



WYDZIAŁ
CHEMICZNY
POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ



Samorząd Studencki
Politechniki Rzeszowskiej



**POLITECHNIKA
RZESZOWSKA**
im. IGNACEGO ŁUKASIEWICZA

POSTER MASTER

KSIĘGA PLAKATÓW
ROK AKADEMICKI 2024/2025

Księga Plakatów **POSTERMASTER 2025** zawiera postery przygotowane na
V Dyplomową Sesję Plakatową
dedykowaną studentom II roku studiów II stopnia,
którzy w roku akademickim 2024/2025
realizowali prace magisterskie na
Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej



**POSTER
MASTER**

Gremia oceniające:

- ✓ Komitet Naukowy
- ✓ Studenci II roku studiów II stopnia Wydziału Chemicznego

Ocenię poddane zostają następujące aspekty prac:

- ✓ wartość naukową oraz oryginalności rozwiązań
- ✓ praktyczny aspekt zaproponowanych rozwiązań
- ✓ sposób prezentacji wyników badań

Komisja Konkursowa:

1. dr hab. Aleksandra Bocian, prof. PRz
2. dr hab. inż. Maciej Kisiel, prof. PRz
3. dr inż. Andrzej Łyskowski
4. dr inż. Dorota Naróg
5. prof. dr hab. inż. Mariusz Oleksy
6. dr hab. inż. Marek Potoczek, prof. PRz
7. dr hab. Łukasz Uram, prof. PRz
8. Sławomir Bem Grupa Azoty S.A., Tarnów
9. Małgorzata Filar Nestlé Polska S.A., Rzeszów
10. Marzena Frączek Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Rzeszów
11. Regina Gnatek FHU Ainer, Ruda Łańcucka
12. Paweł Kuryło OLIMP Laboratories Sp. z o.o., Nagawczyna
13. Aneta Raś Zakłady Farmaceutyczne POLPHARMA SA, Nowa Dęba
14. Janusz Rogulski QEMETICA Agricultural Solutions Poland S.A., Nowa Sarzyna

Komitet Organizacyjny:

1. dr inż. Anna Kuźniar, prof. PRz – przewodnicząca
2. mgr inż. Małgorzata Gabryel-Raus – sekretarz
3. dr inż. Karol Hęclik
4. inż. Daniel Ochyra (student)



**POSTER
MASTER**

Spis posterów

1. inż. Magdalena Burek – Opracowanie metody syntezy i charakterystyka właściwości nowego prekursora z grupą fotoaktywną; opiekun: dr hab. inż. Beata Mossety-Leszczak, prof. PRz
2. inż. Klaudiusz Górnicki – Kationomerowe powłoki poliuretanowe modyfikowane chitozanem; opiekun: dr hab. inż. Łukasz Byczyński, prof. PRz
3. inż. Monika Jastrzębska – Synteza i charakterystyka kompozycji Mezogenicznej żywicy epoksydowej; opiekun: dr hab. inż. Beata Mossety-Leszczak, prof. PRz
4. inż. Anna Krówka – Porównanie wpływu wybranych statyn na żywotność nicienia *Caenorhabditis elegans* szczepu N2 oraz DG4384 z nokautem genu reduktazy HMG-CoA; opiekun: dr hab. Łukasz Uram, prof. PRz
5. inż. Bogdan Marczał Izolacja egzosomów przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania; opiekun: dr hab. Aleksandra Bocian, prof. PRz
6. inż. Justyna Noga – Przydatność wybranych matryc dendrymerowych w terapii nowotworów; opiekun: dr hab. Łukasz Uram, prof. PRz
7. inż. Liliana Pająk – Przeciwnowotworowa aktywność simwastatyny, lowastatyny, atorwastatyny i fluwastatyny wobec komórek wątrobowokomórkowego linii HEPG2; opiekun: dr hab. Łukasz Uram, prof. PRz
8. inż. Filip Tenerowicz – Badanie wpływu wybranych statyn na szlak mewałonowy w komórkach raka wątrobowokomórkowego linii HepG2; opiekun: dr hab. Łukasz Uram, prof. PRz

**POSTER
MASTER**

OPRACOWANIE METODY SYNTEZY I CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI NOWEGO PREKURSORA Z GRUPĄ FOTOAKTYWNA

Autor: **inż. Magdalena Burek**

Kierunek studiów: Technologia chemiczna

Promotor: **dr hab. inż. Beata Mossety-Leszczak, prof. PRz**

Rok akademicki: **2024/2025**

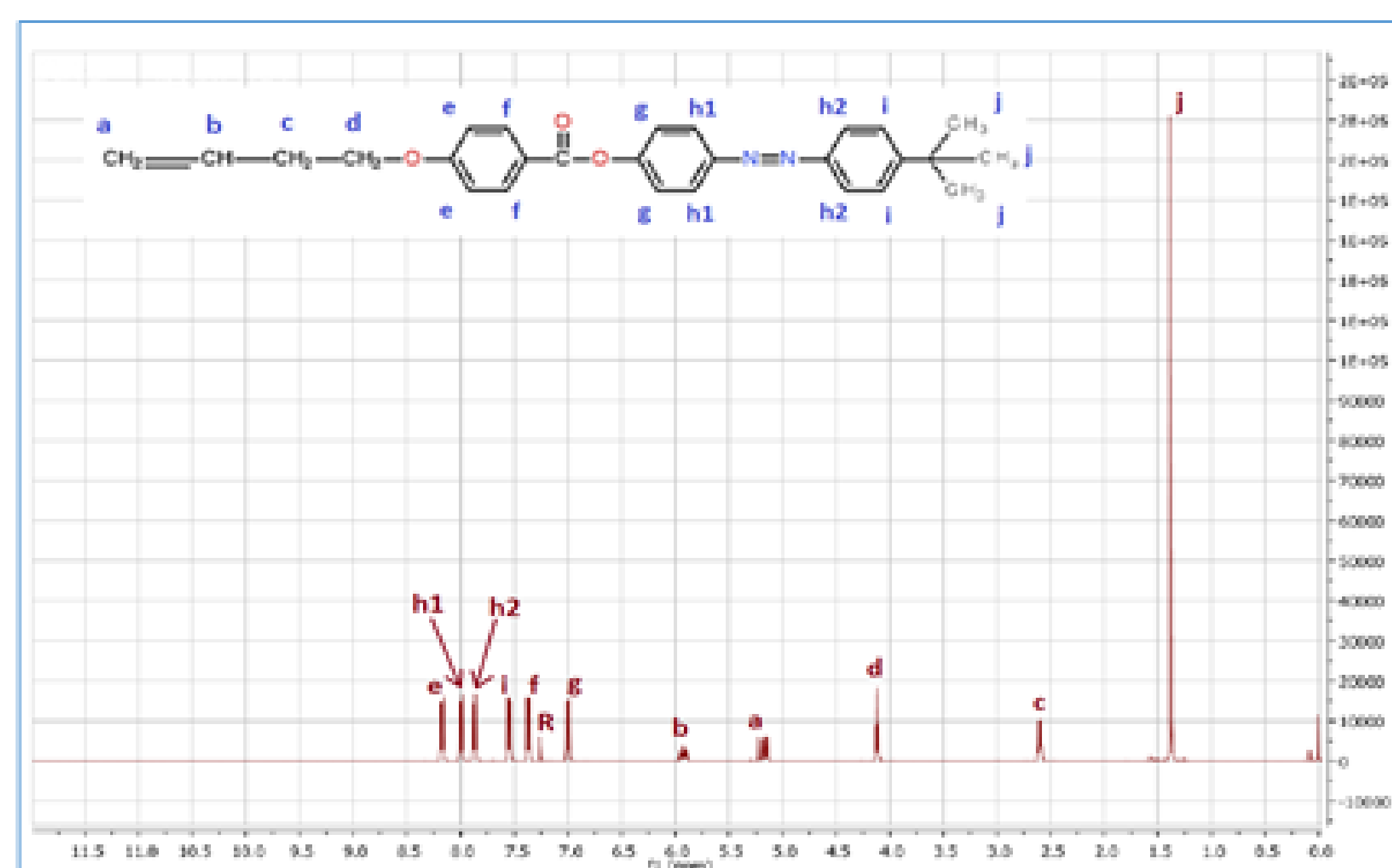
CEL PRACY

- synteza oraz charakterystyka właściwości nowych prekursorów zawierających grupy fotokatywne, które docelowo stanowią będą ugrupowanie boczne w samoorganizujących się elastomerach kopolimerowych na bazie polidimetylosiloksanu.

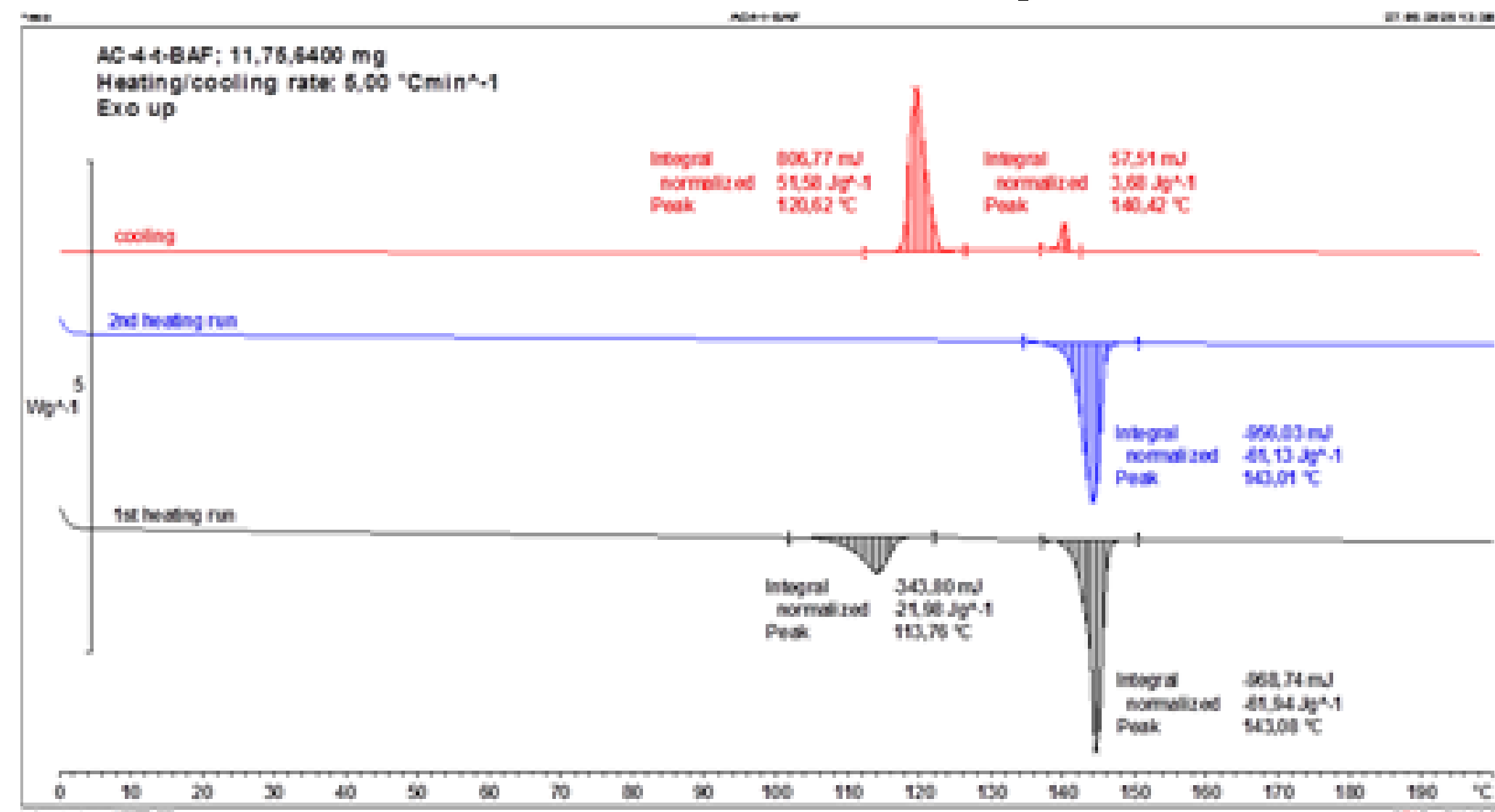
WPROWADZENIE

Technologia materiałów inteligentnych odgrywa kluczową rolę w unowocześnianiu różnych gałęzi przemysłu, poprawiając trwałość i efektywność wykorzystywanych komponentów oraz konstrukcji. Coraz częściej inżynierowie opracowują innowacyjne rozwiązania, wykorzystując nowe kompozytowe materiały o wyjątkowych właściwościach. Połączenie wiedzy z takich dziedzin jak motoryzacja, budownictwo, medycyna, elektronika czy materiałoznawstwo umożliwia szerokie zastosowanie tych nowoczesnych tworzyw. Ich wszechstronność sprawia, że mają one ogromny wpływ na rozwój nauki i technologii, nie tylko umożliwiając tworzenie innowacyjnych rozwiązań, ale także zwiększając wydajność i trwałość już istniejących urządzeń. Inteligentne materiały będą odgrywać coraz większą rolę w przyszłości technologii, przyczyniając się do poprawy bezpieczeństwa i komfortu życia.

WYNIKI ANALIZY ¹H-NMR I DSC

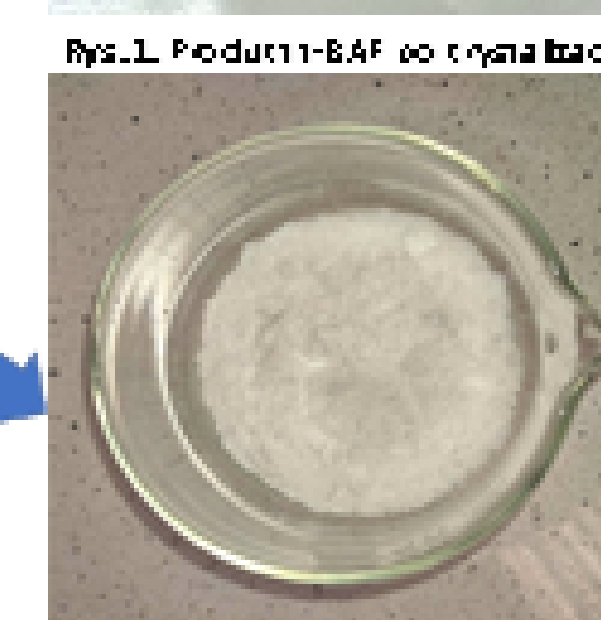
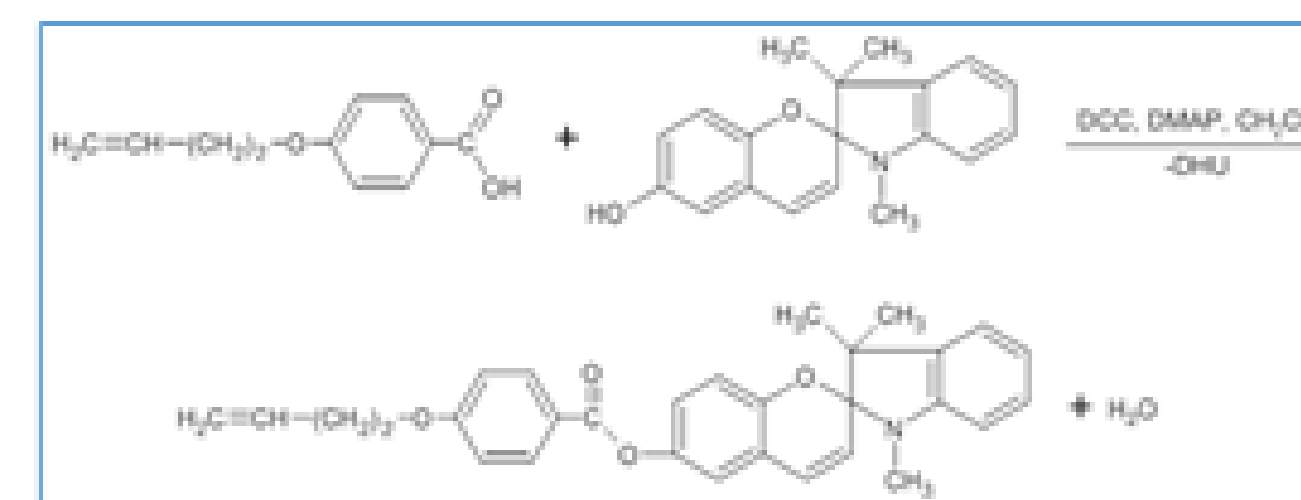
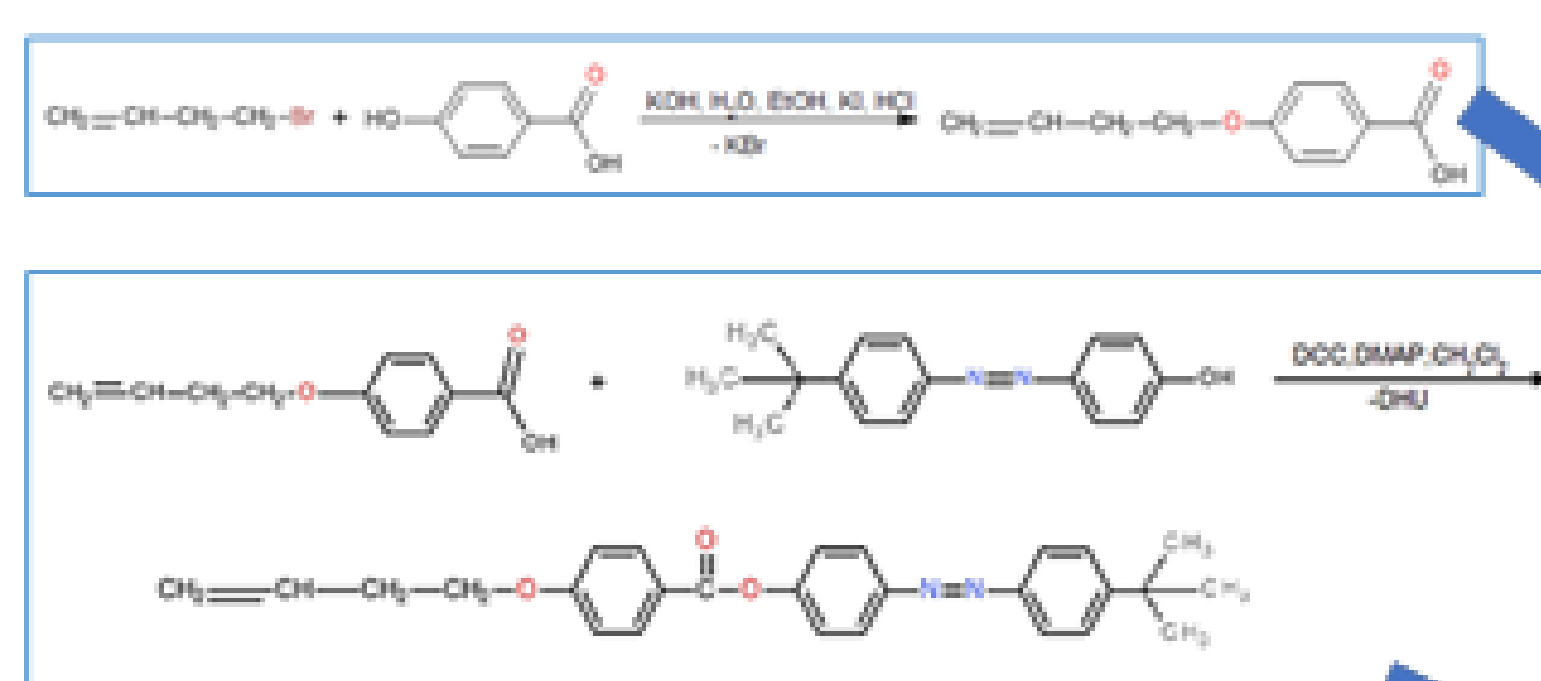
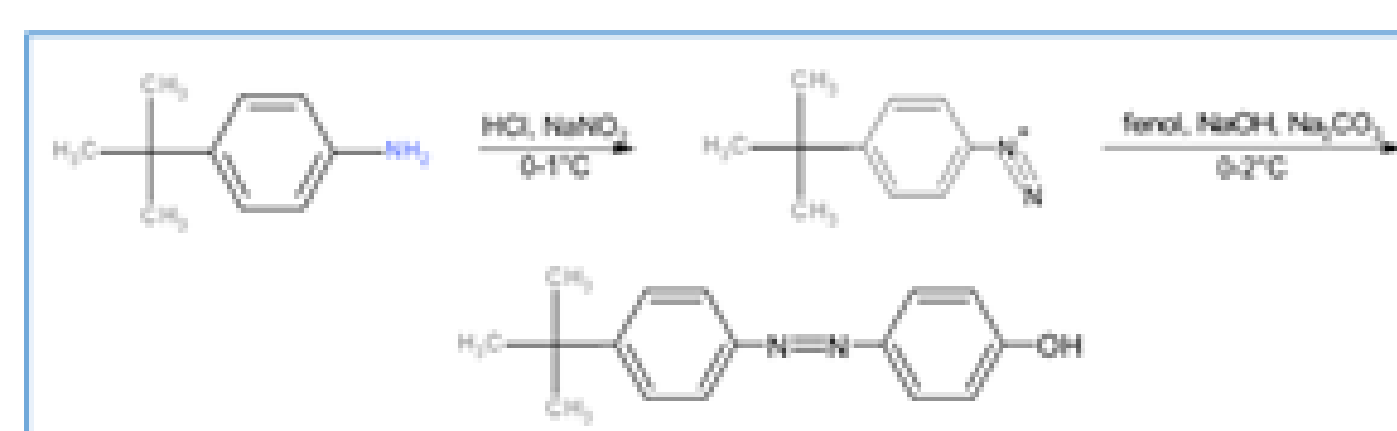


