

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biofizyki Ogólnej

PRACA DOKTORSKA

Sylwia Michlewska

**Przeciwnowotworowe właściwości
dendrymerów zawierających ruten**

Promotor: dr hab. Maksim Ionov prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzenci

Łódź 2019

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej

Badania zostały wykonane w ramach projektów:

FP7-PEOPLE-2012-IRSES „NANOGENE” W dziedzinie przeciwnowotworowej terapii genowej z wykorzystaniem nanomateriałów.”

H2020-TWINN-2015/CSA-692293 “VACTRAIN” Horizon 2020 “Twinning on DNA-based cancer vaccines”.

PPN/BIL/2018/1/00150 “PL-SK” Projekt w ramach programu wymiany bilateralnej, „Nanosystemy dostarczania leków do komórek z wykorzystaniem technologii łączącej właściwości dendrymerów i liposomów.”



Współpraca w ramach wykonywanych badań:

Uniwersytet Alcalá de Henares, Hiszpania. Katedra Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej,
prof. Rafael Gomez-Ramirez, prof. Francisco J. de la Mata.



Białoruska Akademia Nauk w Mińsku, Białoruś Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki,
prof. Dzmitry Shcharbin.



**Institute of Biophysics
and Cell Engineering**
National Academy of Sciences of Belarus

Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. Katedra jądrowej fizyki,
prof. Tibor Hianik, prof. Iveta Vaculikova.



Uniwersytet w Rydze, Łotwa, Rīga Stradiņš University,
prof. Maria Issaguliantis.



**RĪGA STRADIŅŠ
UNIVERSITY**

Spis treści

1. Przedstawienie hipotezy badawczej i omówienie wyników pracy.....	4
1.1. Wprowadzenie	4
1.2. Cele pracy.....	6
1.3. Metodyka Badań.....	7
1.4. Omówienie wyników	8
1.5. Wnioski.....	10
2. Streszczenie w języku polskim	10
3. Streszczenie w języku angielskim.....	12
4. Literatura.....	12
5. Dorobek naukowy.....	16
5.1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	16
5.2. Spis publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej	17
5.3. Komunikaty zjazdowe:	19
6. Działalność naukowa	21
6.1. Treningi i staże.....	21
6.2. Stypendia, nagrody, wydarzenia	21

1. Przedstawienie hipotezy badawczej i omówienie wyników pracy

1.1. Wprowadzenie

Obecnie nowotwory wciąż pozostają jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie. Według Światowej Organizacji zdrowia nowotworami powodującymi najwięcej zgonów u osób dorosłych są rak płuc, piersi, jelita grubego oraz prostaty.

Jednakże, w szczególności u dzieci, ciągle najgroźniejszym rodzajem raka pozostaje białaczka (Allemani i wsp. 2015; Zhang i wsp. 2016). Znane są cztery główne typy raka krwi: ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka mieloblastyczna, chroniczna białaczka limfoblastyczna oraz chroniczna białaczka mieloblastyczna (Heidari i wsp. 2017). Do tej pory wciąż najskuteczniejszym rodzajem terapii leczenia raka krwi pozostaje transplantacja (Qayed i wsp. 2018), jednak ten sposób eliminacji komórek mimo dużej skuteczności niesie za sobą ryzyko zgonu. Zatem znalezienie alternatywnego, skutecznego sposobu walki z tym typem nowotworu wydaje się istotnym problemem do rozwiązania.

Apoptoza jest ściśle regulowanym procesem, który zachodzi powszechnie w żywych organizmach. Za jej regulację odpowiada m.in. utrzymanie odpowiedniego poziomu ekspresji genów kodujących białka z rodziny Bcl2, wśród których wyróżniamy białka pro- i anty-apoptotyczne. Te ostatnie znane są też jako inhibitory programowanej śmierci. Jedną z podstawowych korzyści wynikających z występowania procesu apoptozy jest eliminacja komórek namnażających się w wyniku mutacji, co stanowi naturalne zabezpieczenie przed rozwojem nowotworów (Gandhi i wsp. 2014; Tanos i wsp. 2016). Czasami jednak dochodzi do zaburzeń w regulacji tego procesu, w wyniku czego rozpoczyna się proces nowotworzenia. Jak wiadomo, w komórkach nowotworowych zwiększona jest ekspresja genów związanych z syntezą białek anty-apoptotycznych należących do rodziny Bcl-2 (Bcl-xL Bcl-2, Bcl-W, Mcl-xl, Bfl1/A-1 and Bcl-B) (Creixell i wsp. 2012). Poprzez wprowadzenie siRNA komplementarnego do DNA anty-apoptotycznych białek możliwe jest wyciszenie tych genów na drodze interferencji (Ambesjar i wsp. 2013, Gandhi i wsp. 2014; Ionov i wsp. 2015; Dzitruk i wsp. 2015; Tanos i wsp. 2016). Mechanizm ten polega na degradacji mRNA poprzez dołączenie do niego wprowadzonego siRNA (small interfering RNA) za pośrednictwem kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex), dzięki czemu następuje blokada syntezy docelowego białka (Ambesjar i wsp. 2013; Dzitruk i wsp. 2015). Skutkiem tego zwiększa się prawdopodobieństwo eliminacji komórek zmienionych nowotworowo, poprzez wprowadzenie ich na drogę apoptozy. Jednakże z uwagi na ujemny ładunek siRNA oraz fakt, że jest on wysoce wrażliwy na działanie nukleaz, proces dostarczania kwasów nukleinowych do komórek jest utrudniony (Creixell i wsp. 2012).

Skutecznym rozwiązaniem tego problemu wydaje się być zastosowanie dodatnio naładowanych nanomateriałów jako nośników kwasów nukleinowych.

