



**UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH**

**SZKOŁA DOKTORSKA**

**SEKCJA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH**

**DYSCYPLINA NAUKI BIOLOGICZNE**

**MAGDALENA AGNIESZKA LASAK**

**Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien  
PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami  
przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności  
przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach *in vitro***

**Investigation of biological properties of electrospun PL-b-CL/PVP  
nanofibers modified with nanoparticles and antibacterial  
proteins – evaluation of cytotoxic effect as well as *in vitro*  
antibacterial and anticancer activities**

**Praca doktorska napisana  
pod kierunkiem  
dra hab. Karola Cieplucha, prof. Uniwersytetu Radomskiego**

**Kielce 2025**

*Serdeczne podziękowania dla promotora pracy,  
**dra hab. Karola Cieplucha, prof. URad** za opiekę naukową,  
nieocenioną pomoc oraz wszelkie cenne rady i wskazówki,  
otrzymane na każdym etapie mojego doktoratu.*

*Podziękowania kieruję również do wszystkich, którzy przyczynili się  
do powstania niniejszej pracy doktorskiej, a zwłaszcza  
**prof. Amira Fahmi** oraz **dr. Viraja Pratapa Nirwana**  
z Rhein-Waal University of Applied Sciences,  
za możliwość współpracy naukowej, która była cennym  
doświadczeniem, a także okazaną mi życzliwość i pomoc.*

*Dziękuję **Najbliższym, Rodzicom, Rodzinie i Przyjaciółom**,  
za nieustającą wiarę we mnie i wsparcie w trudnych chwilach.*

## **SPIS TREŚCI**

|                                                                                                                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Wykaz skrótów.....</b>                                                                                                                                                                                       | <b>4</b>   |
| <b>Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....</b>                                                                                                                                          | <b>5</b>   |
| <b>Streszczenie .....</b>                                                                                                                                                                                       | <b>6</b>   |
| <b>Abstract .....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>8</b>   |
| <b>1. Wstęp .....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>10</b>  |
| <b>1.1. Nanowłókna polimerowe – innowacyjne materiały do zastosowań biomedycznych .....</b>                                                                                                                     | <b>11</b>  |
| 1.1.1. Biosensory.....                                                                                                                                                                                          | 13         |
| 1.1.2. Materiały opatrunkowe.....                                                                                                                                                                               | 14         |
| 1.1.3. Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna .....                                                                                                                                                       | 15         |
| 1.1.4. Transport związków bioaktywnych i leków .....                                                                                                                                                            | 17         |
| <b>1.2. Elektroprzędzenie, jako metoda wytwarzania nanowłókien .....</b>                                                                                                                                        | <b>22</b>  |
| <b>2. Cel pracy.....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>26</b>  |
| <b>3. Omówienie publikacji.....</b>                                                                                                                                                                             | <b>27</b>  |
| <b>3.1. Publikacja I. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix (<i>Nanomaterials</i>, 2023).....</b>                                     | <b>27</b>  |
| <b>3.2. Publikacja II. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages (<i>Macromolecular Bioscience</i>, 2024) .....</b>                                                         | <b>34</b>  |
| <b>4.5. Publikacja III. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>Nanotechnology, Science and Applications</i>, 2025) .....</b> | <b>47</b>  |
| <b>5. Wnioski końcowe .....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>57</b>  |
| <b>6. Literatura uzupełniająca .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>58</b>  |
| <b>7. Dorobek naukowy .....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>67</b>  |
| <b>KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....</b>                                                                                                                                          | <b>72</b>  |
| <b>OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI.....</b>                                                                                                                                                                | <b>121</b> |

## Wykaz skrótów

|                               |                                                                                                                                                  |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ATR-FTIR</b>               | spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. <i>Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ) |
| <b>AuNPs</b>                  | nanocząstki złota (ang. <i>gold nanoparticles</i> )                                                                                              |
| <b>CdSe QDs</b>               | kropki kwantowe selenku kadmu (ang. <i>cadmium selenide quantum dots</i> )                                                                       |
| <b>Dend-AgNPs</b>             | dendronizowane nanocząstki srebra (ang. <i>dendronized silver nanoparticles</i> )                                                                |
| <b>DLS</b>                    | dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i> )                                                                          |
| <b>DSC</b>                    | skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )                                                               |
| <b>ECM</b>                    | macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i> )                                                                                    |
| <b>FBS</b>                    | płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )                                                                                       |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | interleukina-1 beta (ang. <i>interleukin-1 beta</i> )                                                                                            |
| <b>MDR</b>                    | wielolekooporność (ang. <i>multidrug resistance</i> )                                                                                            |
| <b>NF</b>                     | nanowłókna (ang. <i>nanofibers</i> )                                                                                                             |
| <b>OM</b>                     | błona zewnętrzna (ang. <i>outer membrane</i> )                                                                                                   |
| <b>PBS</b>                    | roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )                                                                             |
| <b>PDI</b>                    | wskaźnik polidispersyjności (ang. <i>polydispersity index</i> )                                                                                  |
| <b>PL-b-CL</b>                | poli(L-laktyd-ko- $\epsilon$ -kaprolakton) (ang. <i>poly(L-lactide-co-<math>\epsilon</math>-caprolactone)</i> )                                  |
| <b>PVP</b>                    | poliwinylopirolidon (ang. <i>polyvinylpyrrolidone</i> )                                                                                          |
| <b>QDs</b>                    | kropki kwantowe (ang. <i>quantum dots</i> )                                                                                                      |
| <b>ROS</b>                    | reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> )                                                                                     |
| <b>SEM</b>                    | skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i> )                                                                   |
| <b>TEM</b>                    | transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i> )                                                             |
| <b>TGA</b>                    | analiza termogravimetryczna (ang. <i>Thermogravimetric Analysis</i> )                                                                            |

## Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

- I. Nirwan Viraj Pratap, **Lasak Magdalena**, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, *Nanomaterials*, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630.

**Punktacja MNiSW: 100**

**Impact Factor: 4.4**

- II. **Lasak Magdalena**, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, *Macromolecular Bioscience*, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513.

**Punktacja MNiSW: 100**

**Impact Factor: 4.4**

- III. **Lasak Magdalena**, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against *Pseudomonas aeruginosa*, *Nanotechnology, Science and Applications*, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942.

**Punktacja MNiSW: 200**

**Impact Factor: 4.9**

**Sumaryczna punktacja wg MNiSW: 400**

**Sumaryczny Impact Factor: 13.7**

## Streszczenie

Nanomedycyna, obecnie jako jedna z najszybciej rozwijających się dziedzin nanotechnologii oferuje nowe możliwości dla skutecznych metod leczenia wielu schorzeń, w tym chorób nowotworowych, czy też infekcji, wywoływanych przez wysoce odporne na antybiotyki bakterie. Stanowi ona nową alternatywę terapeutyczną, wobec często utrudnionej diagnostyki, czy w nie w pełni efektywnych metod leczenia. Na korzyść nanomateriałów przemawiają ich unikalne właściwości fizykochemiczne i biologiczne, wynikające głównie z ich niewielkiego nanometrycznego rozmiaru. Z drugiej jednak strony, szerokie spectrum działania oraz nie do końca poznane mechanizmy toksyczności stanowią barierę dla medycznego zastosowania nanomateriałów, a co z tym związane, wskazuje też kierunek wielu przyszłych badań. Dlatego też, elektroprzędzone polimerowe nanowłókna, jako innowacyjne nanomateriały o dużym potencjale naukowym i aplikacyjnym, skupiają obecnie uwagę wielu badaczy z różnych dziedzin, obejmując inżynierię tkankową, medycynę regeneracyjną, czy systemy kontrolowanego dostarczania leków.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowych nanomateriałów na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi oraz ocena ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych.

W skład pracy doktorskiej weszły trzy oryginalne prace badawcze opublikowane kolejno w czasopismach *Nanomaterials*, *Macromolecular Bioscience* oraz *Nanotechnology, Science and Applications*. Wszystkie nanowłókna zostały wytworzone z biokompatybilnego i biodegradowalnego kopolimeru PL-b-CL oraz PVP, a następnie zmodyfikowane wcześniej zsyntetyzowanymi nanocząstkami (CdSe QDs, AuNPs, Dend-AgNPs) i/lub białkami (endolizyną). W badaniach zastosowano szeroki zestaw metod fizykochemicznych i biologicznych, a także różne podejścia i metody modyfikacji nanowłókien, które pozwoliły na kompleksową charakterystykę opracowanych nanomateriałów oraz ocenę ich potencjału aplikacyjnego.

W Publikacji I (*Nanomaterials*, 2023) przedstawiona została procedura syntezy hybrydowych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych kropkami kwantowymi selenku kadmu (CdSe QDs) o właściwościach przeciwbakteryjnych skierowanych wobec lekoopornego *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Co jednak szczególnie istotne, opracowane nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs zmniejszały żywotność komórek

nowotworowych do ~20%, co czyni z nich bardzo obiecujące materiały przeciwnowotworowe do stosowania miejscowego.

W Publikacji II (*Macromolecular Bioscience*, 2024) ocenie poddano elektroprzędzone nanowłókna PL-b-CL/PVP sfunkcjonalizowane nanocząstkami złota (AuNPs), które wykazały wyraźną aktywność przeciwbakteryjną wobec *P. aeruginosa* PAO1, niską toksyczność komórkową wobec fibroblastów oraz nieznacznie zwiększoną immunoreaktywność, co stwarza możliwości ich zastosowania jako nowej klasy opatrunków na rany. Otrzymane nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs sprawdziły się również jako platformy do transportu środków przeciwbakteryjnych, w tym przypadku dendronizowanych nanocząstek srebra (Dend-AgNPs), które dodatkowo wzmocniły działanie przeciwbakteryjne całego nanorusztowania.

W ostatniej Publikacji III (*Nanotechnology, Science and Applications*, 2025) potwierdzono z kolei rolę nanowłókien PL-b-CL/PVP jako wydajnych nośników dla substancji terapeutycznych o właściwościach przeciwbakteryjnych, tj. Dend-AgNPs oraz białek pochodzenia bakteriofagowego (endolizyn). Nanowłókna PL-b-CL/PVP, ozdobione powierzchniowo Dend-AgNPs i endolizyną, wykazały zadowalającą aktywność przeciwbakteryjną wobec Gram-ujemnego patogenu *P. aeruginosa* PAO1, a efekt ten powiązany był z Dend-AgNPs, które zwiększając przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej, umożliwiają endolizynie trawienie bakteryjnego peptydoglikanu. Co więcej, włączenie do nanowłókien kompleksu Dend-AgNPs/endolizyna znacząco zmniejszyło jego cytotoksyczność w stosunku do ludzkich fibroblastów. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na potencjał wytworzonych nanowłókien jako innowacyjnych materiałów o właściwościach przeciwbakteryjnych.

Dzięki precyzyjnie dobranym parametrom elektroprzędzenia otrzymano cylindryczne nanowłókna o znaczącej porowatości oraz dobrej stabilności termicznej i mechanicznej, co potwierdziły wykonane analizy fizykochemiczne. Ponadto, zastosowane modyfikacje NF pozwoliły na poszerzenie ich spektrum działania i wytworzenie wielofunkcyjnych nanomateriałów, które mogą być wykorzystane, jako skuteczne rozwiązania w terapiach przeciwbakteryjnych oraz przeciwnowotworowych, co otwiera nowe możliwości w dziedzinie nanomedycyny i zastosowań biomateriałów.

**Słowa kluczowe:** elektroprzędzenie, nanowłókna, nanocząstki, endolizyna, aktywność przeciwbakteryjna, właściwości przeciwnowotworowe

## Abstract

Nanomedicine, currently one of the fastest developing fields of nanotechnology, offers new possibilities for effective methods of treating many diseases, including cancer or infections caused by highly antibiotic-resistant bacteria. It is a new therapeutic alternative to the often difficult diagnostics or not fully effective treatment methods. Nanomaterials are favored by their unique physicochemical and biological properties, mainly resulting from their small nanometric size. However, on the other hand, the wide spectrum of action and not fully understood toxicity mechanisms constitute a barrier to the medical use of nanomaterials, and therefore indicate the direction of many future studies. Therefore, electrospun polymer nanofibers, as innovative nanomaterials with great scientific and application potential, are currently the focus of many researchers from various fields, including tissue engineering, regenerative medicine, and controlled drug delivery systems.

The main aim of this doctoral thesis was to develop new nanomaterials based on electrospun PL-b-CL/PVP nanofibers modified with nanoparticles and antibacterial proteins as well as assessment of their physicochemical and biological properties.

The doctoral thesis consists of three original research papers published in the journals *Nanomaterials*, *Macromolecular Bioscience* and *Nanotechnology, Science and Applications*. All nanofibers were produced from a biocompatible and biodegradable copolymer PL-b-CL and PVP, and then modified with previously synthesized nanoparticles (CdSe QDs, AuNPs, Dend-AgNPs) and/or proteins (endolysin). The research used a wide range of physicochemical and biological methods, as well as various approaches and methods of nanofiber modification, which allowed for a comprehensive characterization of the developed nanomaterials and an assessment of their application potential.

Publication I (*Nanomaterials*, 2023) presents a procedure for the synthesis of hybrid PL-b-CL/PVP nanofibers modified with cadmium selenide quantum dots (CdSe QDs) with antibacterial properties against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. What is particularly important, the developed PL-b-CL/PVP-CdSe QDs nanofibers reduced the viability of cancer cells to ~20%, which makes them very promising anticancer materials for topical use.

In Publication II (*Macromolecular Bioscience*, 2024), electrospun PL-b-CL/PVP nanofibers functionalized with gold nanoparticles (AuNPs) were evaluated, which showed clear antibacterial activity against *P. aeruginosa* PAO1, low cellular toxicity against fibroblasts, and slightly increased immunoreactivity, which creates possibilities for their use as a new class of wound dressings. The obtained PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers also proved to be platforms

for the transport of antibacterial agents, in this case dendronized silver nanoparticles (Dend-AgNPs), which additionally enhanced the antibacterial activity of the entire nanoscaffold.

In the latest Publication III (*Nanotechnology, Science and Applications*, 2025), the role of PL-b-CL/PVP nanofibers as efficient carriers for therapeutic substances with antibacterial properties, i.e. Dend-AgNPs and bacteriophage-derived proteins (endolysins) was confirmed. PL-b-CL/PVP nanofibers, which were surface-decorated with Dend-AgNPs and endolysin, showed satisfactory antibacterial activity against the Gram-negative pathogen *P. aeruginosa* PAO1, and this effect was associated with Dend-AgNPs, which, by increasing the permeability of the outer bacterial membrane, enable endolysin to digest bacterial peptidoglycan. Moreover, the incorporation of the Dend-AgNPs/endolysin complex into nanofibers significantly reduced its cytotoxicity towards human fibroblasts. The obtained results clearly indicate the potential of the produced nanofibers as innovative materials with antibacterial properties.

Thanks to precisely selected electrospinning parameters, cylindrical nanofibers with significant porosity and good thermal and mechanical stability were obtained, which was confirmed by the performed physicochemical analyses. In addition, the applied NF modifications allowed to broaden their spectrum of action and to produce multifunctional nanomaterials that can be used as effective solutions in antibacterial and anticancer therapies, which opens up new possibilities in the field of nanomedicine and biomaterial applications.

**Keywords:** electrospinning, nanofibers, nanoparticles, endolysin, antibacterial activity, anticancer properties

## 1. Wstęp

Nanotechnologia zyskuje coraz większe znaczenie w wielu dziedzinach nauki, a zwłaszcza w medycynie i farmacji, co zaowocowało licznymi badaniami, prowadzonymi w celu opracowania efektywnych terapii leczniczych i nanoleków [1], [2]. To właśnie w nanomedycynie upatruje się rozwiązań problemów antybiotykoodporności bakterii [3], [4], [5], zwalczania wirusów [6], [7], produkcji szczepionek [6], [8], czy opracowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych [9], [10], [11]. Nie dziwi więc zatem fakt, iż z roku na rok na globalnym rynku obserwuje się zwiększoną ilość zatwierdzonych produktów nanobiomedycznych [1]. Zgodnie z danymi bazy *Nanotechnology Products Database*, dotychczas wprowadzono 1318 nanoproductów, które obejmują światowy sektor artykułów medycznych, farmacji, stomatologii, inżynierii tkankowej, protetyki i ortopedii (<https://product.statnano.com/industry/medicine>; dostęp online: 07.02.2025). Spośród nich 316 posiada certyfikat *Agencji ds. Żywności i Leków* (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) (<https://product.statnano.com/certification/fda>; dostęp online: 07.02.2025).

Nanoprodukty biomedyczne to przede wszystkim nanokryształy (np. *Ostim*<sup>®</sup>, *Vitoss*<sup>®</sup>), liposomy (np. *Doxil*<sup>®</sup>, *Marqibo*<sup>®</sup>), nanocząstki na bazie polimerów (np. *Copaxone*<sup>®</sup>, *Zilretta*<sup>®</sup>), białek (np. *Abraxane*<sup>®</sup>, *Rebinyn*<sup>®</sup>) oraz nanocząstki nieorganiczne (np. *Feraheme*<sup>®</sup>, *Dexferrum*<sup>®</sup>) [12], [13]. Na korzyść nanostruktur przemawia ich duży stosunek powierzchni do objętości, jak również możliwość modyfikacji różnymi związkami i ugrupowaniami funkcjonalnymi. Pozwala to na wydajne ładowanie substancji terapeutycznych, ich precyzyjne dostarczanie do miejsc docelowych oraz kontrolowane uwalnianie, zmniejszając tym samym możliwe działania niepożądane wobec organizmu. Cechy te sprawiają, że nanozwiązki, jawią się zatem jako obiecujące narzędzia wobec tradycyjnie stosowanych metod leczenia i diagnostyki chorób [1], [14]. Należy jednak pamiętać, iż oprócz skuteczności, wciąż pozostaje do rozważenia wiele innych kluczowych kwestii, jak np. ich cytotoksyczność, genotoksyczność oraz interakcje z układem odpornościowym [2]. Co więcej, aspekt ekonomiczny, związany z kosztami produkcji i przechowywania, także odgrywa istotną rolę w wdrożeniu nanoproductu na rynek [13], [14]. Spełnienie powyższych kryteriów jest zatem dużym wyzwaniem, co z kolei podkreśla potrzebę dalszych badań nad projektowaniem nowych nanoleków i strategii terapeutycznych opartych na nanotechnologii.

Nanomateriały polimerowe, takie jak nanowłókna (NF), ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne i biologiczne, są idealnymi kandydatami, jako materiały biomedyczne do zastosowań na szeroką skalę, w tym inżynierii tkankowej, medycynie

regeneracyjnej, implantach medycznych, systemach dostarczania leków, czy też jako materiały opatrunkowe. Dostępność różnych polimerów, zarówno naturalnych, jak i syntetycznych, w połączeniu z licznymi metodami produkcji nanowłókien, otwiera nie tylko nowe perspektywy rozwoju badań, ale może również przyczynić się do wydajniejszego transferu NF z laboratorium do ich klinicznego zastosowania.

### **1.1. Nanowłókna polimerowe – innowacyjne materiały do zastosowań biomedycznych**

Włókna nanometryczne, czyli nanowłókna, klasyfikuje się jako nanomateriały, których średnica nie przekracza 100 nm. Dostępność różnorodnych materiałów na bazie węgla, metali i ich tlenków, kompozytów oraz polimerów, które mogą zostać wykorzystane w syntezie nanowłókien, sprawiło iż zyskały one dużą popularność nie tylko w sektorze biomedycznym, ale i różnych obszarach przemysłu, jak w produkcji baterii, ogniw słonecznych, opakowań żywności, filtrów powietrza i wody, a także odzieży ochronnej [15], [16], [17].

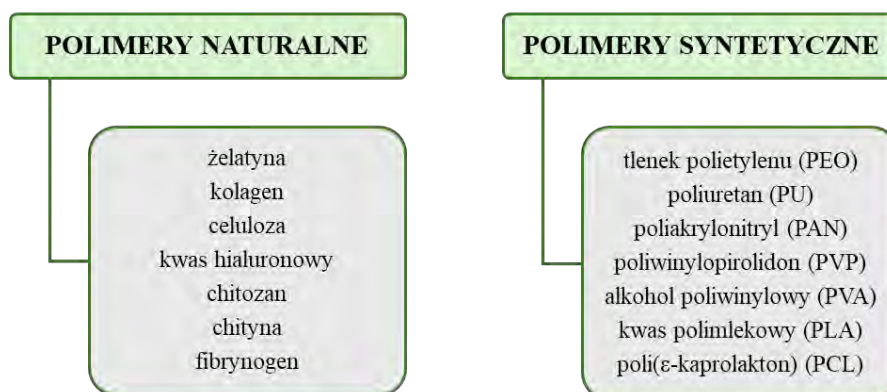
Spośród wspomnianych, na szczególną uwagę zasługują nanowłókna polimerowe, które posiadają takie cechy, jak:

- ✚ duży stosunek powierzchni do objętości,
- ✚ znaczną porowatość,
- ✚ dostosowywalne właściwości fizykochemiczne i mechaniczne,
- ✚ łatwość w funkcjonalizacji [18], [19].

Możliwość przetwarzania rozmaitych biopolimerów oraz polimerów syntetycznych w nanowłókna, w różnych dostępnych technikach ich syntezy, sprawiło że stały się one w ostatnim czasie przedmiotem zainteresowania wielu badaczy z różnych dziedzin. Na rycinie 1 przedstawiono powszechnie stosowane polimery naturalne i syntetyczne wykorzystywane w produkcji nanowłókien [19], [20].

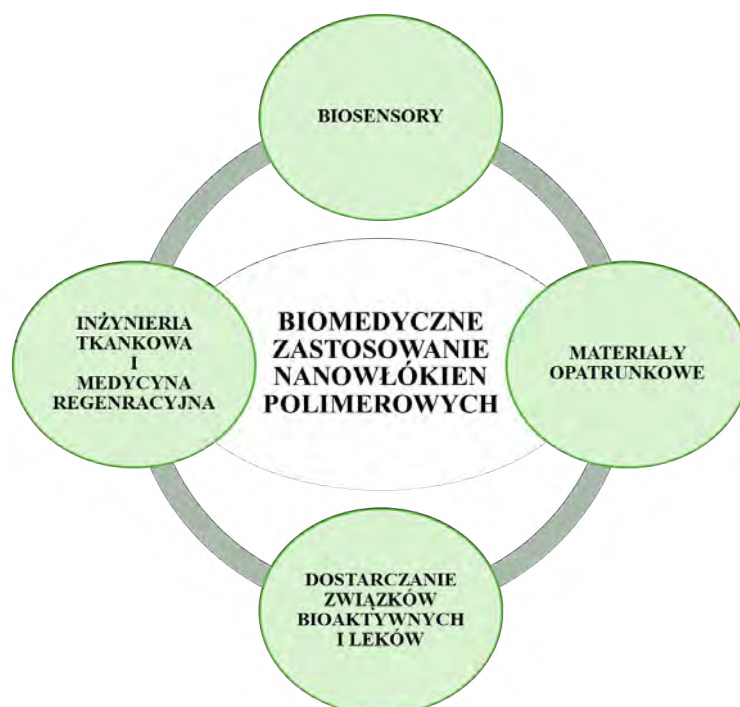
Dobór odpowiedniego polimeru jest kluczowym aspektem dla otrzymania materiału o pożądanej morfologii, odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej, stabilności termicznej, biodegradowalności oraz biokompatybilności. Prawdą jest, iż nanowłókna na bazie polimerów naturalnych wykazują lepszą biokompatybilność w porównaniu do NF syntetycznych, niemniej jednak ich słabe właściwości mechaniczne i przetwarzalność stanowi istotny problem. Co więcej, istnieje także ryzyko przeniesienia mikroorganizmów wraz z naturalnym polimerem, co jest poważnym zagrożeniem, jeśli chodzi o produkty do zastosowań biomedycznych [19], [20], [21]. Z tego też powodu, w celu wytworzenia

nanowłókien o określonej specyfikacji, podejmowane są próby mieszania ze sobą różnych polimerów [22], [23], [24], [25]. Takie podejście daje szansę wzajemnego uzupełniania się pożądanых cech polimerów oraz przezwyciężenia ich wad, co ma kluczowe znaczenie dla opracowania efektywnego i bezpiecznego materiału biomedycznego [19], [26].



Rycina 1. Wybrane polimery naturalne i syntetyczne powszechnie wykorzystywane w produkcji nanowłókien (źródło: opracowanie własne na podstawie [19], [20]).

Zastosowanie biomedyczne nanowłókien polimerowych obejmuje cztery główne obszary: inżynierię tkankową i medycynę regeneracyjną, materiały opatrunkowe, biosensory oraz transport związków bioaktywnych i leków (ryc. 2) [19], [26], co zostało szczegółowo omówione w kolejnych sekcjach tego rozdziału.



Rycina 2. Przykłady biomedycznego zastosowania nanowłókien (źródło: opracowanie własne na podstawie [19], [26]).

### 1.1.1. Biosensory

Biosensory na bazie nanowłókien wykazują znacznie większą czułość detekcji w porównaniu do konwencjonalnych bioczuJNIKÓW. Duża powierzchnia właściwa NF pozwala na wykorzystanie ich jako wydajnej platformy do immobilizacji receptorów, rozpoznających specyficzne anality, takie jak markery nowotworowe, antygeny bakteryjne, leki, hormony, czy neuroprzekazniki. Co więcej, porowata struktura membran nanowłóknistych zapewnia zwiększoną dyfuzję analitu przez warstwę czujnika, umożliwiając skuteczną analizę badanych materiałów i płynów biologicznych [27], [28]. Powszechne jest także wprowadzanie do polimerowej matrycy nanowłókien innych nanostruktur, np. nanocząstek nieorganicznych, w celu modulowania właściwości optycznych, mechanicznych, elektrycznych i termicznych nanobiosensora [29], [30].

