prozdrowotnego działania owoców egzotycznych w stanach hipercholesterolemii i miażdżycy;

Jako wykonawca grantu pt. „Wpływ bioaktywnych składników owoców mini kiwi (*Actinidia arguta*) na profil transkryptomiczny i miRNA oraz metabolizm lipidów w tkankach szczurów z indukowaną hipercholesterolemią”, NCN, panel 9, konkurs OPUS 3 (2013-2016) miałam możliwość wykonania analiz:

- zawartości związków polifenolowych oraz składników mineralnych w owocach mini kiwi,
- preparatów histologicznych aort oraz wątrób szczurzych,
- związków mineralnych wybranych narządów i oceny biodostępności wybranych pierwiastków.

Wyniki powyższego grantu zostały zaprezentowane w publikacjach pokonferencyjnych:

- Zinc content in *Actinidia arguta* cultivars, new selekt M1 and hybrid cultivar Bingo bred at WULS (SGGW). Autorzy: **Iwona Jesion**, Maria Leontowicz, Hanna Leontowicz, Piotr Latocha, Mikołaj A., Shela Gorinstein Konferencja: Międzynarodowa Konferencja Naukowa z okazji 60 - lecia Wydziału Biotechnologii i Hodowli zwierząt ZUT, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, 18 czerwca 2015, Szczecin, Polska,
- Effect of consumption of kiwifruits different iron and manganese content (*Actinidia arguta* and *Actinidia deliciosa*) on spleen mineral content in rats fed diets with cholesterol. Autorzy: **Iwona Jesion**, Maria Leontowicz, Hanna Leontowicz, Piotr Latocha, Mikołaj A., Young-Seo Park, Shela Gorinstein. Konferencja: XIIth Conference of Young Researchers Physiology and Biochemistry in Animal

Nutrition" 2015, Akademia Nauk. konferencja 23-24 września, Łowicz-Nieborów, Polska

- Seasonal differences between iron content in *Actinidia arguta* and *Actinidia deliciosa*, and its effects on liver iron content in rats fed diets with cholesterol. Autorzy: **Iwona Jesion**, Maria Leontowicz, Hanna Leontowicz, Piotr Latocha, Mikołaj A., Gralak, Young-Seo Park, Shela Gorinstein. Konferencja: IOS-PIB, XI International Scientific and Technical Conference Element Cycle In the Environment: Bioaccumulation-Toxicity -Prevention, Warsaw 2015, Wydawca: Instytut Ochrony Środowiska - Państwowy Instytut Badawczy. 10 września, Warszawa, Polska

Charakterystykę właściwości prozdrowotnych na podstawie składu chemicznego owoców minikiwi, ze szczególnym uwzględnieniem związków biologicznie czynnych i ich potencjału antyoksydacyjnego przedstawiono w publikacji:

- Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit *Actinidia arguta* in comparison with *Actinidia deliciosa* 'Hayward' and *Actinidia eriantha* 'Bidan'. Hanna Leontowicz, Maria Leontowicz, Piotr Latocha, **Iwona Jesion**, Yong-Seo Park, Elena Katrich, Dinorah Barasch, Alina Niemirowski, Shela Gorinstein. 2016, Food Chemistry, 196, 281-291, Elsevier.

Wyniki prezentujące ochronny efekt suplementacji owocami mini kiwi u hipercholesterolemicznych szczurów, na podstawie zmian w aorcie i wątrobie opublikowano:

- *Actinidia arguta* supplementation protects aorta and liver in rats with induced hypercholesterolemia. Autorzy: Maria Leontowicz, Hanna Leontowicz, **Iwona Jesion**, Wojciech Bielecki, Katarzyna Najman, Piotr Latocha, Yong-Seo Park, Shela Gorinstein, 2016, Nutrition Research 36, 1231-1242, Elsevier.