Na szczególną uwagę zasługują kuliste polimery nazywane dendrymerami. Ze względu na swoją unikatową budowę, monodispersyjność, niską immunogenność oraz stosunkowo łatwą kontrolę procesu syntezy, wydają się być one świetnymi kandydatami do wykorzystania, jako nośniki genów lub leków (Wu i wsp. 2013). Zbudowane są z centralnie położonego rdzenia, od którego odchodzą rozgałęzienia nazywane dendronami. W trakcie ich syntezy istnieje możliwość kontrolowanego dołączania kolejnych warstw, co umożliwia tworzenie wyższych generacji nanocząstek (Biswas i wsp. 2013; Ionov i wsp. 2015; Hasemi i wsp. 2016). Na powierzchni dendrymerów znajdują się grupy terminalne określające właściwości całej nanocząstki (Biswas and Torchilin 2013; Abbasi i wsp. 2014; Hashemi i wsp. 2016). Możliwość modyfikacji grup powierzchniowych daje dużą swobodę w produkcji nowych nanocząstek, o ściśle określonym przeznaczeniu. Dodatni ładunek kationowych dendrymerów pozwala na interakcję nanocząstek z ujemnie naładowaną błoną komórkową, dzięki czemu możliwa jest ich internalizacja do wnętrza komórki. Co więcej, dendrymery posiadające dodatni ładunek mogą tworzyć kompleksy z ujemnie naładowanymi kwasami nukleionowymi. Tak utworzony kompleks zyskuje nie tylko dodatni ładunek, ale chroni też materiał genetyczny przed działaniem nukleaz. Jest to szczególnie istotne w przypadku siRNA, który w naturalny sposób podlega degradacji przez nukleazy (Wang i wsp. 2012). Wykorzystanie tego mechanizmu jest bardzo obiecujące w walce z chorobami nowotworowymi.

Dodatkową korzyścią wynikającą z zastosowania dendrymerów jest możliwość przyłączenia do ich powierzchni atomów metali wykazujących właściwości przeciwnowotworowe takich jak platyna, złoto, srebro oraz ruten (Frik i wsp. 2015, Maroto-Diaz et al. 2015, Hassemi i wsp. 2016). Obecnie cisplatyna jest najlepiej znanym metalem wykazującym właściwości przeciwnowotworowe i znajduje powszechne zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy. Jednak pomimo skuteczności terapii z wykorzystaniem tego metalu, ciągle problemem pozostaje fakt, że eliminując tkankę rakową, jednocześnie uszkadza on zdrowe tkanki (Frik i wsp. 2015). W związku z powyższym wciąż poszukuje się nowych związków, które w przyszłości pozwolą na optymalizację efektu leczniczego, z jednoczesnym ograniczeniem skutków ubocznych.

W obliczu tych niedogodności obiecującą alternatywą mogą być związki oparte na rutenie. Metal ten w organizmie zachowuje się podobnie jak żelazo, które jest wiązane przez albuminy i transferyny (Carter i wsp. 2016, Michlewska i wsp. 2017). Ruten podobnie jak żelazo, w kompleksie z białkami może być pobierany przez komórki nowotworowe.

Komórki rakowe ze względu na przyspieszony metabolizm mają zwiększone zapotrzebowanie na żelazo, dlatego posiadają więcej receptorów dla transferyny. W ten sposób ruten obecny w krwiobiegu może być intensywnie pobierany przez docelową grupę komórek zamiast żelaza (Spreckelmeyer i wsp. 2014). Przyłączenie rutenu do dendrymerów posiadających dodatni ładunek może skutkować rozpoznawaniem ich przez komórki rakowe i zwiększonym pobieraniem tak zmodyfikowanych nanocząstek. Ruten występuje na różnych stopniach utlenienia, z których na II wykazuje silne właściwości cytotoksyczne (Dragutan i wsp. 2015; Carter i wsp. 2016). Metal ten zakłóca replikację DNA i w rezultacie pod wpływem rutenu komórki mogą wchodzić na drogę śmierci komórkowej (Pereira i wsp. 2014; Spreckelmeyer i wsp. 2014; Vilanova-Costa i wsp. 2014; Dragutan i wsp. 2015; Carter i wsp. 2016). Co więcej, wewnątrz komórek rakowych środowisko jest silnie redukcyjne ze względu na podwyższone stężenie glutationu i lekko kwaśne pH. Skutkiem tego pobrany przez nie ruten uprzednio krążący w organizmie jako forma nietoksyczna, wewnątrz komórek rakowych może ulegać redukcji do toksycznej formy i w ten sposób uszkadzać komórki nowotworowe (Pereira i wsp. 2014). Kationowe dendrymery z przyłączonym ruteniem wydają się być nie tylko potencjalnymi środkami przeciwnowotworowymi, ale również kandydatami do wykorzystania jako nośniki przeciwnowotworowego siRNA do komórek rakowych (Dzmitruk i wsp. 2015, Michlewska i wsp. 2018).

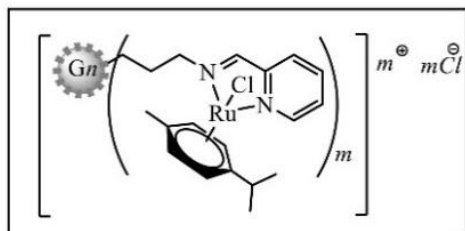
1.2. Cele pracy

Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności przeciwnowotworowej karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten (CRD), a także analiza możliwości wykorzystania ich jako nośników kwasów nukleinowych. W celu potwierdzenia hipotezy badawczej zakładającej zwiększenie przeciwnowotworowych właściwości dendrymerów poprzez dołączenie do ich struktury rutenu określono następujące cele pracy:

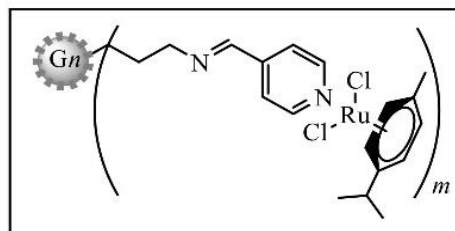
1. scharakteryzowanie biofizycznych właściwości dendrymerów zawierających ruten.
2. ocenę cytotoksyczności dendrymerów w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych.
3. zbadanie możliwości wykorzystania dendrymerów jako nośników siRNA przeciwnowotworowego.
4. wyjaśnienie mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej wybranych dendrymerów.
5. wybór najbardziej obiecujących dendrymerów do zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

1.3. Metodyka Badań

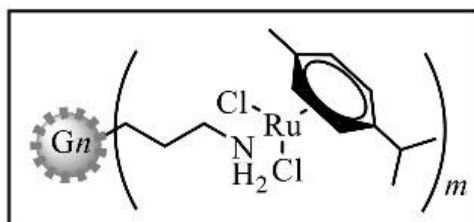
Zbadano trzy rodzaje dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten (CRD) różniących się typem ligandu. Struktura dendrymerów została zaprezentowana na Rys.1.