Badane były różne typy receptorów oraz sposoby ich immobilizacji na powierzchni nanowłókien. Z powodzeniem sfunkcjonalizowano je białkami, przeciwciałami, kwasami nukleinowymi oraz aptamerami, za pomocą wiązań kowalencyjnych, metody adsorpcji, pułapkowania (inkluZji), czy też tzw. *imprintingu* [28]. Duży potencjał upatruje się szczególnie w wykorzystaniu nanowłókien w diagnostyce chorób nowotworowych [31], [32], [33] oraz infekcji bakteryjnych [28], [34]. Dla przykładu, zaprojektowany przez Fan i wsp. biosensor na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PVA/PEI (poli(alkohol winylowy/polietylenoimina), modyfikowanych kwasem foliowym (FA) sprawdził się w wychwytywaniu komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego U-87MG, wykazującego nadekspresję receptorów dla FA [33]. W innym badaniu, Kumar i wsp. potwierdzili z kolei, że włączenie do nanowłókien polimerów przewodzących, pozwala na produkcję efektywnych czujników elektrochemicznych. Opracowany przez nich czujnik PEDOT:PSS/PVA (poli(3,4-etylenodioksytyofen):poli(4-styrenosulfonian)/polialkohol winylowy) zawierający przeciwciała anti-CEA, wykazał bowiem wysoką selektywność wobec biomarkera nowotworu - antygenu karcinoembrionalnego (CEA) [32]. W detekcji bakterii sprawdzano zaś m.in. polimery o właściwościach kalorymetrycznych, jak np. PDA (polidiacetylen). Biosensor na bazie nanowłókien PDA/PU (polidiacetylen/poliuretan) został przetestowany wobec bakterii Gram-ujemnej (*Escherichia coli*) i Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus*). W wyniku interakcji PDA z fosfolipidami obserwowano zmianę koloru nanowłókien z niebieskiej na czerwoną oraz różnicę w intensywności barwy, co pozwoliło zarówno na jakościową, jak i ilościową ocenę obecności bakterii [34].

Biosensory na bazie nanowłókien polimerowych wykazują zatem duży potencjał, jeśli chodzi o opracowanie innowacyjnych urządzeń do skutecznej i szybkiej diagnostyki chorób, umożliwiając tym samym wczesną diagnozę i zwiększając skuteczność terapii.

### 1.1.2. Materiały opatrunkowe

Idealny opatrunek na rany powinien przede wszystkim stanowić ochronę przed czynnikami zewnętrznymi, zapewniać wymianę gazów, pochłaniać wysięki z rany, jak również być biokompatybilny, biodegradowalny i łatwy w aplikacji. Wśród nanomateriałów to właśnie elektroprzędzone polimerowe nanowłókna zasługują w tym przypadku na szczególną uwagę. Po pierwsze, cechują się one regulowanym stopniem porowatości, co warunkuje efektywną wymianę gazów i transport substancji odżywczych. Po drugie, ich struktura przypominająca macierz zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *extracellular matrix*) jest doskonałym mikrośrodowiskiem dla adhezji, migracji i proliferacji komórek, stymulując tym samym regenerację uszkodzonych tkanek i przyspieszając proces gojenia. Co więcej, duża powierzchnia właściwa NF może być odpowiednio modyfikowana w celu wytworzenia bioaktywnych rusztowań, co jest istotną przewagą nad tradycyjnymi opatrunkami, takimi jak bandaże, czy gazy, które tylko izolują ranę od środowiska zewnętrznego i biernie uczestniczą w procesie gojenia [35], [36], [37].

Włączanie do matrycy NF antybiotyków oraz środków przeciwdrobnoustrojowych jest obecnie jednym z głównych kierunków rozwoju innowacyjnych nanoopatrunków [36], [38], [39], [40], [41]. Rany przewlekłe oraz oparzenia stwarzają przyjazne środowisko dla rozwoju mikroorganizmów, co nie tylko utrudnia proces gojenia i negatywnie wpływa na jakość życia pacjentów, ale może także stanowić poważne zagrożenie dla ich życia [37]. Szacuje się bowiem, że infekcje są obecnie jednymi z najczęstszych powikłań po zabiegach chirurgicznych (SSI, ang. *surgical site infection*). Co więcej, wskaźniki te są szczególnie wysokie w krajach o niskich i średnich dochodach (LMICs, ang. *low- and middle-income countries*), gdzie utrzymanie sterylnych warunków jest znacznie utrudnione [42]. Wykorzystanie nanowłókien o właściwościach przeciwbakteryjnych jako miejscowego opatrunku na rany może być także lepszym rozwiązaniem w aspekcie rosnącego obecnie problemu oporności bakterii na antybiotyki. Miejscowa antybiotykoterapia umożliwia bezpośrednie dostarczenie antybiotyku w wyższym stężeniu do potencjalnego miejsca zakażenia, zmniejszając tym samym jego ogólnoustrojowe działanie [37]. Amiri i wsp. opracowali nanowłókna chitozanu i poli(tlenku etylenu) (PEO) modyfikowane teikoplaniną - antybiotykiem o działaniu bakteriobójczym

wobec Gram-dodatnich mikroorganizmów. Wykorzystanie NF jako platformy do transportu teikoplaniny, umożliwiło jej przedłużone uwalnianie przez okres 12 dni, co w efekcie skutkowało zwiększonym działaniem przeciwbakteryjnym wobec *Staphylococcus aureus*. Ponadto, testowane nanowłókna były nietoksyczne dla fibroblastów, a w testach *in vivo* na modelu zwierzęcym znacząco przyspieszały zasklepienie się rany [40]. Z powodzeniem przetestowano także przeciwbakteryjne opatrunki elektroprzędzone zawierające bakteriofagi [43], nanocząstki [44], [45], [46], [47], czy też ekstrakty i związki przeciwdrobnoustrojowe pochodzenia roślinnego [47], [48]. Innym podejściem, jest z kolei włączanie do polimerowej matrycy nanowłókien czynników wzrostu (GF, ang. *growth factor*), co pozwala przezwyciężyć problem ich degradacji przez enzymy hydrolityczne, a tym samym zwiększa stabilność GF w układach biologicznych i przyspiesza regenerację uszkodzonych tkanek [36]. Dla przykładu, nanowłókna z PLGA (poli(laktydo-ko-glikolid) zawierające ekstrakt z aloesu leczniczego (AV) i rekombinowany ludzki czynnik wzrostu naskórka (rhEGF) były badane jako opatrunek do zastosowania w leczeniu ran przewlekłych. Nanowłókna PLGA-AV-EGF cechowały się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, w tym zadowalającą wytrzymałością na rozciąganie i odpowiednią przepuszczalnością, wymaganą dla opatrunków. Ponadto stymulowały proliferację fibroblastów oraz proces zamykania rany w testach *in vivo* [49].

Synergistyczne działanie związków bioaktywnych w połączeniu z właściwościami nanowłókien daje szansę opracowania nowej klasy innowacyjnych opatrunków na rany, wykazujących m.in. właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, czy też promujące proces regeneracji uszkodzonych tkanek [36]. Takie podejście może znacząco poprawić efekty leczenia trudno gojących się ran oraz związaną z tym jakość życia pacjentów.

### **1.1.3. Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna**

Pomimo, że niektóre tkanki ludzkie mają zdolność do samoregeneracji, rozległe urazy, infekcje, czy nowotwory mogą być przyczyną poważnych uszkodzeń, z którymi organizm wciąż nie jest w stanie sobie sam poradzić [50], [51]. Skutecznych rozwiązań tego problemu upatruje się zatem w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, które są ze sobą ściśle powiązane. Podczas, gdy pierwsza z nich dąży do wykorzystania komórek, rusztowań i bioaktywnych cząsteczek w naprawie uszkodzonych tkanek oraz przywracaniu i ulepszaniu ich funkcji poza organizmem, druga z nich - medycyna regeneracyjna czerpie z jej osiągnięć w celu opracowania efektywnych strategii terapeutycznych w warunkach *in vivo* poprzez współdziałanie różnych terapii [52].

Polimerowe nanowłókna jawią się jako idealne rusztowania w inżynierii tkankowej o dużym potencjale ich przyszłego klinicznego zastosowania. Kontrolowana porowatość NF o strukturze naśladującej ECM wraz z ich dużą powierzchnią właściwą sprzyja adhezji, proliferacji i różnicowaniu komórek oraz pozwala na włączanie związków bioaktywnych promujących naprawę uszkodzonej tkanki. Co więcej, dostosowywalne właściwości mechaniczne nanorusztowań, a także możliwość doboru polimerów o odpowiedniej biokompatybilności i stopniu degradacji są kluczowymi aspektami, które przemawiają na korzyść nanowłókien [26], [53], [54]. Stąd też, nanowłókna polimerowe były badane jako rusztowania w inżynierii tkanki kostnej [55], [56], [57], [58], chrzęstnej [55], skóry [59], czy też regeneracji i naprawie uszkodzeń nerwów obwodowych [50], [54] oraz tkanek sercowo-naczyniowych [60], [61]. Dla przykładu, Bozdogan i wsp. opracowali elektroprzędzone nanowłókna na bazie polialkoholu winylowego (PVA), chitozanu (CH) i hydroksyapatytu (HA) nasączone albuminą surowicy bydlęcej (BSA) w celu leczenia pęknięć i złamań kości. Według ich głównych założeń, wykorzystanie BSA miało stymulować interakcje komórkowe oraz proliferację osteoblastów, zaś HA został zastosowany ze względu na swoje dobrze już znane właściwości osteoindukcyjne. Otrzymane wyniki potwierdziły, że nanowłókna posiadały wymaganą porowatość, były biokompatybilne, wykazywały właściwości osteoindukcyjne oraz zwiększały żywotność osteoblastów, zwłaszcza w przypadku rusztowania z najwyższą badaną zawartością BSA (0.15 % wag.) [57]. W innym badaniu, Jaswal i wsp. zaproponowali podejście polegające na wykorzystaniu nanowłókien w leczeniu nowotworu kości oraz regeneracji tkanki kostnej. W tym celu do nanowłókien PCL (polikaprolakton) włączyli 30 nm nanokulki złota (GNS) pokryte polidopaminą (PDA) oraz przetestowali ich cytotoksyczne działanie w terapii fototermicznej wobec ludzkich komórek kostniakomięsaka MG-63. Włączenie nanocząstek GNSs@PDA do matrycy nanowłókien poprawiło m.in. właściwości mechaniczne i fototermiczne całego nanokompozytu oraz jego przewodność elektryczną. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano dla nanowłókien z nanocząstkami GNSs@PDA o najwyższym testowanym stężeniu, czyli 5.0 mg, które spowodowały ablację 94% komórek nowotworowych. Co więcej, te same NF stymulowały proliferację i adhezję osteoblastów MC3T3-E1, wskazując tym samym na ich potencjał jako dwufunkcyjnych nanorusztowań do leczenia i naprawy tkanki kostnej [62]. Nanowłókna polimerowe były także z powodzeniem testowane w naprawie zerwanych i naderwanych więzadeł i ścięgien, jak np. ścięgna Achillesa [63] oraz uszkodzeń nerwów obwodowych, które to posiadają ograniczoną zdolność do samoregeneracji. Wykorzystanie polimerów przewodzących, takich jak poli(3,4-etylenodioksytyofen) (PEDOT), czy polipirol (PPy) w produkcji nanowłóknistych rusztowań, stwarza odpowiednie

mikrośrodowisko dla naprawy neuronów, zapewniając odpowiednią stabilność mechaniczną i stymulację elektryczną, kluczową dla regeneracji tkanki nerwowej i zachowania jej funkcji [54], [64]. Polimery przewodzące zyskały również popularność w regeneracji tkanek sercowo-naczyniowych. Nanowłókna przewodzące były głównie wykorzystywane do produkcji sztucznych zastawek i naczyń krwionośnych oraz rusztowań i tzw. „łatek”, stymulujących regenerację mięśnia sercowego. Materiały do tego typu zastosowań muszą nie tylko zapewniać odpowiednie właściwości elektryczne, ale także być elastyczne i wytrzymałe, aby sprostać wyzwaniom funkcjonalnym układu sercowo-naczyniowego [60]. Mousa i wsp. poprzez zmieszanie dwóch polimerów - poliuretanu (PU) i polilaktydu (PLA), uzyskali nanowłókna o odpowiedniej morfologii, stopniu degradacji i właściwościach mechanicznych, które pokryli polimerem PANI (polianilina), zwiększającym przewodność rusztowania oraz adhezję i proliferację ludzkich komórek śródbłonna EA. hy926, co ostatecznie pozwoliło otrzymać nanowłóknistą „łatkę” do regeneracji mięśnia sercowego [61].

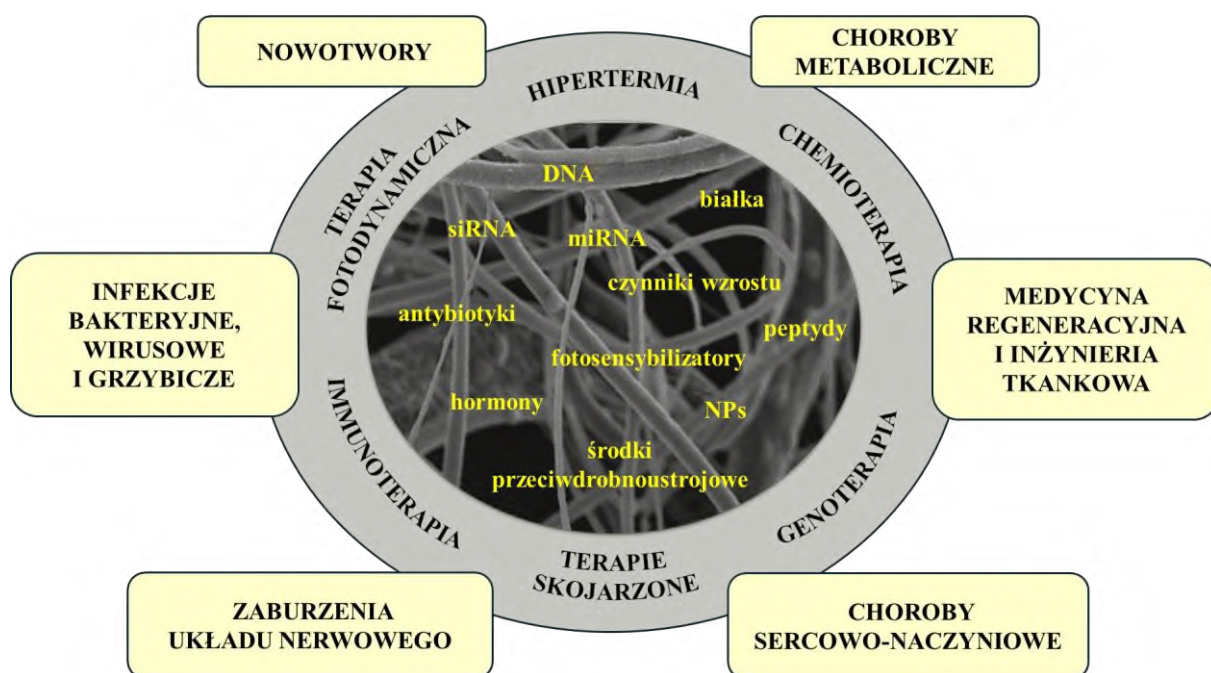
Opracowanie efektywnego i bezpiecznego rusztowania do zastosowania w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej nadal stanowi wyzwanie. Głównymi kwestiami do rozważenia wciąż pozostają biokompatybilność, biodegradowalność, porowatość, właściwości mechaniczne oraz struktura rusztowań, która w jak największym stopniu powinna odtwarzać morfologię naturalnej tkanki [26], [50], [53]. Nanowłókna polimerowe wykazują w tym przypadku największy potencjał, ponieważ mogą zapewnić odpowiednie wsparcie strukturalne dla komórek i tkanek oraz stworzyć odpowiednie mikrośrodowisko dla procesu regeneracji.

#### **1.1.4. Transport związków bioaktywnych i leków**

Nanowłókna to idealna platforma do transportu związków bioaktywnych i leczniczych, które mogą zostać wykorzystane w diagnostyce oraz leczeniu chorób, dotyczących różnych obszarów medycyny [65], [66], [67]. Opracowanie wydajnego i bezpiecznego nośnika na bazie nanowłókien wiąże się z określonymi parametrami i właściwościami, jakie NF muszą posiadać, a mianowicie odpowiednią średnicę, rozmiar porów i geometrię powierzchni. Ponadto, czynniki takie jak szybkość degradacji i skład chemiczny matrycy, a także powinowactwo transportowanych substancji oraz kompatybilność z polimerem, wpływa na ich farmakokinetykę i skuteczność terapeutyczną [9], [67], [68]. Stąd też, nanowłókna hydrofilowe powinny być stosowane z związkami hydrofilowymi, a hydrofobowe z hydrofobowymi, aby zapobiec ich możliwej agregacji i nierównomiernej dystrybucji w polimerze. Nanomateriały hydrofilowe o dużych rozmiarach porów sprawdzają się w uzyskaniu szybkiego i gwałtownego efektu uwolnienia substancji czynnej (tzw. „efekt wyrzutu”), który może być wykorzystany

w sytuacjach wymagających natychmiastowego działania terapeutycznego, jak w leczeniu bólu lub gorączki. Natomiast materiały hydrofobowe o mniejszych porach są idealne w systemach o przedłużonym uwalnianiu np. do leczenia chorób przewlekłych, aby zapewnić utrzymujące się stałe stężenie leku w organizmie [9], [69], [70]. W tym przypadku preferowane są m.in. elektroprzędzone nanowłókna typu rdzeń-powłoka o wielu warstwach wypełnionych lekiem lub z zewnętrzną warstwą, stanowiącą barierę ochronną dla kapsułkowanego w rdzeniu leku. Badane są także kombinacje, polegające na jednoczesnym stosowaniu leków hydrofilowych i hydrofobowych wraz z polimerami o takich samych właściwościach, aby uzyskać hydrofilowo-hydrofobowe nośniki o odpowiedniej dystrybucji leków i dwufazowej kinetyce uwalniania. Co więcej, NF mogą uwalniać swój ładunek terapeutyczny w zależności od zmian w środowisku fizjologicznym, jak np. nanowłókna wrażliwe na niskie pH w kwaśnym mikrośrodku guza, bądź też reagować na bodźce zewnętrzne, np. pole magnetyczne, generujące miejscowy wzrost temperatury i prowadzący tym samym do rozkładu nanowłókien wykonanych z termoczułych polimerów [9], [68], [70].

Nanowłókna polimerowe wykorzystywane są jako lokalne systemy do ukierunkowanego i kontrolowanego dostarczania związków bioaktywnych do docelowych tkanek i narządów, co zwiększa ich skuteczność terapeutyczną i ogranicza niepożądane ogólnoustrojowe działanie. Elektroprzędzone NF sprawdzają się m.in. w transporcie chemioterapeutyków, antybiotyków, czynników wzrostu, genów oraz białek, co zostało wykorzystane w leczeniu nowotworów, zakażeń bakteryjnych, terapiach genowych, immunoterapii, medycynie regeneracyjnej i wielu innych (ryc. 3) [65], [66], [67], [71], [72]. Substancje bioaktywne można kapsułkować w matrycy NF poprzez ich rozpuszczenie bądź rozproszenie w polimerze, czy też wiązać fizycznie (adsorpcja fizyczna) lub chemicznie (wiązanie kowalencyjne) z ich powierzchnią. Metoda kapsułkowania pozwala na efektywniejsze ładowanie substancji terapeutycznych oraz zmniejsza ryzyko ich degradacji w układach biologicznych. Niemniej jednak, w przypadku tej metody proces uwalniania bazuje na degradacji polimerowej matrycy, co ogranicza jej zastosowanie do materiałów biodegradowalnych. Metody chemiczne umożliwiają z kolei wytworzenie stabilnych wiązań między lekiem a powierzchnią nanonośnika, co często wiąże się z koniecznością ich chemicznego traktowania, np. środkami sieciującymi, a tym samym może wpłynąć na strukturę i funkcjonalność ładunku terapeutycznego. Najprostsza metoda unieruchomienia jest zaś adsorpcja fizyczna, związana z występowaniem słabych wiązań, jak oddziaływań hydrofobowych i hydrofilowych oraz sił van der Waalsa [67], [68].



Rycina 3. Przykłady substancji bioaktywnych transportowanych za pomocą nanowłókien oraz główne obszary medycyny wykorzystujące NF polimerowe jako nanonośniki (źródło: opracowanie własne na podstawie [65], [66], [67], [71], [72]).

Tradycyjne terapie genowe polegają głównie na wykorzystywaniu wektorów wirusowych jako nośników genów, co po mimo wysokiej wydajności transfekcji, budzi obawy ze względu na ich immunogenność. Obiecującą alternatywą są zatem wektory niewirusowe, takie jak nanowłókniste rusztowania, które mogą zostać wykorzystane jako nietoksyczne platformy do bezpośredniego dostarczania genów w celu stymulacji komórek do produkcji konkretnych białek i wywołania określonego efektu terapeutycznego [65], [66]. Dla przykładu, Li i wsp. opracowali nanowłókna do transportu plazmidowego DNA kodującego angiopoetynę-1 (pAng) – czynnik wzrostu zaangażowany w proces angiogenezy. Matryca badanych nanowłókien została wytworzona z kwasu polimlekowego (PLLA), do której włączone zostały poliedryczne oligomeryczne nanocząsteczki silseskwioxany (POSS), co pozwoliło uzyskać porowate nanowłókna o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej i przedłużonym uwalnianiu pAng do 35 dni. Ponadto, zastosowanie nośnika PLLA/POSS umożliwiło wyższą wydajność transferu genów do ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) oraz stymulowało angiogenezę i promowało proces gojenia ran oparzeniowych u szczurów [73]. Nanowłókna mogą również modulować ekspresję genów

poprzez dostarczanie fragmentów kwasów nukleinowych, np. krótkich interferujących cząsteczek RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) odpowiedzialnych za wyciszenie ekspresji określonych genów [65], [66], jak było to w przypadku nanowłókien PCL obciążonych mezoporowatymi nanocząstkami krzemionki modyfikowanymi polietylenoiminą (MSN-PEI). Początkowo kompleks siRNA/MSN-PEI został poprzez adsorpcję związany na powierzchni tych nanowłókien, co skutkowało uwalnianiem siRNA do 30 dni z „efektem wyrzutu”. Następnie oceniono wpływ zamknięcia siRNA/MSN-PEI wewnątrz rusztowań z poli(kaprolaktonu-*ko*-fosforanu trietylu) (PCLEEP). W przypadku drugiej metody zauważono przedłużone uwalnianie siRNA przez okres 5 miesięcy. Co więcej, takie podejście jest korzystniejsze, ponieważ może ograniczyć enzymatyczną degradację siRNA w układach biologicznych. Zaobserwowana zmniejszona ekspresja kolagenu typu I w ludzkich fibroblastach skórnych (HDF) oraz warunkach *in vivo*, finalnie potwierdziła funkcjonalność otrzymanego nośnika [74].

W terapiach przeciwnowotworowych elektroprzędzone nanowłókna sprawdzają się jako platformy do dostarczania genów kodujących czynniki proapoptotyczne lub siRNA tłumiącego ekspresję białek antyapoptotycznych w komórkach nowotworowych i innych specyficznych dla ich cyklu komórkowego [65], [71]. Ponadto, NF mogą służyć do transportu chemioterapeutyków, takich jak doksorubicyny, czy cisplatyny [66], [69] oraz być wykorzystywane w terapiach skojarzonych, które bazują na synergistycznym działaniu kilku metod, jak np. chemioterapii i terapii genowej [71]. Terapie skojarzone mają szczególne znaczenie w przypadku zwalczania nowotworów wykazujących zjawisko oporności wielolekowej (MDR, ang. *multidrug resistance*), bowiem wyciszenie ekspresji białek zaangażowanych w rozwój MDR, zwiększa wrażliwość komórek rakowych na działanie leków przeciwnowotworowych. Nanowłókniste rusztowania mogą zatem posłużyć jako wielofunkcyjne platformy do jednoczesnego transportu siRNA i chemioterapeutyków, w celu poprawy efektywności leczenia [71]. Należy podkreślić, że zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien w terapiach onkologicznych jest szczególnie istotne w sytuacjach, gdzie kluczowe jest bezpośrednie i precyzyjne uwalnianie ładunku terapeutycznego w miejscu guza, jak u pacjentów z guzami nieoperacyjnymi, a także po resekcji guza, w celu wyeliminowania pozostałych komórek nowotworowych i zapobieganiu ewentualnemu nawrotowi choroby [9], [71]. Warty uwagi jest również fakt, iż adaptowalność techniki elektroprzędzenia umożliwia produkcję nanowłókien dopasowanych do konkretnego pacjenta, co sprzyja rozwojowi medycyny personalizowanej. Biorąc pod uwagę zjawisko heterogeniczności guzów oraz

indywidualne cechy chorego, NF mogą bowiem zostać odpowiednio zaprojektowane, tak aby wywołać pożądane efekty terapeutyczne [1], [75].