Rys. 4. Widma ¹H-NMR związku AC-4-t-BAF, rozpuszczonego w CDCl₃ na widmie „R” – rozpuszczalnik



Rys. 5. Krzywa termiczna DSC pochodnej AC-4-t-BAF, prędkość ogrzewania i chłodzenia: 5 K/min

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

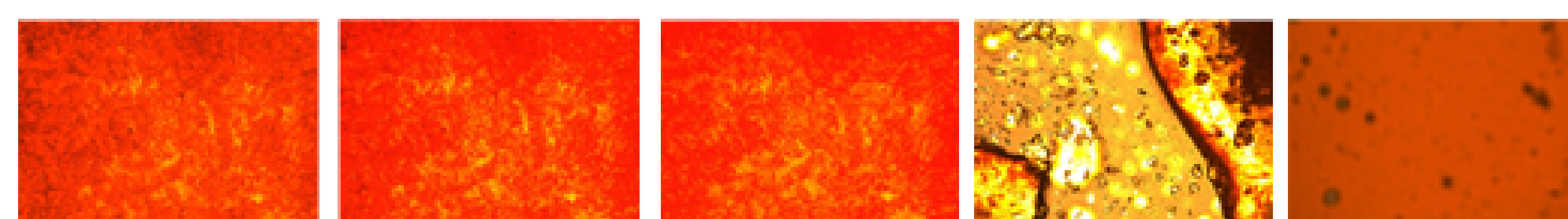


Rys. 1. Produkt 1-BAF po syntezy

Rys. 2. Produkt AC-4 po syntezy

Rys. 3. Produkt AC-4-t-BAF po syntezy

ZDJĘCIA MIKROSKOPOWE POM



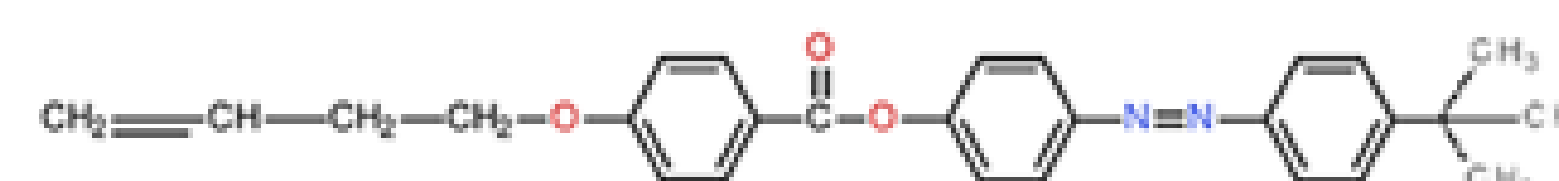
Rys. 6. Tekstury związku AC-4-t-BAF zarejestrowane podczas ogrzewania



Rys. 7. Tekstury związku AC-4-t-BAF zarejestrowane podczas chłodzenia

PODSUMOWANIE

- Opracowano procedurę syntezy nowego prekursora z ugrupowaniem fotoaktywnym – **AC-4-t-BAF**, zawierającego wiązanie azowe w swojej strukturze:



AC-4-t-BAF

- Na podstawie analizy widma ¹H-NMR jednoznacznie potwierdzona poprawność struktury końcowego związku **AC-4-t-BAF**.
- Charakterystykę właściwości termotropowych otrzymanego materiału przeprowadzono z wykorzystaniem techniki DSC oraz obserwacji mikroskopowych.
- Wyznaczono temperatury przejść fazowych oraz określono zakres temperaturowy występowania fazy ciekłokrystalicznej dla końcowego produktu – stwierdzono, że pochodna **AC-4-t-BAF** jest monotropowym ciekłym kryształem, generującym stabilną fazę meromorficzną podczas chłodzenia w zakresie temperatury 140-125°C.

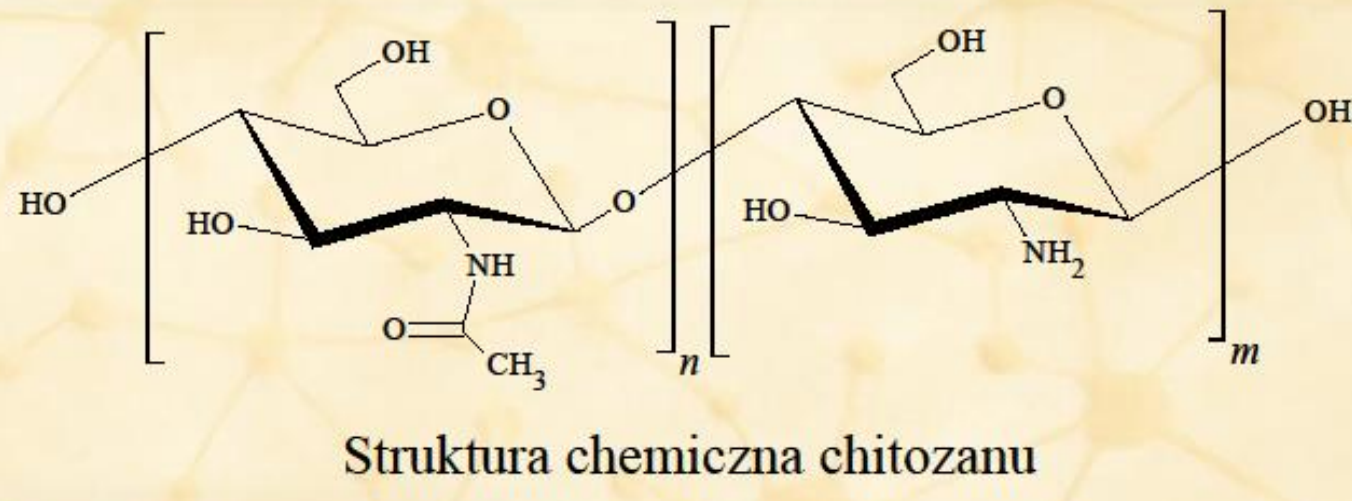
Kationomerowe powłoki poliuretanowe modyfikowane chitozanem

Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest opracowanie metody syntezy kationomeru (uretanowo-akrylowego) modyfikowanego chitozanem oraz określenie wpływu zawartości chitozanu i rodzaju zastosowanych kwasów karboksylowych, które pełniły rolę modyfikatorów zarówno chitozanu, jak i poliuretanu, na wybrane właściwości otrzymanych powłok poliuretanowych.

Wprowadzenie

- Klasykne poliuretany wykazują wyraźnie hydrofobowy charakter względem wody, dlatego konieczna jest gruntowna modyfikacja ich struktury, aby mogły tworzyć stabilne dyspersje wodne.
- Jednym ze sposobów utworzenia stabilnej dyspersji jest modyfikacja budowy łańcucha poprzez wbudowanie grup hydrofilowych np. kationowych do jego struktury. W ten sposób powstają kationomery poliuretanowe.
- Kationomery poliuretanowe zwiększają polarność oraz oddziaływania międzycząsteczkowe w segmentach sztywnych i elastycznych, co sprzyja silniejszej separacji faz, podnosi temperaturę topnienia segmentów sztywnych i poprawia właściwości mechaniczne. Dzięki silnym wiązaniom jonowym IV-rzędowych soli amoniowych, niezależnym od rodzaju anionu, wykazują one również doskonałą adhezję do powierzchni polarynych.



Skorupiaki jako źródło chityny

Chitozan (CS):