CRD7 $n=0, m=1$
CRD13 $n=1, m=4$
CRD27 $n=2, m=8$



CRD5 $n=0, m=1$
CRD14 $n=1, m=4$
CRD28 $n=2, m=8$



CRD34 $n=0, m=1$
CRD32 $n=1, m=4$

n-generacja, *m*-liczba grup powierzchniowych dendrymeru.

Rys.1. Struktura karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten i różniących się typem ligandów powierzchniowych: imino-pirydynowe (CRD7, CRD13 i CRD27), pirydynowe (CRD5, CRD14 i CRD28) i aminowe (CRD34 i CRD32).

Model badawczy stanowiły:

- Komórki prawidłowe PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej),
- Komórki nowotworowe linii HL-60 (białaczka promielocytowa),
- Przeciwnowotworowe siRNA (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1),
- Eryocyty izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców,
- Błony erytrocytarne

W pracy zastosowano następujące techniki badawcze: pomiar potencjału zeta, pomiar średnicy hydrodynamicznej; transmisyjna mikroskopia elektronowa TEM; hemoliza

erytrocytów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców; polaryzacja fluorescencji; test MTT oraz AlamarBlue; dichroizm kołowy (CD); elektroforeza żelowa; symulacja komputerowa; mikroskopia konfokalna; cytometria przepływowa.

1.4. Omówienie wyników

W pierwszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę właściwości biofizycznych i cytotoksycznych dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten, różniących się grupami terminalnymi (pirydynowymi, imino-pirydynowymi oraz aminowymi).

Wszystkie badane dendrymery posiadają ładunek dodatni, a ich właściwości hemolityczne są zależne od generacji i stężenia dendrymeru. Podczas gdy najmniej cytotoksyczne w stosunku do komórek nienowotworowej linii B14 (fibroblasty chomicze) były dendrymery generacji „0”, te same nanocząstki znacząco obniżały liczbę żywych komórek linii nowotworowej HL-60 (komórki ostrej białaczki promielocytowej). Wzrost generacji dendrymerów spowodował zwiększenie ich cytotoksyczności w stosunku do obu linii komórkowych.

Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych analiz oceny zdolności tworzenia kompleksów przez dendrymery z przeciwnowotworowym siRNA wybrano nanocząstki 1 i 2 generacji z grupami pirydynowymi i imino-pirydynowymi.

Właściwości cytotoksyczne dendrymerów oraz ich kompleksów oceniono w stosunku do komórek nowotworowych HL-60. W celu potwierdzenia braku toksyczności związków w stosunku do komórek prawidłowych przeprowadzono analizy na jednojądrzastych komórkach izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej z ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells-PBMC). Dodatkowo określono stopień internalizacji kompleksów tworzonych przez dendrymery z siRNA znakowanym fluoresceiną do komórek HL-60 za pomocą cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej.

Dendrymery CRD tworzą kompleksy z siRNA, w których kwasy nukleinowe nie ulegają degradacji przez nukleazy. Co więcej, dendrymery wykazują zdolność do przenoszenia siRNA do komórek nowotworowych. Ze względu na wysoką cytotoksyczność dendrymerów

w stosunku do komórek nowotworowych, nie zaobserwowano aktywności przeciwnowotworowej kompleksu siRNA z dendrymerami wprowadzonego do komórek białaczki HL-60. Jednakże przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch dendrymerów z imino-pirydynowymi grupami terminalnymi, które wykazywały silną

cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych HL-60, bez negatywnego wpływu na prawidłowe komórki PBMC. Dlatego w kolejnych etapach badań skupiono się na wyjaśnieniu mechanizmu działania wybranych związków w stosunku do komórek HL-60.

Ze względu na fakt, że zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach oraz zmiany potencjału mitochondrialnego mogą wskazywać na rodzaj śmierci komórkowej, wykonano analizy z wykorzystaniem H₂DCFDA i JC-1, pozwalające określić poziom ROS oraz zmiany potencjału mitochondrialnego w komórkach białaczki. Dodatkowo wykonano test kometowy mający na celu określenie ilości uszkodzeń DNA. Przeprowadzono również szczegółową analizę ultrastruktury komórek HL-60 poddanych działaniu wybranych dendrymerów. W celu identyfikacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykonano test z bromkiem etydyny i oranżem akrydyny z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz test aktywności kaspaz 3 i 7. Uzyskane wyniki wskazują, że najwyższy poziom ROS obserwowano po 3 godzinach traktowania dendrymerem generacji 1, a oba badane dendrymery były zdolne do zmiany potencjału mitochondrialnego. Dodatkowo dendrymer 1 generacji generował więcej uszkodzeń DNA w analizowanych komórkach, niż dendrymer generacji 2. Szczegółowa analiza morfologii i ultrastruktury komórek potwierdziła obecność komórek wykazujących zarówno zmiany o charakterze apoptotycznym jak i nekrotycznym. Podobnie wyniki testu, w którym oceniano aktywność kaspaz 3 i 7 po inkubacji z testowanymi dendrymerami, wskazują na pojawienie się zarówno puli komórek apoptotycznych jak i nekrotycznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że aktywność dendrymeru generacji 1 jest większa niż generacji 2. Jednakże, zarówno za pomocą testów spektrofluorometrycznych, jak i mikroskopowych nie udało się jednoznacznie potwierdzić, że pod wpływem badanych związków komórki obumierają na drodze apoptozy. W zależności od kondycji komórek, dostępności glukozy, a w szczególności ATP mogą one obumierać zarówno na drodze apoptozy, jak i nekroptozy, będącej rodzajem kontrolowanej śmierci komórkowej (Michlewska i wsp. 2019). Biorąc pod uwagę mechanizm działania badanych dendrymerów CRD, oba można uznać za potencjalne czynniki przeciwnowotworowe.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane związki nie wykazując aktywności w stosunku do komórek prawidłowych, kierują komórki nowotworowe na drogę programowanej śmierci jaką jest zarówno apoptoza jak i nekroptoza. W związku z tym, że nekroptoza jest zjawiskiem zachodzącym w żywych organizmach bez cech nacieku zapalnego towarzyszącego typowej martwicy, eliminacja tkanki nowotworowej poprzez ten proces wydaje się być zjawiskiem korzystnym.