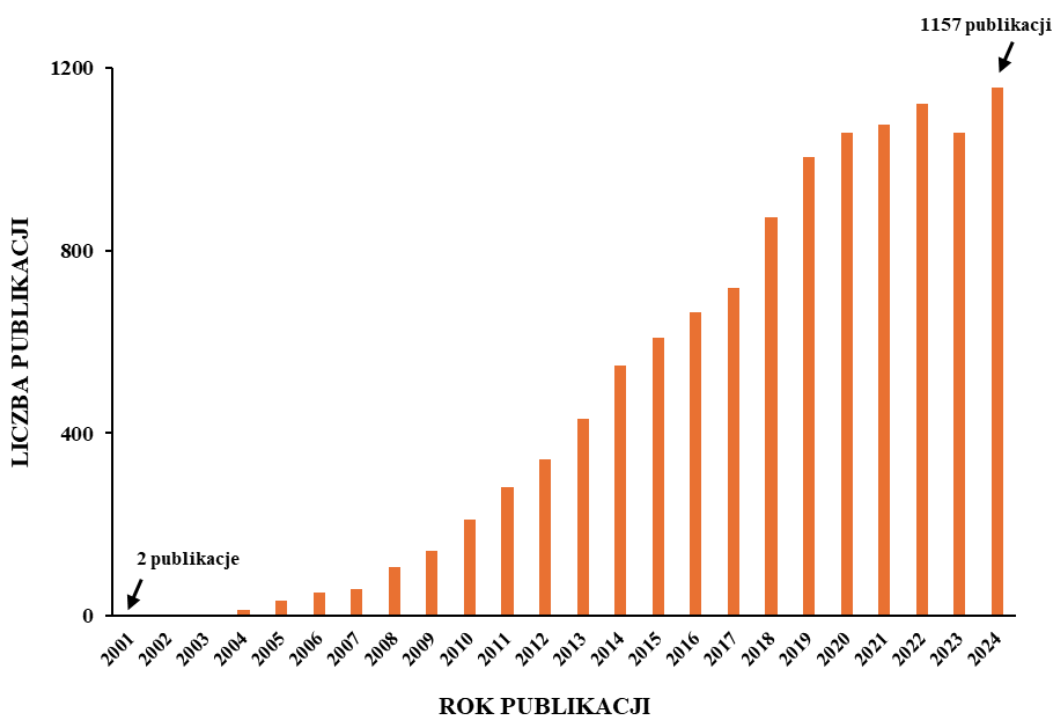
Poza tym, nanowłókna były także wykorzystywane do transportu antybiotyków, np. cyprofloksacyny, gentamycyny [66], metronidazolu [76] oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych [65], [77] w celu leczenia zakażeń bakteryjnych. Golestannejad i wsp. badali z kolei efektywność nośnika wykonanego z dobrze rozpuszczalnych w wodzie nanowłókien alkoholu poliwinylowego (PVA) do transportu środków przeciwwirusowych. Opracowany przez nich nanoplaster sprawdził się w dostarczaniu acyklowiru – leku powszechnie stosowanego w leczeniu opryszczki wargowej. Tradycyjna metoda leczenia opryszczki wargowej polega na wykorzystaniu acyklowiru w postaci kremu, co ze względu na sposób aplikacji wykazuje niską skuteczność jego dostarczania i wchłaniania oraz wymusza konieczność jego stosowania w zwiększonych dawkach. Zaproponowane podejście polegające na zastosowaniu nanowłóknistych platform pozwoliło pokonać te ograniczenia, co w efekcie złagodziło objawy infekcji wirusowej [78].

Ładowanie substancji bioaktywnych do elektroprzędzonych nanowłókien pozwala przezwyciężyć problemy związane z ich krótkim okresem półtrwania oraz ryzyko degradacji enzymatycznej, jak w przypadku czynników wzrostu, czy siRNA. Co więcej, duża powierzchnia właściwa NF przekłada się także na zwiększoną pojemność ładowania leków, które są dostarczane bezpośrednio do miejsc docelowych, zwiększając tym samym ich biodostępność i zmniejszając ich toksyczne ogólnoustrojowe działanie. Niemniej jednak, podczas włączania związków bioaktywnych do nanowłókien należy zwrócić uwagę na wiele kluczowych kwestii dotyczących właściwości fizykochemicznych NF oraz samych transportowanych substancji, aby wytworzyć wydajną i bezpieczną platformę do zastosowań farmaceutycznych i biomedycznych [65], [68], [79].

## 1.2. Elektroprzędzenie, jako metoda wytwarzania nanowłókien

Opracowano kilka technik produkcji nanowłókien, w tym synteza oparta na szablonach (ang. *template synthesis*), rozdzielanie faz (ang. *phase separation*), samoorganizacja (ang. *self-assembly*), ciągnięcie (ang. *drawing*) oraz elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*) [17], [53], [66]. Spośród nich, metoda elektroprzędzenia jest jedną z najbardziej preferowanych ze względu na opłacalność oraz możliwość szybkiej i stosunkowo prostej produkcji różnorodnych NF na szeroką skalę. Co więcej, jest to metoda wysoce powtarzalna, która pozwala na przekształcanie szerokiej gamy polimerów naturalnych i syntetycznych w włókna o średnicach od nano- do mikrometrów oraz włączanie do nich różnych środków funkcjonalnych, jak np. leków, czy nanocząstek [53], [66], [80].

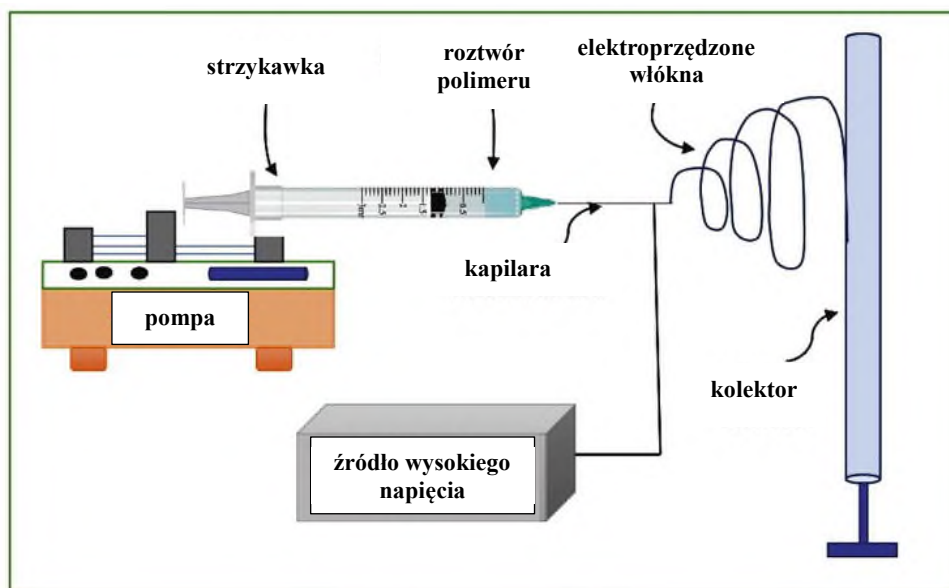
Powstające w procesie elektroprzędzenia nanowłókna mogą posiadać różnorodne formy, od gładkich, przez rozgałęzione, aż po te typu rdzeń-powłoka. Poza tym, wykazują również lepsze właściwości termiczne, mechaniczne i optyczne, co z kolei przekłada się na ich szerokie możliwości aplikacyjne [26], [66]. Unikalne cechy elektroprzędzonych NF sprawiły, iż metoda ta cieszy się coraz większą popularnością, zarówno w środowisku akademickim, jak i przemysłowym. Świadczy o tym wzrastająca w przeciągu ostatnich kilkunastu lat liczba publikacji dotycząca wykorzystania elektroprzędzenia w syntezie nanowłókien (ryc. 4).



Rycina 4. Liczba publikacji opublikowanych w latach 2001-2024 dotyczących wykorzystania metody elektroprzędzenia w produkcji nanowłókien (źródło: *PubMed*, słowo kluczowe: *electrospinning of nanofibers*) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Dążenie do opracowania materiałów o pożądanych cechach i zwiększenia wydajności procesu elektroprzędzenia doprowadziło do rozwoju różnych modyfikacji tej metody. Wyróżnia się zatem elektroprzędzenie współosiowe (ang. *coaxial electrospinning*), emulsyjne (ang. *emulsion electrospinning*), strumieniem gazu (ang. *gas jet electrospinning*), czy też rozdmuchu stopionych polimerów (ang. *melt blowing*) [53], [66]. Najprostszą techniką jest elektroprzędzenie mieszane (ang. *blend electrospinning*), które polega na rozpuszczeniu polimeru przy użyciu rozpuszczalnika i bezpośrednim wymieszaniu roztworu np. z środkiem terapeutycznym. Mieszanie pozwala na równomierne obciążenie matrycy nanowłókien danym związkami, niemniej jednak wykorzystywane w tej metodzie rozpuszczalniki (np. etanol, chloroform, dichlorometan) to przeważnie substancje toksyczne, co wymusza konieczność zachowania szczególnej ostrożności oraz ich precyzyjnego doboru. Wybór rozpuszczalnika oraz szybkość i stopień jego odparowania jest jednym z kluczowych czynników wpływających na morfologię wytwarzanych nanowłókien oraz możliwość ich biomedycznego zastosowania [19], [26], [66].

Najprościej ujmując, proces elektroprzędzenia polega na przekształcaniu roztworu ciekłego polimeru w nanowłókna na skutek działania sił elektrostatycznych generowanych przez źródło wysokiego napięcia. Typowy sprzęt do elektroprzędzenia składa się z pompy, dyszy przędzalniczej (kapilary), źródła wysokiego napięcia, dwóch elektrod i kolektora, które mogą być ułożone w konfiguracji pionowej lub poziomej. System ten znajduje się w kabinie, której warunki, takie jak wilgotność i temperaturę można w łatwy sposób kontrolować [65], [66]. Na rycinie 5 przedstawiono typowy układ poziomy do elektroprzędzenia wraz z jego głównymi elementami.



Rycina 5. Podstawowa konfiguracja układu do elektroprzędzenia (źródło: [80]).

Podczas elektroprzędzenia roztwór polimeru jest wprowadzany do strzykawki i przepuszczany z określoną prędkością przez dyszę przędzalniczą za pomocą pompy. Pozwala to kontrolować szybkość przepływu polimeru oraz prowadzi do utworzenia kropli roztworu na końcu kapilary. Przyłożone do dyszy przędzalniczej wysokie napięcie powoduje gromadzenie się ładunków elektrycznych na powierzchni roztworu polimeru i powstawanie sił elektrostatycznych. Kształt kropli roztworu ulega zniekształceniu, formując tzw. stożek Taylora. W momencie przewyciężenia sił napięcia powierzchniowego cieczy przez siły elektrostatyczne, następuje wyrzut strumienia roztworu ze stożka w kierunku uziemionego kolektora, na którym następnie osadzone zostają nanowłókna [53], [54], [65], [77].

Elektroprzędzenie jest popularną techniką produkcji funkcjonalnych włókien nanometrycznych, których strukturę oraz morfologię można w łatwy sposób modulować poprzez odpowiednie dostosowanie właściwości roztworu przędzalniczego, parametrów związanych z aparaturą oraz czynników środowiskowych [9], [17], [19], [66], [80], [81], co zostało szczegółowo omówione w Tabeli 1.

Technika elektroprzędzenia jest jedną z najbardziej popularnych metod wytwarzania nanowłókien o pożądanej morfologii i zwiększonej powierzchni funkcjonalnej, co czyni je atrakcyjnymi kandydatami do zastosowań biomedycznych, w tym produkcji opatrunków na rany, rusztowań tkankowych, platform do dostarczania leków, biosensorów i wielu innych [19], [66], [80]. Co więcej, elektroprzędzenie wykazuje duży potencjał do zastosowań w skali przemysłowej ze względu na swoją prostotę, aspekt ekonomiczny oraz powtarzalność i elastyczność procesu. Niemniej jednak, kwestie takie jak niestabilność strumienia mogą stanowić problemem podczas elektroprzędzenia [19], [66], [77]. Dlatego też tak ważne są dalsze badania, pozwalające na optymalizację warunków procesu i opracowanie odpowiednich protokołów, wykorzystywanych w produkcji polimerowych nanowłókien.

Tabela 1. Główne parametry wpływające na morfologię NF wywarzanych metodą elektroprzędzenia\*

| PARAMETRY                                                                                                 | WPLYW NA MORFOLOGIĘ WŁÓKIEN                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PARAMETRY ROZTWORU PRZĘDZALNICZEGO</b>                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| NATURA POLIMERU <ul style="list-style-type: none"> <li>• STĘŻENIE</li> <li>• MASA CZĄSTECZKOWA</li> </ul> | W miarę wzrostu stężenia i masy cząsteczkowej polimeru, średnica tworzonych włókien ulega zwiększeniu. Z kolei zbyt niskie stężenie i masa cząsteczkowa sprzyja tworzeniu włókien z uwypukleniami tzw. „koralikami”.                               |
| PRZEWODNOŚĆ ROZTWORU                                                                                      | Zwiększona przewodność roztworu powoduje powstawanie jednorodnych włókien o mniejszych średnicach.                                                                                                                                                 |
| LEPKOŚĆ ROZTWORU                                                                                          | Niska lepkość sprzyja powstawaniu włókien z „koralikami”. Zbyt wysoka powoduje tworzenie się grubych włókien oraz może prowadzić do zatrzymywania polimeru na końcu kapilary i jej zatykania.                                                      |
| LOTNOŚĆ ROZPUSZCZALNIKA                                                                                   | Zastosowanie lotnych rozpuszczalników sprzyja ich szybkiemu odparowaniu podczas elektroprzędzenia, co zwiększa porowatość włókien. Zbyt lotne rozpuszczalniki mogą jednak powodować wysychanie strumienia oraz prowadzić do zablokowania kapilary. |
| <b>PARAMETRY APARATUROWE</b>                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| ODLEGŁOŚĆ MIĘDZY KAPILARĄ A KOLEKTOREM                                                                    | Zwiększenie odległości zwiększa czas potrzebny na rozciąganie polimeru między kapilarą a kolektorem, co skutkuje powstaniem cieńszych włókien o zmniejszonych średnicach.                                                                          |
| SZYBKOŚĆ PRZEPŁYWU                                                                                        | Wraz z zwiększaniem szybkości pompowania roztworu zwiększa się średnica włókna, jednakże w sytuacji bardzo szybkiego przepływu może indukować tworzenie się „koralików”.                                                                           |
| PRZYŁOŻONE NAPIĘCIE                                                                                       | Wyższe napięcie powoduje powstawanie cieńszych włókien, jednak jego zbyt wysokie wartości sprzyjają powstawaniu „koralików”.                                                                                                                       |
| <b>PARAMETRY ŚRODOWISKOWE</b>                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| TEMPERATURA OTOCZENIA                                                                                     | Wyższa temperatura powoduje szybsze odparowanie rozpuszczalnika, co prowadzi do zmniejszenia lepkości roztworu i powstania cieńszych włókien o zmniejszonej średnicy.                                                                              |
| WILGOTNOŚĆ POWIETRZA                                                                                      | Wysoka wilgotność indukuje powstawanie grubszych włókien.                                                                                                                                                                                          |

\*źródło: opracowanie własne na podstawie [9], [17], [19], [66], [80], [81]

## 2. Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było **opracowanie nowych nanomateriałów na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi oraz ocena ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych**. Cel ten osiągnięto poprzez realizację poniższych celów szczegółowych:

- 1) wytworzenie nanomateriałów, za pomocą elektroprzędzenia oraz przeprowadzenie ich odpowiedniej modyfikacji, zmierzających do opracowania poszczególnych nanowłókien:
  - PL-b-CL/PVP-CdSe QDs
  - PL-b-CL/PVP-AuNPs
  - PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs
  - PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs + endolizyna
- 2) wykonanie kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych nanowłókien;
- 3) wskazanie możliwości aplikacyjnych opracowanych nanomateriałów na podstawie oceny ich właściwości biologicznych, tj. przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych oraz cytotoksycznych.

### 3. Omówienie publikacji

Podstawę niniejszej pracy doktorskiej stanowi cykl publikacji, w skład którego weszły trzy oryginalne prace badawcze opublikowane w czasopismach naukowych z listy ministerialnej. We wszystkich pracach ocenie poddano nanowłókna przygotowane metodą elektroprzędzenia, których matryca została wykonana z biokompatybilnego i biodegradowalnego kopolimeru PL-b-CL (poli(L-laktyd-ko- $\epsilon$ -kaprolakton) oraz PVP (poliwinylopirolidon), który wykorzystano jako środek współprzędzący w celu poprawy efektywności procesu elektroprzędzenia. Dla wszystkich nanowłókien zastosowano takie same parametry elektroprzędzenia (Tabela 2).

Tabela 2. Parametry elektroprzędzenia zastosowane podczas syntezy nanowłókien

| Waga [g] |      | Napięcie [kV] | Przepływ [mL h <sup>-1</sup> ] | Temperatura [°C] | Wilgotność [%] |
|----------|------|---------------|--------------------------------|------------------|----------------|
| PL-b-CL  | PVP  |               |                                |                  |                |
| 0.85     | 0.21 | 12            | 0.8 – 1                        | 16               | 85             |

#### 3.1. Publikacja I. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix (*Nanomaterials*, 2023)

Rozprawę doktorską otwiera publikacja pt. „Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix” (*Nanomaterials*, 2023). W pracy tej przedstawiono **procedurę syntezy hybrydowych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych kropkami kwantowymi selenku kadmu (CdSe QDs) oraz dokonano charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej otrzymanych nanomateriałów, wskazując na ich potencjał aplikacyjny jako materiałów o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych.**

#### Materiały i metody

##### *Materiały*

- octan kadmu i proszek selenu (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy), NaBH<sub>4</sub> (Sigma Aldrich) – wykorzystane do syntezy CdSe QDs
- PL-b-CL (kopolimer L-laktydu i  $\epsilon$ -kaprolaktonu) (70:30) (Mw-200 kg) (Purasorb<sup>®</sup>, Corbion, Holandia) - wykorzystany w syntezie matrycy nanowłókien

- PVP (Mw-250 kg) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy) – wykorzystany w syntezie CdSe QDs oraz matrycy nanowłókien
- rozpuszczalniki analityczne: etanol, chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy)

#### ***Linie komórkowe***

- BEAS-2B (ang. *human bronchial epithelial cells*) - ludzkie komórki nabłonka oskrzeli (ATCC CRL-9609) hodowane w pożywce LHC-9 (Gibco)
- A549 (ang. *human lung cancer epithelial cells*) - ludzkie komórki raka płuc (CCL-185) hodowane w pożywce F-12K (Corning) uzupełnionej 10% FBS i 1% mieszaniną penicyliny/streptomycyny (Corning).

#### ***Szczep bakteryjny***

- *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (ATCC 15692) – pochodzący z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej UJK

#### ***Metody***

- Synteza CdSe QDs stabilizowanych *in situ* PVP** - została przeprowadzona zgodnie z opisaną wcześniej procedurą [82] w laboratorium na uniwersytecie Rhein-Waal University of Applied Sciences (Niemcy).
- Synteza nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych CdSe QDs** – kropki kwantowe zostały unieruchomione w matrycy nanowłókien poprzez bezpośrednie zmieszanie roztworu polimerów z zawiesiną QDs i następnie poddanie ich elektroprzędzeniu.
- Charakterystyka fizykochemiczna**
  - Kropki kwantowe CdSe** – ocena morfologii (TEM i DLS) oraz właściwości spektroskopowych z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis i fluorescencyjnej.
  - Nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs** – analiza morfologii (SEM), składu chemicznego (AFT-FTIR) oraz właściwości termicznych (TGA, DSC).
- Charakterystyka biologicznych nanowłókien**
  - Ocena aktywności przeciwbakteryjnej wytworzonych nanowłókien** – w badaniach mikrobiologicznych zastosowano szczep bakteryjny *P. aeruginosa* PAO1; działanie przeciwbakteryjne oceniono spektrofotometrycznie stosując test gęstości optycznej (OD600) oraz pomiar poziomu produkcji dwóch barwników: piocyjaniny i piowerdyny.
  - Ocena cytotoksyczności badanych nanowłókien** – cytotoksyczne działanie nanowłókien oceniono wobec nienowotworowej linii komórkowej BEAS-2B oraz

nowotworowej A549, stosując test żywotności komórek MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric) (abcam).

#### 4.3. Ocena wpływu nanowłókien na proliferację komórek nowotworowych

– została przeprowadzona poprzez wizualną obserwację mikroskopową komórek A549 traktowanych NF przez okres 72 h.

W tym badaniu, CdSe QDs zostały syntetyzowane *in situ* PVP, który wykorzystano jako środek stabilizujący. Należy zaznaczyć, że powszechnie stosowane ligandy stabilizujące QDs to z reguły substancje toksyczne, dlatego też, tutaj zaproponowano podejście polegające na wykorzystaniu biokompatybilnego polimeru. Efektywność przeprowadzonej syntezy została potwierdzona za pomocą TEM, której mikrofotografie wykazały obecność warstwy polimeru wokół nanocząstek. Co więcej, zapewniło to większą kontrolę nad rozmiarem nanocząstek oraz zapobiegało ich agregacji, o czym świadczy otrzymany wskaźnik polidispersyjności (PDI) wynoszący 0.27. Ponadto, otrzymane QDs wykazywały silne zachowanie fotoluminescencyjne (Ex/Em= 290/580 nm), co potwierdza ich możliwość zastosowania jako biosensorów. W Tabeli 3 przedstawiono dane dotyczące rozmiarów uzyskanych QDs.

Tabela 3. Właściwości otrzymanych CdSe QDs

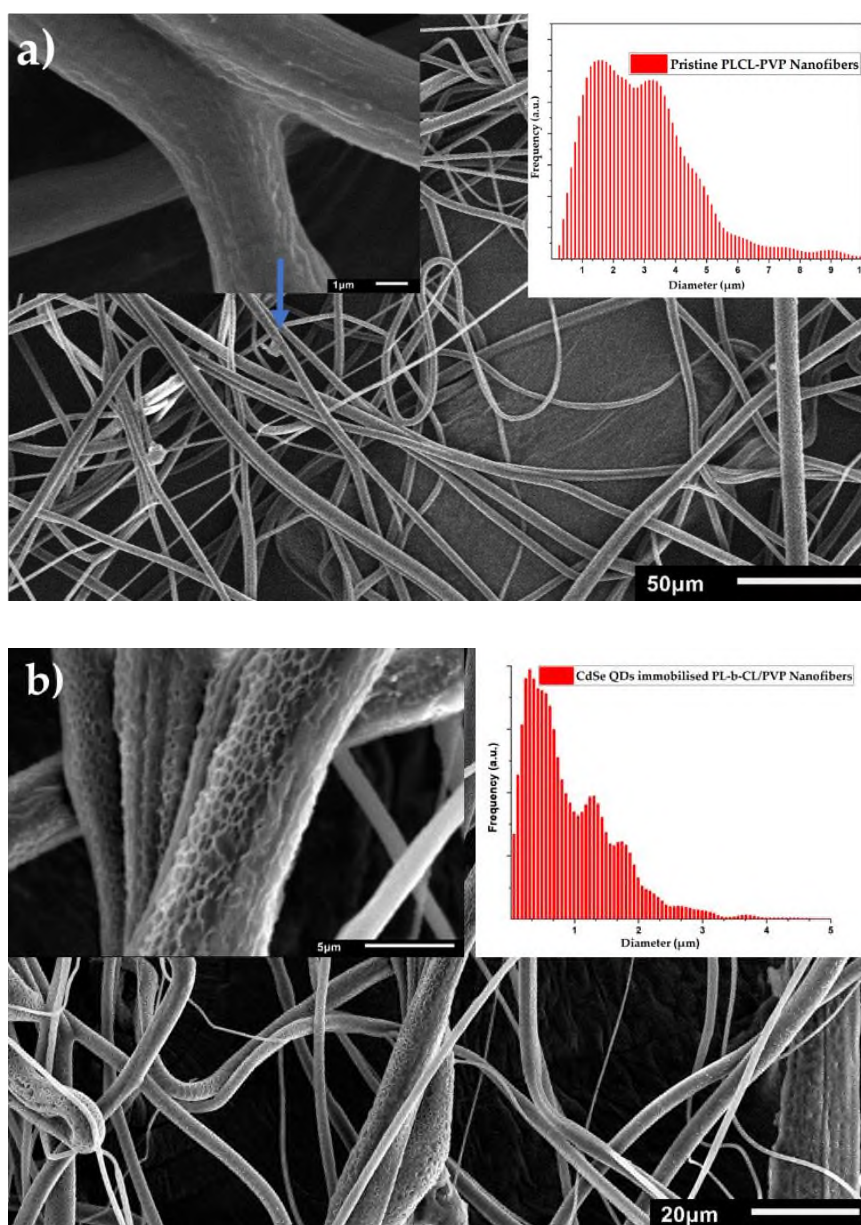
| Średnica CdSe QDs         |                                     | Wskaźnik PDI** |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Średnia średnica rdzenia* | Średnia średnica hydrodynamiczna ** |                |
| 6 ± 4 nm                  | 23 ± 7 nm                           | 0.27           |

\*na podstawie ImageJ program, \*\*na podstawie danych DLS

W kolejnym etapie przeprowadzono syntezę nanowłókien. W tym celu, zawiesinę CdSe QDs bezpośrednio zmieszano z mieszaniną roztworu polimerów PL-b-CL oraz PVP, którego zastosowanie przyczyniło się do poprawy stabilności i efektywności procesu elektroprzędzenia. Co więcej, wykorzystanie tego samego polimeru, co w syntezie nanocząstek ułatwiło związanie QDs z matrycą PL-b-CL/PVP oraz zapewniło ich równomierny rozkład w nanowłóknach.