- nietoksyczny,
- biokompatybilny,
- biodegradowalny,
- bakteriobójczy

Deacetylacja chityny
stęż. NaOH
~100 °C



Próbka CS0%



Próbka CS0,5%



Próbka CS1%



Próbka CS1,5%



Próbka CS1% AA/FA



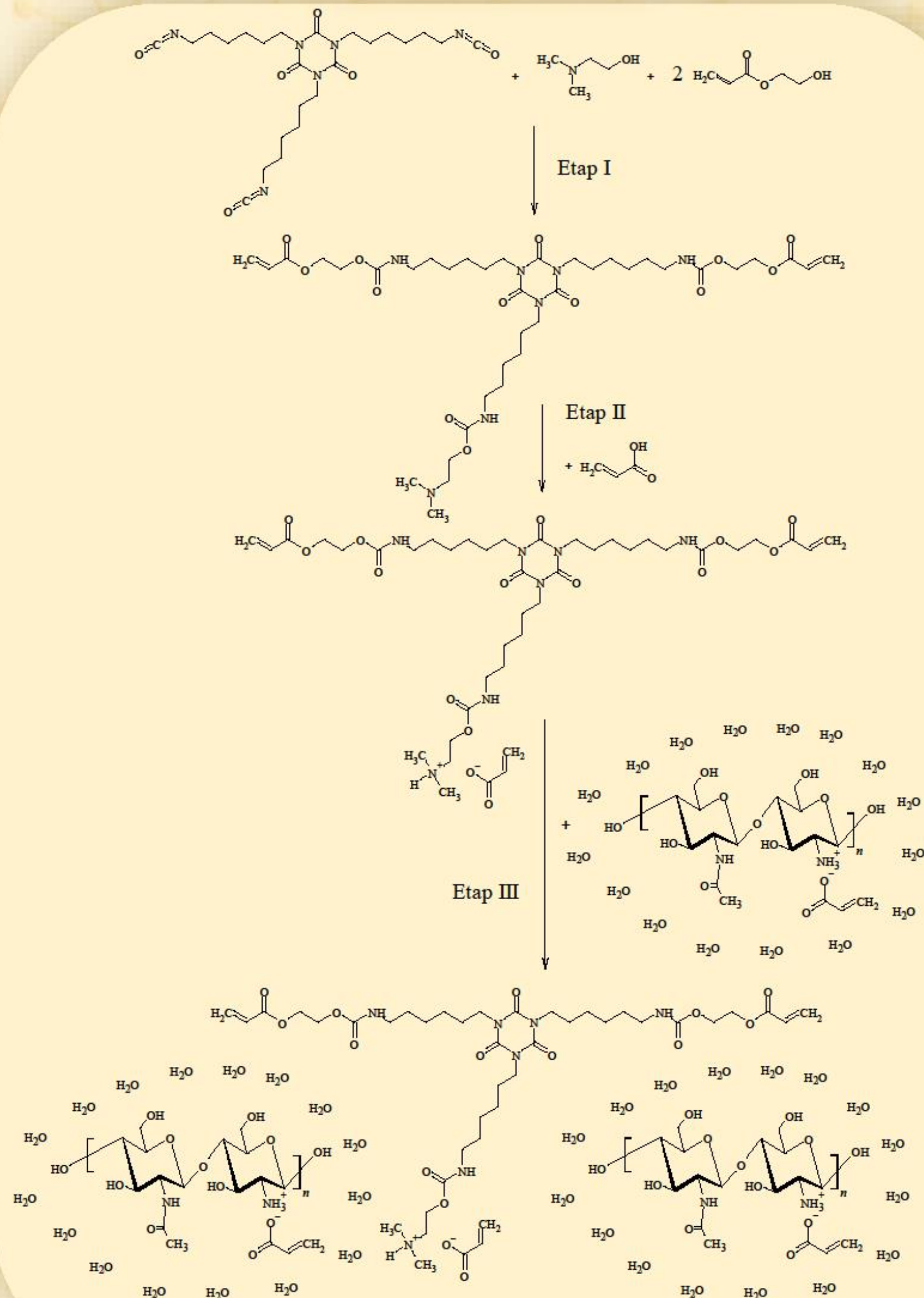
Próbka CS1% FA/AA



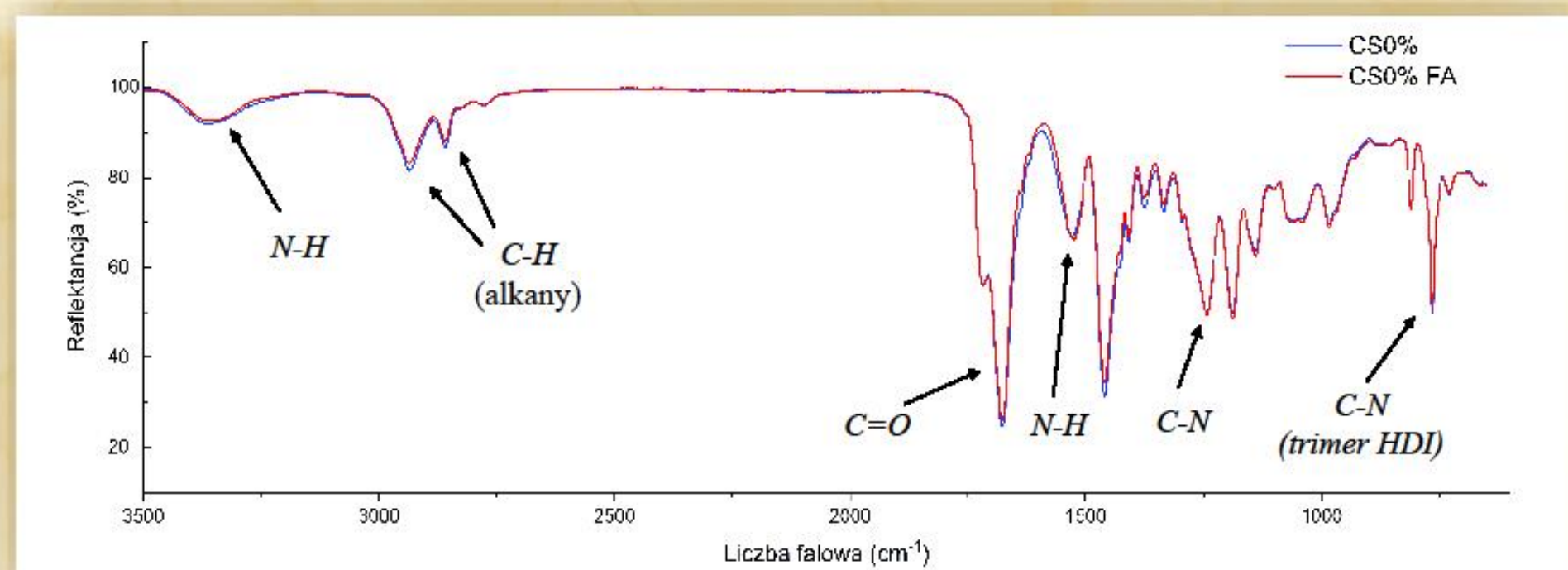
Próbka CS1% FA/FA

Odprowadzenie H₂O,
Promieniowanie UV,
Fotoinicjator Darocur 1173

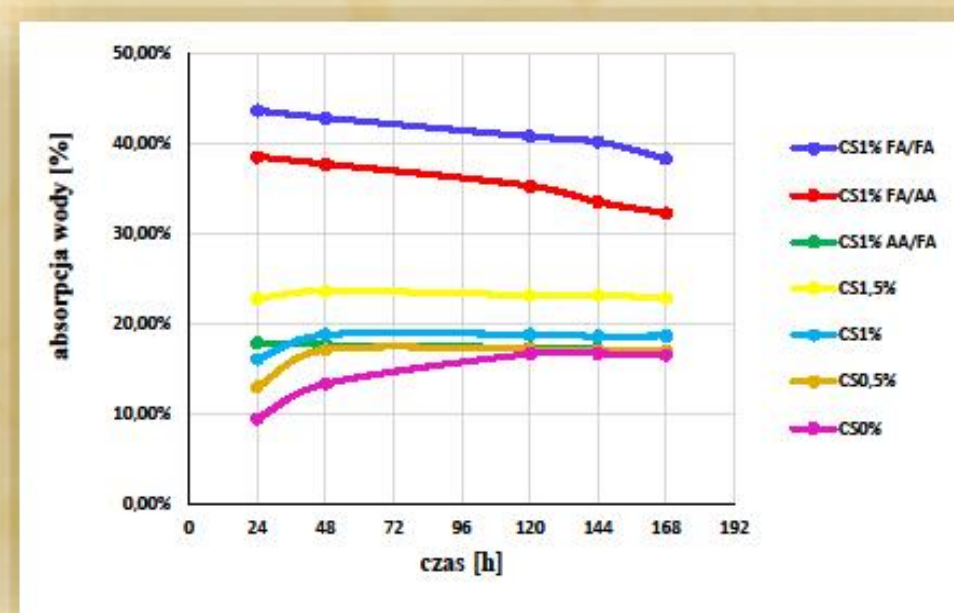
Synteza



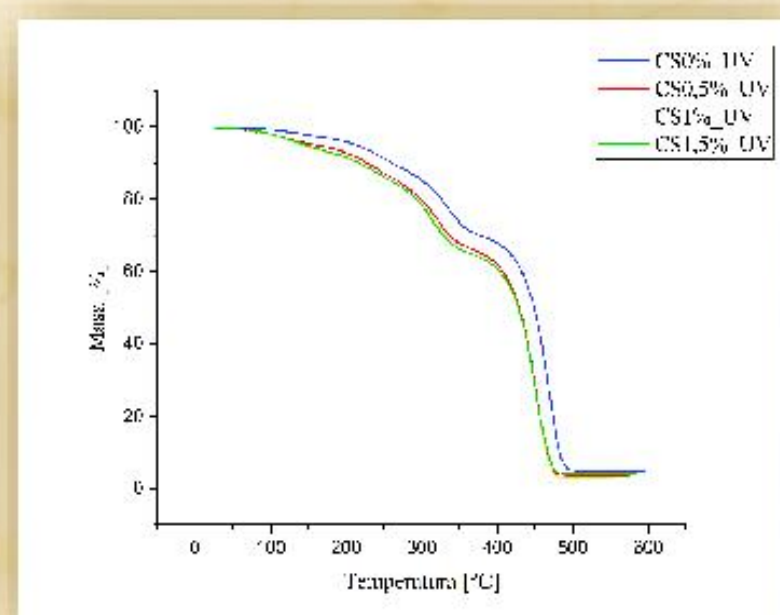
Wyniki



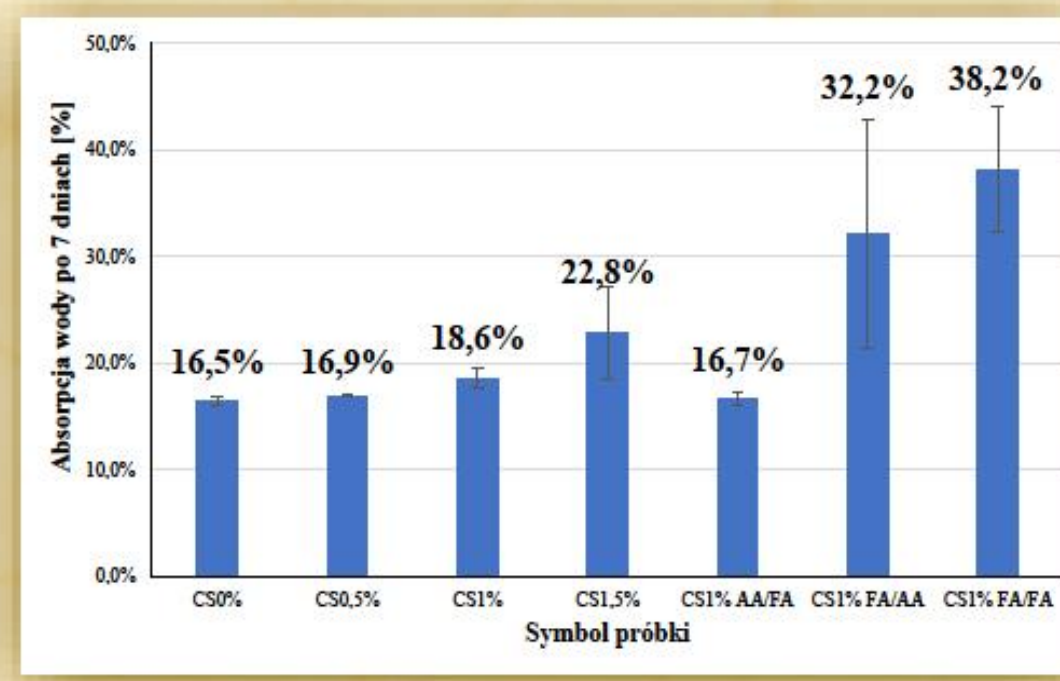
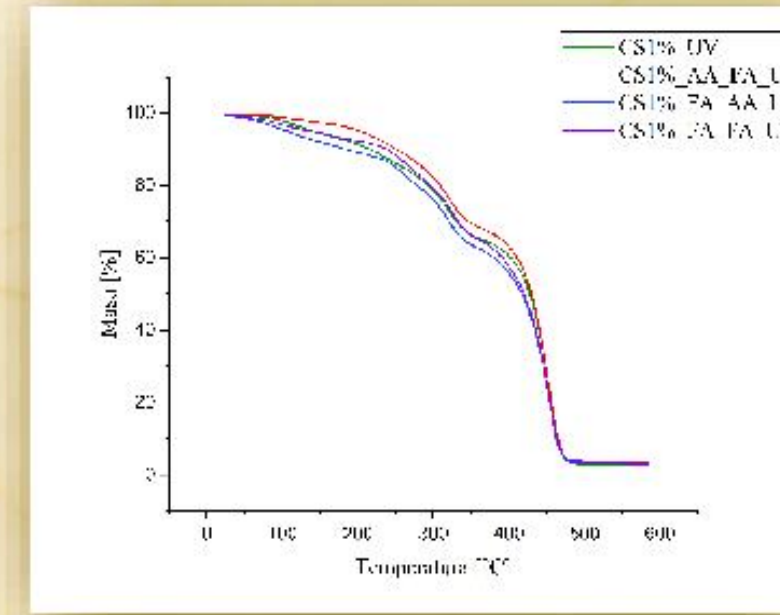
Spektroskopia w podczerwieni (IR)



Absorpcja wody w czasie



Analiza termograwimetryczna (TGA)



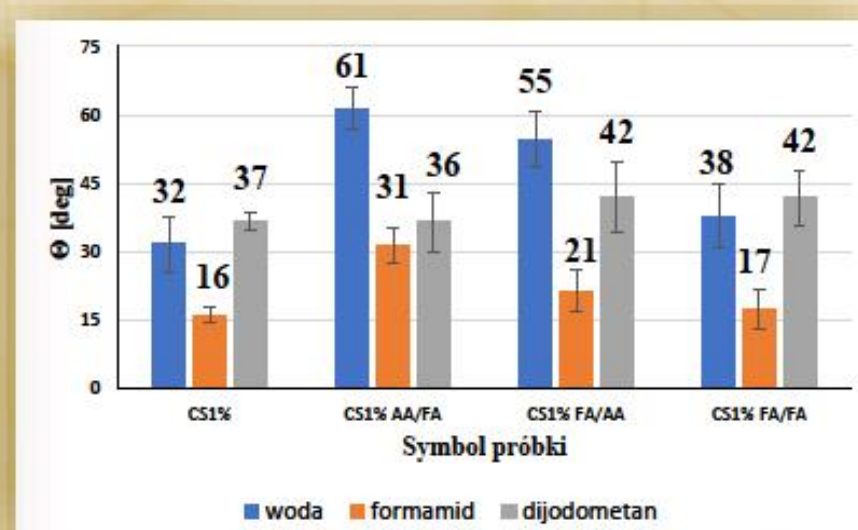
Absorpcja wody po 7 dniach

Wnioski

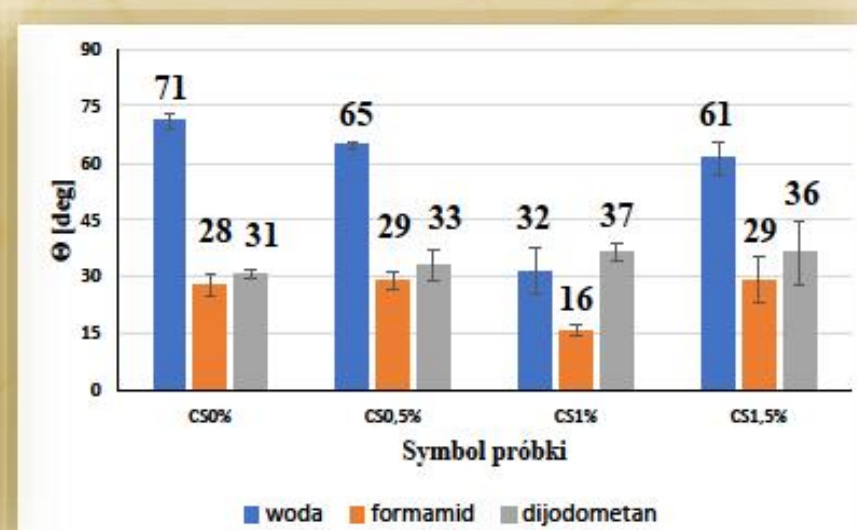
- Opracowano metodę syntezy kationomerów poliuretanowych modyfikowanych chitozanem oraz metodę otrzymywania z nich fotoutwardzalnych powłok, których strukturę potwierdzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (IR).
- Dodatek chitozanu oraz zastosowanie kwasu mrówkowego na etapie neutralizacji poliuretanu powodowały zmniejszenie termoodporności związku, co przejawiało się obniżeniem temperatury początku degradacji.
- Chitozan, dzięki swojej hydrofilowości powodował zwiększenie absorpcji wody przez próbki. Zastosowanie kwasu mrówkowego na etapie neutralizacji poliuretanu wywoływało podobny efekt, dodatkowo powodując obniżenie stabilności próbek w środowisku wodnym.
- Wszystkie badane powłoki wykazywały hydrofilowość, o czym świadczyły kąty zwilżania wodą mniejsze niż 90°. Zwiększenie zawartości chitozanu skutkowało obniżeniem kątów zwilżania wodą ze względu na jego hydrofilowy charakter. Użycie kwasu mrówkowego również powodowało zmniejszenie wartości kątów zwilżania.
- Badane powłoki charakteryzowały się wysoką swobodną energią powierzchniową, mieszczącą się w zakresie od 44,1 do 62,7 mJ/m² (dla metody Owensa-Wendta) oraz od 49,7 do 55,8 mJ/m² (dla metody van Ossa-Gooda). Wyniki uzyskane obiema metodami były porównywalne i wykazywały podobne tendencje. Modyfikacja chitozanem nie miała istotnego wpływu na wartość SEP, natomiast użycie do syntezy kwasu mrówkowego powodowało wzrost swobodnej energii powierzchniowej badanych powłok.
- Właściwości uzyskanych powłok pozwalają rozważać ich zastosowanie jako ochronnych powłok lakierniczych, szczególnie do zabezpieczania powierzchni drewnianych.

Rodzaj powłoki	Parametry SEP [mJ/m ²]										
	Metoda Owensa - Wendta					Metoda van Ossa - Gooda					
	H ₂ O - CH ₂ I ₂	HCONH ₂ - CH ₂ I ₂	Y _s ^p	Y _s ^d	Y _s	Y _i ^{LW}	Y _i ⁺	Y _i ⁻	Y _i ^{AB}	Y _s	
CS0%	6,0	38,1	44,1	18,6	32,9	51,5	43,9	2,9	3,0	5,9	49,7
CS0,5%	10,1	35,2	45,3	20,3	31,6	51,9	43,0	2,2	7,6	8,2	51,1
CS1%	36,4	26,4	62,7	27,7	28,2	56,0	41,3	1,4	39,1	14,5	55,8
CS1,5%	13,2	32,5	45,7	21,3	30,0	51,2	41,4	2,1	10,7	9,5	50,9
CS1%											
AA/FA	13,0	32,6	45,6	19,7	30,4	50,1	41,4	1,9	11,2	9,1	50,5
CS1%											
FA/AA	20,0	27,9	47,9	28,5	25,8	54,3	38,6	3,3	14,7	13,9	52,5
CS1%											
FA/FA	33,8	24,8	58,6	30,0	25,6	55,7	38,8	2,2	32,3	16,7	55,4

Swobodna energia powierzchniowa (SEP)



Wartości kątów zwilżania



SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA KOMPOZYCJI MEZOGENICZNEJ ŻYWICY EPOKSYDOWEJ

Autor: inż. Monika Jastrzębska
Promotor: dr hab. inż. Beata Mossety-Leszczak, prof. PRz

CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszego pracy magisterskiej była synteza kompozycji mezogenicznej żywicy epoksydowej, a następnie przeprowadzenie jej wnikliwej charakterystyki. Zakres przeprowadzonych badań obejmował zadania, które pozwoliły na określenie struktury, właściwości termicznych oraz charakterystykę innych wybranych właściwości otrzymanych produktów.

Zakres pracy obejmuje następujące zagadnienia:

- przegląd literatury dotyczącej tematyki pracy,
- synteza mezogenicznego prekursora diepoksydowego DGE-MEZO II,
- określenie struktury otrzymanego prekursora z wykorzystaniem technik spektralnych,
- charakterystyka właściwości termicznych otrzymanego produktu metodą DSC i POM,
- opracowanie warunków utwardzania kompozycji DGE-MEZO II z wybranym czynnikiem sieciującym i napelniaczem,
- charakterystyka wybranych właściwości otrzymanego produktu,
- opracowanie wyników i przygotowanie rozprawy.

WPROWADZENIE

Żywice epoksydowe – polimery termoutwardzalne o szerokim zastosowaniu w przemyśle. Najbardziej znane są żywice dianowe, otrzymywane z dianu (bisfenolu A) i epichlorohydryny.

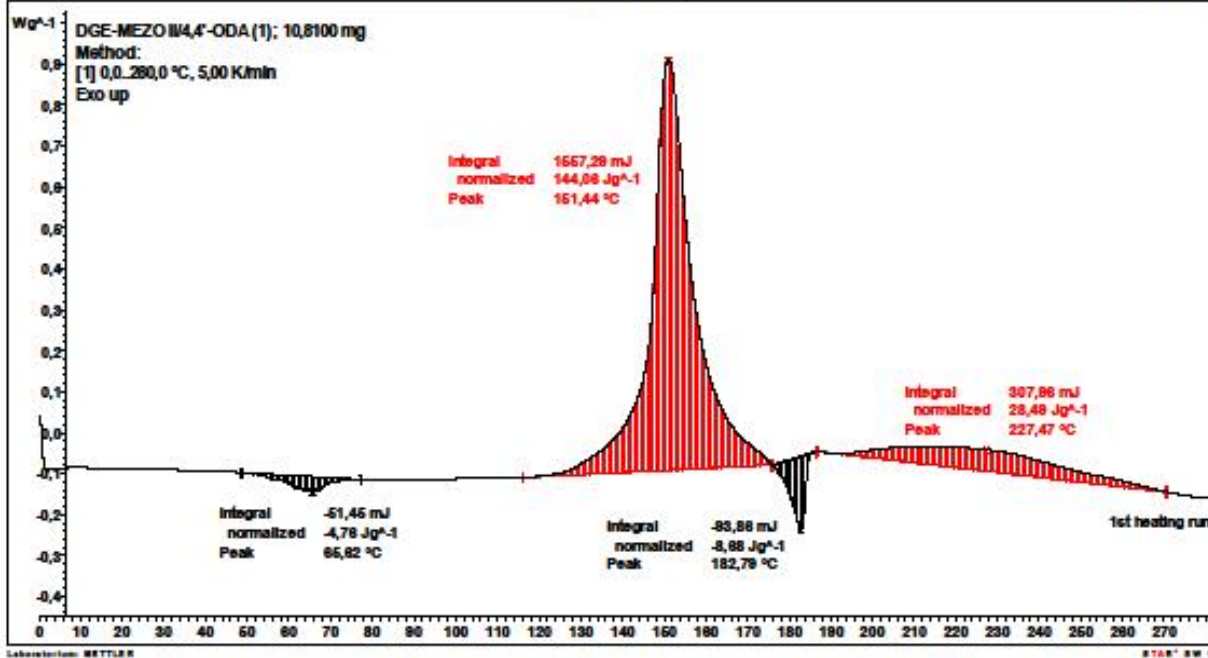
Możliwe modyfikacje:

- **napelniacze** – poprawiają właściwości mechaniczne i termiczne
- **stabilizatory** – zwiększają odporność na degradację
- **plastyfikatory** – zwiększają elastyczność
- **utwardzacze** – determinują szybkość i efektywność sieciowania
- **modyfikacja chemiczna** – np. wprowadzenie grup mezogenicznych w strukturę żywicy, które nadają jej cechy ciekłokrystaliczności