1.5. Wnioski

1. Karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten (CRD) są bardziej toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych niż do komórek prawidłowych.
2. Karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten (CRD) wykazują zdolność kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy i nekroptozy.
3. Karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten (CRD) wykazują zdolność tworzenia kompleksów z przeciwnowotworowymi siRNA.
4. Karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten (CRD) skutecznie przenoszą siRNA do komórek nowotworowych i chronią je przed degradacją przez nukleazy.

W związku z powyższym, w kolejnych etapach badań planuje się przeanalizować działanie wybranych dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych oraz rozpocząć badania *in vivo*.

2. Streszczenie w języku polskim

Jednym z najgroźniejszych rodzajów nowotworów jest białaczka. Mimo, że transplantacja wciąż pozostaje skutecznym rodzajem terapii leczenia raka krwi, to niesie ona za sobą ogromne ryzyko zgonu. Zatem znalezienie alternatywnego i bezpiecznego sposobu walki z tym typem nowotworu w dalszym ciągu jest istotnym problemem do rozwiązania. Uwaga naukowców skupia się więc na możliwościach zastosowania kationowych dendrymerów, mogących stanowić nośniki dla kwasów nukleinowych oraz leków. Dodatkową korzyścią zastosowania dendrymerów jest możliwość modyfikacji grup powierzchniowych tych nanocząstek poprzez przyłączanie do nich metali o właściwościach przeciwnowotworowych, takich jak ruten.

W obecnej pracy przeprowadzono charakterystykę biofizyczną dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten, przeanalizowano ich aktywność przeciwnowotworową, a także oceniono możliwość wykorzystania dendrymerów jako nośników przeciwnowotworowego siRNA do komórek nowotworowych.

Charakterystyka właściwości biofizycznych i cytotoksycznych dendrymerów z rutenem (CRD) pozwoliła na wyselekcjonowanie nanocząstek 1 i 2 generacji z grupami pirydynowymi i imino-pirydynowymi do dalszych etapów badań.

Wykazano, że dendrymery CRD tworzą kompleksy z siRNA, w których kwasy nie ulegają degradacji przez nukleazy. Co więcej, testowane nanocząstki mają potencjał do przenoszenia siRNA do komórek nowotworowych. Zdolność internalizacji kompleksów tworzonych przez dendrymery z siRNA znakowanym fluoresceiną do komórek HL-60 oceniano za pomocą cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej. Ze względu na wysoką toksyczność dendrymerów w stosunku do komórek nowotworowych, nie zaobserwowano aktywności przeciwnowotworowej kompleksu siRNA z dendrymerem wprowadzonego do komórek białaczki HL-60.

Jednakże przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch dendrymerów z imino-pirydynowymi grupami terminalnymi, które wykazywały silną toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych HL-60, bez wpływu na komórki prawidłowe.

Dlatego w kolejnych etapach badań skupiono się na wyjaśnieniu mechanizmu działania wybranych związków w stosunku do komórek HL-60.

Przeprowadzono analizy pozwalające określić poziom RFT oraz zmiany potencjału mitochondrialnego. Dodatkowo wykonano test kometowy mający na celu określenie ilości uszkodzeń DNA. Przeprowadzono również szczegółową analizę ultrastruktury komórek HL-60 poddanych działaniu wybranych dendrymerów. Dodatkowo, w celu identyfikacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych, wykonano test z bromkiem etydyny i oranżem akrydyny, z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Dodatkowo przeanalizowano aktywność kaspaz 3 i 7.

Z analizy przeprowadzonych badań wynika, że aktywność dendrymeru generacji 1 jest większa niż generacji 2. Jednakże nie potwierdzono jednoznacznie mechanizmu śmierci komórkowej powodowanej przez testowane związki.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane dendrymery nie wykazują aktywności w stosunku do komórek prawidłowych, w zależności od kondycji komórek nowotworowych, dostępności glukozy, a w szczególności ATP, kierują je na drogę programowanej śmierci jaką może być zarówno apoptoza, jak i nekroptoza.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można wnioskować, że karbokrzemowe metallodendrymery zawierające ruten mogą być kierowane do dalszych etapów badań *in vivo*, w celu sprawdzenia możliwości ich wykorzystania do przenoszenia kwasów nukleinowych w terapii białaczki mieloblastycznej.

3. Streszczenie w języku angielskim

One of the most dangerous types of cancer is leukaemia. Although transplantation still remains an effective therapy for the treatment of blood cancer, it is extremely risky and can cause death. Therefore, finding an alternative and safe way to fight this type of cancer still is a significant problem to solve. Thus, the attention of scientists is focused on the possibilities of using cationic dendrimers as carriers of nucleic acids and drugs. An additional benefit of using dendrimers is the possibility to modify their surface groups by attaching to them metals with anti-cancer properties, such as ruthenium.

In the present work, the biophysical features of carbosilane ruthenium dendrimers were characterised, their anti-tumour activity was analysed, and the possibility of using dendrimers as carriers of anti-cancer siRNA to cancer cells was evaluated.

Biophysical and cytotoxic characteristics of dendrimers with ruthenium (CRD) allowed to select the 1st and 2nd generation of these nanoparticles with pyridine and imino-pyridine groups for further research.

It was shown that CRD dendrimers formed complexes with siRNAs and protected them from degradation by nucleases. Moreover, the tested nanoparticles have the potential to transfer siRNA to tumour cells. The ability of the complexes formed by dendrimers with fluorescein-labelled siRNA to internalize HL-60 cells was assessed by flow cytometry and confocal microscopy. Due to the high toxicity of dendrimers towards cancer cells, the anti-tumour activity of a siRNA-dendrimer complex introduced into HL-60 leukemia cells was not observed.

However, the performed research allowed to select two dendrimers with imino-pyridine terminal groups that were strongly toxic for tumour (HL-60) cells without affecting normal cells (PBMC).