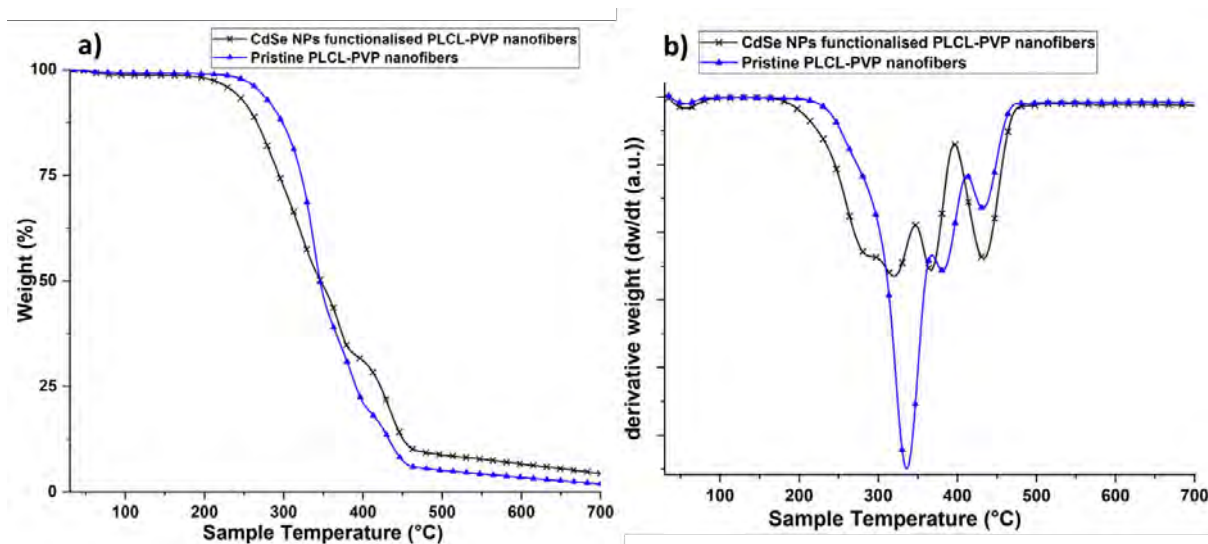
Następnie NF poddano ocenie morfologicznej, z wykorzystaniem SEM, która wykazała otrzymanie cylindrycznych, porowatych nanowłókien, bez „koralików” (rycina 6), co było rezultatem elektroprzędzenia w wysokiej wilgotności i niskiej temperaturze. Takie

warunki były konieczne, aby zapobiec szybkiemu odparowaniu rozpuszczalnika z dyszy przędzalniczej i zestaleniu polimeru. Należy również zaznaczyć, iż porowatość NF jest istotnym czynnikiem, który sprzyja adhezji komórek oraz zwiększa dostępną powierzchnię, co przekłada się z kolei na zwiększoną aktywność całych nanorusztowań i włączonych do nich nanocząstek. Zaobserwowano także, że włączenie nanocząstek do nanowłókien skutkowało dwukrotnym zmniejszeniem ich średnicy, co mogło wynikać ze zmiany przewodności, lepkości i napięcia powierzchniowego roztworu podczas elektroprzędzenia, na skutek oddziaływania kropek kwantowych z matrycą.



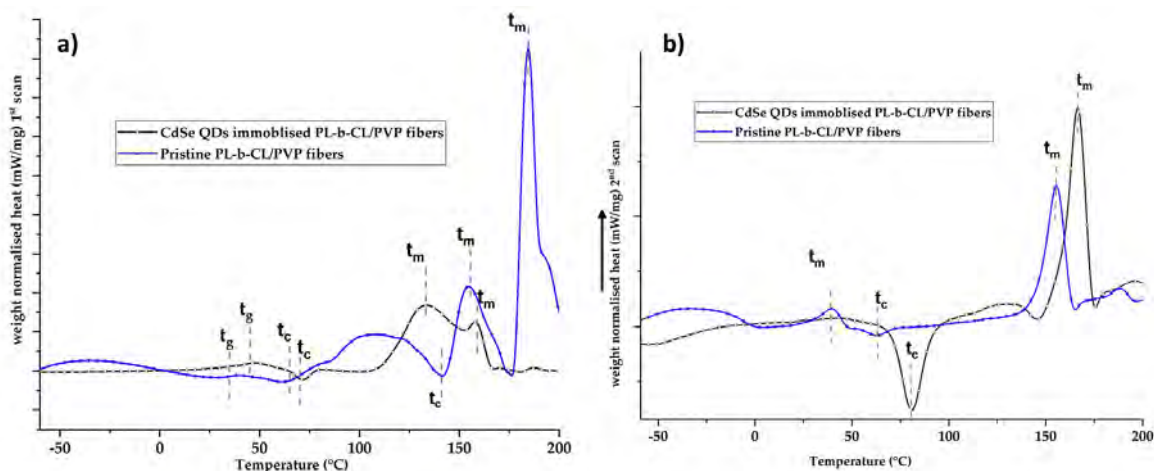
Rycina 6. Mikrofotografie SEM ukazujące morfologię elektroprzędzonych nanowłókien, rozkład ich średnic (wstawka po prawej) oraz powiększony widok przedstawiający szorstkie/porowate powierzchnie włókna (wstawka po lewej); a) nanowłókna PL-b-CL/PVP; b) nanowłókna PL-b-CL/PVP z unieruchomionymi kropkami kwantowymi CdSe.

Analiza ATR-FTIR wykazała z kolei niewielkie zmiany w widmach absorpcji pomiędzy nanowłóknami PL-b-CL/PVP a PL-b-CL/PVP-CdSe QDs, z zachowaniem niezmiennego charakterystycznego obszaru daktyloskopowego dla polimerów (ang. *fingerprint region*) zarówno przed, jak i po włączeniu nanocząstek. Unieruchomienie QDs w matrycy polimerowej sprzyjało zatem słabym interakcjom między ugrupowaniami organicznymi i nieorganicznymi. Kolejno, wykorzystując analizę termograwimetryczną (TGA) oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) potwierdzono bardzo dobrą stabilność termiczną otrzymanych nanowłókien. Jak pokazano na rycinie 7, badane NF posiadały trzystopniowy profil degradacji, co wynikało z zastosowania wieloskładnikowego roztworu do elektroprzędzenia. Co więcej, dane uzyskane po analizie TGA dla niemodyfikowanych i modyfikowanych NF wykazały, iż ich degradacja nastąpiła dopiero przy 280°C oraz 304°C, co było początkiem degradacji, odpowiednio dla nanowłókien PL-b-CL/PVP-CdSe QDs oraz PL-b-CL/PVP. Zaobserwowana nieco niższa początkowa temperatura ubytku masy dla nanowłókien z kropkami kwantowymi, wynikać mogła z zachowania CdSe QDs, które w tym przypadku działały jak punkty grzewcze, prowadząc do obniżenia temperatury początku degradacji, a także opóźnienia temperatury końca degradacji do 429°C (dla nanowłókien PL-b-CL/PVP to 384°C). Ponadto, nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs charakteryzowały się mniejszym ubytkiem procentowym masy (91.6 %) w porównaniu do PL-b-CL/PVP (98.3%).



Rycina 7. Analiza termograwimetryczna (a) i termograwimetryczna krzywa różniczkowa (DTG) (b) niemodyfikowanych i modyfikowanych kropkami kwantowymi nanowłókien PL-b-CL/PVP, pokazująca ich profil degradacji masy oraz wpływ unieruchomienia kropek kwantowych CdSe na stabilność termiczną nanowłókien.

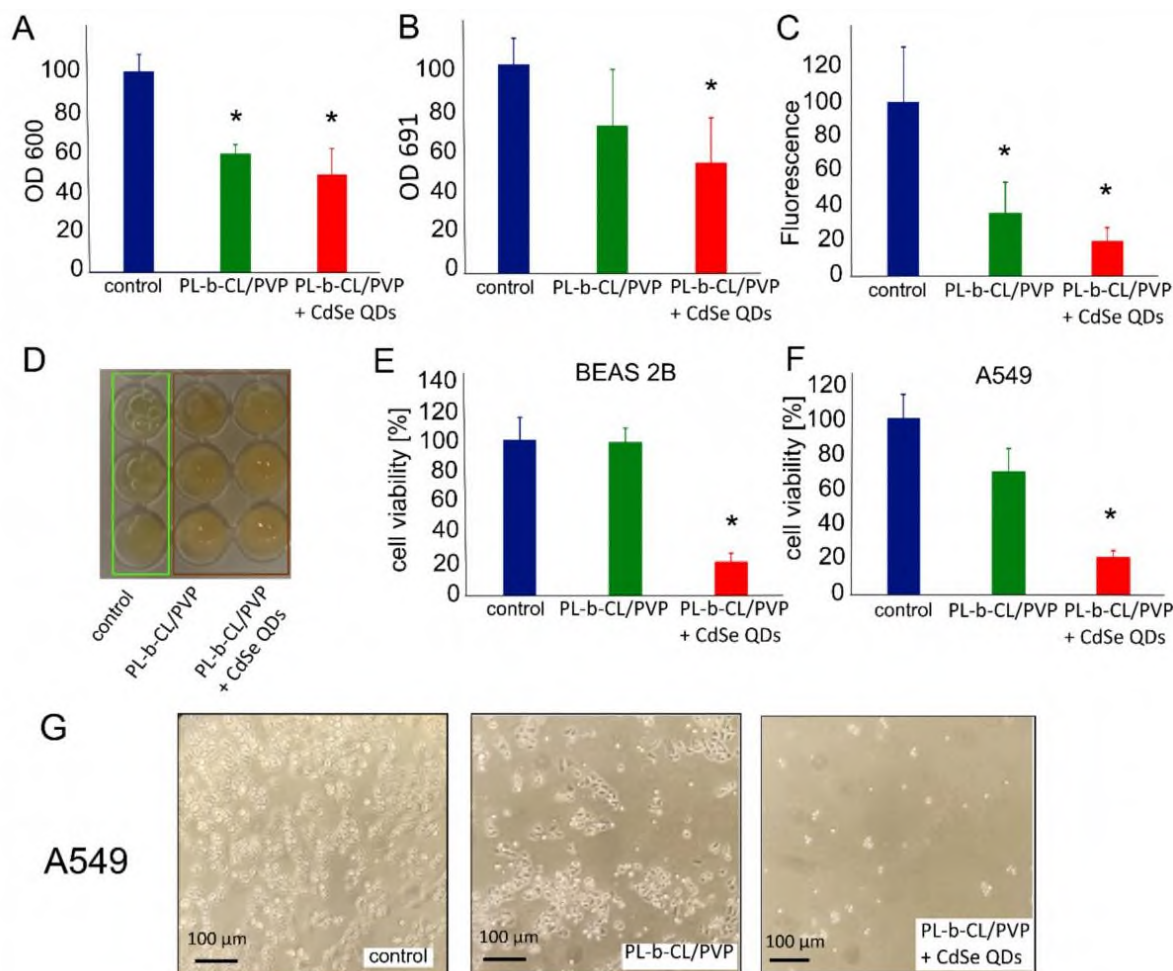
Dalszą charakterystykę właściwości termicznych przeprowadzono za pomocą metody DSC, którą wykorzystano do analizy przemian fazowych zachodzących w nanowłóknach podczas ich nagrzewania. Wykazała ona stosunkowo skomplikowane zachowanie nanowłókien z wieloma pikami topnienia i krystalizacji (rycina 8). Niemniej jednak, ostateczna analiza uzyskanych danych potwierdziła, że włączenie do matrycy polimerowej QDs zwiększa amorficzność nanowłókien PL-b-CL/PVP.



Rycina 8. Krzywa DSC niemodyfikowanych i modyfikowanych kropkami kwantowymi CdSe nanowłókien PL-b-CL/PVP, wykazująca różnice w zachowaniu zmiany fazy ( $T_g$ ,  $T_m$ ) ze względu na obecność kropek kwantowych i interakcję z kopolimerem PL-b-CL; (a) skan po pierwszym cyklu ogrzewania; (b) skan po drugim cyklu ogrzewania;  $t_g$  – temperatura zeszklenia;  $t_c$  – temperatura krystalizacji;  $t_m$  – temperatura topnienia.

Kolejny etap badań obejmował charakterystykę biologiczną wytworzonych nanomateriałów, w tym ocenę ich właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych. Testy antybakteryjne wykazały, że badane nanowłókna, a zwłaszcza PL-b-CL/PVP-CdSe QDs wyraźnie hamowały wzrost *P. aeruginosa* (rycina 9A) oraz produkcję jego czynników wirulencji – piocyjaniny (rycina 9B) i piowerdyny (rycina 9C). Działanie przeciwbakteryjne potwierdziła także zaobserwowana zmiana koloru podłoża hodowlanego bakterii z jasnozielonej, w przypadku nietraktowanej kontroli, po jasnobrązową dla bakterii poddanych działaniu NF (rycina 9D). Mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej badanych nanomateriałów może być zatem związany z blokowaniem podstawowych szlaków metabolicznych u tej bakterii, co w rezultacie skutkuje również ograniczeniem jej wzrostu. Następnie zbadano właściwości cytotoksyczne nanowłókien wobec dwóch linii komórkowych: BEAS-2B (rycina 9E) i A549 (rycina 9F). Co ważne, nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs

hamowały proliferację komórek nowotworowych A549 (rycina 9G) oraz indukowały wyraźny spadek ich żywotności do ~20% (rycina 9F). Przyczynę tego zjawiska upatruje się w zachowaniu kropek kwantowych selenku kadmu, których działanie przeciwnowotworowe często związane jest z blokowaniem szlaków sygnałowych w komórkach.



Rycina 9. Właściwości biologiczne niemodyfikowanych i modyfikowanych CdSe QDs nanowłókien PL-b-CL/PVP. Gęstość optyczna PAO1 mierzona przy 600 nm (A); poziom piocyjaniny mierzony przy 691 nm (B) i poziom piowerdyny (Ex/Em = 405/460 nm) (C). Zmiana koloru podłoża hodowlanego bakterii po potraktowaniu nanowłóknami, gdzie zielona ramka oznacza bakterie nietraktowane, a brązowa bakterie poddane działaniu nanowłókien (D). Żywotność komórek nienowotworowych BEAS-2B (E) i nowotworowych A549 (F) traktowanych nanowłóknami. Wszystkie wyniki przedstawiono w procentach, gdzie 100% oznacza kontrolę niepoddaną działaniu NF. \* istotność statystyczna ( $p < 0,05$ ). Hamowanie wzrostu komórek A549 traktowanych nanowłóknami obserwowane w mikroskopie optycznym (x64) (G).

Podsumowując, w badaniu tym przedstawione zostało proste podejście syntezy hybrydowych nanowłókien PL-b-CL/PVP-CdSe QDs wykazujących **działanie przeciwbakteryjne wobec opornego na antybiotyki *P. aeruginosa* PAO1**. Niemniej jednak, na szczególną uwagę zasługuje ich wysoka cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, co czyni z nich **obiecujące nanomateriały przeciwnowotworowe do stosowania miejscowego** i otwiera nowe perspektywy terapeutyczne, które w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania skutecznych metod leczenia raka, np. polegających na wykorzystaniu NF w terapii fotodynamicznej. Zastosowanie nanowłókien na konkretnie zlokalizowane zmiany nowotworowe pozwoli ograniczyć ich możliwą toksyczność wobec zdrowych tkanek przy jednoczesnym zachowaniu ich wysokiej efektywności terapeutycznej. Co więcej, unikalne właściwości optyczne CdSe QDs, sugerują również duży potencjał nanowłókien sfunkcjonalizowanych CdSe QDs, jako biosensorów do identyfikacji biomakrocząsteczek w płynach biologicznych.

### **3.2. Publikacja II.** Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages (*Macromolecular Bioscience*, 2024)

W drugiej pracy doświadczalnej pt. „Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages” (*Macromolecular Bioscience*, 2024) przedstawiona została **kompleksowa charakterystyka fizykochemiczna oraz biologiczna elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP sfunkcjonalizowanych nanocząstkami złota (AuNPs)**. Ponadto, określono wpływ modyfikacji nanorusztowania PL-b-CL/PVP-AuNPs dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) na jego skuteczność antybakteryjną oraz oceniono potencjał otrzymanych nanowłókien w kierunku rozwoju innowacyjnych opatrunków na rany.

#### **Materiały i metody**

##### ***Materiały***

- prekursor złota ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) oraz środek redukujący ( $\text{NaBH}_4$ ) (Sigma–Aldrich, Germany) – wykorzystane do syntezy nanocząstek złota (AuNPs)

- PL-b-CL (kopolimer L-laktydu i  $\epsilon$ -kaprolaktonu) (70:30) (Mw-200 kg) (Purasorb<sup>®</sup>, Corbion, Holandia) - wykorzystany w syntezie matrycy nanowłókien
- PVP (Mw-250 kg) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy) – wykorzystany w syntezie AuNPs oraz matrycy nanowłókien
- rozpuszczalniki analityczne: etanol, chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy)
- dendronizowane nanocząstki srebra (Dend-AgNPs) - otrzymane dzięki współpracy z University of Alcalá (Hiszpania); Dend-AgNPs z przyłączonymi dendronami karbokrzemowymi zostały przygotowane według metodologii opisanej wcześniej [83] (ryc. 10)

Rycina 10. Schemat dendronizowanych nanocząstek srebra (Dend-AgNPs) [83].

- BEAS-2B 2B (ang. *human bronchial epithelial cells*) - ludzkie komórki nabłonka oskrzeli (ATCC CRL-9609) hodowane w pożywce LHC-9 (Gibco)
- A549 (ang. *human lung cancer epithelial cells*) - ludzkie komórki raka płuc (CCL-185) hodowano w pożywce F-12K (Corning) uzupełnionej 10% FBS i 1% mieszaniną penicyliny/streptomycyny (Corning).
- VH10 (ang. *normal human foreskin fibroblasts*) – ludzkie fibroblaty (ATCC, Manassas, VA, USA, PCS-201-012) hodowano w pożywce DMEM (Sigma–Aldrich) uzupełnionej 10% FBS i 1% mieszaniną penicyliny/streptomycyny (Corning).

- THP-1 (ang. *human monocytic cell line*) – ludzką linię komórek monocytarnych (ATCC, Manassas, VA, USA, TIB-202™) hodowano w zmodyfikowanym podłożu RPMI 1640 (Gibco) zawierającym 10% FBS

#### ***Szczep bakteryjny***

- *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (ATCC 15692) – z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej UJK

### ***Metody***

- 1. Synteza i charakterystyka AuNPs stabilizowanych PVP** – nanocząstki pokryte poliwinylpirolidonem zostały zsyntetyzowane w laboratorium na uniwersytecie Rhein-Waal University of Applied Sciences (Niemcy), a następnie analizowane z wykorzystaniem TEM i DLS.
- 2. Synteza nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych AuNPs** - nanocząstki zostały unieruchomione w matrycy nanowłókien poprzez bezpośrednie zmieszanie roztworu polimerów z zawiesiną AuNPs i następnie poddanie go elektroprzędzeniu.
- 3. Charakterystyka fizykochemiczna nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs** – analiza morfologii (SEM), składu chemicznego (AFT-FTIR) oraz właściwości termicznych (TGA, DSC).
- 4. Charakterystyka biologicznych nanowłókien**
  - 4.1. Ocena cytotoksyczności nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs wobec komórek eukariotycznych** - cytotoksyczność NF oceniono wobec komórek BEAS-2B i A549 za pomocą obserwacji mikroskopowej oraz cytometrii przepływowej z wykorzystaniem testu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA), przeznaczonego do identyfikacji komórek apoptotycznych; poziom ROS w komórkach traktowanych NF mierzono ilościowo z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego CM-H2DCFDA (Sigma-Aldrich).
  - 4.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs** – działanie przeciwbakteryjne NF oceniono wobec *P. aeruginosa* PAO1 na podstawie testu gęstości optycznej (OD600) oraz pomiaru poziomu produkcji dwóch barwników: piocyjaniny i piowerdyny.
  - 4.3. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs modyfikowanych Dend-AgNPs** – nanowłókna zostały zmodyfikowane Dend-AgNPs poprzez bezpośrednie nanoszenie ich na powierzchnię i suszenie nanomateriału; skuteczność przeciwbakteryjną NF oceniono za pomocą: testu

gęstości optycznej (OD600), pomiaru poziomu produkcji dwóch barwników (piocyjaniny i piowerdyny), testu dyfuzji na płytce agarowej, testu hamowania biofilmu bakteryjnego z wykorzystaniem barwienia fioletem krystalicznym, oznaczenia poziomu ROS u bakterii z użyciem znacznika fluorescencyjnego CM-H2DCFDA.

**4.4. Analiza mechanizmu uwalniania Dend-AgNPs z nanowłókien** – modyfikowane Dend-AgNPs nanowłókna zostały umieszczone w PBS, a ilość uwalnianych Dend-AgNPs z nanowłókien oceniono na podstawie pomiaru absorbancji przy 560 nm w poszczególnych punktach czasowych.

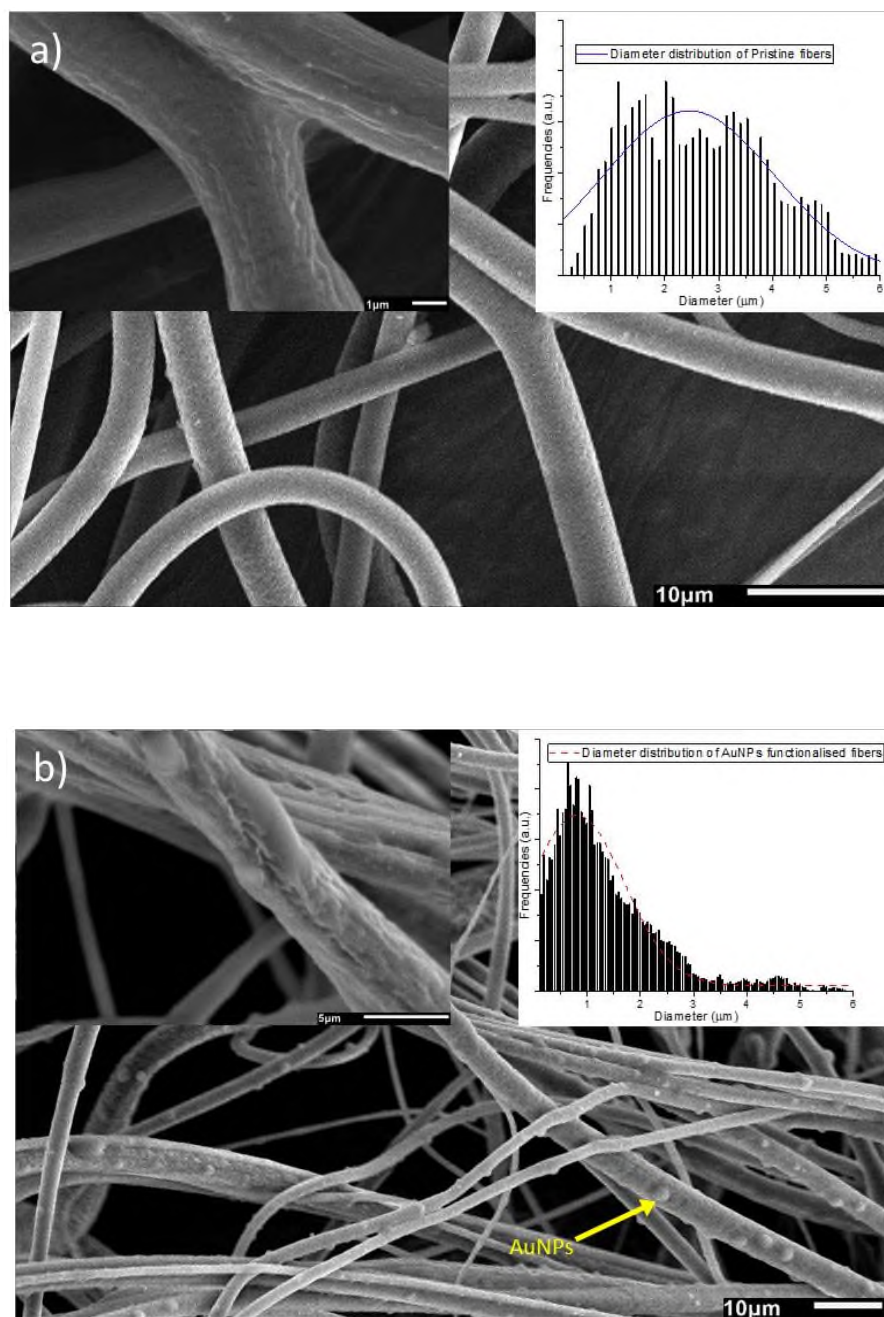
**4.4. Ocena żywotności i proliferacji fibroblastów VH10** – wzrost i proliferację komórek w obecności NF oceniono poprzez obserwację mikroskopową, a żywotność fibroblastów za pomocą testu MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric) (abcam).

**4.5. Ocena żywotności komórek THP-1 traktowanych nanowłóknami i ich wpływu na poziom ekspresji IL-1 $\beta$  w komórkach** – do oceny żywotności komórek wykorzystano test MTS, a poziom interleukin mierzono za pomocą zestawu ELISA (Human IL-1 beta ELISA Kit, Abcam100562)

Pierwszy etap badań obejmował syntezę nanocząstek złota *in situ* PVP, co zapewniło kontrolowany rozkład wielkości AuNPs i zapobiegało ich agregacji. Otrzymane NPs były w większości jednorodne ze średnią średnicą cząstek wynoszącą ~10 nm, a w przypadku analizy DLS o średniej wielkości ~8 nm. Następnie nanocząstki złota zostały unieruchomione w matrycy nanowłókien PL-b-CL/PVP. Wytworzone nanowłókna były cylindryczne i porowate, jak pokazano na rycinie 11. Co więcej, tak jak oczekiwano, włączenie nanocząstek do NF skutkowało również zmniejszeniem ich średnicy, wskutek zmiany lepkości i napięcia powierzchniowego elektroprzędzywanego roztworu (Tabela 4).