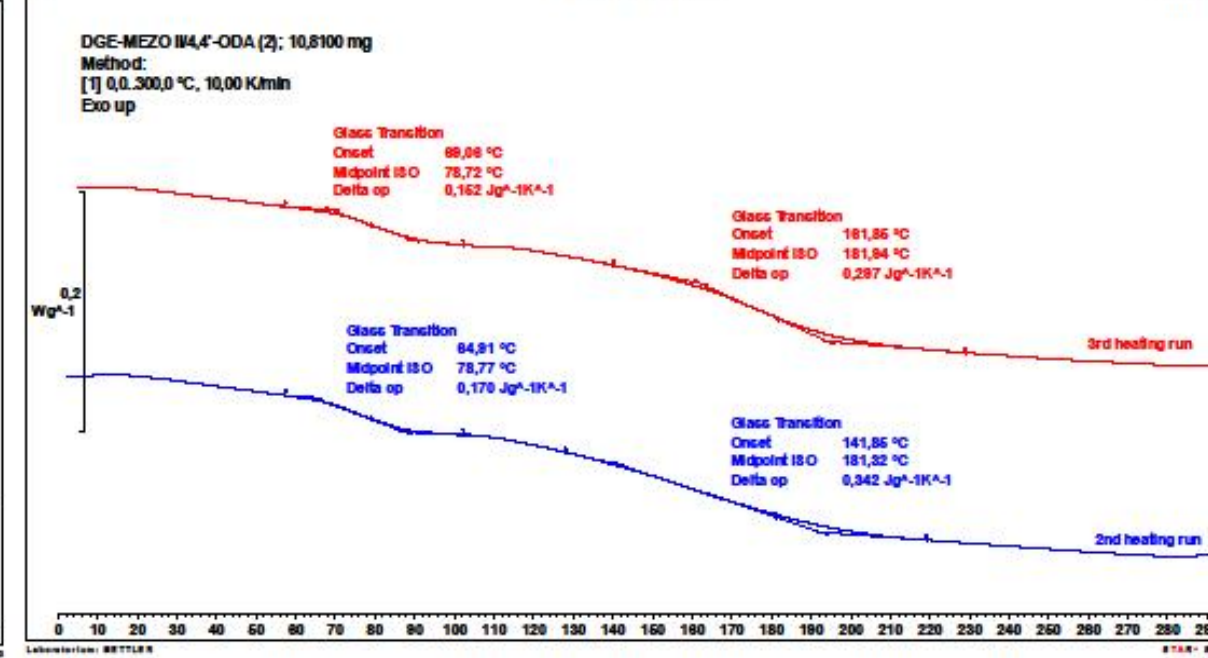
Zastosowania: elektronika, lotnictwo, motoryzacja, budownictwo, kompozyty

WYNIKI BADAŃ

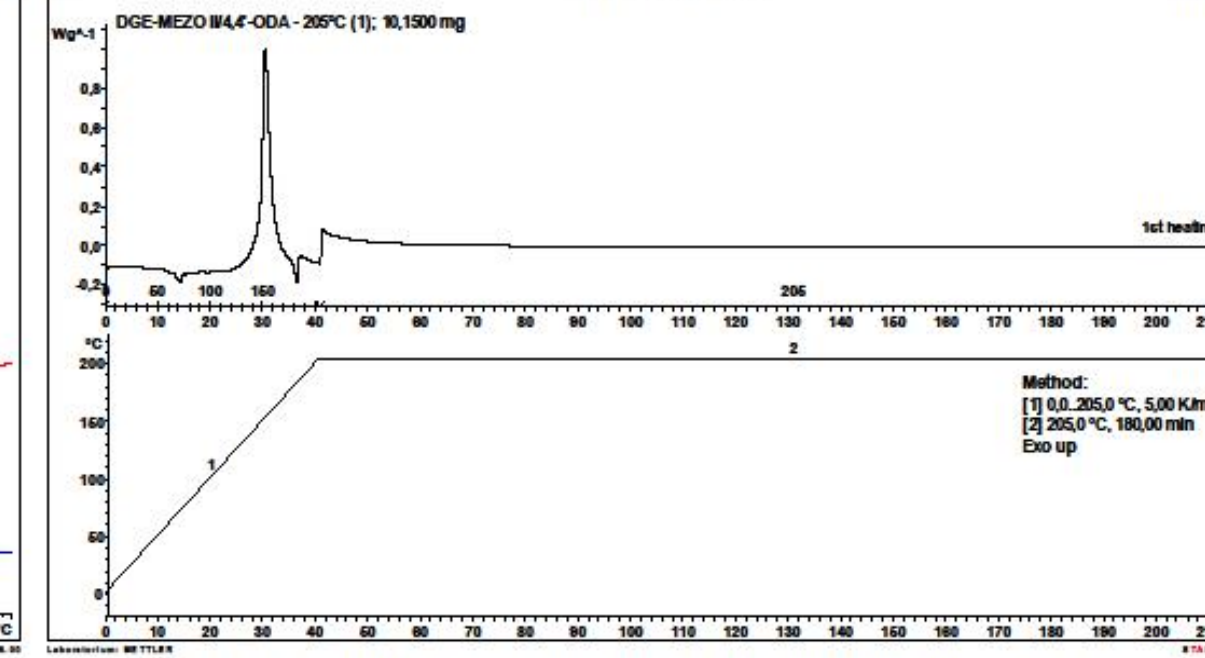
Proces sieciowania kompozycji DGE-MEZO II/4,4'-ODA



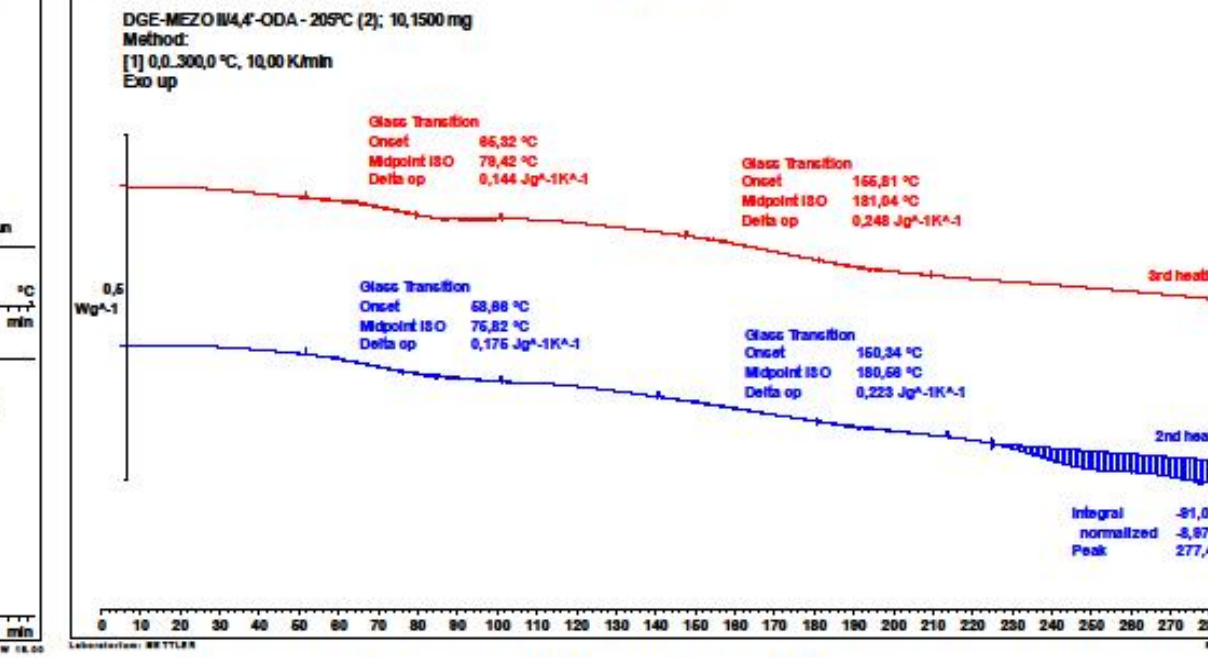
Rys. 1. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/4,4'-ODA – 1 cykl pomiarowy; szybkość zmian temperatury 5 K/min.



Rys. 2. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/4,4'-ODA – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.

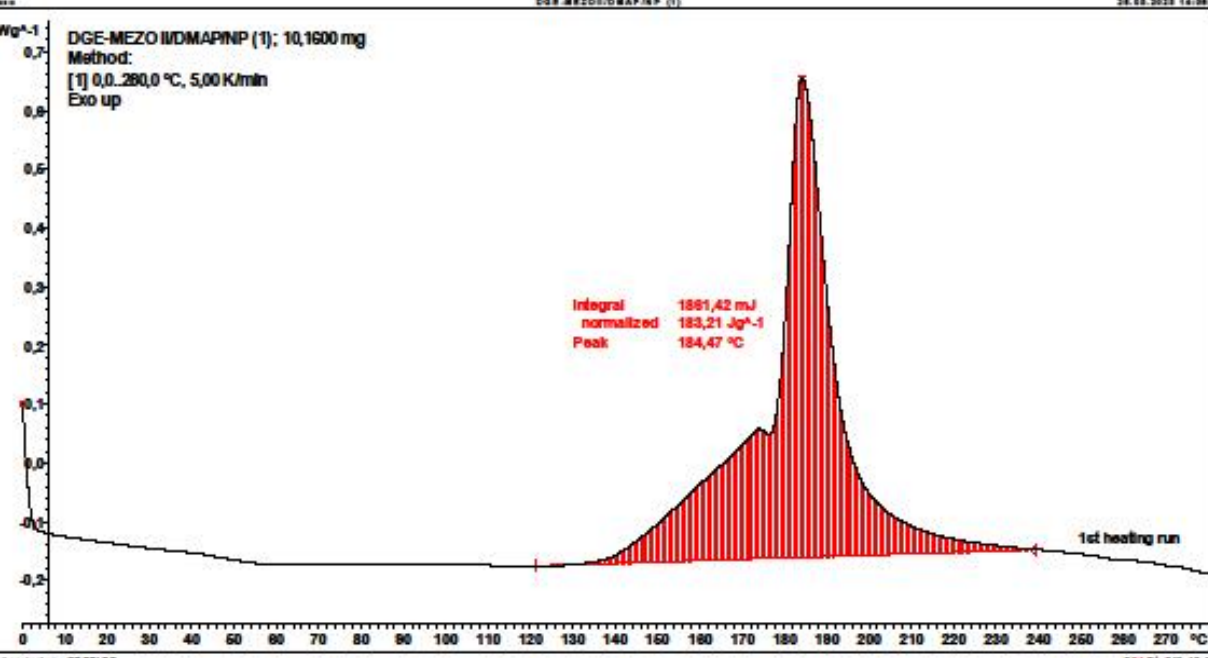


Rys. 3. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/4,4'-ODA dla analizy izotermicznej 205 °C prowadzonej przez 180 min.

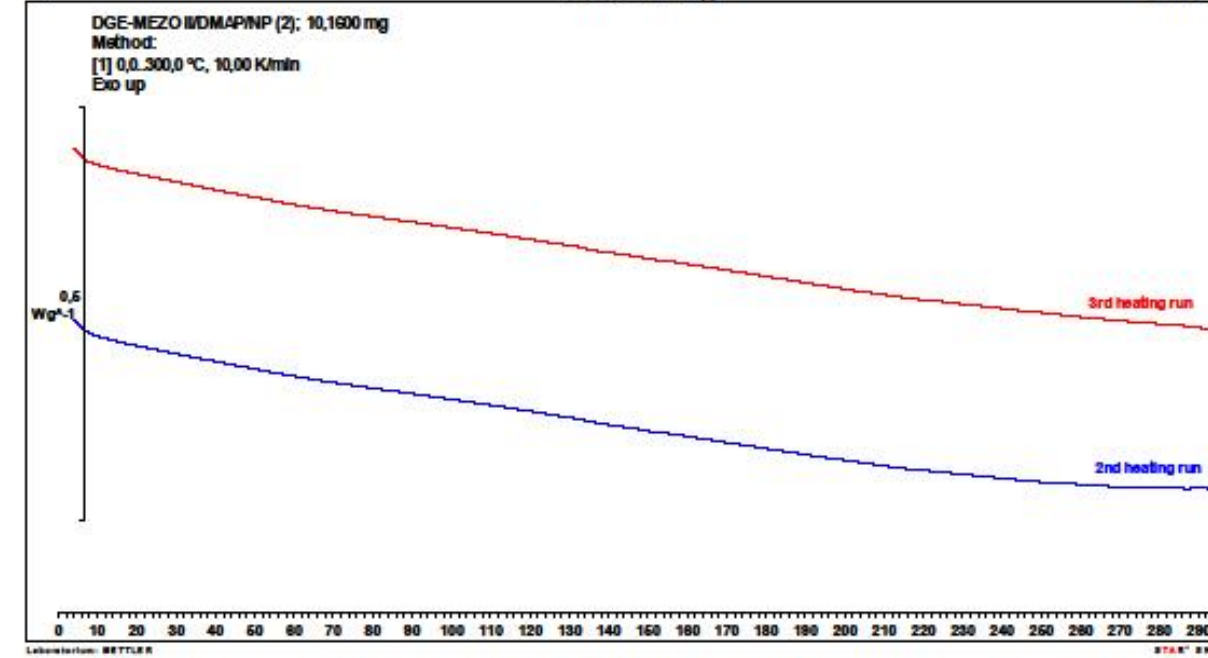


Rys. 4. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/4,4'-ODA – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.

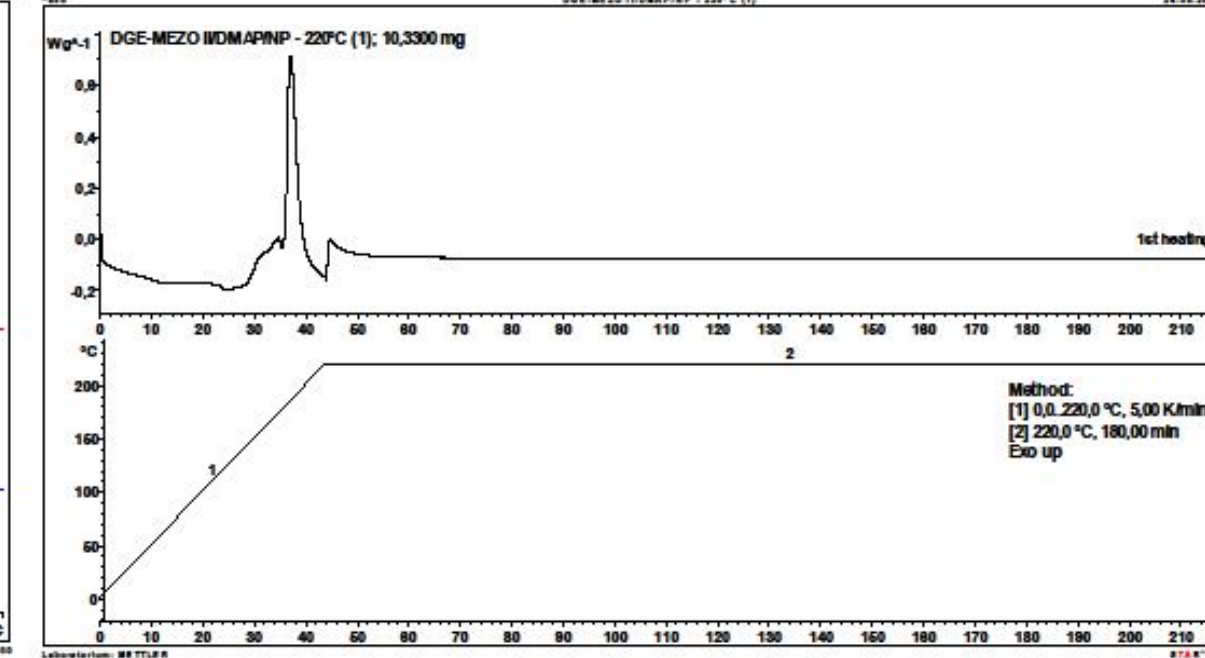
Proces sieciowania kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP



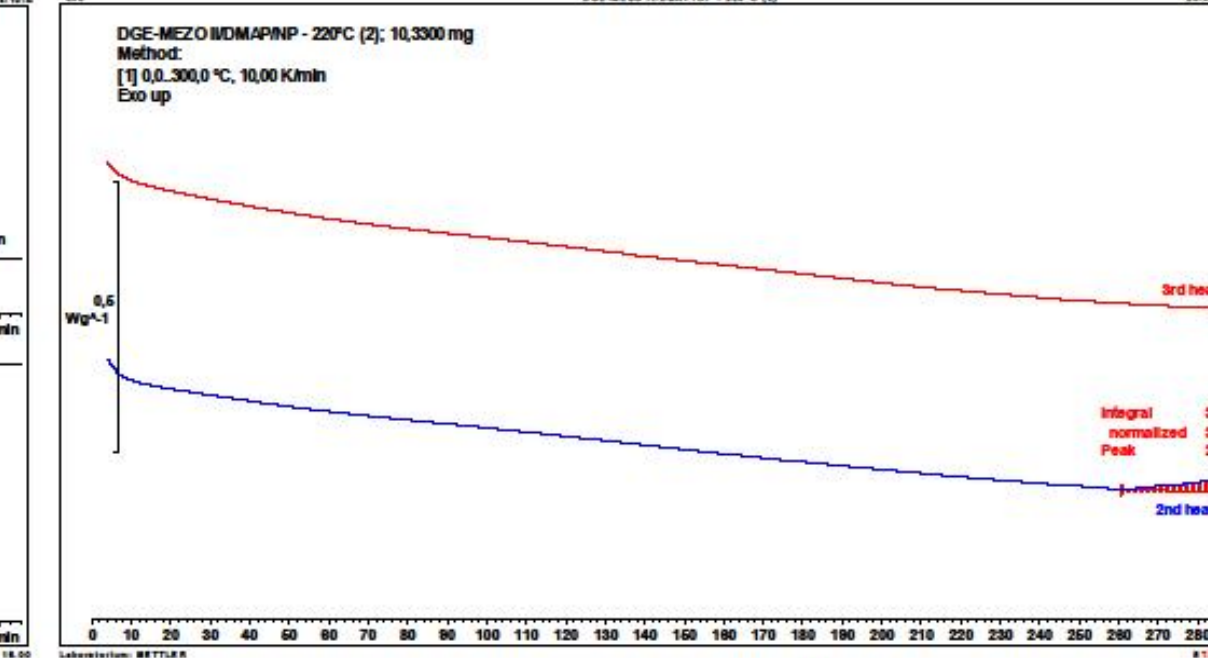
Rys. 5. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP – 1 cykl pomiarowy; szybkość zmian temperatury 5 K/min.



Rys. 6. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.