Therefore, subsequent steps of research focused on explaining the mechanism of action of the selected compounds in relation to HL-60 cells. The level of ROS and changes of mitochondrial potential were analysed. Additionally, to determine the amount of DNA damage, the comet assay was carried out. A detailed analysis of ultrastructure of HL-60 cells treated with the selected dendrimers was performed. To identify apoptotic and necrotic cells, ethidium bromide and acridine orange tests by confocal microscopy were performed. Moreover, activities of caspases 3 and 7 were evaluated.

The analysis of presented studies shows that the activity of the 1st generation of dendrimer is greater than that of the 2nd generation. On the basis of the obtained results, it can

be concluded that the tested dendrimers do not affect normal cells, but they can cause programmed death of HL-60 such as apoptosis and necroptosis, however this effect depends on the condition of cancer cells, availability of glucose, and especially of ATP.

To sum up the results of the conducted research, it can be concluded that carbosilane ruthenium dendrimers can be suggested for further *in vivo* studies to analyse the possibilities of using them for the transfer of nucleic acids in the treatment of myeloblastic leukaemia.

4. Literatura

1. Abbasi E., Aval S.F., Akbarzadeh A., Milani M., Nasrabadi H.T., Joo S.W.B., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K., Pashaei-Asl R., 2019 Dendrimers: synthesis, applications, and properties *Nanoscale Res Lett.*, 9, 1-10.
2. Allemani C., Weir H.K., Carreira H., Harewood R., Spika D., Wang X.S., Bannon F., Ahn J.V., Johnson C.J., Bonaventure A., Marcos-Gragera R., Stiller C., de Silva G.A., Chen W.Q., Ogunbiyi O.J., Rachet B., Soeberg M.J., You H., Matsuda T., Bielska-Lasota M., Storm H., Trucker T.C., Coleman M.P., 2015 Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.* 385, 977-1010.
3. Ambesajir A., Kaushik A., Kaushik J.J., Petros S.T., 2012. RNA interference: a futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 395–403.
4. Biswas S., Torchilin V.P., 2013 Dendrimers for siRNA Delivery, *Pharmaceuticals Basel.* 2, 161–183.
5. Carter R., Westhorpe A., Romero M.J., Habtemariam A., Gallevo C.R., Bark Y., Menezes N., Sadler P.J., Sharma R.A., 2016 Radiosensitisation of human colorectal cancer cells by ruthenium(II) arene anticancer complexes. *Sci. Rep.* 6, 20596.
6. Creixell M., Peppas N.A., 2012 Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance, *Nano Today.* 7/4, 367–379.
7. Dragutan I., Dragutan V., Démonceau A., 2015 Editorial of special issue ruthenium complex: The expanding chemistry of the ruthenium complexes. *Molecules.* 20, 17244-17274.
8. Dźmitruk V., Szulc A., Shcharbin D., Janaszewska A., Shcharbina N., Lazniewska J., Novopashina D., Buyanova M., Ionov M., Klajnert-Maculewicz B., Gómez-Ramírez R., Mignani S., Majoral J.P., Muñoz-Fernández M.A., Bryszewska M.,

- 2015 Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B), Efficiency of pharmacological action, *Inter. J. Pharm.*, 485, 288–294.
9. Frik M., Fernández-Gallardo J., Gonzalo O., Mangas-Sanjuan V., González-Alvarez M., Serrano del Valle A., Hu C., González-Alvarez I., Bermejo M., Marzo I., Contel M., 2015 Cyclometalated Iminophosphorane Gold(III) and Platinum(II) Complexes. A Highly Permeable Cationic Platinum(II) Compound with Promising Anticancer Properties, *J. Med. Chem.*, 58, 5825–5841.
 10. Gandhi N.S., Tekade R.K., Chougule M.B., 2014 Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: current progress and advances, *J. Control. Release*. 194, 238–256.
 11. Hashemi M., Tabatabai S. M., Parhiz H., Milanizadeh S., Farzad S.A., Abnous K., Ramezani M., 2016 Gene delivery efficiency and cytotoxicity of heterocyclic amine-modified PAMAM and PPI dendrimers *Mat. Sci. Eng.* 61, 791-800.
 12. Heidari N., Abroun S., Bertacchini J., Vosoughi T., Rahim F., Saki N., 2017 Significance of Inactivated Genes in Leukemia: Pathogenesis and Prognosis *Cell J. Spring*. 19: 9–26.
 13. Ionov M., Lazniewska J., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Novopashina D., Apartsin E., Krasheninina O., Venyaminova A., Milowska K., Nowacka O., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Majoral J.P., Shcharbin D., Bryszewska M., 2015 Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction, *Inter. J. Pharm.* 485 261–269.
 14. Ionov M., Ciepluch K., Garaiova Z., Melikishvili S., Michlewska S., Balcerzack Ł., Glińska S., Miłowska K., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Shcharbin D., Waczulikova I., Bryszewska M., Hianik T., 2015 Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 1848, 907–915.
 15. Maroto-Díaz M., Elie B.T., Gómez-Sal P., Pérez-Serrano J., Gómez R., Contel M., 2016 Synthesis and anticancer activity of carbosilane metallodendrimers based on arene ruthenium(ii) complexes. *Dalt Trans.* 45(16), 7049–66.
 16. Michlewska S., Ionov M., Shcharbin D., Maroto-Díaz M., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., 2017 Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia (HL60) cell line. *Eur. Polym. J.* 87, 39-47.
 17. Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Loznikova S., Shcharbin D., Maly M., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J.,