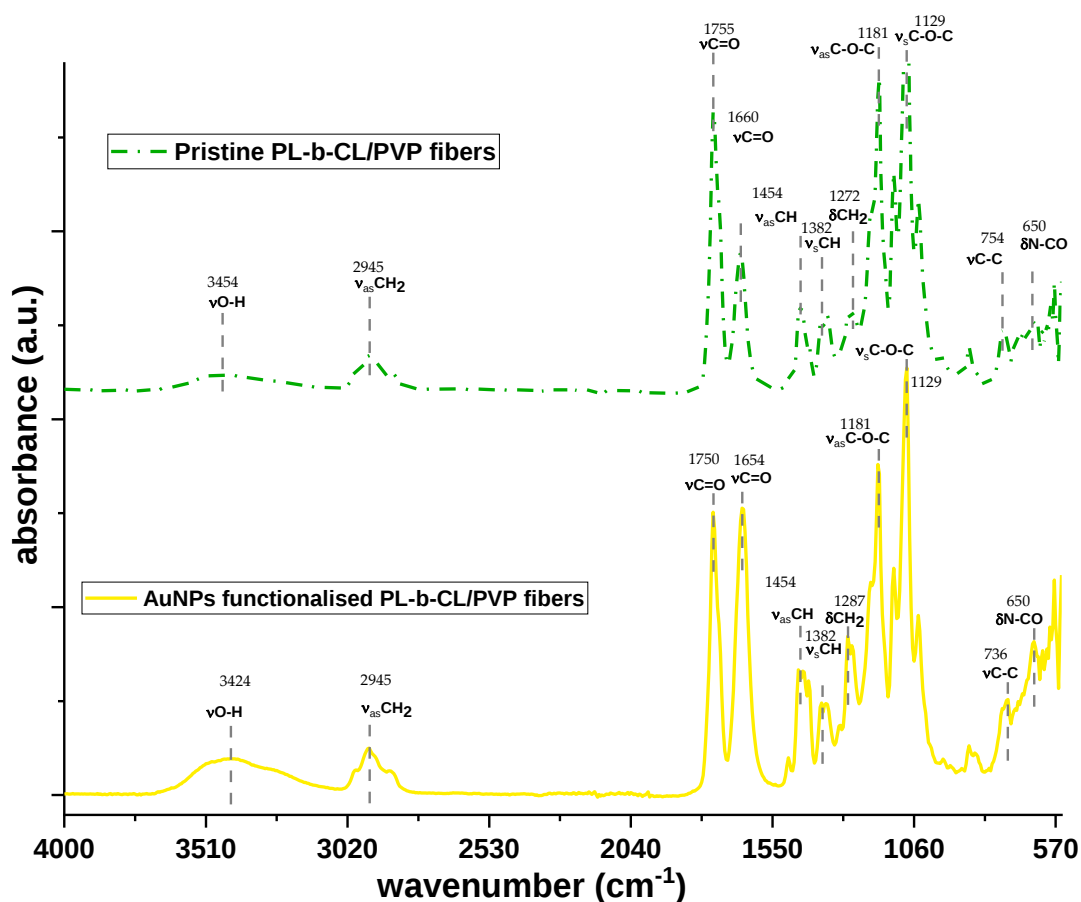
Tabela 4. Analiza statystyczna średnicy nanowłókien mierzona za pomocą programu ImageJ

| Badane NF           | Średnia średnica   | Odchylenie standardowe |
|---------------------|--------------------|------------------------|
| PL-b-CL/PVP         | 2.12 $\mu\text{m}$ | 1.6 $\mu\text{m}$      |
| AuNPs + PL-b-CL/PVP | 0.95 $\mu\text{m}$ | 0.7 $\mu\text{m}$      |



Rycina 11. Mikrofotografie SEM elektroprzędzonych nanowłókien pozwalające na analizę ich morfologii i rozkładu średnic (wstawka po prawej) oraz powiększony widok ukazujący szorstkie/porowate powierzchnie włókien (wstawka po lewej); a) nanowłókna PL-b-CL/PVP; b) nanowłókna PL-b-CL/PVP sfunkcjonalizowane AuNPs/PVP.

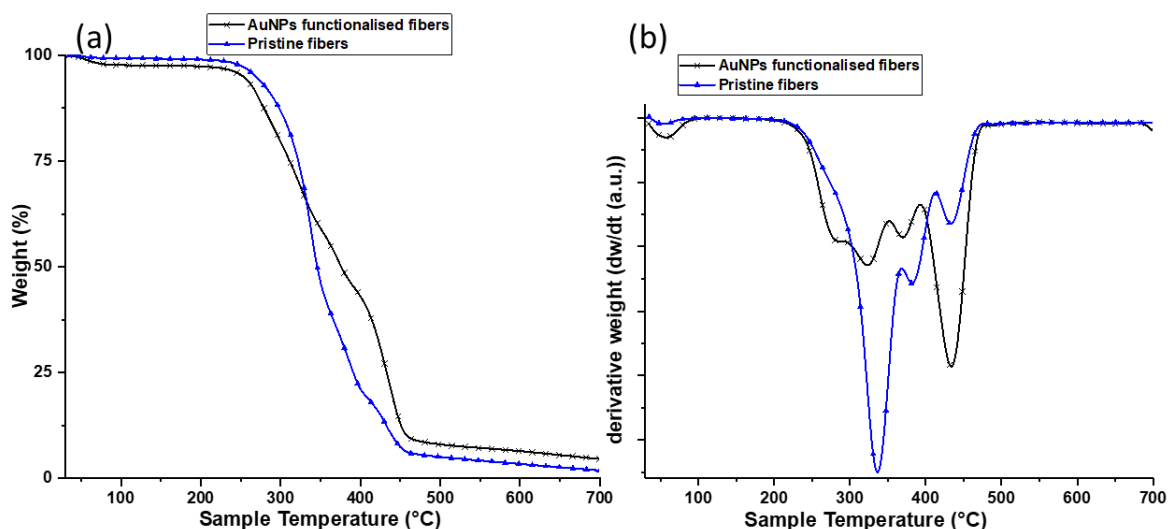
Przeprowadzona analiza widm absorpcyjnych ATR-FTIR potwierdziła efektywność immobilizacji NF nanocząstkami złota. Jak wykazano, dwukierunkowe zastosowanie polimeru PVP, tj., jako środka współrządzącego oraz stabilizującego AuNPs, przyczyniło się do poprawy efektywności elektroprzewodzenia, a także sprzyjało interakcjom między ugrupowaniami nieorganicznymi i matrycą, zwiększając stabilność otrzymanego nanomateriału (ryc. 12).



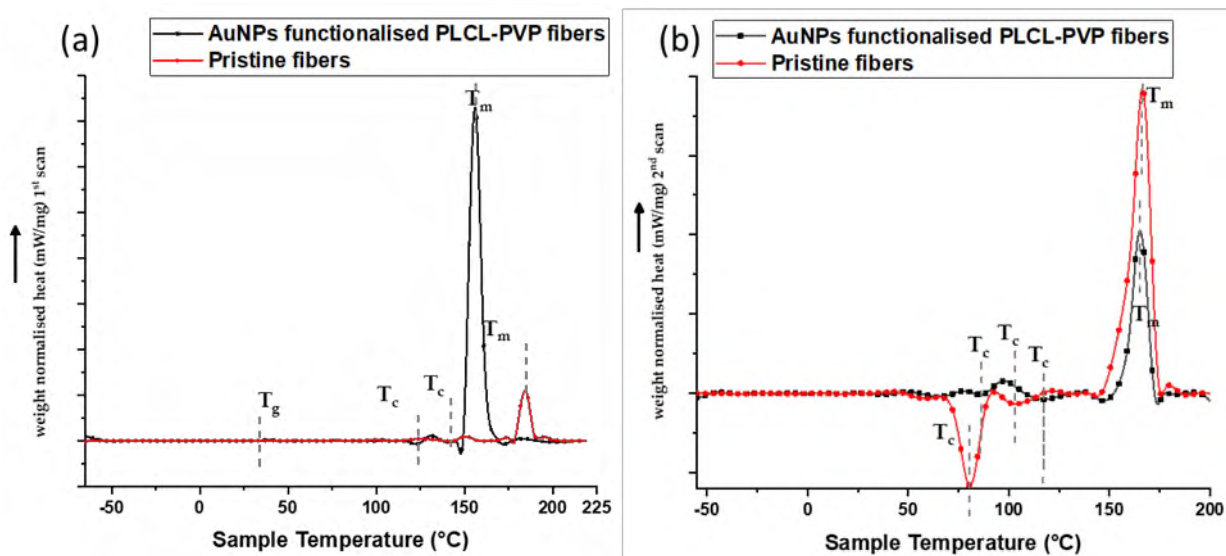
Rycina 12. Porównanie widm ATR-FTIR nanowłókien PL-b-CL/PVP i PL-b-CL/PVP-AuNPs.

Badane nanowłókna wykazywały również trzystopniowy profil degradacji masy, co pokazano na rycinie 13. Zaobserwowano także, że unieruchomienie nanocząstek złota w matrycy powoduje wzrost temperatury początku jej degradacji z 304°C do 345°C, a jej końca z 384°C do 457°C. Ponadto, wystąpiły różnice w przemianach fazowych między nanowłóknami PL-b-CL/PVP a PL-b-CL/PVP-AuNPs (ryc. 14). Reasumując, włączenie AuNPs do NF

wpływa na ich zachowanie termiczne poprzez zwiększenie ich stabilności termicznej i krystaliczności oraz obniżenie piku endotermii topnienia (ryc. 14).

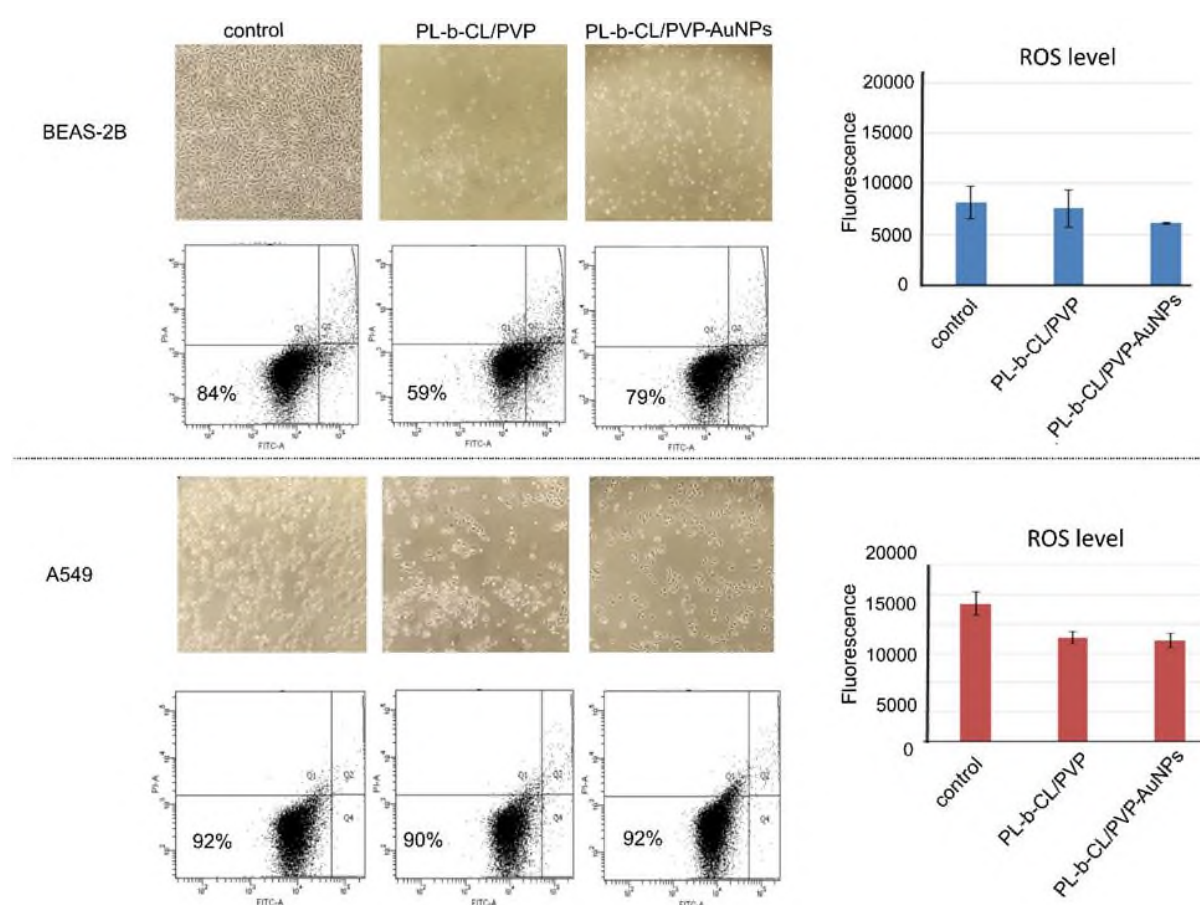


Rycina 13. Analiza termogravimetryczna (TGA) (a) i termogravimetryczna krzywa różniczkowa (DTG) (b) niemodyfikowanych i modyfikowanych AuNPs/PVP nanowłókien PL-b-CL/PVP.



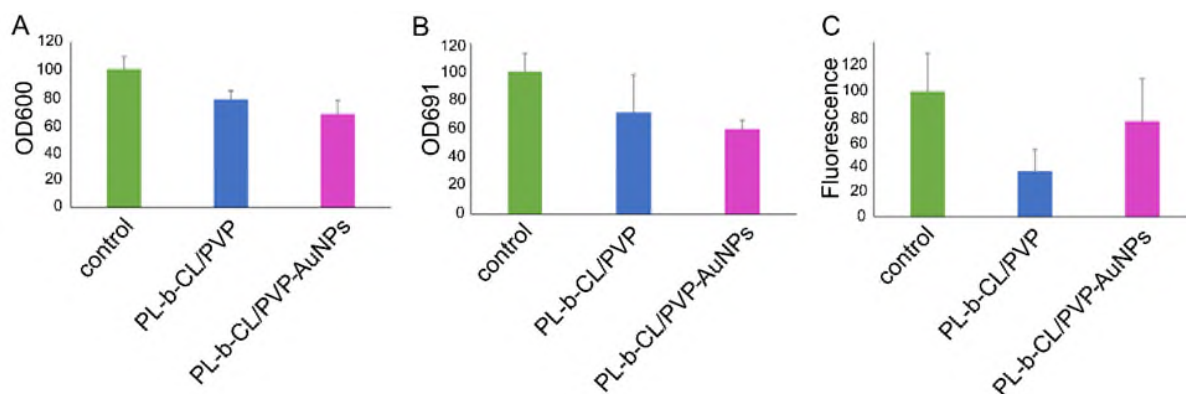
Rycina 14. (a) Krzywa DSC niemodyfikowanych i modyfikowanych AuNPs nanowłókien PL-b-CL/PVP, ukazująca różnice w ich zachowaniu zmiany fazy z powodu włączenia nanocząstek i interakcji z kopolimerem PL-b-CL po pierwszym cyklu ogrzewania, (b) po drugim cyklu ogrzewania po kontrolowanym schłodzeniu próbek ;  $T_g$  – temperatura zeszklenia;  $T_c$  – temperatura krystalizacji;  $T_m$  – temperatura topnienia.

Nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs charakteryzowała niewielka cytotoksyczność wobec nienowotworowej linii komórkowej BEAS-2B, w przeciwieństwie do nanorusztowań PL-b-CL/PVP, które indukowały spadek żywotności komórek do 59%. Co ciekawe, mechanizm toksyczności NF nie był związany ze zwiększoną produkcją ROS w komórkach, która jest uważana za jedną z głównych przyczyn toksyczności nanomateriałów. Zwiększona toksyczność nanowłókien PL-b-CL/PVP wynikać mogła zatem np. z wydłużonej fazy adaptacyjnej komórek do materiału i struktury jego powierzchni. Co jednak istotne, oba rodzaje nanowłókien nie wykazywały działania przeciwnowotworowego (rycina 15).



Rycina 15. Hodowla komórek BEAS-2B i A549 po 24 h inkubacji z różnymi typami nanowłókien. Komórki nietraktowane NF zastosowano jako kontrolę. Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) mierzono w hodowli komórkowej po 24 h inkubacji z nanowłóknami.

W testach mikrobiologicznych, zarówno nanowłókna PL-b-CL/PVP, jak i PL-b-CL/PVP-AuNPs hamowały wzrost antybiotykoopornego *P. aeruginosa* odpowiednio do 80% i 68%, jak również ograniczały produkcję dwóch podstawowych barwników PAO1 – piocyjaniny i piowerdyny, co sugeruje na działanie antibakteryjne powiązane z ich ingerencją w zachodzące u tej bakterii szlaki metaboliczne (ryc. 16).

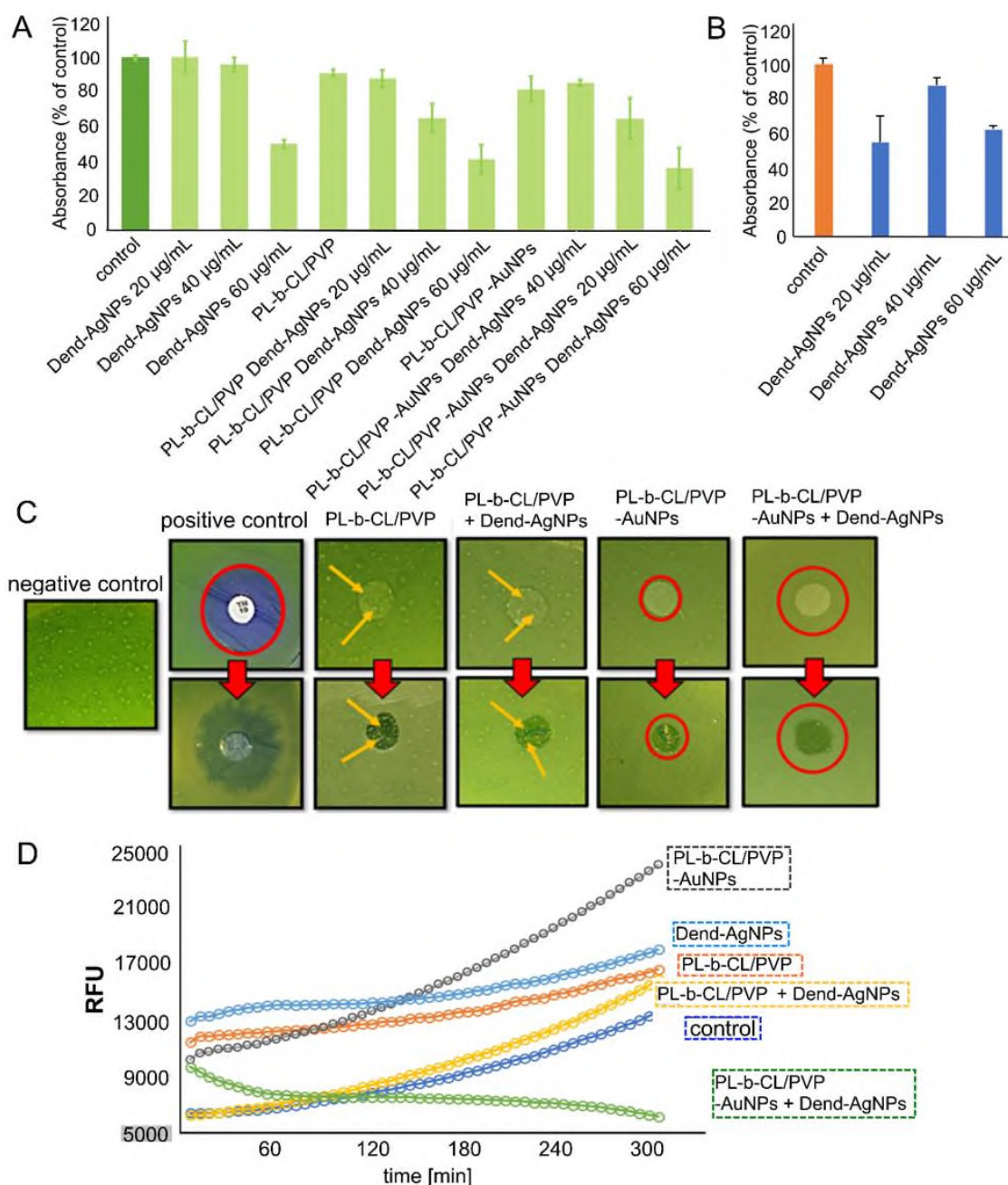


Rycina 16 . (a) Gęstość optyczna *P. aeruginosa* PAO1 bez i w obecności różnych typów nanowłókien mierzona przy 600 nm po 24 h inkubacji. (b) Poziom piocyjaniny wytwarzanej przez *P. aeruginosa* PAO1 bez i w obecności różnych typów nanowłókien mierzony przy 691 nm po 24 h inkubacji. (c) Poziom piowerdyny wytwarzanej przez *P. aeruginosa* PAO1 bez i w obecności różnych typów nanowłókien po 24 h inkubacji. Nietraktowaną hodowlę bakteryjną wykorzystano jako kontrolę.

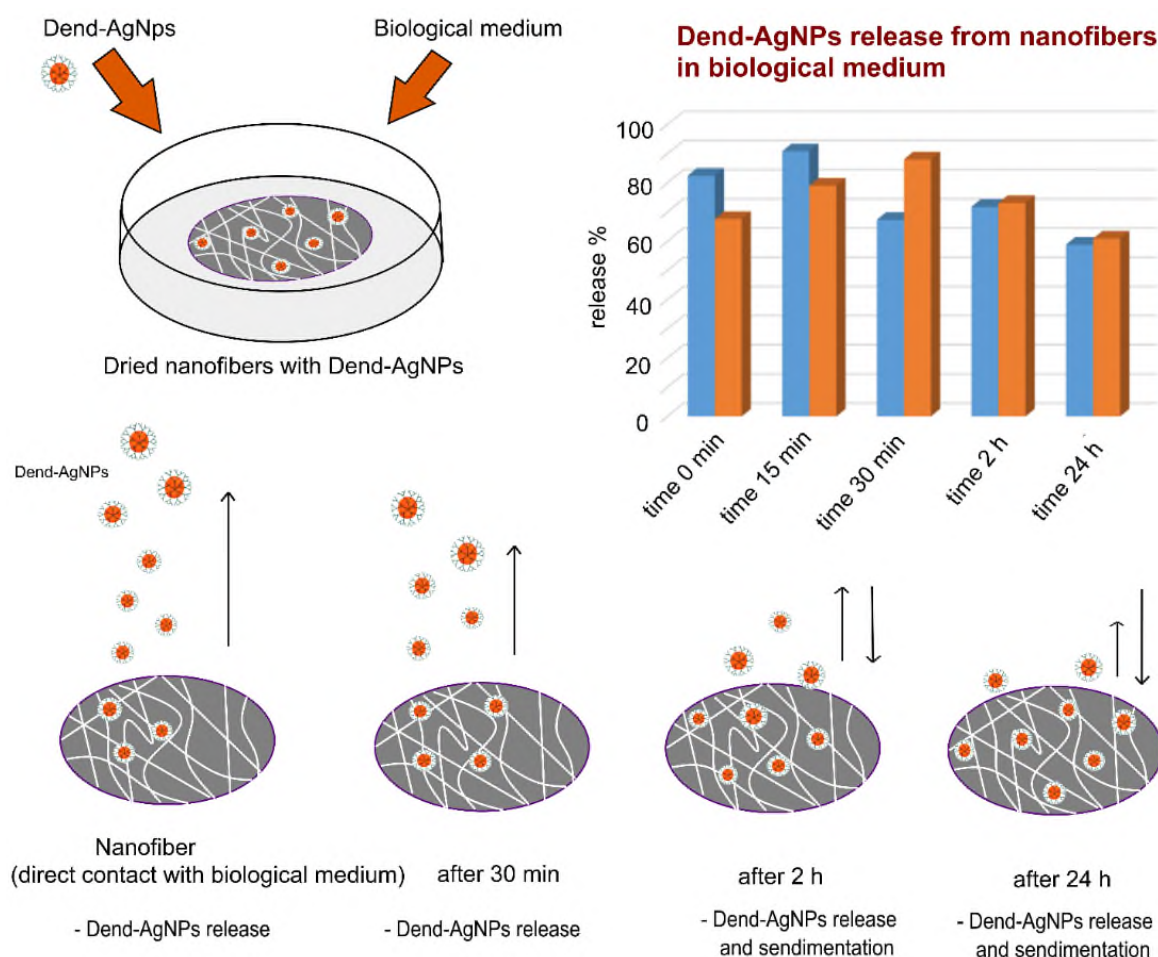
Ze względu na obiecujące właściwości przeciwbakteryjne badanych nanowłókien, w kolejnym etapie w celu zwiększenia ich potencjału antibakteryjnego zostały one zmodyfikowane Dend-AgNPs, które mogą zakłócać integralność błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych poprzez indukowanie jej zwiększonej przepuszczalności. Na podstawie wcześniejszych badań wybrano trzy różne stężenia Dend-AgNPs (20, 40, 60  $\mu\text{g/mL}$ ), których działanie przeciwbakteryjne potwierdzono poprzez test hamowania biofilmu z wykorzystaniem barwienia fioletem krystalicznym (ryc. 17B). Następnie przeprowadzono test gęstości optycznej z wykorzystaniem wszystkich możliwych kombinacji, co przedstawia rycina 17A. Zaobserwowano, że modyfikowanie nanowłókien dendronizowanymi nanocząstkami srebra zwiększa ich działanie przeciwbakteryjne w porównaniu do nanowłókien niemodyfikowanych. Do dalszej części badań wybrano Dend-AgNPs o stężeniu 40  $\mu\text{g/mL}$ , które zapewniło zadowalającą aktywność przeciwbakteryjną oraz stosunkowo niską toksyczność dla komórek ludzkich, a następnie wykonano test dyfuzji na płytce agarowej w celu oceny wpływu

badanych nanomateriałów na wzrost bakterii (ryc. 17C). Nie stwierdzono obecności kolonii bakteryjnych zarówno pod, jak i na nanowłóknach PL-b-CL/PVP-AuNPs oraz PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs. Zaobserwowano również zwiększoną strefę zahamowania wzrostu bakterii podczas traktowania ich nanowłóknami PL-b-CL/PVP-AuNPs modyfikowanymi Dend-AgNPs. Dopełnieniem powyższych badań był pomiar ilości ROS w komórkach bakterii poddanych działaniu nanowłókien (ryc. 17D). Zarówno nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs, jak i same Dend-AgNPs promowały nadprodukcję ROS u bakterii, w przeciwieństwie do nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs, w przypadku których wystąpiło wyraźne zmniejszenie ich produkcji, co biorąc pod uwagę wcześniejsze pozytywne wyniki testów antybakteryjnych wskazuje na inny mechanizm działania przeciwbakteryjnego.