Wyniki dotyczące biodostępności mikro i makroelementów u hipercholesterolemicznych szczurów, otrzymujących 5% dodatek zliofilizowanych owoców mini kiwi w diecie zaprezentowano na łamach czasopisma Foods:

- Bioavailability of macro- and microelements in rats fed hypercholesterolemic diets containing *Actinidia arguta* fruits. Autorzy: Gralak Mikołaj, **Lasocka Iwona**, Leontowicz Maria, Leontowicz Hanna, Latocha Piotr, Gorinstein Shela. 2022, Foods 11, 11, 1-11, 1633. Wydawca: MDPI

2. **Drugi poboczny wątek tematyczny** dotyczył hodowli komórkowej w systemie „*lab on a chip*”, w którym komórka poddana jest działaniu naprężeń ścinających na skutek przepływającego w układzie medium.

Początkowo system ten zainteresował mnie z uwagi na lokalizację zmian miażdżycowych, głównie w miejscach, gdzie ściana tętnic jest narażona na oddziaływanie małych naprężeń ścinających. Jednak podjęta współpraca z dr hab. Elżbietą Jastrzębską i wcielenie mnie do Zespołu, w ramach grantu pt.: „Mikrosystem Lab-on-a-chip do modelowania i badania wzrostu komórek mięśnia sercowego”, NCBiR, konkurs Lider, 573/L-4/2012, (2013-2016), jako wykonawcy przekierowało moje zainteresowania na badanie komórek macierzystych z użyciem tego modelu („*lab on a chip*”).

Efektywne różnicowanie komórek MSC w kierunku pożądanym linii komórek i utrzymanie ich fenotypu jest wyzwaniem dla naukowców. MSC mają zdolność do różnicowania *in vitro* w kierunku, m.in. kości, chrząstki, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych (Bajek i wsp., 2011). Pojawiło się także wiele doniesień na temat różnicowania MSC w kierunku kardiomiocytów (Balana i wsp., 2006; Deng i wsp., 2009; Siegel i wsp., 2012; Potdar i Prasannan, 2013; Ye i wsp., 2013).

W poniższej publikacji przeglądowej Autorzy skoncentrowali się głównie na opisie systemów „*lab-on-a-chip*” wykorzystywanych w inżynierii tkankowej serca oraz czynników biochemicznych, mechanicznych i fizycznych stylujących różnicowanie komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów:

- Jastrzębska Elżbieta, Tomecka Ewelina, **Jesion Iwona**, 2016: Heart-on-a-chip based on stem cell biology. Biosensors & Bioelectronics, 75, 67-81. DOI:10.1016/j.bios.2015.08.012

Zgodnie z zadaniami i funkcjami przypisanymi w projekcie zakres prac, w które byłam zaangażowana obejmował: udział w doborze metody wytwarzania struktur przestrzennych do wzrostu kardiomiocytów, doborze sposobu obserwacji i oceny wzrastających komórek macierzystych z wykorzystaniem metod mikroskopowych, nadzorowanie prac dotyczących opracowania metody pomiaru i wizualizacji komórek macierzystych po stymulacji VEGF, 5-azacytydyną. Ocenie podlegała m.in. obecność specyficznych dla kardiomiocytów markerów: α -aktyniny, troponiny T w komórkach MSC.

Celem badania było zoptymalizowanie warunków różnicowania MSC do kardiomiocytów za pomocą wybranych czynników biochemicznych. Różnicowanie MSC w warunkach *in vitro* polega na zastosowaniu swoistych czynników wzrostu lub związków