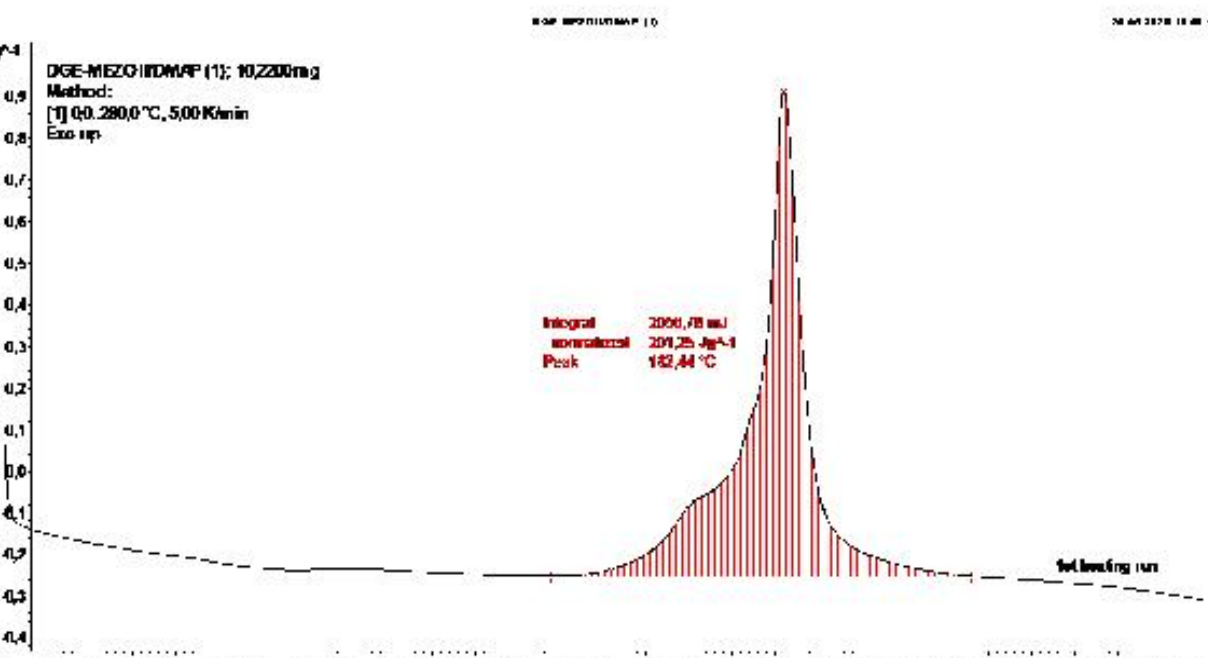


Rys. 7. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP dla analizy izotermicznej 220 °C prowadzonej przez 180 min.

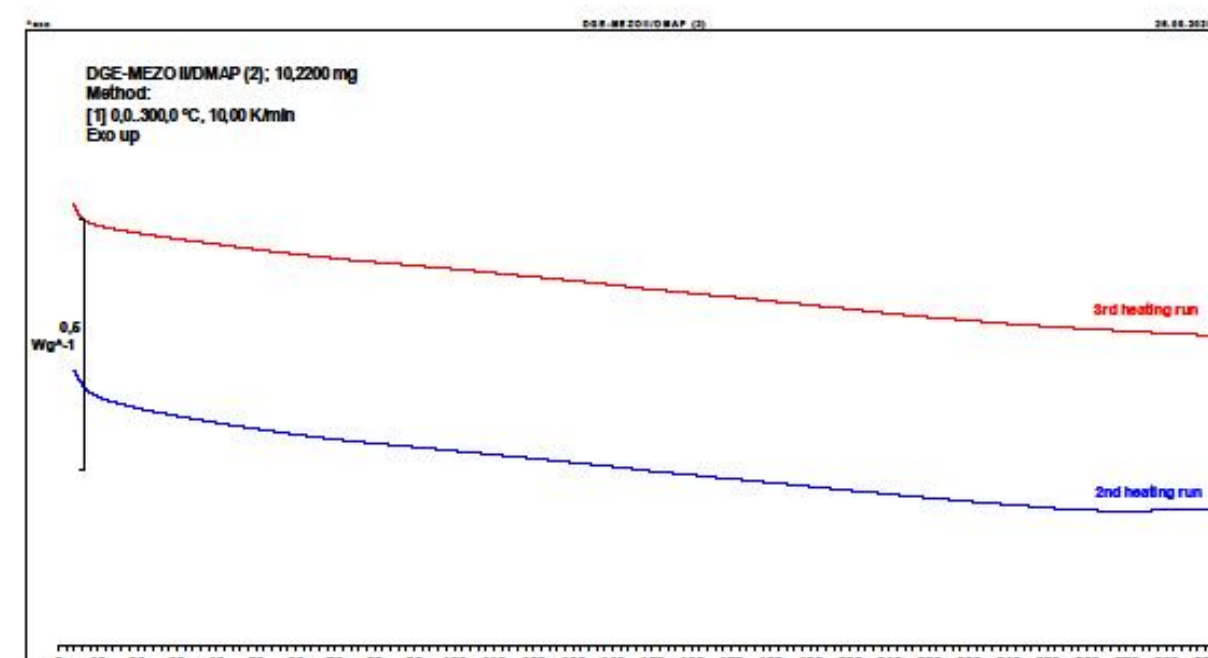


Rys. 8. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.

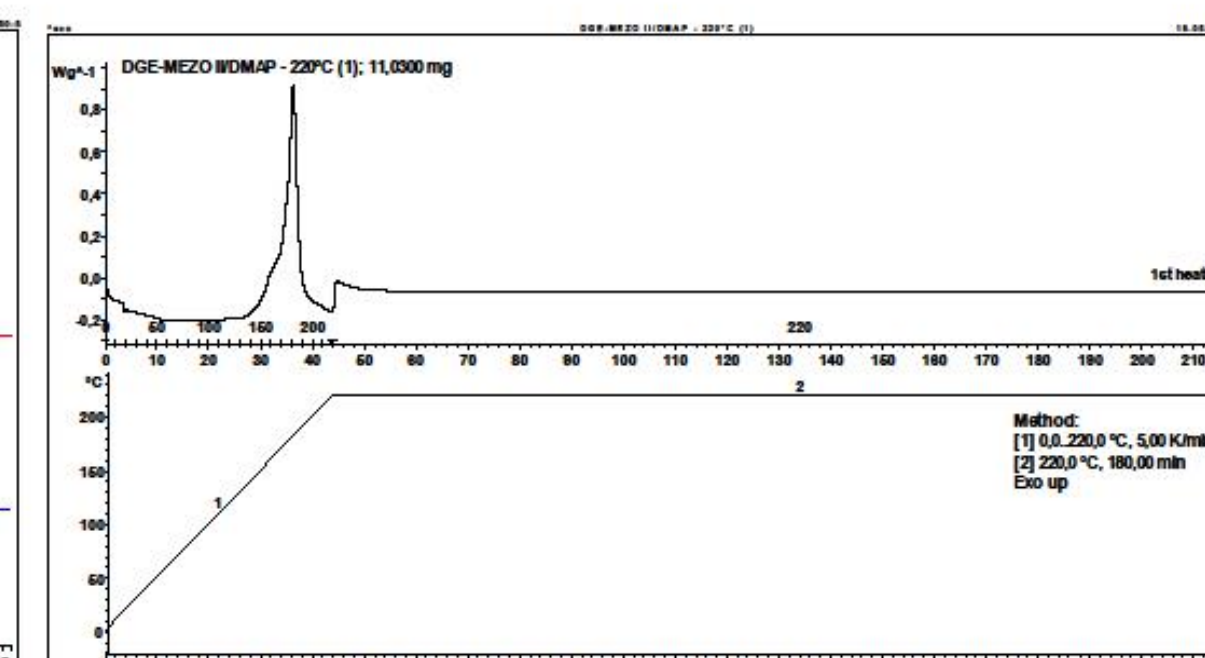
Proces sieciowania kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP/5%NP



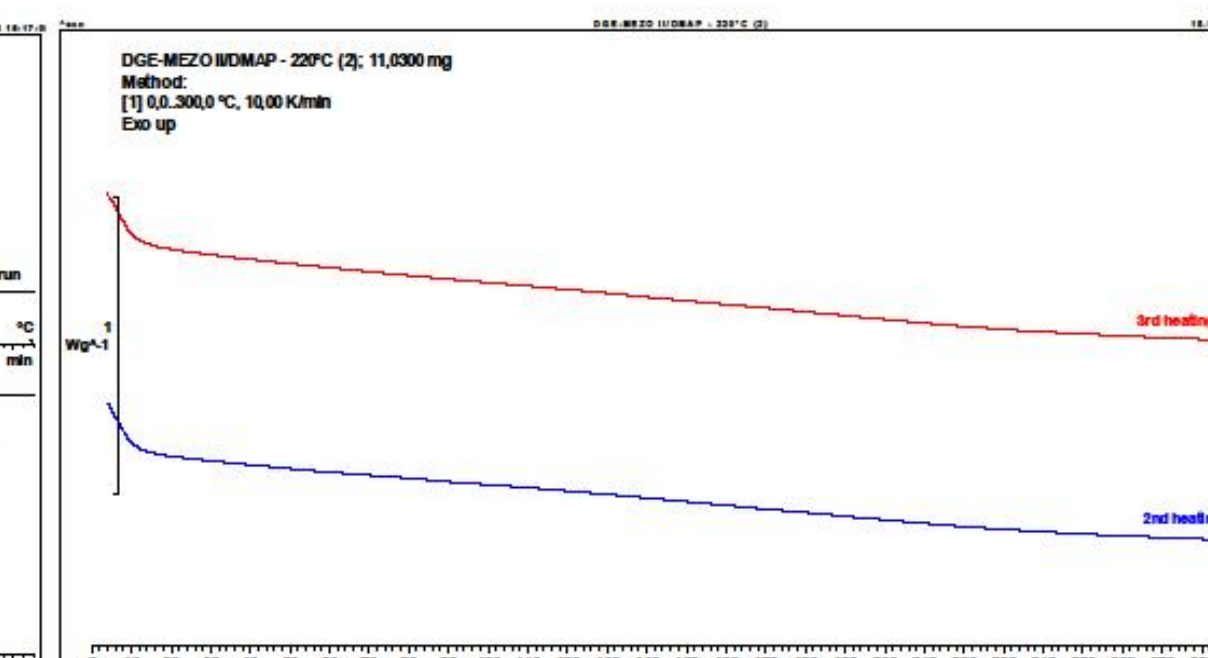
Rys. 9. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP/5%NP – 1 cykl pomiarowy; szybkość zmian temperatury 5 K/min.



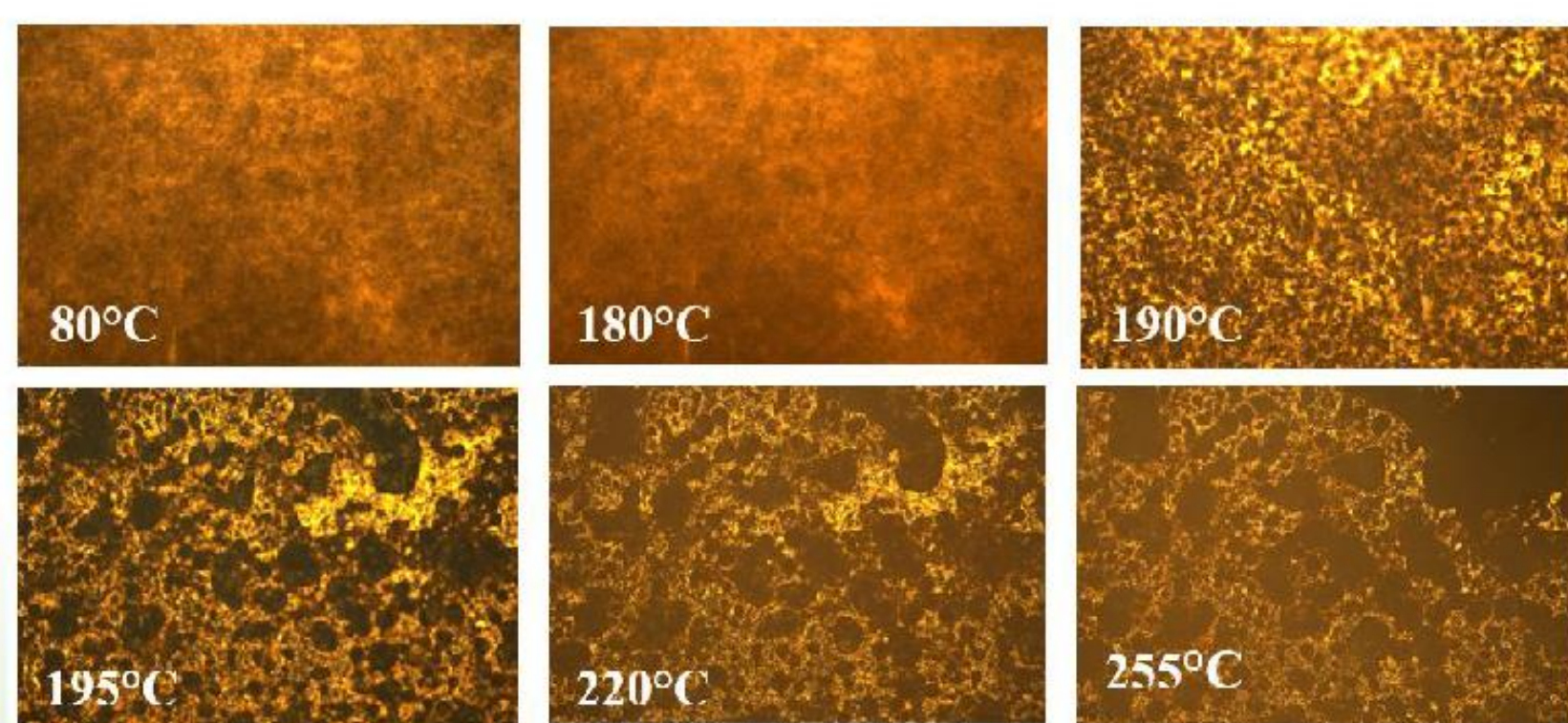
Rys. 10. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP/5%NP – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.



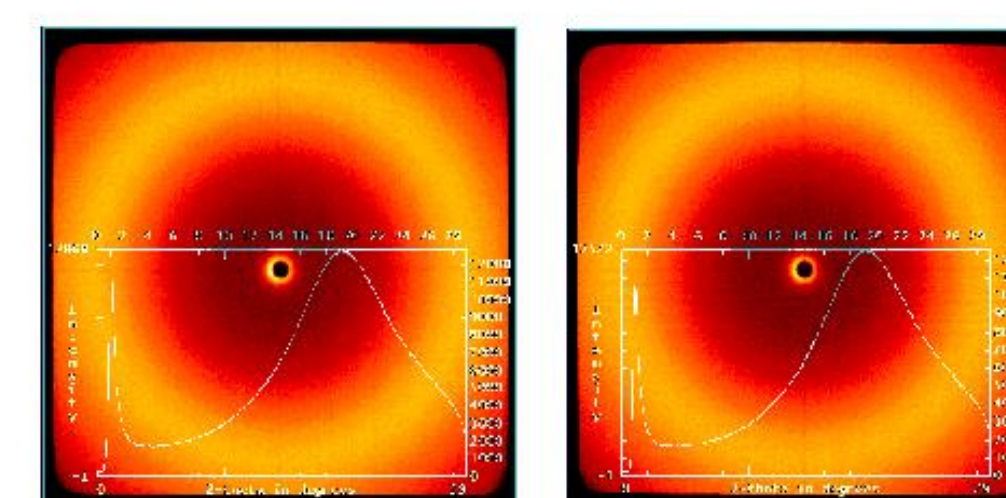
Rys. 11. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP/5%NP dla analizy izotermicznej 220 °C prowadzonej przez 180 min.



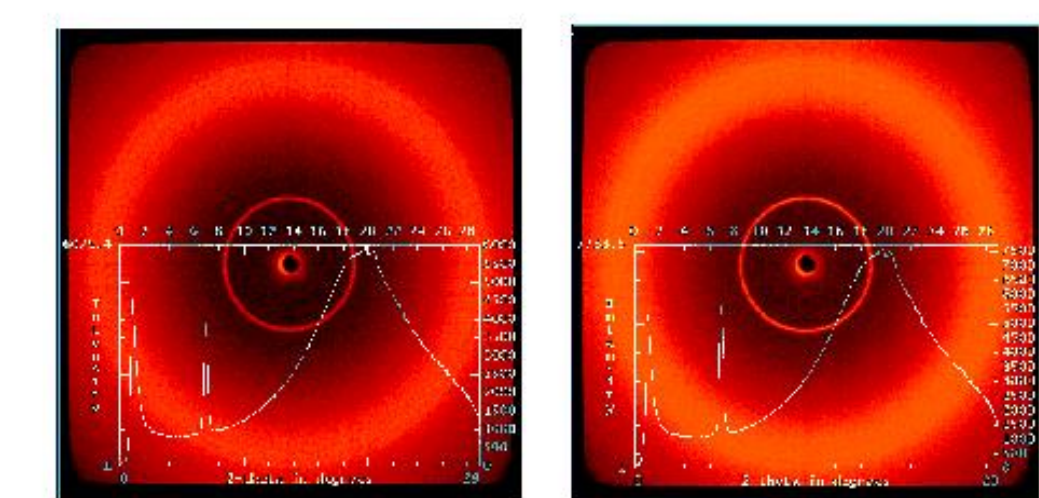
Rys. 12. Termogram DSC kompozycji DGE-MEZO II/1,5%DMAP/5%NP – 2 (niebieska linia) i 3 (czerwona linia) cykle pomiarowy; szybkość ogrzewania: 10 K/min.



Rys. 13. Mikrofotografie POM pochodzącej DGE-MEZO II zarejestrowane w różnych temperaturach.



Rys. 14. Rentgenogram WAXS kompozycji DGE-MEZO II/DMAP utwardzanej bez pola (po prawej) oraz w polu magnetycznym o indukcji 1,2 T w temperaturze 220 °C (po lewej).



Rys. 15. Rentgenogram WAXS kompozycji DGE-MEZO II/DMAP/5%NP utwardzanej bez pola (po prawej) oraz w polu magnetycznym o indukcji 1,2 T w temperaturze 220 °C (po lewej).