- Bryszewska M., 2018 Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *J. Inorg. Biochem.* 181, 18–27.
18. Pereira F.C., Lima A.P., Vilanova-Costa C.A., Pires W.C., Ribeiro A.S., Pereira L.C., Pavanin L.A., Dos Santos W.B., Silveira-Lacerda E.P., 2014 Cytotoxic effects of the compound cistetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on K-562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Springer Plus* 3, 301.
 19. Qayed M., Wang T., Hemmer M.T., Spellman S., Arora M., Couriel D., Alousi A., Pidala J., Abdel-Azim H., Aljuf M., Ayas M., Bitan M., Cairo M., Choi S.W., Dandoy C., Delgado D., Gale R.P., Hale G., Frangoul H., Kamble R.T., Kharfan-Dabaja M., Lehman L., Levine J., MacMillan M., Marks D.I., Nishihori T., Olsson R.F., Hematti P., Ringden O., Saad A., Satwani P., Savani B.N., Schultz K.R., Seo S., Shenoy S., Waller E.K., Yu L., Horowitz M.M., Horan J., 2018 Influence of age on acute and chronic GVHD in children receiving HLA-identical sibling BMT for acute leukemia: implications for prophylaxis *Biol Blood Marrow Transplant.* 24(3), 521–528.
 20. Spreckelmeyer S., Orvig C., Casini A., 2014 Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: An overview beyond cisplatin. *Molecules.* 19, 15584-15610.
 21. Tanos R., Karmali D., Nalluri S., Goldsmith K.C., Select Bcl-2 antagonism restores chemotherapy sensitivity in high-risk neuroblastoma, *BMC Cancer*, 2016, 13, 16–97.
 22. Vilanova-Costa C.A., Porto H.K., Pereira F.C., de Lima A.P., Dos Santos W.B., Silveira-Lacerda E.P., 2014 The ruthenium complexes cis-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride and cistetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate overcome resistance inducing apoptosis on human lung carcinoma cells (A549). *Biometals.* 27, 459-469.
 23. Wang X., Meng G., Zhang S., Liu X., . 2016 A reactive 1O₂ – responsive combined treatment system of photodynamic and chemotherapy for cancer. *Sci. Rep.* 6, 1-9.
 24. Wu J., Huang W., He Z., 2013 Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: a review, *Sci. World J.* 630654, 1–16.
 25. Zhang N., Lia S., Huab H., Liu D., Song L., Sun P., Huang W., Tang Y., Zhao Y., 2016 Low density lipoprotein receptor targeted doxorubicin/DNA-Gold Nanorods as a chemo- and thermo-dual therapy for prostate cancer. *Int. J. Pharm.* 513, 376-386.

5. Dorobek naukowy

5.1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Michlewska S.**, Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Loznikova S., Shcharbin D., Maly M., Gomez Ramirez R., de la Matic, F.J., Bryszewska M., 2018, Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* 181: 18-27. **MNiSW 35, IF 3,348.**
2. **Michlewska S.**, Ionov M., Shcharbin D., Maroto-Díaz M., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., 2017, Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60). *European Polymer Journal* 87: 39-47. **MNiSW 35, IF 3,485.**
3. **Michlewska S.**, Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Abashkin V., Dzmitruk V., Rogalska A., Denel M., Gapińska M., Shcharbin D., Gomez Ramirez R., Javier de la Mata F., Bryszewska M., 2019, Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukaemia. *In vitro* studies on HL-60 cells. *Future Medicinal Chemistry* DOI: 10.4155/fmc-2018-0274. **MNiSW 40; IF 3,969.**

Łącznie: punkty MNiSW: 110; IF=10,802

1.1.Spis publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Glińska S., **Michlewska S.**, Gapińska M., Seliger P., Bartosiewicz R., **2014**, The effect of EDTA and EDDS on lead uptake and localization in hydroponically grown *Pisum sativum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 399-408. **MNiSW 25, IF 1,563.**
2. Solarska-Ściuk K., Gajewska A., Glińska S., Studzian M., **Michlewska S.**, Balcerzak Ł., Skolimowski J., Kolago B., Bartosz G., **2014**, Intracellular transport of nanodiamond particles in human endothelial and epithelial cells. *Chemico-Biological Interactions* 219: 90-100. **MNiSW 30, IF 2,618.**
3. Solarska-Ściuk K., Gajewska A., Glińska S., **Michlewska S.**, Balcerzak Ł., Jamrozik A., Skolimowski J., Burda K., Bartosz G., **2014**, Effect of functionalized and non-functionalized nanodiamond on the morphology and activities of antioxidant enzymes of lung epithelial cells (A549). *Chemico-Biological Interactions* 222: 135-147. **MNiSW 30, IF 2,618.**
4. Szymańska R., Nowicka B., Gabruk M., Glińska S., **Michlewska S.**, Dłużewska J., Sawicka A., Kruk J., Laitinen R., **2015**, Physiological and antioxidant responses of two accessions of *Arabidopsis thaliana* in different light and temperature conditions. *Physiologia Plantarum* 154(2): 194-209. **MNiSW 40, IF 3,52.**
5. Ionov M., Ciepluch K., Garaiova Z., Melikshvili S., **Michlewska S.**, Balcerzak Ł., Glińska S., Miłkowska K., Gomez-Ramirez R., Javier de la Mata F., Shcharbin D., Waczulikowa I., Bryszewska M., Hianik T., **2015**, Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 907-915. **MNiSW 35, IF 5,083.**
6. Kołodziejek J., **Michlewska S.**, Glińska S., **2015**, Seasonal leaf dimorphism in *Potentilla argentea* L. var. *tenuiloba* (Jord.) Sw. (Rosaceae). *Acta Botanica Croatica* 74 (1): 53–70. **MNiSW 15, IF 0,734.**
7. Kołodziejek J., **Michlewska S.**, **2015**, Effect of soil moisture on morpho-anatomical leaf traits of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae) *Polish Journal of Ecology* Vol. 63: 400-413. **MNiSW 15, IF 0,567.**
8. Glińska S., Gapińska M., **Michlewska S.**, Skiba E., Kubicki J. **2016**, Analysis of *Triticum aestivum* seedlings response to the excess of zinc. *Protoplasma* 253: 367-377. **MNiSW 30, IF 2,343.**

9. Ionov M., Ihnatsyeu-Kachan A., **Michlewska S.**, Shcharbina N., Shcharbin D., Majoral J.P., Bryszewska M., **2016**, Effect of dendrimers on selected enzymes - Evaluation of nano carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 499: 247-254. **MNiSW 40, IF 3,994.**
10. Gerszon J., Serafin E., Buczkowski A., **Michlewska S.**, Bielnicki J.A., Rodacka A., **2018**, Functional consequences of piceatannol binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *PLoS One*. 13: 1-18 **MNiSW 35, IF 2,806.**

Tab.1. Tabela przedstawiająca dorobek doktoranta

	Liczba prac	Punkty MNISW	Sumaryczny IF	Liczba cytowań
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	3	110	10,802	4
Publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej	10	295	25,846	68
Łącznie	13	405	36,648	72
<hr/>				
Komunikaty zjazdowe	18			
<hr/>				
Indeks Hirsha	5			

Współczynnik Impact Factor został podany zgodnie z rokiem opublikowania pracy, a dla prac z roku 2018 został użyty wskaźnik dla roku 2017. W przypadku punktów MNiSW użyto listy z dnia 09.12.2016 r. Liczba cytowań i Indeks Hirsha podane według bazy Web od Science dla roku 2019.