chemicznych o właściwościach różnicujących. Wśród czynników wzrostu, które modulują różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów jest m.in. VEGF. Działa on chemotaktycznie na komórki i może promować różnicowanie komórek macierzystych w kardiomiocyty (Song i wsp., 2007, Singh i wsp. 2016, Zisa i wsp. 2009). Ponadto autorzy wykazali, że anty-VEGF blokuje różnicowanie hADSC (*ang.* human adipose derived stem cells) w kierunku kardiomiocytów. Ye i wsp. (2013) opublikowali protokół różnicowania wybranych linii hiPCS (*ang.* human induced pluripotent stem cells) do kardiomiocytów (hiPSC-CM) przy udziale m.in. VEGF w ilości 5-10 ng/ml inkubowanych przez 72 godziny. Oprócz swoistych czynników wzrostu w różnicowaniu odgrywają również rolę inne czynniki, takie jak 5'azacytydyna. Wykazano, że MSC hodowane w obecności 5'azacytydyny różnicują się w mioblasty, które łącząc się dają początek kurczącym się rytmicznie miotubulom (Liu i wsp., 2009). Badania Balana i wsp. (2006) nie wykazały wpływu 5-azacytydyny na różnicowanie hMSC w kierunku kardiomiocytów (brak ekspresji MyoD, Nkx2.5, α -aktyniny), w przeciwieństwie do MSC pozyskanych ze szpiku myszy. Autorzy w komórkach hMSC traktowanych 5-azacytydyną (3 μ mol przez 24 h) stwierdzili istotny wzrost gęstości prądów jonowych K^+ po 6 tygodniach hodowli. Z kolei Siegel i wsp. (2012) w doświadczeniu z hMSC, stosując różne protokoły różnicowania w kierunku kardiomiocytów, m.in. z 5-azacytydyną (10 μ mol przez 48h) i VEGF (10 ng/ml) wykazali zwiększoną ekspresję specyficznych markerów sercowych względem grupy kontrolnej. Jednak hMSC hodowane bez dodatku w medium substancji promujących różnicowanie także wykazywały ekspresję, m.in. cTnI, ANP, α -aktyniny. Siegel i wsp. (2012) w doświadczeniach z różnymi induktorami różnicowania hMSC w kierunku kardiomiocytów nie otrzymali komórek spontanicznie pulsujących. Fukuda (2003) uzyskał populację komórek spontanicznie kurczących się po 2 tygodniach od inkubacji subklonów mBM-MSC z 5-azacytydyną (3 μ mol przez 24h). Potdar i Prasannan (2013) poddali hDMSC (*ang.* human dermal mesenchymal stem cells) różnicowaniu za pomocą 5-azacytydyny (10 i 20 μ mol przez 48 h) i po 15 dniach stwierdzili ekspresję, m.in. α -aktyniny i cTnT.

Uzyskane wyniki zrealizowanego projektu przedstawiono w pracy:

- Sokołowska Patrycja, Żukowski Kamil, **Lasocka Iwona** [i in.], 2020: Human mesenchymal stem cell (hMSC) differentiation towards cardiac cells using a new microbioanalytical method. *Analyst*, 145, 8, 3017-3028.

Realizacja drugiego pobocznego tematu badawczego zapoznała mnie ze specyfiką pracy w skali mikro („lab on a chip”) i umożliwiła wykorzystanie tego systemu w ocenie

cytotoksyczności monowarstwy grafenu w warunkach dodatkowego stresora (naprężeń ścinających) i adhezji komórek HaCaT w warunkach mikroprzepływu.

3. **Trzecim pobocznym wątkiem tematycznym** jest ocena znaczenia oraz toksyczności wybranych pierwiastków dla zwierząt towarzyszących, gospodarskich i dzikich.

W Katedrze Biologii Środowiska Zwierząt, w której rozpoczęłam pracę w grudniu 2012 roku, pod kierunkiem profesora dr hab. Tadeusza Kośła a następnie dr hab. Ewy Skibniewskiej prof. SGGW, od lat prowadzone były badania dotyczące wpływu makro- i mikroelementów na organizmy żywe. Wiedza i umiejętności zdobyte w trakcie studiów doktoranckich na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, przede wszystkim w zakresie oznaczania ilościowego pierwiastków przy użyciu płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej pod kierunkiem prof. dr hab. Mikołaja Gralaka, umożliwiła mi aktywne włączenie się w prace badawcze Zespołu na Wydziale Nauk o Zwierzętach. W Katedrze Biologii Środowiska Zwierząt przeprowadzane są także analizy rtęci w materiale biologicznym za pomocą spektrometru absorpcji atomowej AMA 254, będącego na wyposażeniu Katedry. Pracą podsumowującą wieloletnie badania i zainteresowania Zespołu w zakresie niezbędności i toksyczności pierwiastków była publikacja dwóch rozdziałów monografii o tytule:

„Mammals and birds as bioindicators of trace element contaminations in terrestrial environments: an ecotoxicological assessment of the Northern Hemisphere” / Kalisińska Elżbieta (red.), 2019, Cham, **Springer**, s.247-279, ISBN 978-3-030-00121-6. DOI:10.1007/978-3-030-00121-6_8. Jeden rozdział dotyczył chromu (Autorzy: Kośła Tadeusz, **Lasocka Iwona**, Kołnierzak Marta), drugi rozdział poświęcony był molibdenowi (Autorzy: Tadeusz Kośła, Michał Skibniewski, Ewa Skibniewska, **Iwona Lasocka**, Marta Kołnierzak).

Ta obszerna monografia dokumentuje ocenę ekotoksykologiczną półkuli północnej, m.in. dzięki różnym gatunkom ssaków i ptaków jako bioindykatorów zanieczyszczeń pierwiastkami śladowymi w środowiskach lądowych. Monografia ta jest także efektem współpracy krajowej, wielośrodkowej z naukowcami z Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, Akademii Rolniczej w Szczecinie, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

8. Plany na przyszłość

W centrum moich zainteresowań znajduje się problematyka procesu gojenia ran i poszukiwaniowe rozwiązań mogących usprawnić ten złożony proces i ostatecznie wpłynąć na dobrostan i zdrowotność zwierząt. Wiadomym jest, że proces gojenia ran jest niemożliwy do przeprowadzenia bez udziału makrofagów oraz, że makrofagi wykazują dużą zmienność charakteru polaryzacji w odpowiedzi na zmiany mikrośrodowiska. Dzięki odpowiedniej modulacji mikrośrodowiska (podłoże grafenowe) może okazać się możliwe sterowanie polaryzacją makrofagów, w taki sposób, aby proces gojenia rany przebiegał sprawnie i prawidłowo. Powyższa problematyka badawcza została zakwalifikowana do finansowania przez NCN w ramach **konkursu Miniatura 6**. Makrofagi wybrano jako model komórkowy ze względu na ich kluczową rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej i procesie gojenia ran, oraz na ich powszechne stosowanie w testach nanotoksyczności (norma ISO 10993-5:2009(E)). W badaniu wykorzystane zostaną komórki pierwotne pozyskane ze szpiku kości udowej myszy oraz komórki linii RAW 264.7. W związku z tym możliwa będzie także analiza porównawcza odpowiedzi tych dwóch typów komórek: które mają taki sam kariotyp jak organizm i charakteryzują się ograniczoną liczbą pasaży (hodowla pierwotna) i komórki linii ustalonych, które charakteryzują się nieogranoczoną liczbą pasaży i są aneuploidalne.

Polaryzacja M1/M2 makrofagów zostanie oceniona pod kątem następujących analiz:

1. ekspresja genów IL-1 β , TNF- α oraz IL-6 (aktywacja M1) lub IL-10, IL-13, arginazy 1 i/lub PPAR γ (aktywacja M2) za pomocą qRT-PCR;
2. produkcję TNF- α , IL-6, IL-10i/lub IL-13 za pomocą metody ELISA;
3. analizę ekspresji markerów powierzchniowych, włączając CD69, MHC II, CD80 i/lub CD86 za pomocą cytometrii przepływowej.

Dodatkowo, (4.) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej zostanie oceniona zdolność makrofagów M0, M1 i M2 do tworzenia struktur adhezyjnych (podosomów) na podłożu z grafenem i bez grafenu. Struktury te, mechanizm ich powstawania, aktywacja białek biorących udział w ich tworzeniu, dynamika i reakcja na podłoże, które eksplorują nadal wymagają badań. Powstawanie podosomów jest nierozdzielnie związane z polaryzacją makrofagów i pełnionymi przez nie funkcjami, m.in. uczestniczą w eliminacji stanów zapalnych.