PODSUMOWANIE

- Analizy DSC i POM potwierdziły obecność przejść fazowych charakterystycznych dla materiałów ciekłokrystalicznych.
- Badano warunki sieciowania z użyciem różnych czynników sieciujących (4,4'-ODA, DMAP oraz dodatku napelniacza NP), które wykazały różny wpływ na procesy termiczne i przebieg sieciowania.
- Przeprowadzone izotermiczne analizy DSC pozwoliły na określenie optymalnych temperatur i czasu utwardzania dla badanych kompozycji.
- Kompozycja sieciowana z zastosowaniem 4,4'-ODA nie uległa efektywnemu utwardzeniu ponieważ wysoka reaktywność aminy spowodowała reakcję w stanie stałym, co zakłóciło prawidłowe sieciowanie i stworzyło nieuporządkowaną strukturę
- W przypadku kompozycji z 1,5% DMAP analizy izotermiczne DSC wykazały, że najefektywniejsze sieciowanie dla tego układu zachodzi w temperaturze 220 °C.
- Dodatek nanoprętów NP (5%) do kompozycji z 1,5% DMAP nie wpłynął znacząco na przebieg reakcji sieciowania.
- Zastosowanie mezogenicznej struktury może przyczynić się do poprawy właściwości żywic epoksydowych, otwierając perspektywy ich wykorzystania w nowoczesnych zastosowaniach inżynierskich.

Porównanie wpływu wybranych statyn na żywotność nicienia *Caenorhabditis elegans* szczepu N2 oraz DG4384 z nokautem genu reduktazy HMG-CoA

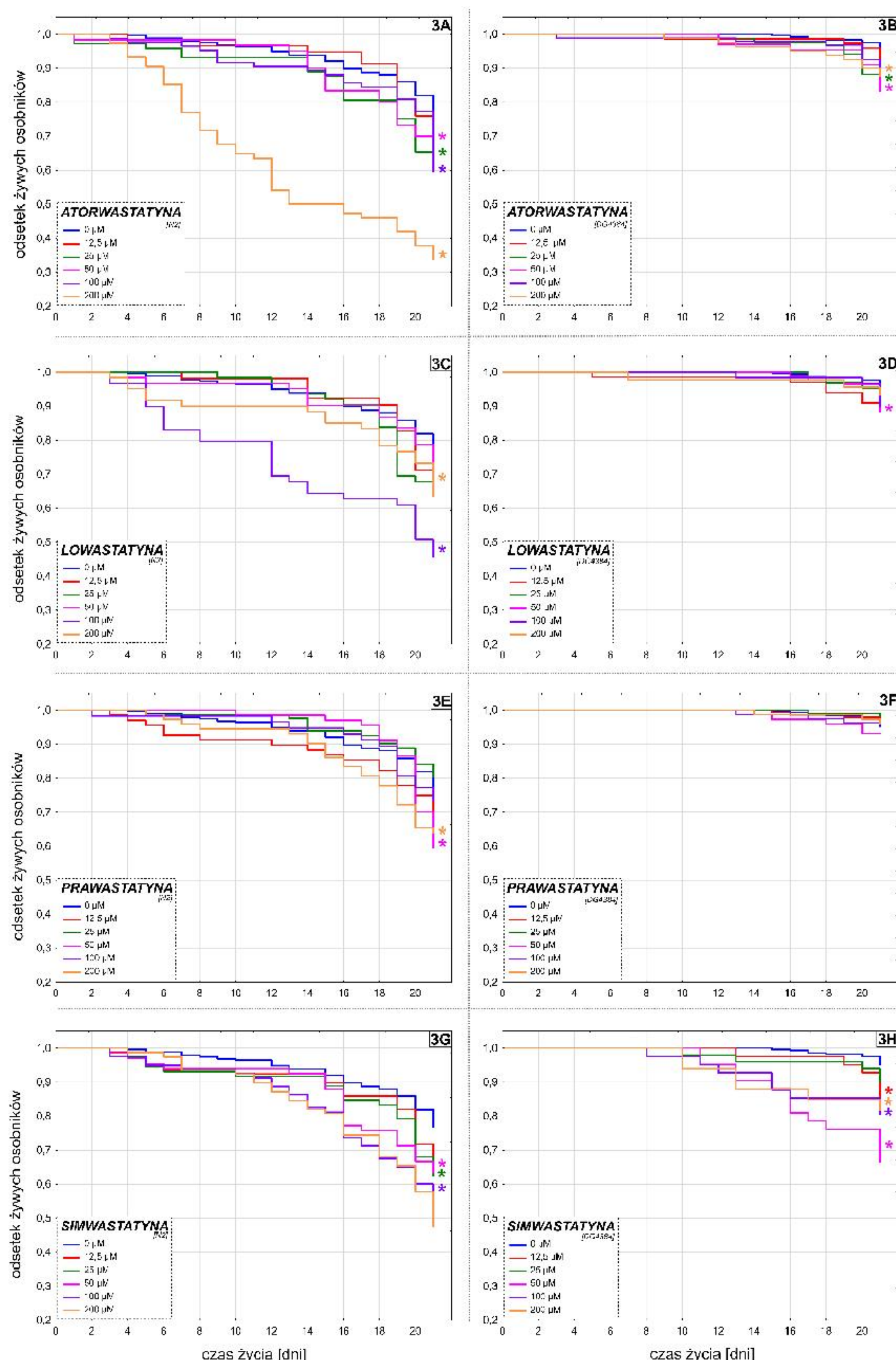
Wprowadzenie

Statyny jako inhibitory reduktazy hydroksymetyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) hamując szlak mewaloniowy, obniżają poziomu cholesterolu, ograniczają syntezę dolicholu, koenzymu Q, izoprenoidów, co wpływa na powstawanie przeciwutleniaczy i białek prenylowanych. Plejotropowe działanie statyn pozwala na badania pod kątem zastosowania jako leki w chorobach neurodegeneracyjnych czy nowotworowych. Powodują też szereg skutków ubocznych jak miopatia, wzrost ryzyka zachorowania cukrzycy, wzrost poziomu transaminaz. *Caenorhabditis elegans* jest przykładem organizmu modelowego o prostej hodowli i doskonale opisanej budowie, morfologii, behawiorze. Posiada 60-80% genów homologicznych, wspólnych z ludzkiemi, przez co stanowi wzorzec do badań nad mechanizmami działania leków. W ich komórkach również zachodzi szlak mewaloniowy z pominięciem syntezy cholesterolu. Daje to model do badania działania statyn pod kątem ich mechanizmu działania, toksyczności oraz wpływu na morfologię i zachowanie nicienia.

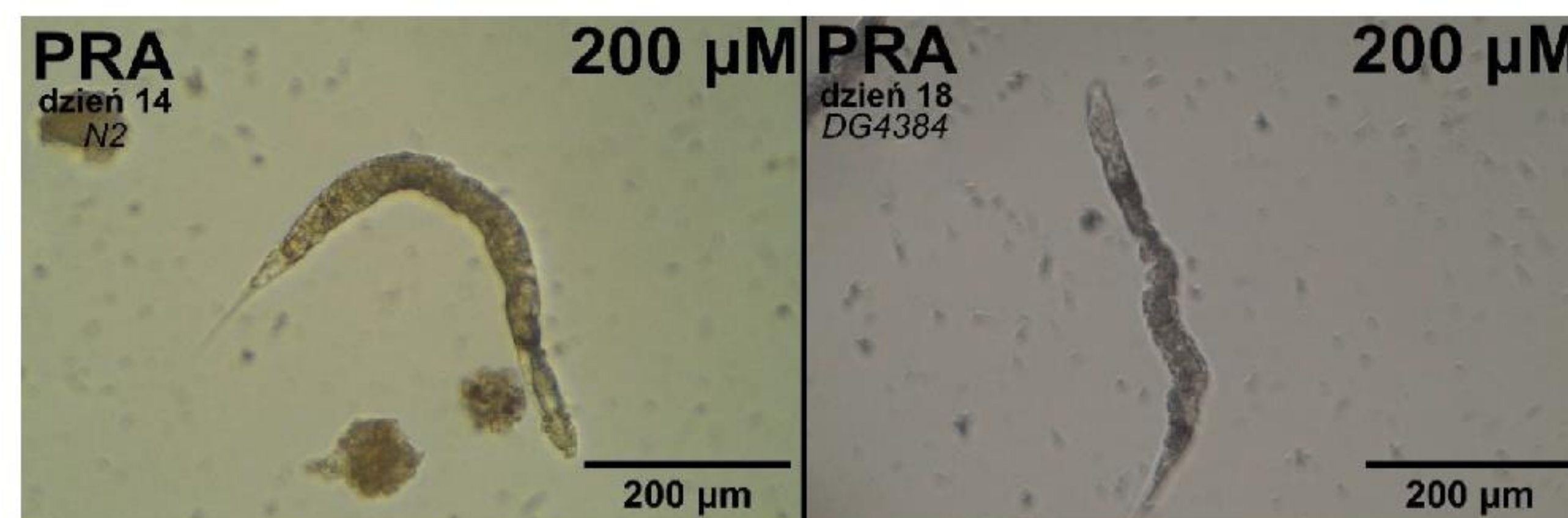
Cel pracy

Porównanie wpływu wybranych statyn (simwastatyny, lowastatyny, prawastatyny i atorwastatyny) na żywotność nicienia *Caenorhabditis elegans* szczepu N2 oraz DG4384 z nokautem genu reduktazy HMG-CoA oraz dodatkiem mewalonianu

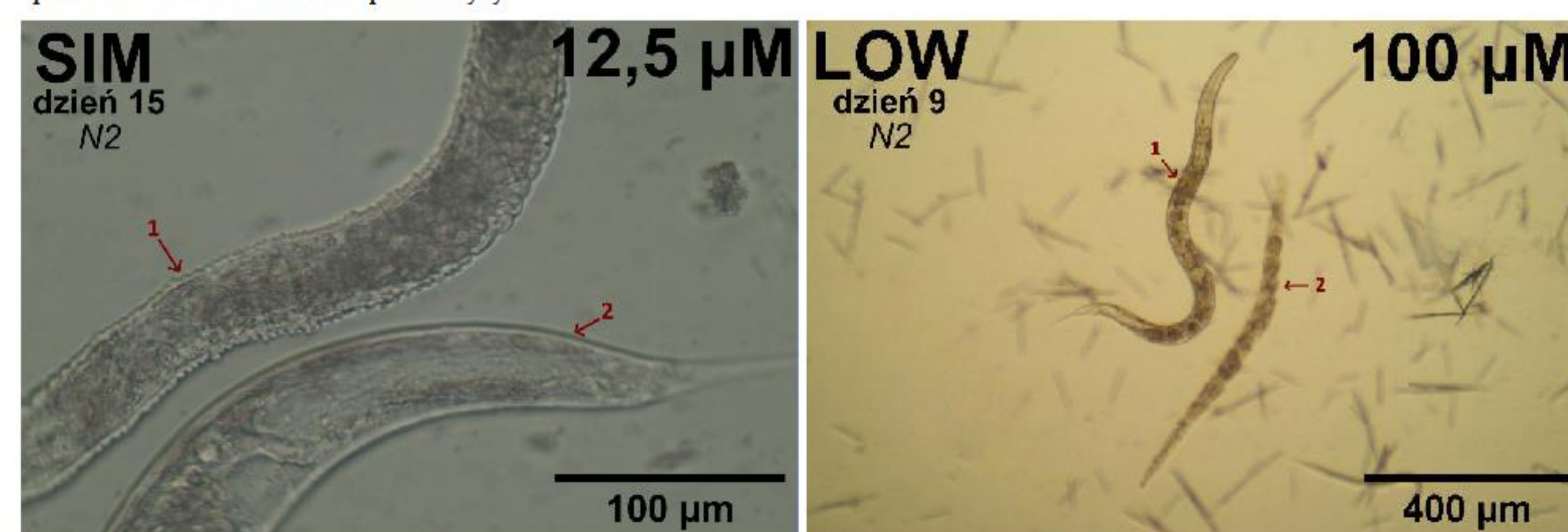
-  Hodowla na szalkach agarowych
-  Synchronizacja metodą bleachingu
-  Inkubacja z lekami (20°C/21 dni)
-  Obserwacja mikroskopowa



Krzywe przeżycia Kaplana - Meiera dla nicieni N2 (wykresy 3A, 3C, 3E, 3G) oraz nicieni z nokautem genu reduktazy HMG-CoA GD4384 (wykresy 3B, 3D, 3F, 3H) po dwudziestu jeden dniach inkubacji ze statynami w rosnących stężeniach. Wyniki przedstawiono jako odsetek żywych osobników. Różnice istotne statystycznie w porównaniu z kontrolą oznaczono * (Test Wilcoxon wg Gehana, $p < 0,05$).



Przykłady nicieni z zdegradowaną osłonką szczepu N2 (po lewej) po czterech dniach stosowania prawastatyny (PRA) oraz szczepu DG4384 (po prawej) po osiemnastu dniach stosowania prawastatyny.



Porównanie osłonki zdegradowanej (1) oraz osłonki prawidłowej (2) Porównanie nicienia żywego (1) oraz martwego (2) dziewiątego dnia piętnastego dnia stosowania simwastatyny o stężeniu 12,5 µM. stosowania lowastatyny o stężeniu 100 µM.

Wnioski

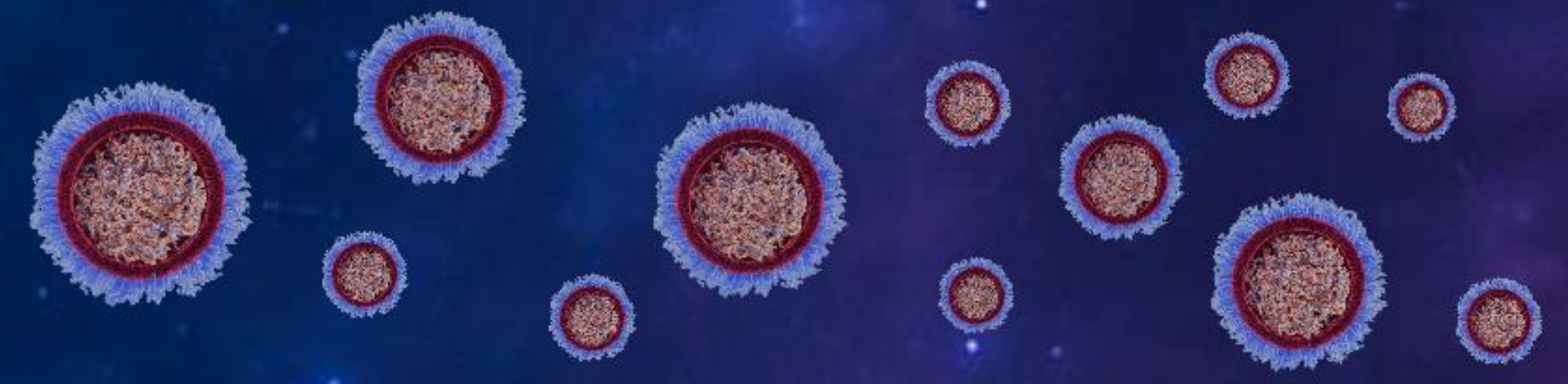
- › Największą toksyczność wykazały atorwastatyna i simwastatyna wobec obu szczepów nicieni
- › Statyny wpływały na morfologię i behawior *C. elegans*, powodując degradację osłonek a także wywołując ruchy padaczkowe
- › Szlak mewaloniowy jest istotny w kontekście przeżycia badanych organizmów i wpływa na ich prawidłowe funkcjonowanie
- › Dodatek mewalonianu wpływa na wydłużenie długości życia nicieni

Bibliografia:

1. F. Iannelli i in., „Targeting Mevalonate Pathway in Cancer Treatment: Repurposing of Statins”, PRA, t. 13, nr 2, s. 184-200, maj 2018, doi:10.2174/1574892812666171129141211
2. T. Kaletta i M. O. Hengartner, „Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism”, Nat Rev Drug Discov, t. 5, nr 5, s. 387-399, maj 2006, doi: 10.1038/nrd2031.
3. M. Rauthan i M. Pilon, „The mevalonate pathway in *C. elegans*”, Lipids Health Dis, t. 10, nr 1, s. 243, 2011, doi: 10.1186/1476-511X-10-243

IZOLACJA EGZOSOMÓW PRZY WYKORZYSTANIU CHROMATOGRAFII WYKLUCZANIA

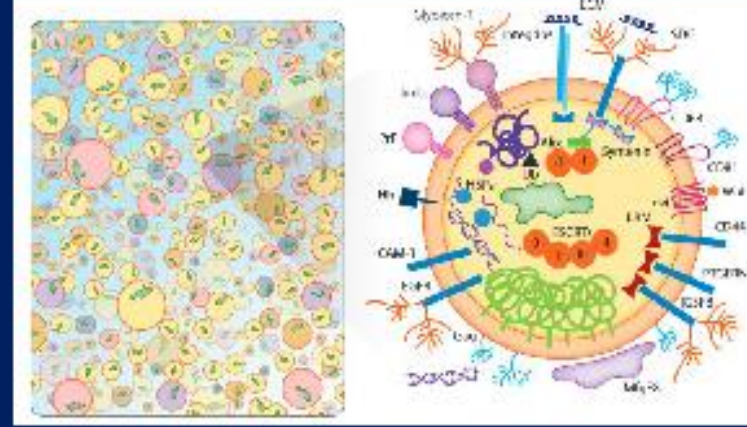
Autor: inż. Bogdan Marczak
Kierunek studiów: biotechnologia
Promotor: dr hab. Aleksandra Bocian, prof. PRz
Rok akademicki: 2024/2025



Wprowadzenie

Egzosomy

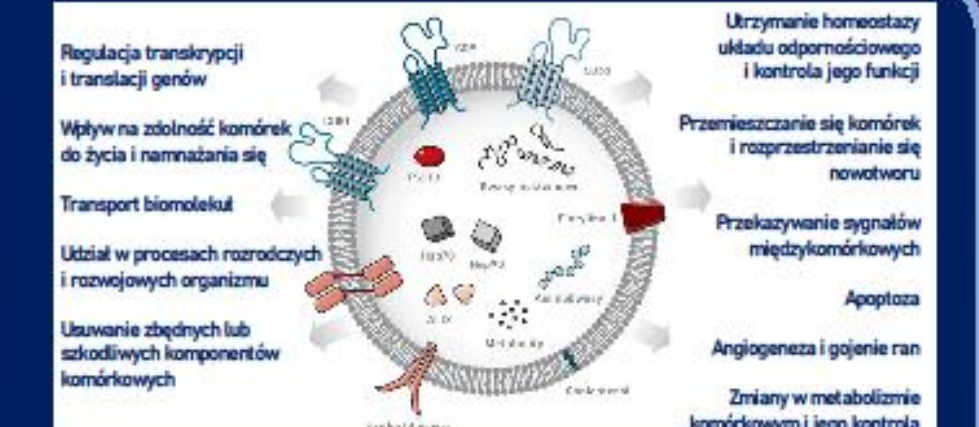
Egzosomy to niewielkie pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV - ang. *Extracellular Vesicles*) o średnicy od około 30 do 200 nm, wydzielane przez niemal wszystkie typy komórek eukariotycznych. Stanowią one najmniejszą z trzech głównych klas EV, otoczone są pojedynczą błoną o topologii komórki pochodzenia. Charakteryzują się sferoidalnym, jednorodnym kształtem oraz zróżnicowaną wielkością. Zawierają m.in. wyselekcjonowane białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe, które odzwierciedlają stan komórki macierzystej.