Dlatego też, w kolejnym kroku zbadano profil uwalniania Dend-AgNPs z nanowłókien w czasie (ryc. 18), który wykazał początkowe szybkie uwalnianie nanocząstek słabo związanych na powierzchni NF, o czym świadczyła zaobserwowana zwiększona absorbancja. Po upływie 2 i 24 h nastąpił spadek absorbancji, co można wyjaśnić sedimentacją uwolnionych NPs i ich penetracją do wnętrza NF. To właśnie taka sytuacja mogła mieć miejsce podczas traktowania bakterii nanowłóknami PL-b-CL/PVP-AuNPs+Dend-AgNPs, bowiem przenikanie Dend-AgNPs do wnętrza NF może ograniczać ich kontakt z bakteriami, a tym samym prowadzić do zmniejszonej produkcji ROS.

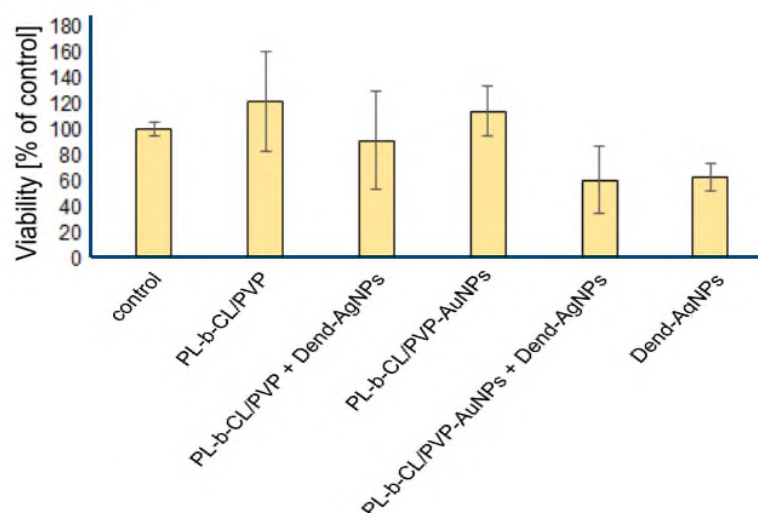


Rycina 17. (a) Gęstość optyczna *P. aeruginosa* PAO1 bez i w obecności różnych typów nanowłókien i dendronizowanych nanocząstek srebra mierzona przy 600 nm po 24 h inkubacji. (b) Hamowanie tworzenia biofilmu bez i w obecności różnych stężeń dendronizowanych nanocząstek srebra mierzono poprzez absorbancję fioletu krystalicznego po 24 h inkubacji. (c) Ocena działania przeciwbakteryjnego wytworzonych nanowłókien przy użyciu testu dyfuzyjnego na płycie agarowej i wizualną obserwację wzrostu bakterii na i pod nanowłóknami. Brak kolonii bakteryjnych i zahamowany wzrost bakterii na i pod nanowłóknami PL-b-CL/PVP-AuNPs wskazuje na ich aktywność przeciwbakteryjną (czerwone okęgi). Żółte strzałki wskazują kolonie bakteryjne obecne na i pod nanowłóknami PL-b-CL/PVP. Nietraktowaną hodowlę bakteryjną wykorzystano jako kontrolę negatywną. Jako kontrolę pozytywną zastosowano hodowlę bakteryjną poddaną działaniu antybiotyku (Tobramycyny). (d) Wpływ niemodyfikowanych i modyfikowanych Dend-AgNPs nanowłókien na wewnątrzkomórkową generację ROS. Poziom ROS oznaczono po 15 minutach traktowania CM-H2DCFDA.

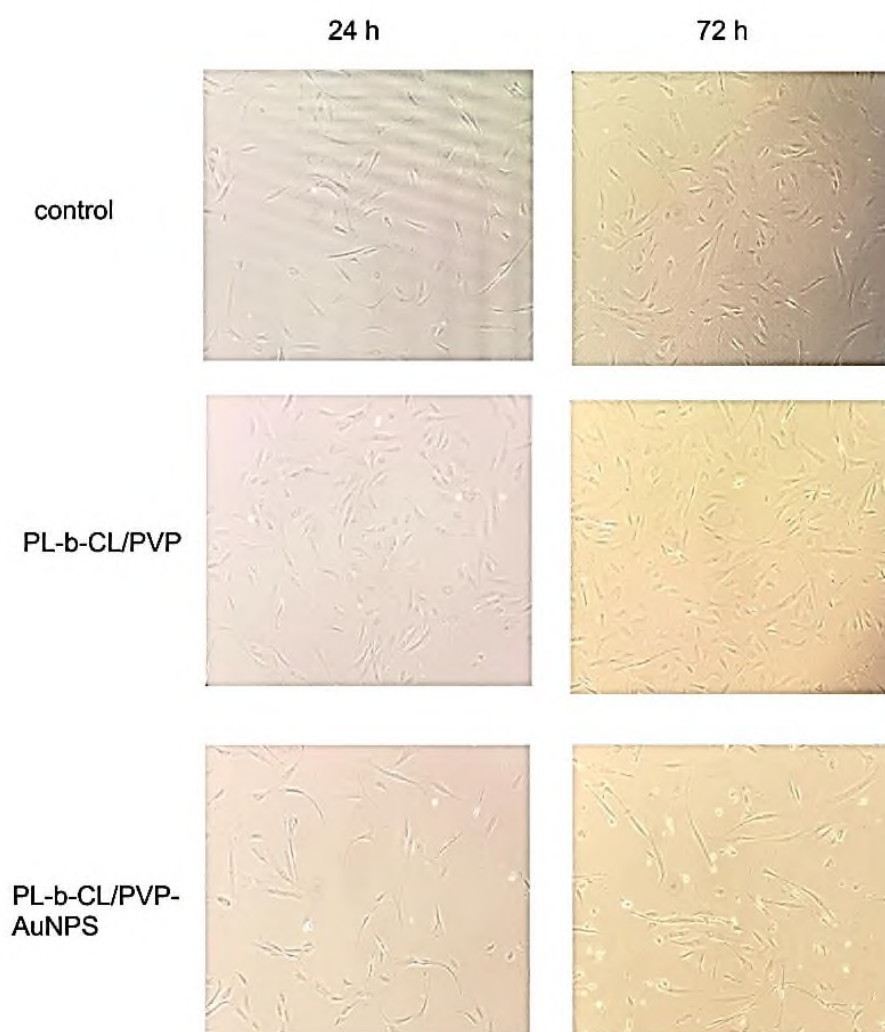


Rycina 18. Mechanizm uwalniania dendronizowanych nanocząstek srebra z nanowłókien w czasie w PBS. Procent nanocząstek uwalnianych z nanowłókien w PBS przedstawiono w prawym rogu, gdzie niebieskie słupki odpowiadają PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs, a pomarańczowe PL-b-CL/PVP-AuNP + Dend-AgNP.

Na koniec, zbadano cytotoksyczność badanych nanomateriałów wobec fibroblastów – komórek istotnych w procesie gojenia ran. Zarówno Dend-AgNPs oraz modyfikowane nimi NF zmniejszały żywotność komórek VH10, jak pokazano na ryc. 19. Niemniej jednak, nanowłókna PL-b-CL/PVP oraz PL-b-CL/PVP-AuNPs nie były toksyczne dla fibroblastów i nie ograniczały ich wzrostu (ryc. 20). Można zatem wnioskować, że obserwowana cytotoksyczność modyfikowanych NF wynika głównie z działania Dend-AgNPs. Podobną sytuację zaobserwowano także w przypadku makrofagów, gdzie wykorzystanie Dend-AgNPs indukowało zwiększoną cytotoksyczności nanowłókien. Co więcej, NF niemodyfikowane i modyfikowane AuNPs promowały wzrost produkcji prozapalnych interleukin w komórkach, a zastosowanie Dend-AgNPs ich spadek. Zatem, wystąpiła zależność, w której wysoka cytotoksyczność nanomateriałów korelowała z niską produkcją IL-1 $\beta$ , co może wskazywać na całkowite zniszczenie komórek, a tym samym brak wytwarzanych IL-1 $\beta$ .



Rycina 19. Żywotność komórek VH10 traktowanych nanowłóknami lub Dend-AgNPs. Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę. Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako procent kontroli.



Rycina 20. Hodowla komórek VH10 po 24 h i 72 h inkubacji z różnymi typami nanowłóknien. Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę.

Podsumowując, zaproponowane modyfikacje nanowłókien PL-b-CL/PVP pozwoliły na poszerzenie ich spectrum zastosowania. Opracowane nanorusztowanie **PL-b-CL/PVP-AuNPs**, cechowała silna aktywność przeciwbakteryjna skierowana wobec opornego na antybiotyki Gram-ujemnego patogenu - *P. aeruginosa* oraz, co ważne stosunkowo niska toksyczność komórkowa wobec ludzkiej linii fibroblastów i nieznacznie zwiększona immunoreaktywność. Wyniki te potwierdzają zatem możliwość zastosowania tych nanowłókien jako **nowej klasy opatrunków przeciwbakteryjnych**, które będą w stanie sprostać wszystkim restrykcyjnym wymaganiom jakie stawia się materiałom tego typu oraz pokonać ich główne ograniczenia. Łatwe w aplikacji NF o porowatej strukturze gwarantują bowiem efektywną wymianę gazów i skuteczne pochłanianie wysięków z rany, zaś ich właściwości przeciwbakteryjne, będą zapobiegały infekcji, zapewniając optymalne środowisko dla procesu gojenia się rany. Co więcej, otrzymane **nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs** są **bardzo dobrymi platformami do transportu innych związków**, w tym przypadku dendronizowanych nanocząstek srebra (Dend-AgNPs), które dodatkowo wzmacniają działanie przeciwbakteryjne całego rusztowania.

#### **4.5. Publikacja III.** Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa (*Nanotechnology, Science and Applications*, 2025)

W ostatniej pracy doświadczalnej pt. „Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa” (*Nanotechnology, Science and Applications*, 2025) **przedstawiono podejście polegające na opracowaniu materiału o właściwościach przeciwbakteryjnych na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) oraz białkiem pochodzenia bakteriofagowego – endolizyną.** Ponadto, wskazano główne zalety z zastosowanej podwójnej modyfikacji NF w aspekcie wytworzenia innowacyjnego opatrunku do leczenia trudno gojących się ran i jednocześnie zapobiegającego zakażeniom, wywoływanym przez bakterie wielolekooporne.

## Materialy i metody

### Materialy

- PL-b-CL (kopolimer L-laktydu i  $\epsilon$ -kaprolaktonu (70:30) (średnia Mw-200 kg) (Purasorb<sup>®</sup>, Corbion, Holandia) oraz polimer PVP (Mw-250 kg) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy) - wykorzystane w syntezie matrycy nanowłókien
- rozpuszczalniki analityczne: chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy)
- dendronizowane nanocząstki srebra (Dend-AgNPs) - otrzymane dzięki współpracy z University of Alcalá (Hiszpania); Dend-AgNPs zostały przygotowane według metodologii opisanej wcześniej [83] (ryc. 10)
- rekombinowana endolizyna (domena katalityczna CHAP faga Î812) – zakupiona z firmy Protean (Czechy)

### Linia komórkowa

- VH10 (ang. *normal human foreskin fibroblasts*) – ludzkie fibroblaty (ATCC, Manassas, VA, USA, PCS-201-012) hodowano w pożywce DMEM (Sigma–Aldrich) z 10% FBS i 1% mieszaniną penicyliny/streptomycyny (Corning).

### Szczep bakteryjny

- *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (ATCC 15692) – z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej UJK

## Metody

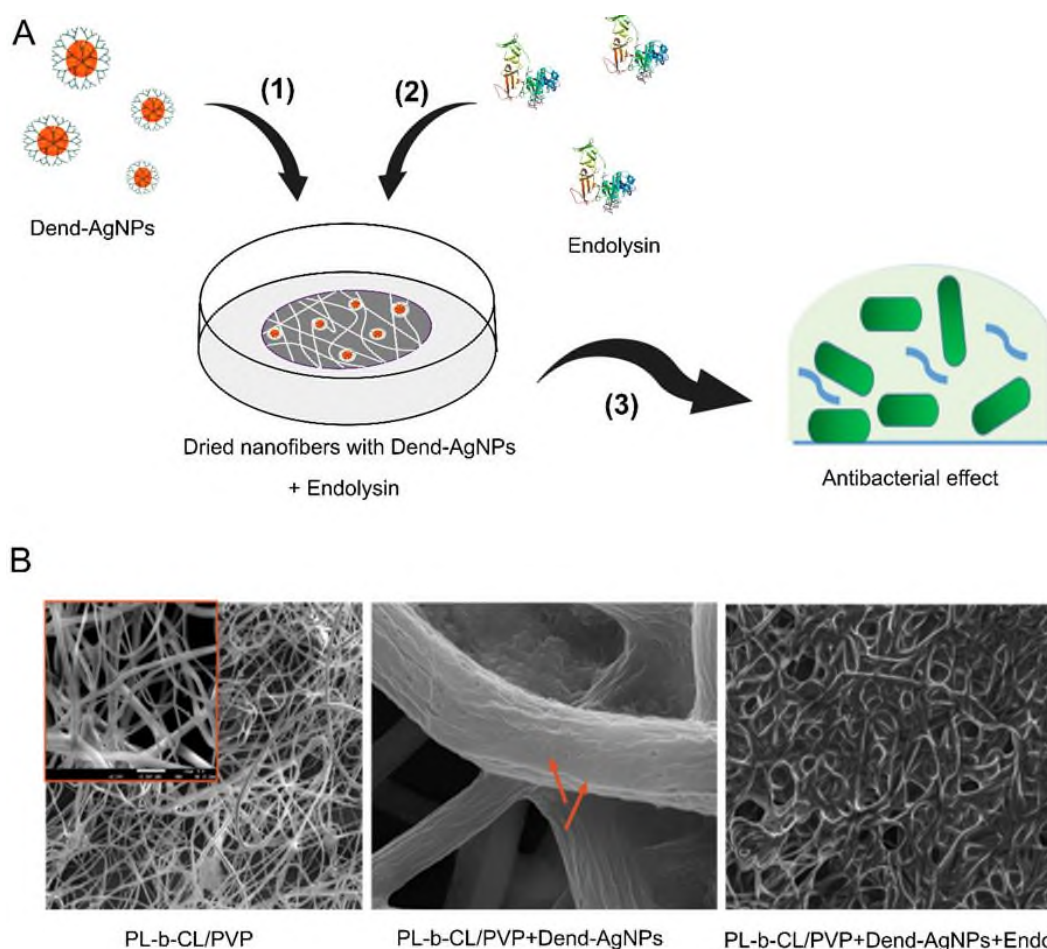
- 1. Przygotowanie nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych Dend-AgNPs oraz endolizyną** – nanowłókna PL-b-CL/PVP zostały wytworzone według procedury i parametrów elektroprzędzenia opisanych wcześniej (Publikacja 2) [83]. Otrzymane nanowłókna zostały następnie pokryte Dend-AgNPs i endolizyną, poprzez bezpośrednie nanoszenie i suszenie nanomateriału.
- 2. Ocena morfologii niemodyfikowanych i modyfikowanych nanowłókien** - zmiany w morfologii badanych nanowłókien obserwowano za pomocą SEM
- 3. Charakterystyka biologiczna nanowłókien**
  - 3.1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej** - działanie przeciwbakteryjne NF oceniono na podstawie testu gęstości optycznej (OD600) oraz pomiaru poziomu produkcji dwóch barwników (piocyjaniny i piowerdyny); morfologię komórek bakteryjnych traktowanych NF oceniono za pomocą SEM, a ich przeżywalność przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej z wykorzystaniem testu LIVE/DEAD Cell

Viability Assays (Thermo Fisher); wpływ NF na tworzenie biofilmu bakteryjnego *P. aeruginosa* określono stosując barwienie fioletem krystalicznym

### **3.2. Ocena działania cytotoksycznego NF wobec fibroblastów – żywotność ludzkich fibroblastów VH10 poddanych działaniu nanowłókien określono za pomocą testu MTS**

W tym badaniu wytworzone metodą elektroprzędzenia nanowłókna PL-b-CL/PVP zostały zmodyfikowane Dend-AgNPs i endolizyną, jak przedstawiono na ryc. 21A. Białka fagowe, takie jak endolizyny wykazują działanie przeciwbakteryjne poprzez trawienie peptydoglikanu znajdującego się w ścianie komórkowej bakterii. Niemniej jednak, obecność zewnętrznej błony bakteryjnej (OM, ang. *outer membrane*) w przypadku Gram-ujemnych bakterii stanowi istotną przeszkodę dla ich efektywnego egzogenego zastosowania. Dlatego też, w celu zapewnienia zadowalającej skuteczności przeciwbakteryjnej, przeprowadzono dodatkową modyfikację NF permeabilizatorami zewnętrznej błony bakteryjnej, tj. Dend-AgNPs z kationowymi dendronami karbokrzemowymi, których interakcja z ujemnie naładowaną OM prowadzi do zwiększenia jej przepuszczalności.

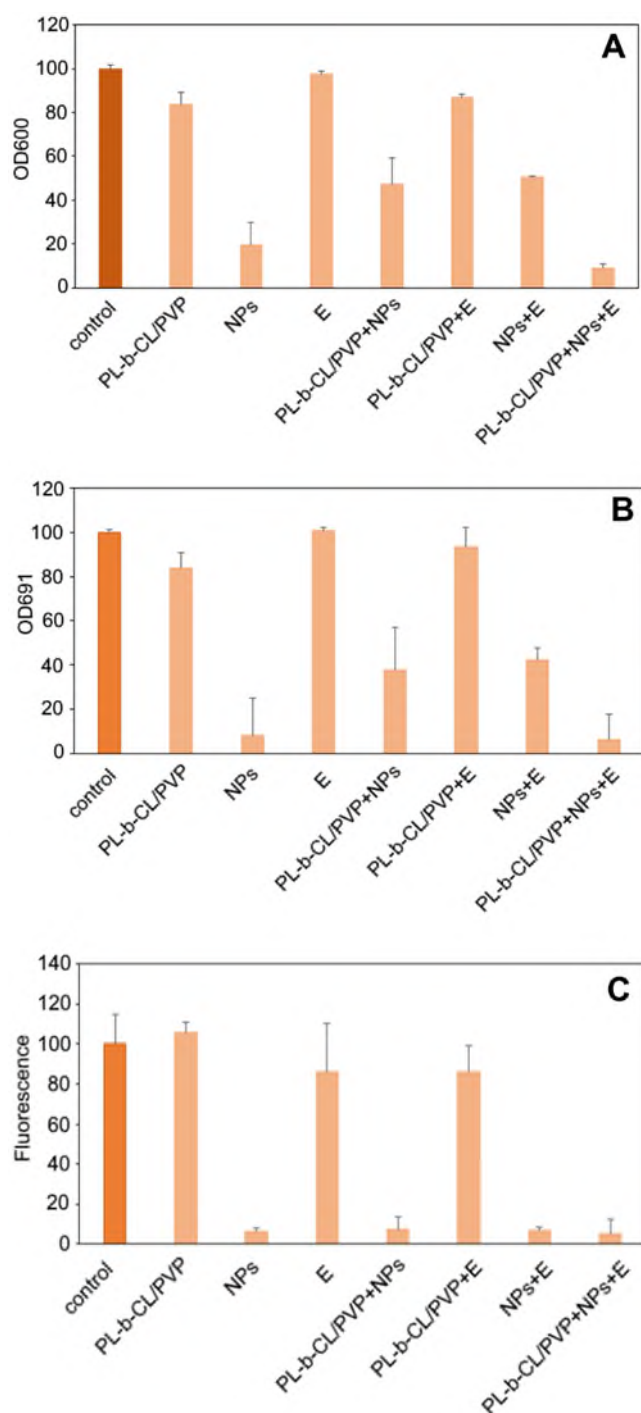
Właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanowłókien PL-b-CL/PVP zostały opisane wcześniej w Publikacji 2 (*Macromolecular Bioscience*, 2024). Wpływ modyfikacji nanowłókien Dend-AgNPs i endolizyną oceniono za pomocą SEM (ryc. 21B), która potwierdziła efektywne przyłączenie nanocząstek do nanowłókien oraz co ciekawe, powstanie widocznej warstwy białka tzw. „filmu” na ich powierzchni podczas traktowania endolizyną. Mogło to być spowodowane utworzeniem dodatkowego rusztowania na nanowłóknach, na skutek oddziaływania przyłączonych do nich Dend-AgNPs z endolizyną, co w efekcie doprowadziło również do zmiany morfologii badanych nanowłókien. Zmiany te nie powodowały jednak trwałej deformacji ani kurczenia się nanomateriału, a po jego umieszczeniu w roztworze PBS, na skutek uwolnienia wcześniej związanego białka obserwowano powrót NF do ich pierwotnej morfologii.



Rycina 21. (A) Schemat przygotowania nanowłókien. (B) Mikrofotografie SEM niemodyfikowanych nanowłókien (PLCL/PVP) (po lewej), NF modyfikowanych dendronizowanymi nanocząstkami srebra (PLCL/PVP + Dend-AgNPs) (w środku) i nanowłókien modyfikowanych dendronizowanymi nanocząstkami srebra i endolizyną (PLCL/PVP + Dend-AgNPs + Endolizyna) (po prawej).

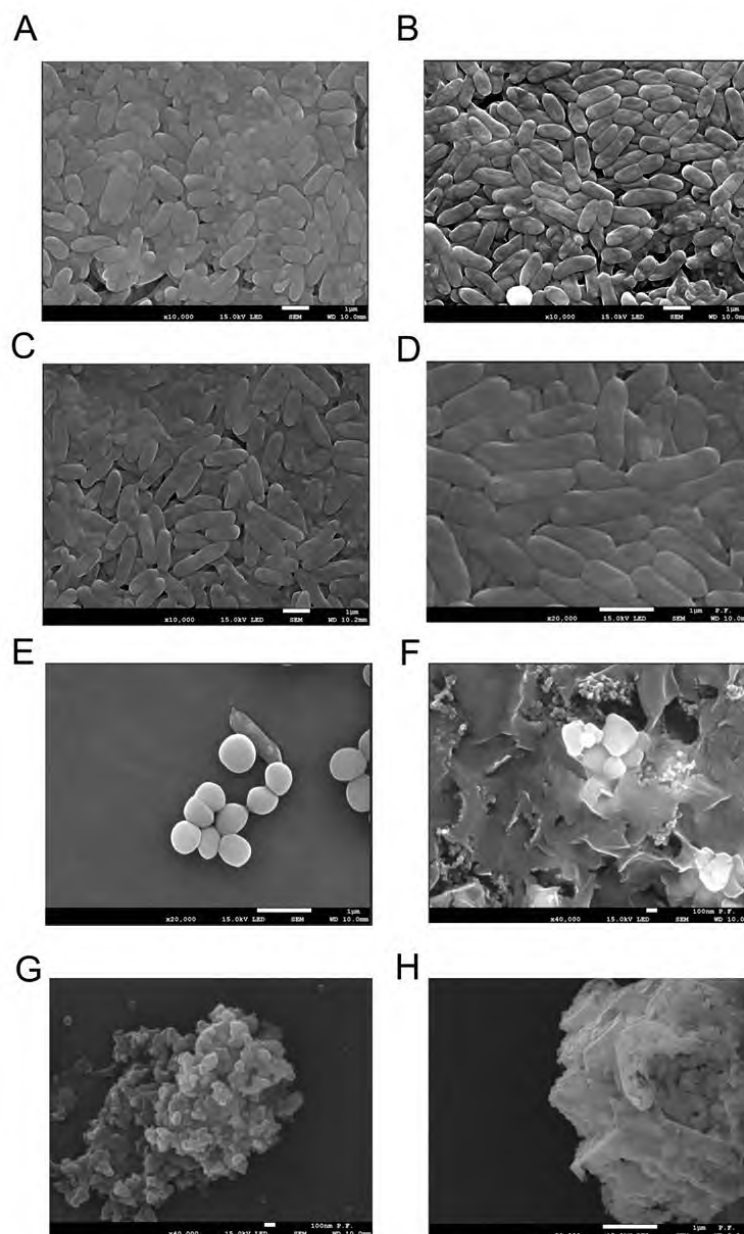
Kolejno ocenie poddano działanie przeciwbakteryjne otrzymanych nanomateriałów. Zarówno nanowłókna PL-b-CL/PVP, jak i endolizyna, nieznacznie wpływały na wzrost *P. aeruginosa*, w przeciwieństwie do Dend-AgNPs, które hamowały wzrost bakterii do 13%. W każdej z zastosowanej kombinacji, gdzie występowały nanocząstki obserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu PAO1. Jak pokazano na rycinie 22A, dla PL-b-CL/PVP+DendAgNPs, DendAgNPs+ednolizyna oraz PL-b-CL/PVP +DendAgNPs+endolizyna, było to odpowiednio 47%, 50% i 9%. Wyniki te były spójne z pomiarem poziomu piocyjany (ryc. 22B) i piowerdyny (ryc. 22C) – dwóch podstawowych barwników wytwarzanych przez *P. aeruginosa*, gdzie układ nanowłókna + nanocząstki + endolizyna również wykazywał najsilniejsze działanie hamujące. Potwierdziło to kluczową rolę kompleksu Dend-AgNPs i endolizyny w zaobserwowanej aktywności przeciwbakteryjnej, która mogła obejmować

bezpośrednie niszczenie osłon bakteryjnych oraz zakłócanie bakteryjnych procesów metabolicznych.