Wyniki uzyskane dzięki planowanym badaniom pomogą w stworzeniu nowych rozwiązań biomedycznych, służących przyspieszeniu procesu leczenia ran skórnych poprzez manipulowanie środowiskiem makrofagów, ale także fibroblastów przy udziale monowarstwy

grafenu. W przyszłości planowane są także badania we współpracy z naukowymi ośrodkami zagranicznymi, umożliwiające zastosowanie opatrunku grafenowego u zwierząt towarzyszących, gospodarskich i użytkowanych sportowo.

Badania w ramach konkursu MINIATURA mają stanowić uzupełnienie wiedzy na temat bezpieczeństwa stosowania grafenu w kontakcie z żywą komórką oraz jego zastosowania jako rusztowanie (*ang.* scaffolding) w warunkach *in vitro* w celu „kontrolowanej” polaryzacji, mogącej przynieść duże korzyści w procesie gojenia ran i opracowania specjalistycznego opatrunku z jego wierzchnią warstwą mającą kontakt z raną. Planowane doświadczenia mogą stać się preludium do szerzej zakrojonych badań, dotyczących synergistycznego działania grafenu i „odpowiednio” spolaryzowanych makrofagów, poznania mechanizmu polaryzacji w kierunku M1 i M2 przy udziale monowarstwy grafenu, a w konsekwencji stworzenia specjalistycznego opatrunku dobieranego w zależności od fazy gojenia uszkodzenia skóry.

9. Piśmiennictwo

- 1) Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2005: Podstawy biologii komórki. PWN, rozdział 17
- 2) Alonso L.J., Goldmann W. H. 2016: Cellular mechanotransduction. AIMS Biophys. 3, 50–62. 10.3934/biophy.2016.1.50
- 3) Atherton P., Stutchbury B., Wang D.-Y., Jethwa D., Tsang R., Meiler-Rodriguez E., Wang P., Bate N., Zent R., Barsukov I.L., Goult B.T., Critchley D.R., Ballestrem C. 2015: Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. Nat. Commun., 6, 1-12
- 4) Bajek A, Olkowska J, Drew T. 2011: Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów. Postepy Hig Med. Dosw, 65, 124-132.
- 5) Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, Ravens U. 2006: 5-azacytidine induces changes In electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. Cell Research, 16, 949-960.
- 6) Barbolina I, Woods CR, Lozano N, Kostarelos K, Novoselov KS, Roberts IS. 2016: Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. 2D Materials, 3(2):025025.
- 7) Bhatt, M.D., Kim, H., Kim, G. 2022: Various defects in graphene: a review. RSC Adv., 12, 21520-21547, 10.1039/D2RA01436J
- 8) Chubinskiy-Nadezhdin VI, Vasileva VY, Pugovkina NA, Vassilieva IO, Morachevskaya EA, Nikolsky NN, Negulyaev YA. 2017: Local calcium signalling is mediated by mechanosensitive ion channels in mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 22;482(4):563-568. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.074