Budowa oraz skład molekularny egzosomów [1]

Funkcje i zastosowanie egzosomów

Egzosomy, jako zewnątrzkomórkowe pęcherzyki, pochodzenia endosomalnego, ze względu na ich zróżnicowane role w fizjologii i patologii komórek wzbudziły w ostatnich latach intensywne zainteresowanie środowisk naukowych. Pełnią one szereg istotnych funkcji, m.in. uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej, transporcie biomolekuł oraz modulacji odpowiedzi biologicznych w komórkach docelowych. Ich unikalne właściwości czynią je obiecującymi kandydatami do zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych w wielu dziedzinach medycyny.



Funkcje egzosomów [2]

Metodyka



Wyniki oraz Wnioski

Wyniki – Dot blot I

Dot blot I miał na celu wykazanie obecności egzosomów, po pierwszym etapie izolacji (wytrącanie acetonem oraz zagęszczanie przez wirowanie I).

Parametry testu:

- roztwór blokujący: 5% roztwór odtuszczonego mleka,
- przeciwciała pierwszorzędowe: *CD81 Rabbit Polyclonal antibody*,
- przeciwciała drugorzędowe: *HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)*,
- kontrola pozytywna: lizaty komórek DUI45 w buforach PBS oraz HEPES,
- kontrola negatywna: czysty bufor PBS oraz HEPES.

W próbkach badanych nie uzyskano wyniku pozytywnego co świadczy o zbyt dużym rozcieńczeniu białka CD81, i tym samym egzosomów w próbkach.



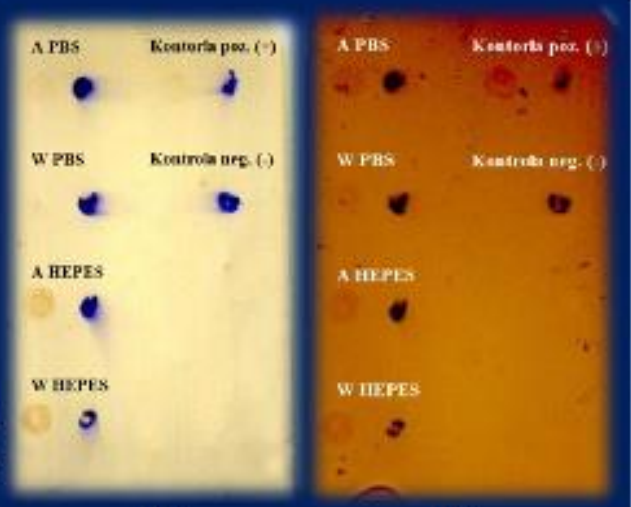
Wyniki – Dot blot II

Dot blot II miał na celu wykazanie obecności egzosomów po rozdziale chromatograficznym oraz zagęszczeniu przez wirowanie II (drugi etap izolacji).

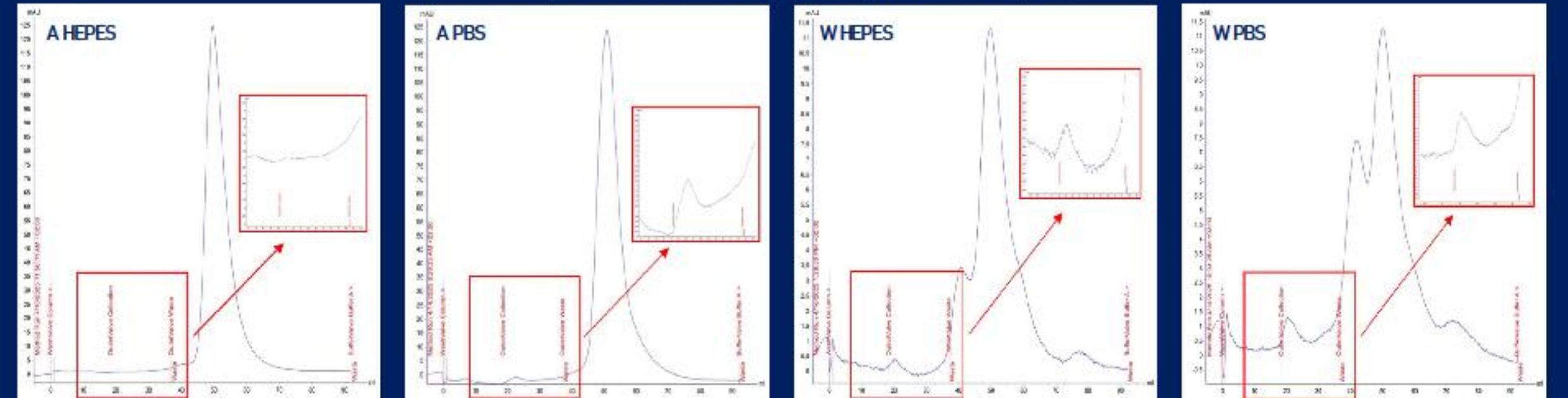
Parametry testu:

- roztwór blokujący: 5% roztwór odtuszczonego mleka,
- przeciwciała pierwszorzędowe: *CD81 Rabbit Polyclonal antibody*,
- przeciwciała drugorzędowe: *HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)*,
- kontrola pozytywna: lizaty komórek DUI45 w buforze HEPES,
- kontrola negatywna: czysty bufor HEPES.

Niemal natychmiastowo (a) sygnał pozytywny zaobserwowano w próbkach A PBS, A HEPES oraz W HEPES. Po 24 godzinach (b) sygnał pojawił się również w próbce W PBS. Wyniki te wskazują na wyższe stężenie białka CD81, a tym samym wzbogacenie izolatów w egzosomy po przeprowadzonym rozdziale SEC i zagęszczeniu przez wirowanie II.



Wyniki – Chromatografia Wykluczania (SEC)



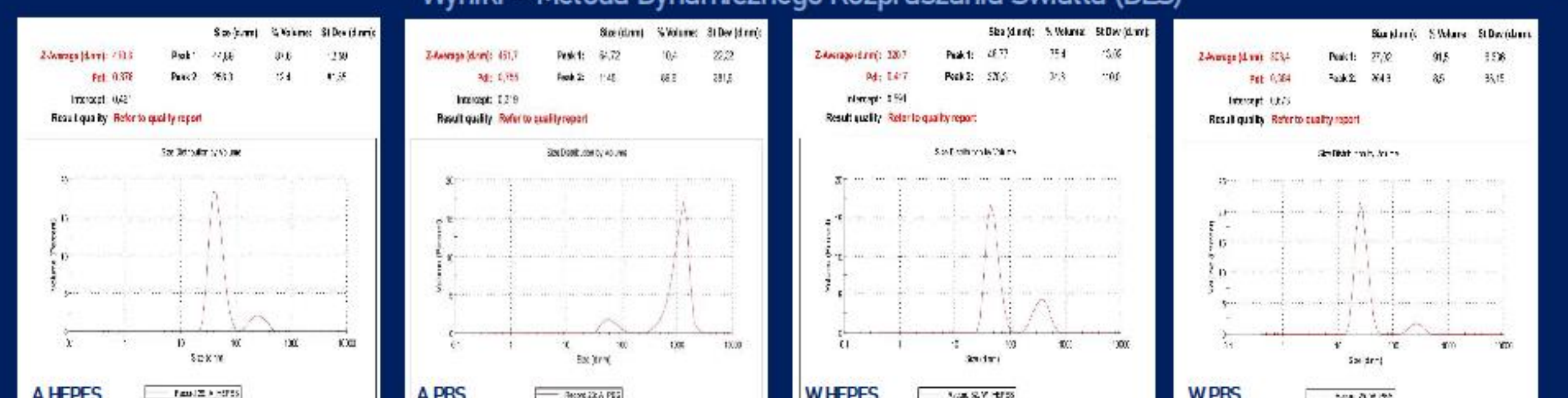
Czerwonymi kwadratami zaznaczono kluczowy obszar odpowiadający zakresowi pobierania frakcji objętości martej, w której obecne były egzosomy.

Rozdział i frakcjonowanie próbek, na kolumnie *Cytiva XK 26/20* wypełnionej złożem *Sephacryl S-400 HR*.

Parametry rozdziaku:

- prędkość przepływu – 1 ml/min,
- limit ciśnienia – 0,20 MPa,
- zbiór frakcji – od -18 do -38 ml,
- objętość kolumny – 70 ml,
- przemycie kolumny – 1,3 objętości.

Wyniki – Metoda Dynamicznego Rozpraszania Światła (DLS)



Pomiary metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) względem objętości.

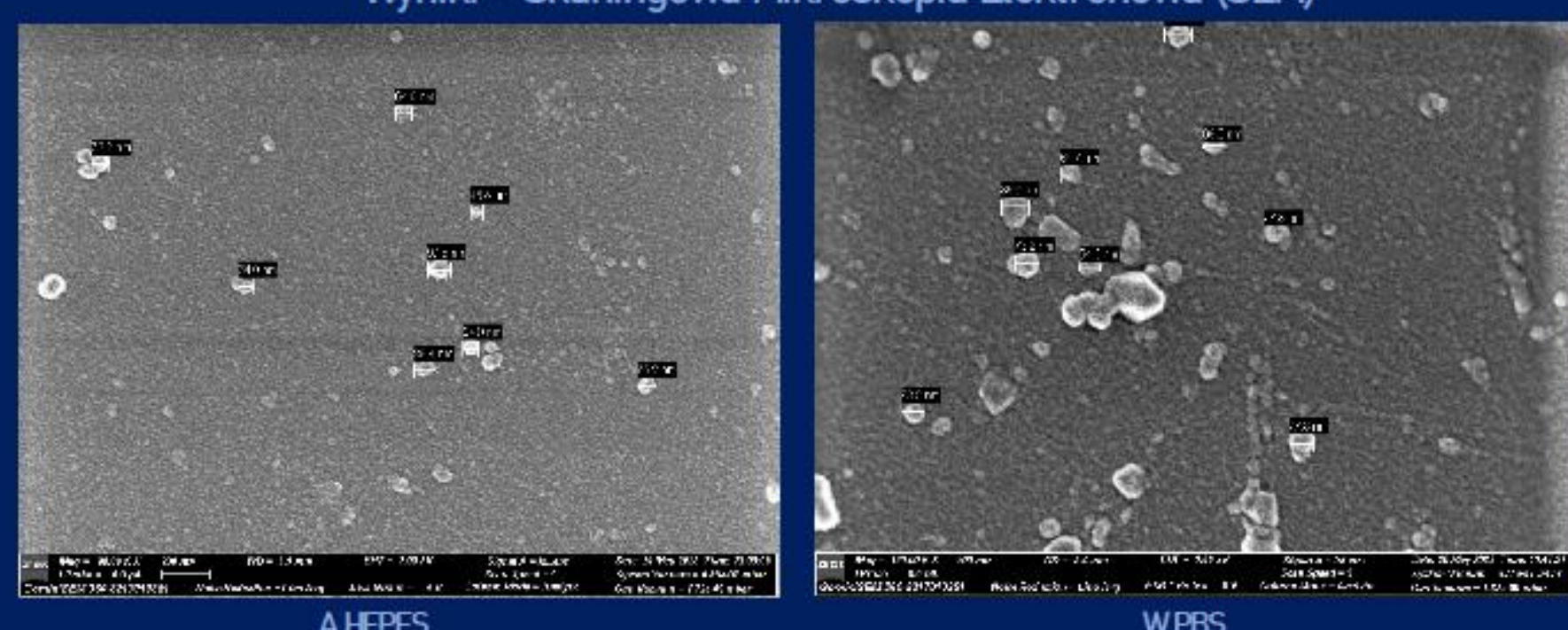
Parametry pomiaru:

- dwukrotne rozcieńczenie próbek – najpierw 1:3 (240 μl próbki + 960 μl wody), następnie 1:4,
- gęstość oraz lepkość r-r – wartości dla wody w 25°C,
- liczba pomiarów – automatycznie dostosowana dla danej próbki.

Próbka	Wielkość cz. Pik 1	% obj. Pik 1	Wielkość cz. Pik 2	% obj. Pik 2	PdI
A HEPES	44,89	87,60%	256,30	12,40%	0,38
A PBS	64,72	10,40%	1145,00	89,60%	0,76
W HEPES	48,77	75,40%	370,30	24,60%	0,42
W PBS	27,02	91,50%	264,60	8,50%	0,38

PdI – ang. Polydispersity Index; miara zróżnicowania wielkości cząstek. Kolor czerwony odpowiada wynikom najmniej efektywnym a zielony wynikom najbardziej efektywnym.

Wyniki – Skaningowa Mikroskopia Elektronowa (SEM)



Obrazowanie metodą SEM wykonano dla próbek, które wykazały najbardziej efektywne wyniki w pomiarze DLS – A HEPES oraz W PBS.

Procedura przygotowania próbki oraz obrazowania SEM:

- utrwalenie – mieszanina próbki z roztworem PFA w buforze kaskodowym (w proporcji 1:1),
- dehydratacja – seria w etanolu (50%, 70%, 100%) po 5 minut.
- suszenie – odparowanie etanolu,
- napylenie – pokrycie chromem (120 s, warstwa 0,2 nm),
- obrazowanie – mikroskop: ZEISS GeminiSEM 360 (napięcie 1 kV, detektor SE2).

Uzyskane obrazy SEM są zgodne z wynikami pomiarów DLS, potwierdzając obecność dominującej populacji cząstek o rozmiarach odpowiadających egzosomom, a także wskazując na obecność większych cząstek oraz agregatów, szczególnie w próbce W PBS. Wyniki te wskazują również, iż metoda wytrącania acetonem może zapewniać łagodniejsze warunki izolacji, sprzyjające zachowaniu integralności i typowej morfologii egzosomów, również wykorzystanie buforu HEPES może pozytywnie wpływać na izolację, gdyż w próbce A HEPES nie stwierdzono obecności dużej ilości agregatów jak miało to miejsce w W PBS.

Wnioski

- I etap izolacji (wytrącanie acetonem oraz zagęszczanie przez wirowanie I) nie umożliwił wykrycia obecności egzosomów, testem Dot blot I, ze względu na zbyt duże rozcieńczenie próbki.
- II etap izolacji (rozdzielanie chromatograficzne oraz zagęszczanie przez wirowanie II) umożliwił wykrycie obecności egzosomów w uzyskanych izolatach testem Dot blot II.
- Wyniki pomiaru DLS względem objętości wykazały, iż proces izolacji egzosomów przebiegł efektywnie dla próbek W PBS, A HEPES oraz W HEPES. Jedynie próbka A PBS wykazała przeważający udział populacji o rozmiarach przewyższających rozmiary egzosomów.
- Żadna z wykorzystanych metod nie umożliwiła całkowitego usunięcia populacji cząstek o rozmiarach przewyższających literaturowe rozmiary egzosomów – będącymi agregatami oraz większymi zanieczyszczeniami.
- Podsumowując wyniki, ze wszystkich przeprowadzonych analiz, najefektywniejszy wynik izolacji egzosomów wykazały próbki przygotowane w buforze HEPES, zarówno próbki A i W. Kluczowym aspektem była zgodność wyników DLS oraz SEM, ponieważ potwierdziły (liczbowo i wizualnie) obecność dużej populacji cząstek o literaturowych rozmiarach egzosomów.
- Opisana w pracy procedura, pomimo pewnych elementów wymagających walidacji, wykazuje możliwy potencjał w badaniach nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, ze względu na swoją prostotę połączoną z opłacalnością, hybrydowym charakterem oraz w pewnym stopniu innowacyjnością.

PRZYDATNOŚĆ WYBRANYCH MATRYC DENDRYMEROWYCH W TERAPII NOWOTWORÓW

WPROWADZENIE

Nowotwory charakteryzują się niekontrolowanym wzrostem komórek, które mogą tworzyć przerzuty oraz naciekać na sąsiadujące tkanki. Choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród pacjentów na całym świecie, ponieważ pomimo postępu medycyny wciąż brakuje skutecznych terapii zapobiegających powstawaniu nowotworów i ich zwalczania. Rak płaskonabłonkowy (SCC; ang. squamous cell carcinoma) pochodzi z keratynocytów znajdujących się w warstwie kolczystej zrogowaciałego nabłonka, co powoduje, że komórki nowotworowe mogą występować na całej powierzchni skóry, ale także w przełyku, płucach, gardle, jamie nosowej, tarczycy, trzustce drogach moczowych, szyjce macicy i prostaty. SCC jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u ludzi i stanowi główną przyczynę zgonów na świecie. Nowotwór ten charakteryzuje się agresywnym przebiegiem, w którym często występują przerzuty.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie wpływu matryc poliuretanowych zawierających rokopol D450, glicydylowane dendrymery PAMAM trzeciej generacji oraz doksorubicynę (DOX) na nieśmiertelne ludzkie keratynocyty (HaCaT) oraz komórki raka płaskonabłonkowego (SCC-15).