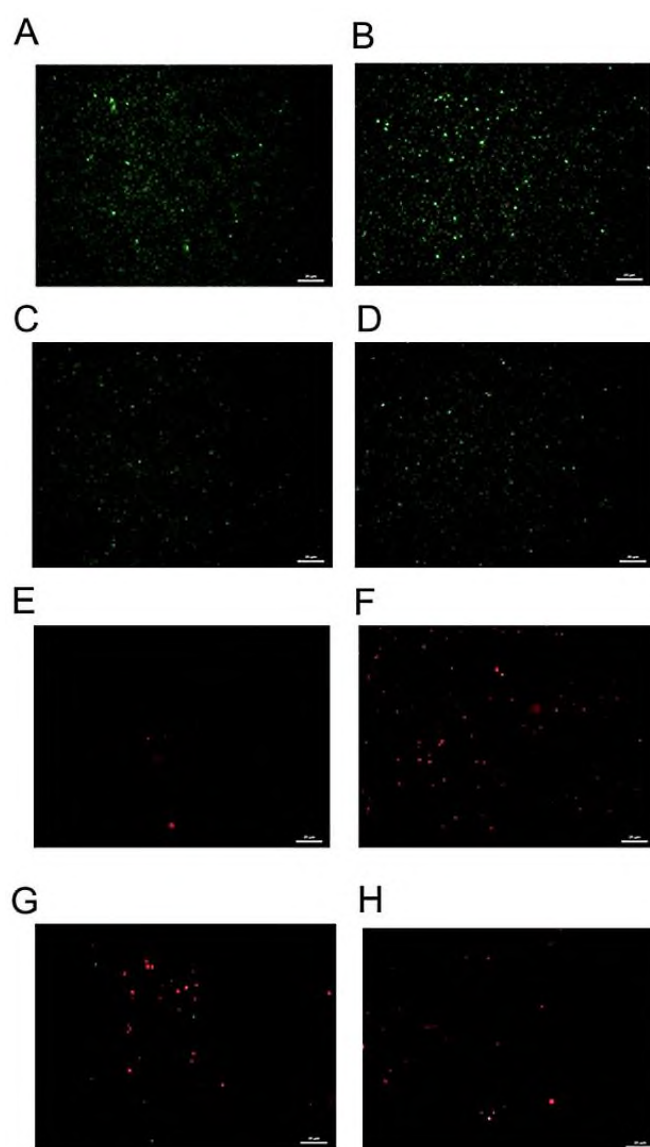
Rycina 22. Gęstość optyczną *P. aeruginosa* PAO1 mierzono przy 600 nm bez i w obecności niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych nanowłókien, Dend-AgNP, Endolizyny i Dend-AgNP + Endolizyny po 24 h inkubacji (A). Produkcja piocyjaniny przez PAO1 mierzona przy 691 nm bez i w obecności niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych nanowłókien, Dend-AgNP, Endolizyny i Dend-AgNP + Endolizyny po 24 h inkubacji (B). Produkcja piowerdyny przez PAO1 bez i w obecności niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych nanowłókien, Dend-AgNP, Endolizyny i Dend-AgNP + Endolizyny po 24 h inkubacji (C). Nietraktowane komórki zastosowano jako kontrolę.

Ponadto, mikroskopowa obserwacja komórek bakteryjnych traktowanych samymi Dend-AgNPs, jak i w połączeniu z nanowłóknami i/lub endolizyną, potwierdziła brak zachowania typowej dla tych komórek morfologii oraz występowanie ich pozostałości na skutek zniszczenia (ryc. 23). Jest to zgodne z poprzednimi wynikami testów mikrobiologicznych i sugeruje na udział kompleksu Dend-AgNPs/endolizyna w zwiększaniu przepuszczalność błony i ściany komórkowej bakterii, prowadzącej do wycieku składników komórkowych i ostatecznego zniszczenia komórki.



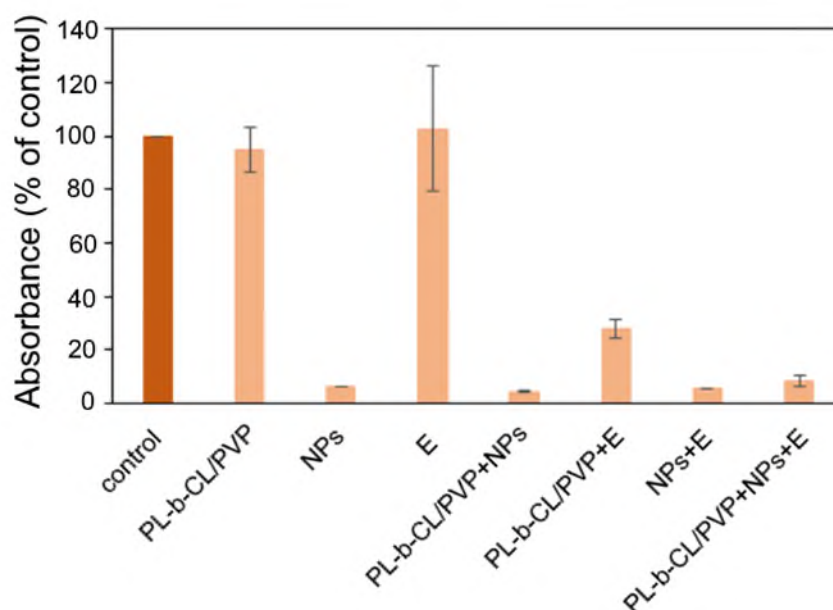
Rycina 23. Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologię nietraktowanych komórek bakteryjnych (A), traktowanych NF (B), endolizyną (C), NF+endolizyną (D), Dend-AgNPs (E), NF+Dend-AgNPs (F), Dend-AgNPs+endolizyną (G) oraz NF+Dend-AgNPs+endolizyna (H).

Dopełnieniem powyższych testów antybakteryjnych była ocena żywotności bakterii poddanych działaniu badanych nanomateriałów (ryc. 24). W tym celu zastosowano test LIVE/DEAD, który pozwolił na rozróżnienie żywych komórek, barwionych na zielono, od martwych barwionych na kolor czerwony. Analogicznie, w każdej z kombinacji gdzie zastosowane były Dend-AgNPs, zaobserwowano wyraźny spadek żywotności *P. aeruginosa*, ze szczególnym uwzględnieniem nanowłókien modyfikowanych nanocząstkami i endolizyną, które to indukowały znaczący wzrost śmiertelności PAO1. Zatem, wszystkie powyższe badania potwierdziły aktywność przeciwbakteryjną Dend-AgNPs oraz kompleksu Dend-AgNPs/endolizyna, a także jej brak w przypadku stosowania samych nanowłókien PL-b-CL/PVP.



Rycina 24. Wyniki barwienia LIVE/DEAD: nietraktowanej NF hodowli bakteryjnej (kontrola) (A), po 24 h traktowania niemodyfikowanymi NF (B), endolizyną (C), NF z endolizyną (D), Dend-AgNPs (E), NF z Dend-AgNPs (F), Dend-AgNPs+endolizyną (G) i NF modyfikowanymi kompleksem Dend-AgNPs/endolizyna (H).

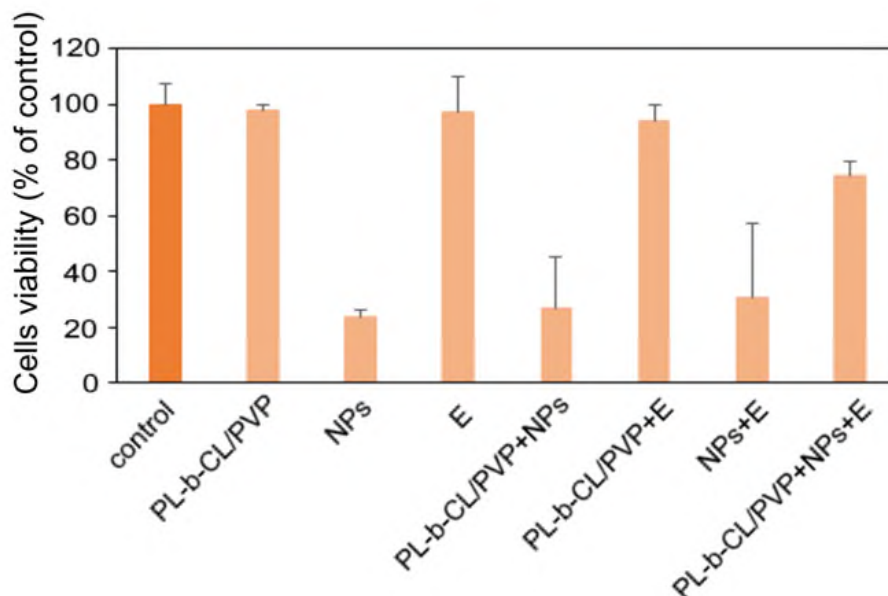
Następnie, oceniono wpływ badanych nanomateriałów na tworzenie biofilmu *P. aeruginosa*, którego występowanie może znacząco utrudniać leczenie i gojenie ran. W tym celu przeprowadzono barwienie fioletem krystalicznym, a ilość powstałego biofilmu mierzono spektrofotometrycznie. Jak pokazano na rycinie 25 modyfikacje nanowłókien Dend-AgNPs, endolizyną oraz kompleksem Dend-AgNPs/endolizyna, doprowadziły do zahamowania tworzenia biofilmu odpowiednio do 4.5%, 28% i 9%. Podczas gdy, sam kompleks dendronizowanych nanocząstek srebra i enzymu hamował tworzenie biofilmu do 5%. Należy zaznaczyć, że oprócz bezpośredniego uszkodzania komórek i ograniczania ich wzrostu, hamowanie tworzenia biofilmu może być także powiązane z działaniem jonów srebra, w tym ich interakcją z resztami cysteiny, obecnymi w enzymach zaangażowanych w metabolizm egzopolisacharydów, czy też być związane z zakłócaniem zjawiska QS (ang. *quorum sensing*).



Rycina 25. Hamowanie tworzenia biofilmu bez i w obecności niezmodyfikowanych i modyfikowanych NF z Dend-AgNP i/lub endolizyną oceniono poprzez pomiar absorbancji fioletem krystalicznym po 24 godzinach inkubacji.

W związku z przeznaczeniem opracowanych nanomateriałów tj. funkcjonalnych opatrunków na rany, w kolejnym etapie zbadano ich działanie cytotoksyczne wobec ludzkich fibroblastów (ryc. 26). Zarówno nanowłókna PL-b-CL/PVP, jak i endolizyna nie były cytotoksyczne dla komórek, w przeciwieństwie do Dend-AgNPs i modyfikowanych nimi NF, które zmniejszały żywotność fibroblastów odpowiednio do 24% i 26%. Z kolei badany kompleks Dend-AgNPs/endolizyna indukował spadek żywotności komórek do 30 %. Niemniej

jednak, włączenie kompleksu do nanowłókien ograniczyło jego efekt cytotoksyczny, z zachowaniem żywotności komórek na poziomie 74%, co stwarza obiecujące perspektywy, jeśli chodzi o ich medyczne zastosowanie.



Rycina 26. Żywotność komórek VH10 poddanych działaniu niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych nanowłókien PLCL/PVP, Dend-AgNP, Endolizyny i Dend-AgNP + Endolizyny po 24 h inkubacji. Komórki nietraktowane zastosowano jako kontrolę. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako procent kontroli.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP jako **nośników substancji terapeutycznych o właściwościach przeciwbakteryjnych, tj. Dend-AgNPs oraz białek pochodzenia bakteriofagowego (endolizyn).** Nanowłókna PL-b-CL/PVP, modyfikowane powierzchniowo Dend-AgNPs i endolizyną, wykazują zadowalającą aktywność przeciwbakteryjną wobec lekoopornego *P. aeruginosa*, a efekt ten powiązany jest z Dend-AgNPs, które działają jako permeabilizatory zewnętrznej błony bakteryjnej, umożliwiając działanie endolizynie - trawienie bakteryjnego peptydoglikanu. Ponadto, **zastosowanie nanowłókien jako nośnika dla kompleksu Dend-AgNPs/endolizyna znacząco zmniejsza jego cytotoksyczność w stosunku do ludzkich fibroblastów.** Właściwości biologiczne badanych nanomateriałów podsumowano w Tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie właściwości antybakteryjnych i cytotoksycznych

|                                 | <b>Bacteria Growth<br/>(Percentage of Control)</b> | <b>Inhibition of Biofilm Formation<br/>(Percentage of Control)</b> | <b>Fibroblast Cell Viability<br/>(Percentage of Control)</b> |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Nanofibers                      | 83 %                                               | 92 %                                                               | 98 %                                                         |
| Dend-AgNPs                      | 13 %                                               | 10 %                                                               | 24 %                                                         |
| Endolysin                       | 100 %                                              | 100 %                                                              | 98 %                                                         |
| Nanofibers + Dend-AgNPs         | 47 %                                               | <b>4.5 %</b>                                                       | 26 %                                                         |
| Nanofibers+ Endolysin           | 87 %                                               | 28 %                                                               | 92 %                                                         |
| Dend-AgNPs + Endolysin          | 50 %                                               | <b>5 %</b>                                                         | 39 %                                                         |
| Nanofibers+Dend-AgNPs+Endolysin | <b>9%</b>                                          | <b>9 %</b>                                                         | <b>74 %</b>                                                  |

Jak, widać zastosowanie nanowłókien PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs + endolizyna jest kolejnym trafnym podejściem polegającym na wykorzystaniu właściwości różnych związków, których współdziałanie daje szansę otrzymania **innowacyjnego rusztowania dla komórek, jednocześnie zapobiegającego infekcjom i wspomagającego regenerację uszkodzonych tkanek**, co może być doskonałym rozwiązaniem, zwłaszcza jeśli chodzi o kraje o niskich i średnich dochodach, gdzie ograniczone zasoby i dostęp do usług medycznych, uniemożliwia utrzymanie sterylnych warunków, a każdy nawet nieskomplikowany zabieg wiąże się z wysokim ryzykiem zakażenia.

## 5. Wnioski końcowe

1. Dzięki precyzyjnie dobranym parametrom elektroprzędzenia otrzymano porowate, cylindryczne nanowłókna o satysfakcjonującej stabilności termicznej i mechanicznej, co potwierdziły wykonane analizy fizykochemiczne.
2. Włączenie do nanowłókien PL-b-CL/PVP kropek kwantowych selenku kadmu (CdSe QDs) pozwoliło na wytworzenie nanomateriałów o właściwościach przeciwbakteryjnych skierowanych wobec lekoopornego *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oraz istotnej aktywności przeciwnowotworowej.
3. Powierzchniowa modyfikacja przeciwbakteryjnych nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs dendronizowanymi nanocząstkami srebra wzmacnia działanie antybakteryjne całego nanorusztowania wobec opornego na antybiotyki *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a zastosowanie tych nanowłókien jako platformy do transportu Dend-AgNPs ogranicza cytotoksyczność tych nanocząstek w stosunku do ludzkich fibroblastów.
4. Elektroprzędzone nanowłókna PL-b-CL/PVP modyfikowane Dend-AgNPs i endolizyną wykazują silne działanie przeciwbakteryjne wobec *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hamując jego wzrost, produkcję czynników wirulencji i indukując uszkodzenia błony zewnętrznej i ściany komórkowej bakterii, a wykorzystanie tych nanowłókien jako nośnika dla Dend-AgNPs istotnie zmniejsza ich cytotoksyczność wobec fibroblastów.

## 6. Literatura uzupełniająca

- [1] X. Shan, X. Gong, J. Li, J. Wen, Y. Li, and Z. Zhang, “Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 12, no. 7, pp. 3028–3048, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.APSB.2022.02.025.
- [2] Q. Liu, J. Zou, Z. Chen, W. He, and W. Wu, “Current research trends of nanomedicines,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 13, no. 11, pp. 4391–4416, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.APSB.2023.05.018.
- [3] N. Rabiee, S. Ahmadi, O. Akhavan, and R. Luque, “Silver and Gold Nanoparticles for Antimicrobial Purposes against Multi-Drug Resistance Bacteria,” Mar. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/ma15051799.
- [4] K. Skrzyniarz, D. Kuc-Ciepluch, M. Lasak, M. Arabski, J. Sanchez-Nieves, and K. Ciepluch, “Dendritic systems for bacterial outer membrane disruption as a method of overcoming bacterial multidrug resistance,” *Biomater Sci*, vol. 11, no. 6421, 2023, doi: 10.1039/d3bm01255g.
- [5] P. V. Baptista *et al.*, “Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria-"A Battle of the Titans",” Jul. 02, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2018.01441.
- [6] Y. Huang *et al.*, “Nanotechnology’s frontier in combatting infectious and inflammatory diseases: prevention and treatment,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 1–50, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01745-z.
- [7] S. Yasamineh *et al.*, “An overview on nanoparticle-based strategies to fight viral infections with a focus on COVID-19,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 1–26, Oct. 2022, doi: 10.1186/S12951-022-01625-0.
- [8] D. Lozano, V. Larraga, M. Vallet-Regí, and M. Manzano, “An Overview of the Use of Nanoparticles in Vaccine Development,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 12, p. 1828, Jun. 2023, doi: 10.3390/NANO13121828.
- [9] M. Q. Khan, M. A. Alvi, H. H. Nawaz, and M. Umar, “Cancer Treatment Using Nanofibers: A Review,” *Nanomaterials*, vol. 14, no. 15, p. 1305, Aug. 2024, doi: 10.3390/NANO14151305.
- [10] Y. Xue *et al.*, “Porous Silicon Nanocarriers with Stimulus-Cleavable Linkers for Effective Cancer Therapy,” *Adv Healthc Mater*, vol. 11, no. 12, Jun. 2022, doi: 10.1002/adhm.202200076.
- [11] S. Siddique and J. C. L. Chow, “Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy,” *Applied Sciences*, vol. 10, no. 11, Jun. 2020, doi: 10.3390/app10113824.

- [12] A. A. Halwani, "Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, p. 106, Jan. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14010106.
- [13] F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Roointan, M. Karimi, and M. R. Hamblin, "Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities," *Nanomedicine*, vol. 14, no. 1, p. 93, Jan. 2018, doi: 10.2217/NNM-2018-0120.
- [14] A. Haleem, M. Javaid, R. P. Singh, S. Rab, and R. Suman, "Applications of nanotechnology in medical field: a brief review," *Global Health Journal*, vol. 7, no. 2, pp. 70–77, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.GLOHJ.2023.02.008.
- [15] G. Anusiya and R. Jaiganesh, "A review on fabrication methods of nanofibers and a special focus on application of cellulose nanofibers," *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 4, p. 100262, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.CARPTA.2022.100262.
- [16] Kenry and C. T. Lim, "Nanofiber technology: current status and emerging developments," *Prog Polym Sci*, vol. 70, pp. 1–17, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2017.03.002.
- [17] A. Patnaik, "Recent Developments in Application of Nanofibers," *Processes*, vol. 12, no. 9, p. 1894, Sep. 2024, doi: 10.3390/PR12091894.
- [18] V. S. Reddy *et al.*, "A Review on Electrospun Nanofibers Based Advanced Applications: From Health Care to Energy Devices," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 21, p. 3746, Nov. 2021, doi: 10.3390/POLYM13213746.
- [19] A. Al-Abduljabbar and I. Farooq, "Electrospun Polymer Nanofibers: Processing, Properties, and Applications," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 65, Jan. 2023, doi: 10.3390/polym15010065.
- [20] M. Zahmatkeshan *et al.*, "Polymer Based Nanofibers: Preparation, Fabrication, and Applications," *Handbook of Nanofibers*, pp. 1–47, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-42789-8\_29-2.
- [21] A. M. Al-Enizi, M. M. Zagho, and A. A. Elzatahry, "Polymer-based electrospun nanofibers for biomedical applications," Apr. 20, 2018, *MDPI*. doi: 10.3390/nano8040259.

- [22] S. Anjum *et al.*, “Multifunctional electrospun nanofibrous scaffold enriched with alendronate and hydroxyapatite for balancing osteogenic and osteoclast activity to promote bone regeneration,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1302594.
- [23] I. Behere, Z. Pardawala, A. Vaidya, V. Kale, and G. Ingavle, “Osteogenic differentiation of an osteoblast precursor cell line using composite PCL-gelatin-nHAp electrospun nanofiber mesh,” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 70, no. 18, pp. 1281–1295, 2021, doi: 10.1080/00914037.2020.1767619.
- [24] Y. Wu, L. Zhou, Y. Li, and X. Lou, “Osteoblast-derived extracellular matrix coated PLLA/silk fibroin composite nanofibers promote osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 110, no. 3, pp. 525–534, Mar. 2022, doi: 10.1002/jbm.a.37302.
- [25] S. D. Dutta *et al.*, “In Vitro Biocompatibility of Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Cellulose Nanocrystals-Nanofibers for Tissue Engineering,” *J Nanomater*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/2061545.
- [26] B. Abadi, N. Goshtasbi, S. Bolourian, J. Tahsili, M. Adeli-Sardou, and H. Forootanfar, “Electrospun hybrid nanofibers: Fabrication, characterization, and biomedical applications,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Dec. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.986975.
- [27] K. Halicka and J. Cabaj, “Electrospun Nanofibers for Sensing and Biosensing Applications—A Review,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 12, p. 6357, Jun. 2021, doi: 10.3390/IJMS22126357.
- [28] L. A. Mercante, A. Pavinatto, T. S. Pereira, F. L. Migliorini, D. M. dos Santos, and D. S. Correa, “Nanofibers interfaces for biosensing: Design and applications,” *Sensors and Actuators Reports*, vol. 3, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.snr.2021.100048.
- [29] Z. Chen, M. Guan, Y. Bian, and X. Yin, “Multifunctional Electrospun Nanofibers for Biosensing and Biomedical Engineering Applications,” *Biosensors*, vol. 14, no. 1, p. 13, Dec. 2023, doi: 10.3390/BIOS14010013.
- [30] J. Li *et al.*, “Recent Development of Polymer Nanofibers in the Field of Optical Sensing,” *Polymers*, vol. 15, no. 17, p. 3616, Aug. 2023, doi: 10.3390/POLYM15173616.