- 9) Coradeghini, R.; Gioria, S.; García, P.C.; Nativo, P.; Franchi, F.; Gilliland, D.; Ponti, J.; Rossi, F. 2013: Size-Dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 217, 205–216
- 10) Costigliola N., Ding L., Burckhardt C.J., Han S.J., Gutierrez E., Mota A., Groisman A., Mitchison T.J., Danuser G. 2017: Vimentin fibers orient traction stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201614610; DOI: 10.1073/pnas.1614610114
- 11) Dai J-F, Wang G-J, Ma L, Wu C-K. 2015: Surface properties of graphene: relationship to graphene-polymer composites. *Rev Adv Mater Sci.* 40:60–71
- 12) Dalby, M.J.; Garcia, A.; Salmeron-Sanchez, M. 2018: Receptor control in mesenchymal stem cell engineering. *Nat. Rev. Mater.* 3, 17091, 1–14
- 13) Deng F-G, Li Y-L, Zhang X-Y 2009: Role of 5-azacytidine In differentiation of human mesenchymal stem cells into cardiomyocytes in vitro. *Journal of geriatric cardiology.* 6, 3, 182-188.
- 14) Duan, G., Y.Zhang, B. Luan, J. K. Weber, R. W. Zhou, Z. Yang, L. Zhao, J. Xu, J. Luo, and R. Zhou. 2017: „Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes.“*Scientific Reports* 742767. <https://doi.org/10.1038/srep42767>
- 15) Ekanem, A. U., and K. P. Udoh. 2018: „Expression of E-Cadherin in Epidermis from Wounds Treated with Costus afer Stem Juice Extract.“*Toxicology and Applied Pharmacology Insights* 1 1-4
- 16) Fukuda K 2003: Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow: Use of mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering. *Cytotechnology* 41, 165–175.
- 17) Furuhashi A., Ayukawa Y., Atsuta I., Okawachi H., Koyano K. 2012: The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology*, 100, 199-205
- 18) Jasiński M. 2018: Bezpieczeństwo stosowania nanomateriałów. *Technika, Informatyka, Inżynieria Bezpieczeństwa*, t. VI, s. 519–534
- 19) Jaworski, S.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Kutwin, M.; Daniluk, K.; Chwalibóg, 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.* 20, 650
- 20) Jiu, Y., Peränen, J., Schaible, N., Cheng, F., Eriksson, J. E., Krishnan, R., & Lappalainen, P. 2017: Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA. *Journal of Cell Science*, 130(5), 892–902. <http://doi.org/10.1242/jcs.196881>
- 21) Kalbacova M., Broz A., Kong J., Kalbac M. 2010: Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells *Carbon*, 48, 4323-4329
- 22) Kalbacova M., Verdanova M., Broz A., Vetushka A., Fejfar A., Kalbac M. 2014: Modulated surface of single-layer graphene controls cell behavior. *Carbon*, 72, 207-214

- 23) Karashima T, Tsuruta D., Hamada T., Ishii N., Ono F., Hashikawa K., Ohyama B., Natsuaki Y., Fukuda S., Koga H., Sogame R., Nakama T., Dainichi T., Hashimoto T. 2012: Interaction of plectin and intermediate filaments. *J Dermatol Sci* 66(1):44–5
- 24) Kim, J.; Park, S.; Kim, Y.J.; Jeon, C.S.; Lim, K.T.; Seonwoo, H.; Cho, S-P.; Chung, T. D.; Choung, P-H.; Choung, Y-H.; Hong, B.H.; Chung, J.H. 2015: Monolayer graphene-directed growth and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11, 1–10. doi:10.1166/jbn.2015.2137
- 25) Kyrova, J., Kopeckova, L., Buckova, H., Mrazova, L., Vesely, K., Hermanova, M., ... Fajkusova, L. 2016: Epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. Review of the literature and a case report. *Journal of Dermatological Case Reports*, 10(3), 39–48. <http://doi.org/10.3315/jdcr.2016.1231>
- 26) Latifi Pupovci H., Kuçi Z., Wehner S., Böning H., Lieberz R., Klingebiel T., Bader P., Kuçi S. 2015: In vitro migration and proliferation (“wound healing”) potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271+ bone marrow mononuclear cells. *J Transl Med*. 13:315
- 27) Leonard, A.P.; Cameron, R.B.; Speiser, J.L.; Wolf, B.J.; Peterson, Y.K.; Schnellmann, R.G.; Beeson, C.C.; Rohrer, B. 2015: Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853, 348–360
- 28) Li, R., L.M. Guiney, C. H. Chang, N. D. Mansukhani, Z.Ji, X. Wang, Y. P. Liao, W. Jiang, B. Sun, M. C. Hersam, A. E. Nel, and T.Xia. 2018: Surface Oxidation of Graphene Oxide Determines Membrane Damage, Lipid Peroxidation, and Cytotoxicity in Macrophages in a Pulmonary Toxicity Model. *ACS Nano* 12 1390–1402. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07737>
- 29) Liang, CC., Park, A. & Guan, JL. 2007: In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329–333 <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- 30) Liao K.-H., Lin Y.S., Macosko C.W., Haynes C.L. 2011: Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 3 (7), 2607–2615
- 31) Liu, L., Zhang, M., Zhang, Q., Jiang, W. 2020: Graphene nanosheets damage the lysosomal and mitochondrial membranes and induce the apoptosis of RBL-2H3 cells, *Science of The Total Environment*, 734, 139229, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139229>
- 32) Liu W., Sun C., Liao C., Cui L., Li H., Qu G., Yu W., Song N., Cui Y., Wang Z., Xie W., Chen H., Zhou Q. 2016: Graphene enhances cellular proliferation through activating the epidermal growth factor receptor. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (29), 5909-5918
- 33) Liu Z.J., Zhuge Y., Velazquez O.C. 2009: Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 106: 984–991