Niewielka liczba cytowań artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynika z faktu publikacji tych prac w latach 2017-2019.

1.2. Komunikaty zjazdowe:

1. Rupniewska M., Kazimierska D., Glińska S., Gapińska M., **Michlewska S.**, Skiba E., The effect of zinc on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. seedlings. 9th International Conference PLANT FUNCTIONING UNDER ENVIRONMENTAL STRESS Kraków Polska 12-15.09.2012 Acta Physiologiae Plantarum 34 (Suppl 1): S1–S116. **2012**.
2. Grzywnowicz K., Glińska S., Gapińska M., **Michlewska S.**, The ultrastructure of zinc treated *Triticum aestivum* L. root meristematic cells. The 6th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology,. Streszczenie opublikowane w: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology 94(3): 331-332. Łódź 16-19.09.**2013**.
3. Gapińska M., Glińska S., **Michlewska S.**, The correlation between size of *Beta vulgaris* L. flower buds and the stadium of pollen grains development. The 6th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology, 16-19.09.**2013**. Łódź. Streszczenie opublikowane w: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology 94(3): 348.
4. Ionov M., Lazniewska J., Dzmitruk V., Loznikowa S., Balcerzak Ł., **Michlewska S.**, Glińska S., Novopashina D., Apartsin E., Krasheninina O., Buyanova M., Veniaminova A., Szulc A., Nowacka O., Milowska K., Gomez-Ramirez R., delaMata F.J., Muñoz-Fernández M.A., Gabryelak T., Electron microscopis studies of the anticancer siRNA dendrimer complex. The International Conference “Molecular, Membrane and Cell Principles of Biosystem Functioning” THE XI CONGRESS OF BELARUSIAN PUBLIC ASSOCIATION OF PHOTOBIOLOGISTS AND BIOPHYSICISTS. Mińsk, Białoruś 17-20.06.**2014**. Streszczenie opublikowane w: Conference materials: ISBN: УДК 557(06) ББК 28.071я43, 364-366.
5. **Michlewska S.**, Szwed A., Gapińska M., Maroto-Díaz M., Ionov M., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Shcharbin D., Gabryelak T., Bryszewska M., Cytotoxicity of anticancer carbosilane mertaliodendrimers in human leukemia (HL-60) cells, The International Conference “Molecular, Membrane and Cell Principles of Biosystem Functioning” Mińsk, Białoruś 28-30.06.**2016**.
6. **Michlewska S.**, Gapińska M., Szwed A., Pedziwiatr-Werbicka E., Maroto-Díaz M., Ionov M., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Shcharbin D., Bryszewska M., The impact of ruthenium terminated carbosilane dendrimers on cell membranes The International Conference “Molecular, Membrane and Cell Principles of Biosystem Functioning” Mińsk, Białoruś 28-30.06.**2016**.
7. Rudnicka K., Niewiadomska A., Skibińska P., **Michlewska S.**, Walencka M., Matusiak D., Döring G., Chmiela M., The activation, ROS induction and cytokine secretion in human monocytes exposed to *H. pylori* lipopolysaccharide depend on the availability of TLR4/2 and TLR2/6 receptor complexes. The 16th European Mycroscopy Congress Lyon, Francja 28.08-02.09.**2016**
8. Ionov M., **Michlewska S.**, Bryszewska M., Ruthenium dendrimers as anticancer drug delivery agents. International Conference “Toolkits for DNA vaccine design, an update” Moskwa, Rosja 17-21.11.**2016**

9. Ionov M., **Michlewska S.**, Milowska K., Pędziwiatr-Werbicka E., Dzmitruk V., Shcharbin D., Bryszewska M., Dendrimers as carriers in anticancer gene delivery. International VACTRAIN/ 3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases Sztokholm, Szwecja 16-17.01.2017.
10. Garaiova Z., Melikishvili S., Ionov M., **Michlewska S.**, Pedziwiatr-Werbicka E., Waczulikova I., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Muñoz-Fernandez M.A., Hianik T., Bryszewska M. Biophysical methods for studying peptide/protein – nanoparticle interactions. Interactive Conference of Young Scientists. www.preveda.sk/conference 2017.
11. Ionov M., **Michlewska S.**, Zadvornyi T., Storchai D., Demash D., Borukin t., Berzina A., Petkov S., Milowska K., Pędziwiatr-Werbicka E., Gomez-ramirez R., Javier de la Mata F., Muñoz-Fernandez M.A., Majoral J.P., Shcharbin D., Kashuba E., Wahren B., Bryszewska M., Dendrimers in anti-cancer drug delivery. International conference «VACCINES & VACCINATION» Moskwa, Rosja 27.09-1.10, 2017.
12. Berzina A., **Michlewska S.**, Petkov S., Podschwat P., Boruki T., Zadvornyi T., Storchai D., Gordeychuk I., Janson J., Isagulants M., Ionv M. dendrimers in *in vitro* and *in vivo* DNA transfection. International conference «VACCINES & VACCINATION» Moskwa, Rosja 27.09-1.10, 2017
13. Ihnatsyeu-Kachan A., Dzmitruk V., **Michlewska S.**, Apartsin E., maroto-Diaz M., Shcharbin D., Ionov M., Gomez-ramirez R., Javier de la Mata F., Majoral J.P., Bryszewska M. Novel dendrimers as delivery platform for gene drugs: *in vitro* examination. International conference «VACCINES & VACCINATION» Moskwa, Rosja 27.09-1.10, 2017
14. Rudnicka K., Śmiegielska E, Orkisz N., Mnich E., **Michlewska S.**, Balcerazk Ł., Chmiela M. Antimicrobial, antiadhesive and immunomodulatory activity of linolic acid against H. pylori – a multi-level *in vitro* study. Mikrobiot 2017 4th Workshop on Microbiology in Health care and Environmental Protection, Łodzi 19-21.09.2017. Postępy Mikrobiologii.
15. Rudnicka K. , Mnich E., Gatkowska J., Wieczorek M. , Nawrotek K., Tylman M., Nowak K.M., **Michlewska S.**, Pluta K., Sobczak-Kupiec A., **Glińska S.**, Fiedor P., Kosieradzki M., Chmiela M. new experimental protocol for the biosafety evaluation of innovative nano materials – a complex *in vitro* study. Mikrobiot 2017 4th Workshop on Microbiology in Health care and Environmental Protection, Łodzi 19-21.09.2017. Published: Postępy Mikrobiologii.
16. Papiewska_Pająk I., Przygodzka K., **Michlewska S.**, Krzyżanowski D., Boncela J., Kowalska M.A., Extracellular vesicles secreted by colorectal cancer cel line HT29 overexpressing Snail can fuse with activate the cells constituting metastic niche. Congress BIO 2018, 51th Meeting of the Polish Biochemical Society, 14thConferecnce of Polish Society for Cell Biology, Gdańsk, Poland 18-21.09.2018
17. Ionov M., **Michlewska S.**, Berezina A., Dzmitruk V., Fridrihsone I., Petkov S., Shcharbin D., Isagulants M.G., Bryszewska M., Electroporation or nanotechnology? Efficient ways of gene delivery in anticancer therapy. „International conference Perspective Technologies in Vaccination and Immunotherapy” Moskwa, Rosja 05-08.10, 2018.
18. **Michlewska S.**, Kubczak M., Maroto-Diaz M., Ionov M., Gomez Ramirez R., de la Matak, F.J., Bryszewska M., Carbosilane ruthenium dendrimers as a candidate for controlled delivery and imaging in anticancer therapy. „International conference Perspective Technologies in Vaccination and Immunotherapy” Moskwa, Rosja 05-08.10, 2018. wystąpienie ustne.

