

Warszawa, 04.09.2025

Autor rozprawy doktorskiej: **mgr inż. Aneta Magiera**

Promotor: **prof. dr hab. Robert Hołyst**

*Drugi promotor (*ewentualnie, tylko w przewodach doktorskich): nie dotyczy

Promotor pomocniczy: **dr inż. Karina Kwapiszewska**

Temat rozprawy doktorskiej: „*Badanie internalizacji cząsteczek chemicznych i biologicznych do wnętrza żywych komórek*”

Streszczenie

Wnikanie dowolnej cząsteczki do wnętrza ludzkich komórek, określane mianem internalizacji, zależy od właściwości tej molekuly, jak rozmiar, hydrofobowość, czy ładunek elektryczny. Rozważając cząsteczkę o znaczeniu terapeutycznym, a więc istniejący lub obiecujący lek, jej internalizacja może być procesem pożądanym lub nie. Decyduje o tym jej mechanizm działania – są molekuly, które ulegają związaniu z białkiem znajdującym się wewnątrz komórki. Inne z kolei oddziałują z ligandem występującym zewnątrzkomórkowo. Zatem te dwa przykłady to odpowiednio internalizacja pożądana oraz nie. Proces wnikania leku do komórki jest szczególnie istotny w ujęciu prężnie rozwijanych i testowanych obecnie terapii celowanych. Ich zadaniem jest ograniczenie skutków ubocznych standardowych metod leczenia nowotworów poprzez skierowanie leku precyzyjnie na wybrany element komórki nowotworowej. Zatem określenie, czy i w jakim stopniu cząsteczka o potencjale terapeutycznym wnika do komórek wydaje się etapem początkowym jej testowania w ujęciu klinicznym.

W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę internalizacji różnych cząsteczek biologicznych i chemicznych (w tym leków, dinukleotydów, białek i wybranego barwnika) do wnętrza żywych, pojedynczych komórek nowotworowych. Jako podstawową metodę badawczą zastosowano spektroskopię korelacji fluorescencji. Precyzyjna, ilościowa analiza była możliwa poprzez wykorzystanie modelu nanolepkości wnętrza komórek zależnego od skali długości. Jako technikę towarzyszącą, jakościową, stosowano obrazowanie konfokalne/FLIM. Uzyskane wyniki wykazały, że przyjęte podejście badawcze pozwala określić, co dzieje się z wyznakowaną fluorescencyjnie cząsteczką wewnątrzkomórkowo oraz jakim interakcjom ta molekula ulega.

Na przykładzie leku olaparib udowodniono, że stopień wnikania tego związku do komórek nowotworowych zależy od ilości jego celu molekularnego – białka PARP1. Technikę FCS zastosowano także do monitorowania procesu endocytozy leku bewacizumab. Jak wykazano, ten działający zewnątrzkomórkowo związek jest pobierany przez komórki na drodze endocytozy konstytutywnej, ale nie jest uwalniany wewnątrzkomórkowo z endosomów do cytoplazmy. Zbadano także, czy wybrane terapeutyczne dinukleotydy wnikają do komórek i są w nich obecne w formie swobodnie dyfundującej oraz określono, jakie formy oligomeryczne białek ferrytyny i

hemoglobiny dominują wewnątrz komórek. Przeprowadzone badania pozwoliły także ustalić, że barwnik YO-PRO-1 selektywnie wybarwia cząsteczki tRNA i rRNA w żywych komórkach. Z kolei na przykładzie białka PRMT1 wykazano użyteczność techniki FCS do oceny dystrybucji związku między kompartmentami komórkowymi.

Na koniec, zbadano zastosowanie różnic ciśnienia osmotycznego do dostarczania do ludzkich komórek związków, które nie są przez nie samodzielnie pobierane. Wykazano, że użycie polimeru w reżimie splątania łańcuchów polimerowych jest parametrem decydującym o powodzeniu całego procesu. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm wprowadzania cząsteczek do ludzkich komórek szokiem osmotycznym.