- 34) Martínez Tapial, P.; Navajas López, P.; Lietha, D. 2020: FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules*, 10, 179. <https://doi.org/10.3390/biom10020179>
- 35) Mendez, M. G., Kojima, S.-I., & Goldman, R. D. 2010: Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*, 24(6), 1838–1851. <http://doi.org/10.1096/fj.09-151639>
- 36) Mukherjee S, Sriram P, Barui AK, Nethi SK, Veeriah V, Chatterjee S, Suresh KI, Patra CR. 2015: Graphene Oxides Show Angiogenic Properties. *Adv Healthc Mater.* 5;4(11):1722-32. doi: 10.1002/adhm.201500155
- 37) Nuydens R, Novalbos J, Dispersyn G, Weber C, Borgers M, Geerts H. 1999: A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties. *J Neurosci Methods.* 15;92(1-2): 153-9. doi: 10.1016/s0165-0270(99)00107-7. PMID: 10595713
- 38) Pavel E., Marinescu V., Lungulescu M. 2021: Nanopatterning of monolayer graphene by quantum optical lithography, *Appl. Opt.* 60, 1674-1677
- 39) Pelin, M., H.Lin,A. Gazzi,S. Sosa,C. Ponti,A. Ortega,A.Zurutuza,E. Vázquez,M. Prato,A. Tubaro,A.Bianco. 2020: Partial Reversibility of the Cytotoxic Effect Induced by Graphene-Based Materials in Skin Keratinocytes. *Nanomaterials*, 15101602. doi: 10.3390/nano10081602
- 40) Pelin, M., L. Fusco, V.León, et al. 2017: Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes. *Scientific Reports* 7 40572. <https://doi.org/10.1038/srep40572>
- 41) Pelin, M.,L. Fusco, C.Martín, S.Sosa, J.Frontiñán-Rubio, J. M. González-Domínguez, M.Durán-Prado, E.Vázquez, M.Prato and A.Tubaro 2018: Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: the role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase. *Nanoscale*10 11820 —11830
- 42) Piśula M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P. 2015: Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. *Postępy Hig Med Dosw.*69, 874-885
- 43) Polo Y., Luzuriaga J., Iturri J., Irastorza I., Toca-Herrera J.L., Ibarretxe G., Unda F., Sarasua J.-R., Pineda J. R., Larrañaga A., 2021: Nanostructured scaffolds based on bioresorbable polymers and graphene oxide induce the aligned migration and accelerate the neuronal differentiation of neural stem cells, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 31, 102314, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102314>
- 44) Potdar PD, Prasanna P 2013: Differentiation of human dermal mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by treatment with 5-azacytidine: concept for regenerative therapy in myocardial infarction. *ISRN Stem Cells*, ID 687282, 9 pages.
- 45) Rafelski, S.M. 2013: Mitochondrial network morphology: Building an integrative, geometrical view. *BMC Biol.* 11, 71
- 46) Rastogi, S.K., Raghavan, G., G. Yang, Cohen-Karni, T. 2017: Effect of Graphene on Nonneuronal and Neuronal Cell Viability and Stress. *Nano Lett.* 17, 5, 3297–3301