6. Działalność naukowa

6.1. Treningi i staże

- 2015 Szkolenie „Przegląd metod określania żywotności komórek, cytotoksyczności, poziomu apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz planowanie i optymalizacja eksperymentów z wykorzystaniem genów reporterowych” Łódź.
- 2015 Kurs Techniki Real Time PCR do analizy ekspresji genów, Warszawa.
- 2016 Jednomiesięczny staż naukowy w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś.
- 2016 Wyjazd szkoleniowy w ramach programu „Erasmus+” UTAD Uniwersytet, Vila Real, Portugalia.
- 2016 Dwutygodniowy staż naukowy w Katedrze Jądrowej Fizyki, Uniwersytetu Kamińskiego w Bratysławie, Słowacja.
- 2017 Wyjazd szkoleniowy w ramach programu „Erasmus+” UCO, Kordoba, Hiszpania.
- 2017 Dwutygodniowy staż naukowy Rīga Stradiņš University, Research Department, Dzirciema 16, Block K, Rīga, Latvia.
- 2018 Trening naukowy w pisaniu międzynarodowego projektu naukowego MWT ERA NET Call 2019, Rīga Stradiņš University, Rīga, Latvia.
- 2018 Podsumowujące spotkanie konsorcjum naukowego projektu Vactrain, Rīga Stradiņš University, Rīga, Latvia.

6.2. Stypendia, nagrody, wydarzenia

- 2008 List Gratulacyjny Rektora UŁ za osiągnięcia naukowe w roku 2007/2008.
- 2009 List Gratulacyjny Rektora UŁ za osiągnięcia naukowe w roku 2008/2009.
- 2009 Dyplom Dziekana UŁ Wydziału BIOŚ za chlubne studia 2009.
- 2013 Prowadzenie zajęć w ramach programu organizacji warsztatów dla Licealistów „Uniwersytet Zawsze Otwarty”.
- 2013 Prowadzenie zajęć w ramach programu organizacji warsztatów dla Licealistów „Festiwalu Nauki i Sztuki”.

- 2015 Prowadzenie zajęć w ramach programu organizacji warsztatów dla Licealistów „Uniwersytet Zawsze Otwarty”.
- 2016 Prowadzenie zajęć w ramach programu organizacji warsztatów dla Licealistów „Uniwersytet Zawsze Otwarty”.
- 2016 Prowadzenie zajęć w ramach programu organizacji warsztatów dla Licealistów „Instytut Kreatywnej Biologii UŁ”.
- 2016 Opieka nad mgr Viktarem Abashkinem i mgr Aliakseiem Ihnatsyeu-Kachanem z Instytutu Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk w Mińsku, Białoruś w trakcie ich stażu w KBO UŁ.
- 2016 Nagroda Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ za wyniki publikacyjne w roku 2015.
- 2017 Prowadzenie warsztatów dla Licealistów w ramach programu „Instytut Kreatywnej Biologii UŁ”.
- 2017 Współprowadzenie warsztatów „Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych, mykologicznych i parazytologicznych”.
- 2017 Opieka nad gośćmi zagranicznymi, mgr Tarasem Zadvornym, mgr Tatianą Borikun, mgr Dimitro Demashem, mgr Daria Starchaj z Instytutu Eksperymentalnej Patologii Onkologii i Radiobiologii w Kijowie, Ukraina w ramach projektu VACTRAIN.
- 2017 Opieka nad gościem zagranicznym mgr Anitą Berzina z Rīga Stradiņš University, Ryga, Łotwa w ramach projektu VACTRAIN.
- 2017 Opieka nad gościem zagranicznym Dr Zuzaną Garaiową z Uniwersytetu Komeńskiego, Katedry Fizyki Jądrowej i Matematyki w Bratysławie, Słowacja w ramach projektu PL-SK.
- 2018 Opieka nad gościem zagranicznym mgr Anitą Berzina z Rīga Stradiņš University, Ryga, Łotwa w ramach projektu VACTRAIN.
- 2018 Opieka nad gościem zagranicznym, mgr. Natalią Sanz del Olmo z Uniwersytetu w Alcalá, Katedry Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej, Alcalá, Hiszpania w ramach programu NAWA PROM.
- 2018-2019 Pomoc w opiece nad magistrantem UŁ Jakubem Magierą.