METODYKA

- hodowla komórek linii HaCaT oraz SCC-15
- inkubacja komórek z matrycami poliuretanowymi moczonymi w różnych stężeniach DOX
- test na cytotoksyczność z fioletem krystalicznym (CV)
- obserwacja mikroskopowa komórek po inkubacji
- analiza statystyczna i opracowanie wyników

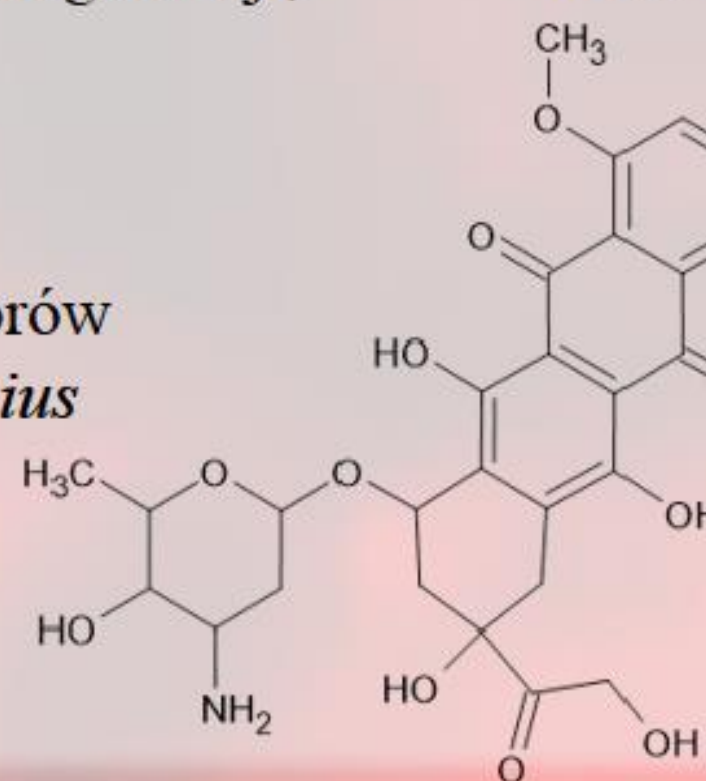
MATERIAŁY

Pianki poliuretanowe

- pianki są układami koloidalnymi
- mogą służyć jako nośniki, np. środków przeciwbakteryjnych, leków przeciwzapalnych lub znieczulających
- ich porowata powierzchnia umożliwia zwiększenie powierzchni kontaktu
- leki z pianek uwalniane są na drodze dyfuzji lub podczas degradacji, w której łańcuchy ulegają rozpadowi

Dokсорubicyna

- antybiotyk antracyklinowy, powszechnie stosowany w terapii nowotworów
- wyizolowana z grzybów *Streptomyces percutus* oraz *Streptomyces caesi*
- wielokierunkowy mechanizm działania
- wykazuje właściwości kardiotoxyczne
- dobrze przenika do komórek
- wykazuje fluorescencję na kolor czerwony

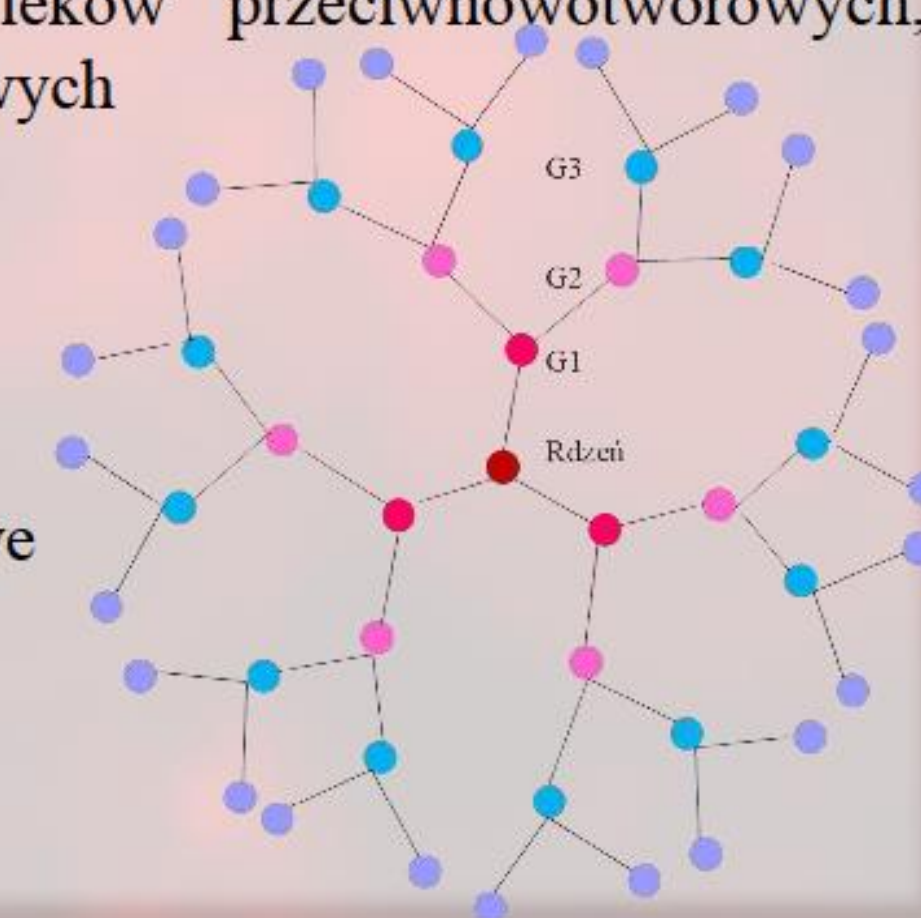


Dendrymery PAMAM

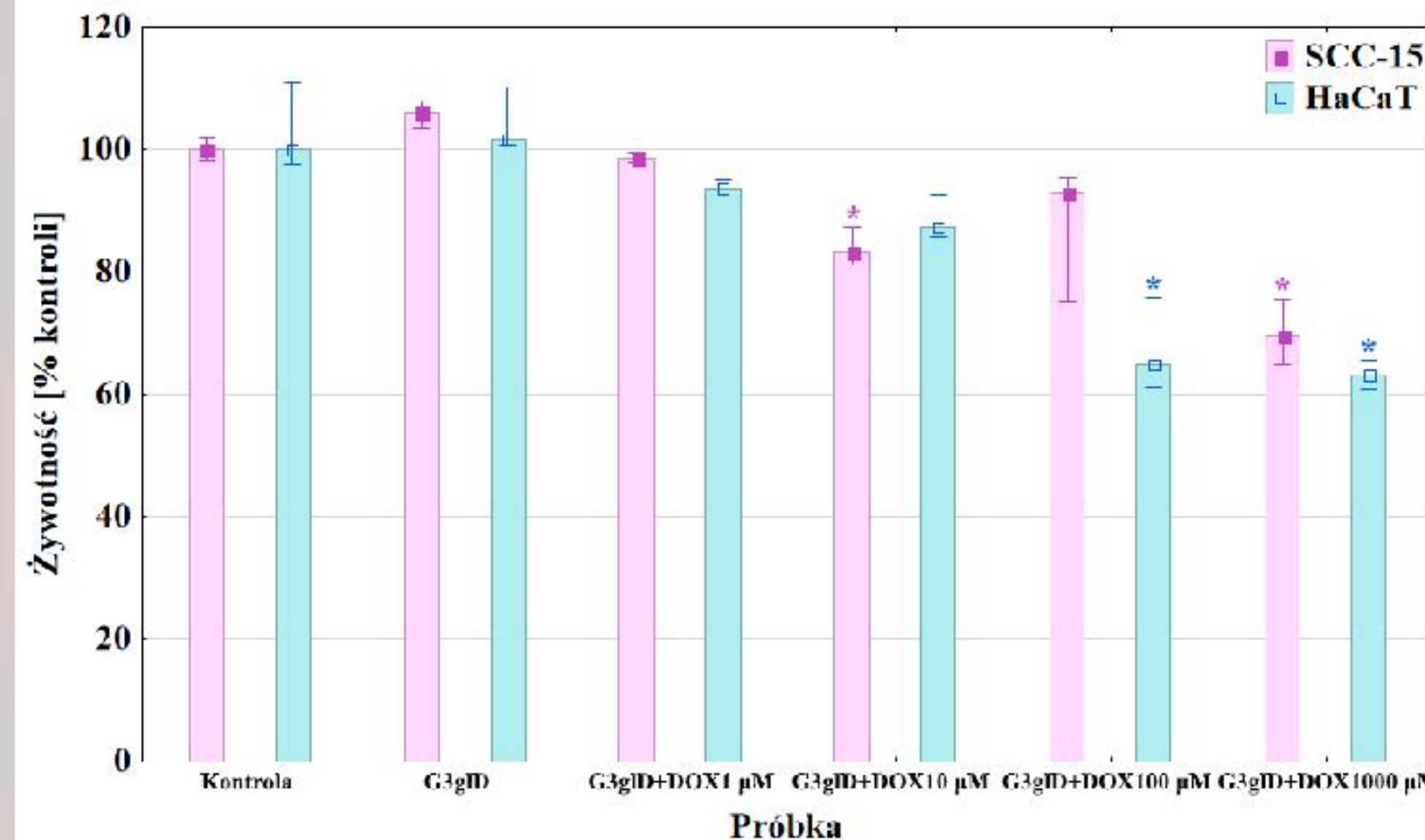
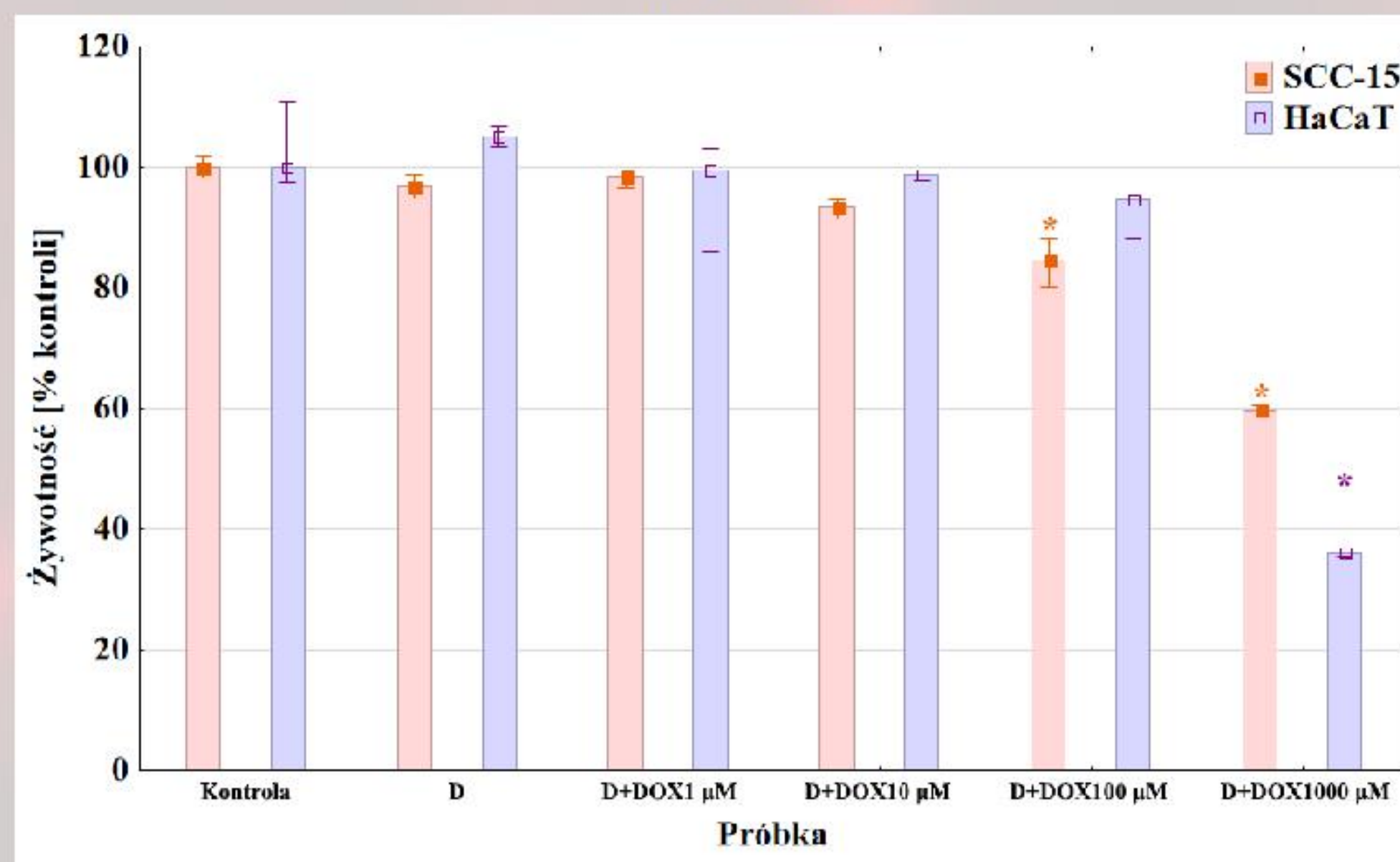
- rozgałęzione makrocząsteczki, zakończone resztami amin pierwszorzędowych
- liczba zakończeń zależy od generacji dendrymeru, im wyższa generacja, tym więcej grup powierzchniowych
- mogą być wykorzystywane jako nośniki leków przeciwnowotworowych, antygenów, szczepionek oraz kwasów nukleinowych

Budowa dendrymeru:

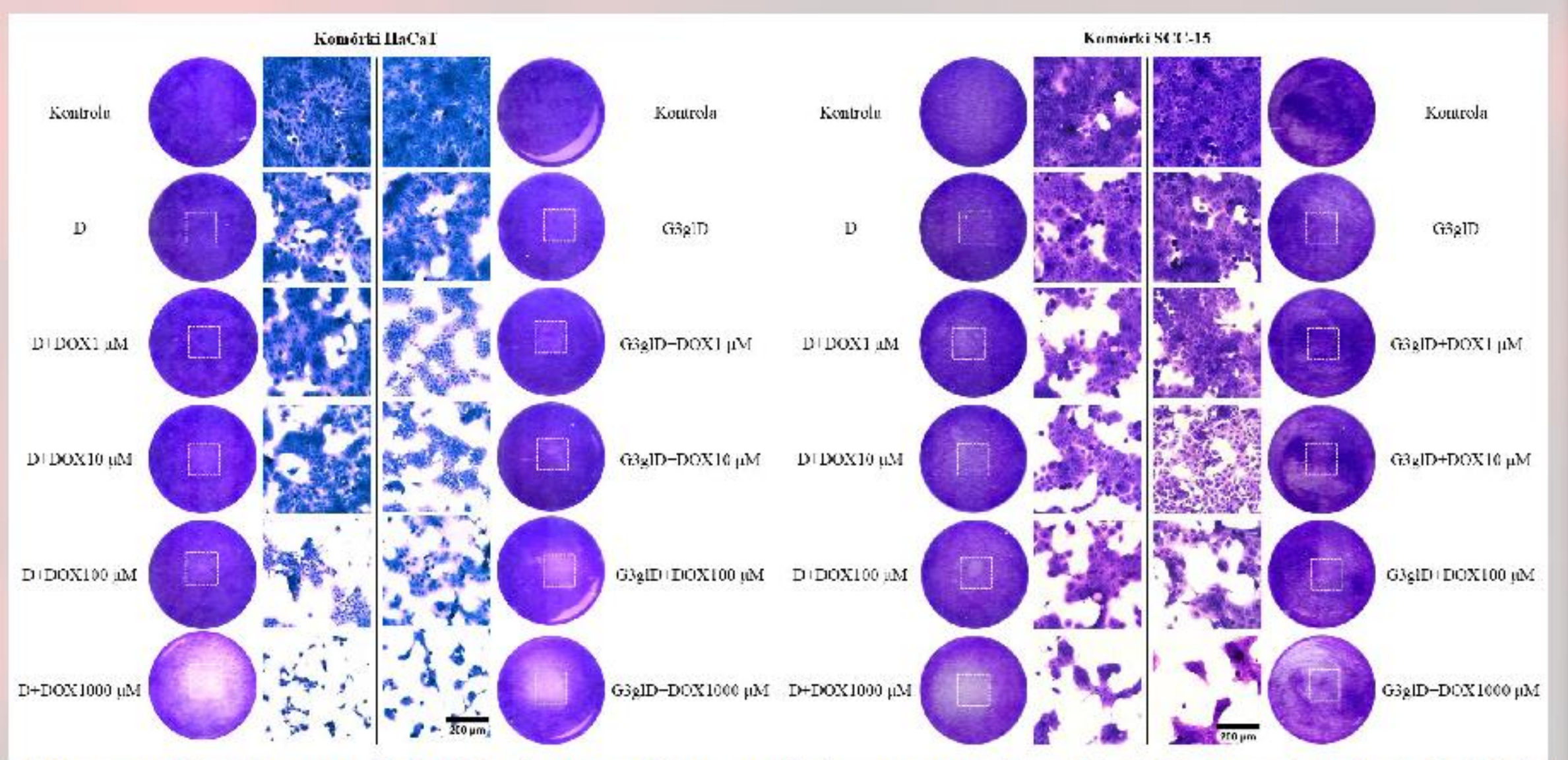
- Rdzeń inicjatora (G0)
- G1, G2 – warstwy wewnętrzne, generacje
- G3 – funkcyjne grupy powierzchniowe



WYNIKI



Wpływ matryc zawierających rokopol D450 bez/z glicydylowanym dendrymerem PAMAM G3 oraz dokсорubicyną enkapsulowaną w roztworach alkoholowych o różnych stężeniach (1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM) na toksyczność wobec do komórek SCC-15 i HaCaT po 24 godzinach inkubacji, określona przy użyciu testu z fioletem krystalicznym (CV). * p < 0.05, test Kruskala-Wallis.



Obrazy mikroskopowe ludzkich immortalizowanych keratynocytów (HaCaT) oraz komórek ludzkiego raka płaskonabłonkowego (SCC-15) barwionych fioletem krystalicznym po 24-godzinnej inkubacji z piankami poliuretanowymi z rokopolem D450, dendrymerami PAMAM trzeciej generacji oraz enkapsulowaną przez nie dokсорubicyną w różnych stężeniach (1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM).

WNIOSKI

- Badane matryce nie zawierające dokсорubicyny są nietoksyczne wobec nieśmiertelnych ludzkich keratynocytów, co oznacza, że mogą zostać wykorzystane w przyszłości jako nośniki do kontrolowanego uwalniania leków, ponieważ są biogodne wobec komórek prawidłowych
- Działanie cytotoksyczne badanych matryc jest zależne od dawki enkapsulowanej dokсорubicyny wobec komórek HaCaT oraz SCC-15
- Wprowadzenie glicydylowanego dendrymeru PAMAM trzeciej generacji nie powoduje istotnego spadku żywości komórek, co świadczy o jego biokompatybilności
- Matryce zawierające glicydylowany dendrymer PAMAM G3 oraz dokсорubicynę powodują większy spadek żywości komórek HaCaT, niż matryce bez dendrymeru

PARTNER KONKURSU

Fundacja Rozwoju Politechniki Rzeszowskiej
im. Ignacego Łukasiewicza



POSTER
MASTER