- 47) Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girão H. 2017: Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci.* Nov 1;130(21):3619-3630. doi: 10.1242/jcs.200667
- 48) Salesa, B., and Serrano-Aroca Á. 2021: Multi-Layer Graphene Oxide in Human Keratinocytes: Time-Dependent Cytotoxicity, Proliferation, and Gene Expression. *Coatings.* 114414. <https://doi.org/10.3390/coatings11040414>
- 49) Salesa, B.; Tuñón-Molina, A.; Cano-Vicent, A.; Assis, M.; Andrés, J.; Serrano-Aroca, Á. 2022: Graphene Nanoplatelets: In Vivo and In Vitro Toxicity, Cell Proliferative Activity, and Cell Gene Expression. *Appl. Sci.* 12, 720. doi.org/10.3390/app12020720
- 50) Siegel G, Krause P, Wöhrle S, Nowak P, Ayturan M, Kluba T, Brehm BR, Neumeister B, Köhler D, Rosenberger P, Just L, Northoff H, Schäfer R 2012: Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Express Cardiomyogenic Proteins But Do Not Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation Potential. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, 21, 13, 2457-2470.
- 51) Singh A, Singh A, Sen D 2016: Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Research and Therapy.* 7, 82, doi: 10.1186/s13287-016-0341-0.
- 52) Song Y-H, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X, Matthias N, Alt E 2007: VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 999-1003.
- 53) Szmids, M., Sawosz, E., Urbańska, K. et al. 2016: Toxicity of different forms of graphene in a chicken embryo model. *Environ Sci Pollut Res* 23, 19940–19948. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7178-z>
- 54) Tan X.W., Thompson B., Konstantopoulos A., Goh T.W., Setiawan M., Yam G. H-F., Tan D., Khor K.A., Mehta J.S. 2015: Application of graphene as candidate biomaterial for synthetic keratoprosthesis skirt. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56, 11, 6605-6611
- 55) Tvorogova A, Saidova A, Smirnova T, Vorobjev I. 2018: Dynamic microtubules drive fibroblast spreading. *Biol Open.* 13;7(12):bio038968. doi: 10.1242/bio.038968
- 56) Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. 2010: Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 316:1271–81
- 57) Wiche G, Winter L. 2010: Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. *Bioarchitecture.* 1(1):14-20. doi: 10.4161/bioa.1.1.14630
- 58) Winter, L., Türk, M., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Kornblum, C., Norwood, F., ... Schröder, R. 2016: Downstream effects of plectin mutations in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica Communications*, 4, 44. <http://doi.org/10.1186/s40478-016-0314-7>

- 59) Wytrwal M., Koczurkiewicz P., Zrubek K., Niemiec W., Michalik M., Kozik B., Szneler E., Bernasik A., Madeja Z., Nowakowska M., Kepczynski M. 2016: Growth and motility of human skin fibroblasts on multilayer strong polyelectrolyte films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 461, 305-316
- 60) van de Vyver M, Boodhoo K, Frazier T, Hamel K, Kopcewicz M, Levi B, Maartens M, Machcinska S, Nunez J, Pagani C, Rogers E, Walendzik K, Wisniewska J, Gawronska-Kozak B, Gimble JM. 2021: Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds. *Stem Cells Dev.* 1; 30(23):1141-1152. doi: 10.1089/scd.2021.0124
- 61) van Roy, F., and G.Berx, 2008: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- 62) Yao M., Goult B.T., Chen H., Cong P., Sheetz M.P., Yan J. 2014: Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci. Rep.*, 4 (4610), 1-7
- 63) Ye L, Zhang S, Greder L, Dutton J, Keirstead SA, Lepley M, Zhang L, Kaufman D, Zhang J 2013: Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF. *PLoS One* 8(1), e53764.
- 64) Zhang XF, Cui X. 2017: Connexin 43: Key roles in the skin. *Biomed Rep.* 6(6):605-611. doi: 10.3892/br.2017.903
- 65) Zhang H, Hou R, Xiao P, et al. 2016b: Single cell migration dynamics mediated by geometric confinement. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 145:72–78
- 66) Zhang, B.; Wei, P.; Zhou, Z.; Wei, T. 2016: Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105, 145–162
- 67) Zou X, Zhang L, Wang Z, Luo Y. 2016: Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials. *J Am Chem Soc.* 138(7):2064–2077
- 68) Zwetsloot, A.J., G. Tut, and A. Straube. 2018: Measuring microtubule dynamics. *Essays Biochemistry* 7(62):725-735. doi: 10.1042/EBC20180035

.....
(podpis wnioskodawcy)