- [31] N. Elnagar, N. Elgiddawy, W. M. A. El Rouby, A. A. Farghali, and H. Korri-Youssoufi, "Impedimetric Detection of Cancer Markers Based on Nanofiber Copolymers," *Biosensors (Basel)*, vol. 14, no. 2, p. 77, Feb. 2024, doi: 10.3390/BIOS14020077/S1.
- [32] S. Kumar, P. Rai, J. G. Sharma, A. Sharma, and B. D. Malhotra, "PEDOT:PSS/PVA-Nanofibers-Decorated Conducting Paper for Cancer Diagnostics," *Adv Mater Technol*, vol. 1, no. 4, p. 1600056, Jul. 2016, doi: 10.1002/ADMT.201600056.
- [33] Z. Y. Fan, Y. L. Zhao, X. Y. Zhu, Y. Luo, M. W. Shen, and X. Y. Shi, "Folic acid modified electrospun poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine nanofibers for cancer cell capture applications," *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, vol. 34, no. 6, pp. 755–765, Jun. 2016, doi: 10.1007/S10118-016-1792-6/METRICS.
- [34] M. O. Kim *et al.*, "Fabrication and characterization of colorimetric polymer based novel nanofibers for sensing and blocking of bacterial," *Mater Res Express*, vol. 7, no. 8, p. 085405, Aug. 2020, doi: 10.1088/2053-1591/ABABBC.
- [35] K. Chen *et al.*, "Recent advances in electrospun nanofibers for wound dressing," *Eur Polym J*, vol. 178, p. 111490, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2022.111490.
- [36] X. Zhang *et al.*, "Advances in wound dressing based on electrospinning nanofibers," *J Appl Polym Sci*, vol. 141, no. 1, p. e54746, Jan. 2024, doi: 10.1002/APP.54746.
- [37] S. Homaeigohar and A. R. Boccaccini, "Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings," *Acta Biomater*, vol. 107, pp. 25–49, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2020.02.022.
- [38] S. P. Miguel *et al.*, "Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 60–71, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2018.05.011.
- [39] B. S. Alotaibi, M. Shoukat, M. Buabeid, A. K. Khan, and G. Murtaza, "Healing potential of neomycin-loaded electrospun nanofibers against burn wounds," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 74, p. 103502, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.JDDST.2022.103502.
- [40] N. Amiri *et al.*, "Teicoplanin-loaded chitosan-PEO nanofibers for local antibiotic delivery and wound healing," *Int J Biol Macromol*, vol. 162, pp. 645–656, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.195.
- [41] S. Cui *et al.*, "Polylactide nanofibers delivering doxycycline for chronic wound treatment," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 104, p. 109745, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.109745.
- [42] Y. I. Wan, A. Patel, C. Achary, R. Hewson, M. Phull, and R. M. Pearse, "Postoperative infection and mortality following elective surgery in the International Surgical Outcomes

- Study (ISOS),” *British Journal of Surgery*, vol. 108, no. 2, pp. 220–227, Mar. 2021, doi: 10.1093/BJS/ZNAA075.
- [43] T. Kielholz, F. Rohde, N. Jung, and M. Windbergs, “Bacteriophage-loaded functional nanofibers for treatment of *P. aeruginosa* and *S. aureus* wound infections,” *Scientific Reports* 2023 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–13, May 2023, doi: 10.1038/s41598-023-35364-5.
- [44] P. Javadi, M. A. Derakhshan, F. Asghari, S. Kharrazi, and R. Faridi-Majidi, “Co-electrospun PCL-collagen nanofibers containing saffron-synthesized gold nanoparticles as an antioxidant wound dressing,” *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 237, no. 11, pp. 1318–1329, Nov. 2023, doi: 10.1177/09544119231203773.
- [45] C. He *et al.*, “Harnessing biocompatible nanofibers and silver nanoparticles for wound healing: Sandwich wound dressing versus commercial silver sulfadiazine dressing,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 128, p. 112342, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2021.112342.
- [46] C. Liu, Y. Zhu, X. Lun, H. Sheng, and A. Yan, “Effects of wound dressing based on the combination of silver@curcumin nanoparticles and electrospun chitosan nanofibers on wound healing,” *Bioengineered*, vol. 13, no. 2, pp. 4328–4339, 2022, doi: 10.1080/21655979.2022.2031415.
- [47] N. Palani, P. Vijayakumar, P. Monisha, S. Ayyadurai, and S. Rajadesingu, “Electrospun nanofibers synthesized from polymers incorporated with bioactive compounds for wound healing,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 22, no. 1, pp. 1–30, Apr. 2024, doi: 10.1186/S12951-024-02491-8.
- [48] R. Ran *et al.*, “Fabrication of antimicrobial poly(lactic-co-glycolic acid)/silk fibroin/aloe anthraquinone fibrous membranes for potential application of wound healing,” *J Appl Polym Sci*, vol. 139, no. 25, p. e52394, Jul. 2022, doi: 10.1002/APP.52394.
- [49] I. Garcia-Orue *et al.*, “Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and Aloe vera for wound healing applications,” *Int J Pharm*, vol. 523, no. 2, pp. 556–566, May 2017, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2016.11.006.
- [50] G. G. Flores-Rojas, B. Gómez-Lazaro, F. López-Saucedo, R. Vera-Graziano, E. Bucio, and E. Mendizábal, “Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering: A Review,” *Macromol*, vol. 3, no. 3, pp. 524–553, Aug. 2023, doi: 10.3390/MACROMOL3030031.
- [51] A. Ho-Shui-Ling, J. Bolander, L. E. Rustom, A. W. Johnson, F. P. Luyten, and C. Picart, “Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells

- current stage and future perspectives,” *Biomaterials*, 180:143-162, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017.
- [52] A. J. Salgado *et al.*, “Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Past, Present, and Future,” in *International Review of Neurobiology*, vol. 108, Academic Press, 2013, pp. 1–33. doi: 10.1016/B978-0-12-410499-0.00001-0.
- [53] B. A. Venmathi Maran, S. Jeyachandran, and M. Kimura, “A Review on the Electrospinning of Polymer Nanofibers and Its Biomedical Applications,” *Journal of Composites Science*, vol. 8, no. 1, p. 32, Jan. 2024, doi: 10.3390/JCS8010032.
- [54] E. Bayrak, “Nanofibers: Production, Characterization, and Tissue Engineering Applications,” *21st Century Nanostructured Materials - Physics, Chemistry, Classification, and Emerging Applications in Industry, Biomedicine, and Agriculture*, Feb. 2022, doi: 10.5772/INTECHOPEN.102787.
- [55] H. Ding, Y. Cheng, X. Niu, and Y. Hu, “Application of electrospun nanofibers in bone, cartilage and osteochondral tissue engineering,” *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 32, no. 4, pp. 536–561, Nov. 2020, doi: 10.1080/09205063.2020.1849922.
- [56] T. Huang *et al.*, “Application and Development of Electrospun Nanofiber Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 10, no. 7, pp. 4114–4144, Jul. 2024, doi: 10.1021/acsbiomaterials.4c00028.
- [57] M. Bozdog, F. Urek, S. Cesur, A. Sahin, and O. Gunduz, “Bovine serum albumin (BSA)-Loaded polyvinyl alcohol (PVA) / chitosan (CH) / hydroxyapatite (HA) electrospun nanofibers for bone tissue regeneration,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 106, p. 106712, Apr. 2025, doi: 10.1016/J.JDDST.2025.106712.
- [58] X. Yan, H. Yao, J. Luo, Z. Li, and J. Wei, “Functionalization of Electrospun Nanofiber for Bone Tissue Engineering,” Jul. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/polym14142940.
- [59] J. Wu *et al.*, “Electrospun Nanofiber Scaffold for Skin Tissue Engineering: A Review,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 7, no. 6, pp. 3556–3567, Jun. 2024, doi: 10.1021/acsabm.4c00318.
- [60] W. Huang, M. Huo, N. Cheng, and R. Wang, “New Forms of Electrospun Nanofibers Applied in Cardiovascular Field,” *Front Cardiovasc Med*, vol. 8, p. 801077, Jan. 2021, doi: 10.3389/FCVM.2021.801077.
- [61] H. M. Mousa, M. G. Ali, A. I. Rezk, E. A. Nasr, and K. H. Hussein, “Development of conductive polymeric nanofiber patches for cardiac tissue engineering application,” *J Appl Polym Sci*, vol. 139, no. 32, p. e52757, Aug. 2022, doi: 10.1002/APP.52757.

- [62] R. Jaswal *et al.*, “Osteopromotive PDA-modified gold nanoparticles-incorporated bioinspired polycaprolactone-based nanofibers for bone cancer therapy and robust bone regeneration,” *Mater Today Nano*, vol. 25, p. 100453, Mar. 2024, doi: 10.1016/J.MTNANO.2024.100453.
- [63] S. Zhu *et al.*, “Advanced Nanofiber-Based Scaffolds for Achilles Tendon Regenerative Engineering,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 897010, Jun. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.897010/PDF.
- [64] A. Chaudry, J. Wu, H. Wang, X. Mo, M. A. Bhutto, and B. Sun, “Research and application of conductive nanofiber nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration: a narrative review,” *Advanced Technology in Neuroscience*, 2025, doi: 10.4103/ATN.ATN-D-24-00024.
- [65] N. Anup *et al.*, “Reinforced electrospun nanofiber composites for drug delivery applications,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 109, no. 10, pp. 2036–2064, Oct. 2021, doi: 10.1002/JBM.A.37187.
- [66] G. K. Rao, M. Kurakula, and K. S. Yadav, “Application of Electrospun Materials in Gene Delivery,” in *Electrospun Materials and Their Allied Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, pp. 265–306. doi: 10.1002/9781119655039.CH10.
- [67] X. Duan, H. Ian Chen, and C. Guo, “Polymeric Nanofibers for Drug Delivery Applications: A Recent Review,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 33, no. 12, p. 78, Dec. 2022, doi: 10.1007/S10856-022-06700-4.
- [68] S. Kajdič, O. Planinšek, M. Gašperlin, and P. Kocbek, “Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 51, pp. 672–681, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.JDDST.2019.03.038.
- [69] Y. Yang *et al.*, “Application of Electrospun Drug-Loaded Nanofibers in Cancer Therapy,” *Polymers (Basel)*, vol. 16, no. 4, p. 504, Feb. 2024, doi: 10.3390/POLYM16040504/S1.
- [70] L. Louis, B. shin Chee, M. McAfee, and M. Nugent, “Electrospun Drug-Loaded and Gene-Loaded Nanofibres: The Holy Grail of Glioblastoma Therapy?,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 6, p. 1649, Jun. 2023, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS15061649.
- [71] Y. Fu, X. Li, Z. Ren, C. Mao, and G. Han, “Multifunctional electrospun nanofibers for enhancing localized cancer treatment,” *Small*, vol. 14, no. 33, p. e1801183, Aug. 2018, doi: 10.1002/SMLL.201801183.

- [72] L. Fu, Q. Feng, Y. Chen, J. Fu, X. Zhou, and C. He, “Nanofibers for the Immunoregulation in Biomedical Applications,” *Advanced Fiber Materials* 2022 4:6, vol. 4, no. 6, pp. 1334–1356, Sep. 2022, doi: 10.1007/S42765-022-00191-2.
- [73] W. Li, L. Huang, J. Zhang, B. Lin, Z. Huang, and Y. Li, “PLLA/POSS Nanofibers Loaded with Multitargeted pANG Composite Nanoparticles for Promotion of Vascularization in Shear Flow,” *Macromol Biosci*, vol. 20, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.1002/mabi.201900204.
- [74] C. Pinese *et al.*, “Sustained delivery of siRNA/mesoporous silica nanoparticle complexes from nanofiber scaffolds for long-term gene silencing,” *Acta Biomater*, vol. 76, pp. 164–177, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.05.054.
- [75] G. Kuang, X. Lin, J. Li, W. Sun, Q. Zhang, and Y. Zhao, “Electrospun nanofibers-derived functional scaffolds for cancer therapy,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 489, p. 151253, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.CEJ.2024.151253.
- [76] Š. Zupančič *et al.*, “Sustained release of antimicrobials from double-layer nanofiber mats for local treatment of periodontal disease, evaluated using a new micro flow-through apparatus,” *Journal of Controlled Release*, vol. 316, pp. 223–235, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.JCONREL.2019.10.008.
- [77] I. Maliszewska and T. Czapka, “Electrospun Polymer Nanofibers with Antimicrobial Activity,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 9, May 2022, doi: 10.3390/polym14091661.
- [78] Z. Golestannejad, F. Khozeimeh, M. Mehrasa, S. Mirzaeei, and D. Sarfaraz, “A novel drug delivery system using acyclovir nanofiber patch for topical treatment of recurrent herpes labialis: A randomized clinical trial,” *Clin Exp Dent Res*, vol. 8, no. 1, pp. 184–190, Feb. 2022, doi: 10.1002/CRE2.512.
- [79] A. Hiwrale, S. Bharati, P. Pingale, and A. Rajput, “Nanofibers: A current era in drug delivery system,” *Heliyon*, vol. 9, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18917.
- [80] G. K. Sharma, N. R. James, G. K. Sharma, and N. R. James, “Electrospinning: The Technique and Applications,” *Recent Developments in Nanofibers Research*, Aug. 2022, doi: 10.5772/INTECHOPEN.105804.
- [81] B. A. Chinnappan, M. Krishnaswamy, H. Xu, and M. E. Hoque, “Electrospinning of Biomedical Nanofibers/Nanomembranes: Effects of Process Parameters,” *Polymers*, vol. 14, no. 18, p. 3719, Sep. 2022, doi: 10.3390/POLYM14183719.
- [82] A. Fahmi *et al.*, “Fabrication of CdSe nanofibers with potential for biomedical applications,” *Adv Funct Mater*, vol. 20, no. 6, pp. 1011–1018, Mar. 2010, doi: 10.1002/adfm.200902013.

- [83] C. E. Peña-González *et al.*, “Antibacterial and antifungal properties of dendronized silver and gold nanoparticles with cationic carbosilane dendrons,” *Int J Pharm*, vol. 528, no. 1–2, pp. 55–61, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.067.

## 7. Dorobek naukowy

### Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

- Nirwan Viraj Pratap, **Lasak Magdalena**, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, *Nanomaterials*, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630.

**Punktacja MNiSW: 100 Impact Factor: 4.4**

- **Lasak Magdalena**, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, *Macromolecular Bioscience*, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513.

**Punktacja MNiSW: 100 Impact Factor: 4.4**

- **Lasak Magdalena**, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against *Pseudomonas aeruginosa*, *Nanotechnology, Science and Applications*, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942.

**Punktacja MNiSW: 200 Impact Factor: 4.9**

### Pozostałe publikacje

- Kuc-Ciepluch Dorota, Gorzkiewicz Michał, Pędziwiatr-Werbicka Elżbieta, Barrios-Gumiel Andrea, **Lasak Magdalena**, Mariak Aleksandra, Sztandera Krzysztof, Gomez Rafael, de la Mata F. Javier, Lankoff Anna, Klajnert-Maculewicz Barbara, Bryszewska Maria, Arabski Michał, Ciepluch Karol. The effect of surface modification of dendronized gold nanoparticles on activation and release of pyroptosis-inducing pro-inflammatory cytokines in presence of bacterial lipopolysaccharide in monocytes, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2022, 217, 112652. DOI:10.1016/j.colsurfb.2022.112652.

**Punktacja MNiSW: 100 Impact Factor: 5.4**

- Skrzyniarz Kinga, Kuc-Ciepluch Dorota, **Lasak Magdalena**, Arabski Michał, Sanchez-Nieves Javier, Ciepluch Karol. Dendritic systems for bacterial outer membrane disruption as a method of overcoming bacterial multidrug resistance, *Biomaterials Science*, 2023. DOI: 10.1039/d3bm01255g.

**Punktacja MNiSW: 140 Impact Factor: 5.8**

- **Lasak Magdalena**, Ciepluch Karol. Overview of mechanism and consequences of endothelial leakiness caused by metal and polymeric nanoparticles, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2023, 14, 329–338. DOI:10.3762/bjnano.14.28.

**Punktacja MNiSW: 100 Impact Factor: 2.6**

### Konferencje naukowe

- **58<sup>th</sup> International Conference on Medicinal Chemistry RICT** (Bordeaux, France); 03.07. – 05.07.2024  
Poster: *Development of a nanomaterial based on nanofibers modified with antibacterial proteins*
- **VII Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach**; 06.06. – 07.06.2024  
Wystąpienie ustne: *Development of a nanomaterial based on nanofibers modified with antibacterial proteins*
- **VI Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach**; 01.06. – 02.06.2023  
Wystąpienie ustne: *Physicochemical and biological properties of hybrid nanofibers functionalized with gold nanoparticles and modified with dendronized silver nanoparticles*
- **BioNanoMed 2023 Nanotechnology Enables Personalized Medicine; 11<sup>TH</sup> International Congress** (Graz, Austria) – 12.04. – 14.04.2023  
Poster: *Biological Properties of Nanofibers Functionalized with Gold Nanoparticles*

- International Conference: **COST ACTION CA17140 NANO2CLINIC 2<sup>nd</sup> STSM Virtual Conference** – 23.02.2023

Wystąpienie ustne: *Synthesis and characterization of nanofibers functionalized with nanoparticles with anticancer properties*

- **V Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach;**  
02.06 – 03.06.2022

Wystąpienie ustne: *The influence of surface modification of nanoparticles on the induction of the NanoEL effect, or nanomaterials-induced endothelial leakiness*

### **Staż naukowe**

- **Université de Tours, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes (NMNS), Faculté de Pharmacie** (Tours, France)

Czas trwania: 01.11. – 30.11.2024

Źródło finansowania: *FRENCH GOVERNMENT SCHOLARSHIP: SSHN RESEARCH STAY*

- **Rhine-Waal University of Applied Science, Faculty of Technology and Bionics** (Kleve, Germany)

Czas trwania: 01.07. – 29.07.2022

Źródło finansowania: EUROPEAN COOPERATION IN SCIENCE & TECHNOLOGY (COST) E-COST-GRANT-CA17140-d00a191a

### **Projekty naukowe i granty**

- **FRENCH GOVERNMENT SCHOLARSHIP: SSHN RESEARCH STAY**

Tytuł: *Metal nanofibers for SERS sensing of bacteria and bacterial endotoxins*

Okres realizacji: 01.11. – 30.11.2024

- **UJK dla rozwoju biznesu – projekt z programu NAUKA DLA SPOŁECZEŃSTWA** realizowany we współpracy z Regeneris Sp. z o. o. (Kielce)

Tytuł: *Development of a nanomaterial based on nanofibers modified with antibacterial proteins*

Okres realizacji: 21.12.2023 – 31.03.2024

Stanowisko: wykonawca

- **COST Action: CA17140, SHORT-TERM SCIENTIFIC MISSION GRANT, E-COST-GRANT-CA17140-d00a191a**

Tytuł: *Influence of hybrid nanofibers on endothelial leakiness - synthesis and characterization of nanofibers functionalized with NPs*

Okres realizacji: 1.07. – 29.07.2022

### **Kursy i szkolenia**

- **2<sup>nd</sup> CA17140 Training School: Preclinical and clinical studies of cancer nanomedicine – state of the art and future perspectives**

Institute of Oncology Research (Bellinzona, Switzerland)

Czas trwania: 13.03. – 14.03.2023

### **Szkolenia on-line**

- **Testy w hodowlach komórkowych oparte o inserty**

Szkolenie on-line organizowane przez Merck Life Science

Czas trwania: 08.10.2024

- **Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej do szybkiej analizy jakościowej**

Warsztat praktyczny on-line organizowany przez Merck Life Science

Czas trwania: 03.10.2023

- **Oligonukleotydy - projektowanie, dobieranie i specyfika pracy**

Szkolenie aplikacyjne on-line organizowane przez Merck Life Science

Czas trwania: 10.10.2023

- **Oczyszczanie kwasów nukleinowych**

Szkolenie aplikacyjne on-line organizowane przez Merck Life Science

Czas trwania: 17.10.2023

### **Nagrody i wyróżnienia**

- **Laureat Nagrody Prodomus JM Rektora UJK za najlepszy referat wygłoszony w dyscyplinie Nauki Biologiczne**

Ogólnopolska konferencja naukowa: 6<sup>TH</sup> PhD STUDENTS FORUM OF JAN KOCHANOWSKI UNIVERSITY IN KIELCE; 01.06. – 02.06.2023

Wystąpienie ustne: *Physicochemical and biological properties of hybrid nanofibers functionalized with gold nanoparticles and modified with dendronized silver nanoparticles*

- **Finalist of the *Poster Award***

*BioNanoMed 2023 Nanotechnology enables Personalized Medicine; 11<sup>TH</sup> International Congress* (Austria, Graz); 12.04. – 14.04.2023

Poster: *Biological Properties of Nanofibers Functionalized with Gold Nanoparticles*

**Działalność na rzecz Uniwersytetu i popularyzowanie nauki**

- Członek Okręgowej Komisji Wyborczej Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach na kadencję 2024-2028
- Udział w współprowadzeniu Uniwersyteckich warsztatów laboratoryjnych pt. „*Spotkanie z biologią. Wykłady i warsztaty dla uczniów*” zorganizowanych w Instytucie Biologii UJK w Kielcach dla szkół ponadpodstawowych (18.03. – 08.04.2022)
- Prowadzenie warsztatów laboratoryjnych „*Młody biochemik*” w ramach „*Nocy Biologów*” w Instytucie Biologii UJK w Kielcach (20.01.2022)
- Prelekcja „*Nanotechnology in Medicine*” wygłoszona podczas Świętokrzyskiego Festiwalu Nauki (09.10.2021)
- Prowadzenie warsztatów „*Nanotechnologia w medycynie*” w ramach Świętokrzyskiego Festiwalu Nauki (09.10.2021)

**KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY  
DOKTORSKIEJ**

Article

# Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix

Viraj P. Nirwan <sup>1</sup>, Magdalena Lasak <sup>2</sup>, Karol Ciepluch <sup>2</sup> and Amir Fahmi <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Technology and Bionics, Rhine-Waal University of Applied Science, Marie-Curie-Straße 1, 47533 Kleve, Germany

<sup>2</sup> Division of Medical Biology, Jan Kochanowski University in Kielce, Uniwersytecka Street 7, 25-406 Kielce, Poland

\* Correspondence: amir.fahmi@hochschule-rhein-waal.de; Tel: +49-0282-1806-73634

**Abstract:** Fabrication and characterization of hybrid nanomats containing quantum dots can play a prominent role in the development of advanced biosensors and bio-based semiconductors. Owing to their size-dependent properties and controlled nanostructures, quantum dots (QDs) exhibit distinct optical and electronic characteristics. However, QDs include heavy metals and often require stabilizing agents which are toxic for biological applications. Here, to mitigate the use of toxic ligands, cadmium selenide quantum dots (CdSe QDs) were synthesized in situ with polyvinylpyrrolidone (PVP) at room temperature. The addition of PVP polymer provided size regulation, stability, and control over size distribution of CdSe QDs. The characterization of the optical properties of the CdSe QDs was performed using fluorescence and ultraviolet–visible (UV-Vis) spectroscopy. CdSe QDs exhibited a typical absorbance peak at 280 nm and a photoluminescence emission peak at 580 nm. Transmission electron microscopy (TEM) micrographs demonstrated that CdSe QDs having an average size of  $6 \pm 4$  nm were obtained via wet chemistry method. CdSe QDs were immobilized in a blend of PVP and poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) (PL-b-CL) copolymer that was electrospun to produce nanofibers. Scanning electron microscopy (SEM), thermal analyses and attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) were used to characterize properties of fabricated nanofibers. Both pristine and hybrid nanofibers possessed cylindrical geometry and rough surface features, facilitating increased surface area. Infrared absorption spectra showed a slight shift in absorbance peaks due to interaction of PVP-coated CdSe QDs and nanofiber matrix. The presence of CdSe QDs influenced the fiber diameter and their thermal stability. Further, in vitro biological analyses of hybrid nanofibers showed promising antibacterial effect and decline in cancer cell viability. This study offers a simple approach to obtain hybrid nanomats immobilized with size-controlled PVP-coated CdSe QDs, which have potential applications as biosensors and antibacterial and anticancer cell agents.

**Citation:** Nirwan, V.P.; Lasak, M.; Ciepluch, K.; Fahmi, A. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix. *Nanomaterials* **2023**, *13*, 630. <https://doi.org/10.3390/nano13040630>

Academic Editors: Antonios Kelarakis and Yurii K. Gun'ko

Received: 21 December 2022

Revised: 26 January 2023

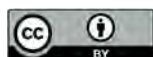
Accepted: 31 January 2023

Published: 5 February 2023

**Keywords:** polymer-stabilized quantum dots; hybrid structured nanomaterials; copolymer; electrospinning; non-wovens; fluorescence; biosensors

## 1. Introduction

Nanostructured organic/inorganic semiconductor hybrids possess exceptional size-dependent optical [1], electrical [2], and magnetic properties [3]. These materials have been explored substantially for biosensing [4,5], photocatalysis [6,7] and photovoltaic [8–10] applications. Hybrid nanomaterials based on polymer-templated quantum dots are innovative functional materials, which combine the flexibility and the processability of polymers together with the unique optical collective properties of QDs [11]. Inorganic QDs comprise semiconductor nanoparticles based on metals from the II–VI groups of the periodic table, with an average size between 2 and 20 nm. Favorably, quantum dots offer the possibility of tuning optical properties based on their shape, size, and composition



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

[12,13]. Moreover, templating the QDs within the biopolymers can extend their solubility and compatibility in wide range of biological media in addition to providing control over their morphology. Additionally, inorganic/organic hybrid combinations at nanoscales offer efficient charge separation at the interface between the dielectric shell and semiconductor core, therefore resulting in magnification of quantum effect and power translation efficiency in addition to improving the photostability. CdSe QDs are remarkable as they offer the possibility of the systematic tuning of the absorption and emission wavelengths as well as wide wavelengths of photoluminescence and stability [14–16]. Due to these characteristics, CdSe QDs are preferred for applications such as biomarkers and sensors [17]. CdSe QDs, similar to other inorganic/organic hybrids, consist of a luminescent active core and stabilizing ligands as a shell. Traditionally, the role of stabilizing QDs has been played by ligands such as trioctylphosphine oxide (CT) and octadecylamine (CA) [18]. These ligands are often toxic for biological systems, hence restricting their usage in biological applications [19]. Therefore, combinations such as P3HT-coated CdSe QDs are highly demanded to overcome such issues. Here, P3HT, as an electron donor, is well-suited to coat CdSe QDs as well as enable modification of emissions over a wide wavelength of spectrum [20–22]. Similarly, by using polymers as stabilizing agents, it is possible to mitigate the use of toxic ligands while providing stable QDs for biological applications [13,17,23]. In particular, applying the in situ approach restricts agglomeration and facilitates a greater control over the size and the size distribution of QDs [22,24]. Additionally, use of polymer offers a selection of biocompatible materials [13]. Moreover, the presence of functional polymeric matrix can open energy transfer pathways and prevent the self-quenching of the fluorescence of QDs [22,25] and subsequently enhance the efficiency and effectiveness of QDs by structuring them at the nanoscale. Herein, the fabrication of nanofibers via electrospinning offered as an excellent tool for homogenous immobilization of QDs in low dimensional structure. Utilization of nanofibers for structuring hybrid QDs offers two main advantages:

- a. They provide QDs access to a large surface area due to their characteristic high aspect ratio [26].
- b. Secondly, they offer QDs a shielding effect, which in turn mitigates toxicity and leaching issues as well as facilitating access to a targeted delivery mechanism [8].

Electrospinning offers a cost effective, relatively controlled mechanism to obtain CdSe QDs structured in nanofibers, which are made from biocompatible polymers [27–29]. Hence, in this two-stage investigation, initially, the synthesis of CdSe QDs was performed in situ with PVP polymer to control size and size distribution of QDs. Thereafter, QDs were immobilized in an electrospun nanofibers matrix using a biodegradable and biocompatible copolymer of poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) (PL-b-CL). PVP polymer was used as co-spinning agent to stabilize the electrospinning process. Additionally, it facilitated an interface between the PVP-stabilized QDs and the nanofiber matrix. Therefore, hybrid nanofibers with a homogenous distribution of CdSe QDs in nanofiber matrix were fabricated. Finally, the properties of the obtained nanomaterials were characterized using various physicochemical techniques and electron microscopy. Biological analysis was performed to describe antimicrobial activity of nanofibers and their cytotoxic effect on eukaryotic cells. Nanostructured hybrid materials fabricated using this study exhibit suitability for biosensing, biomarker, semiconductor, and photocatalysis applications.

## 2. Materials and Methods

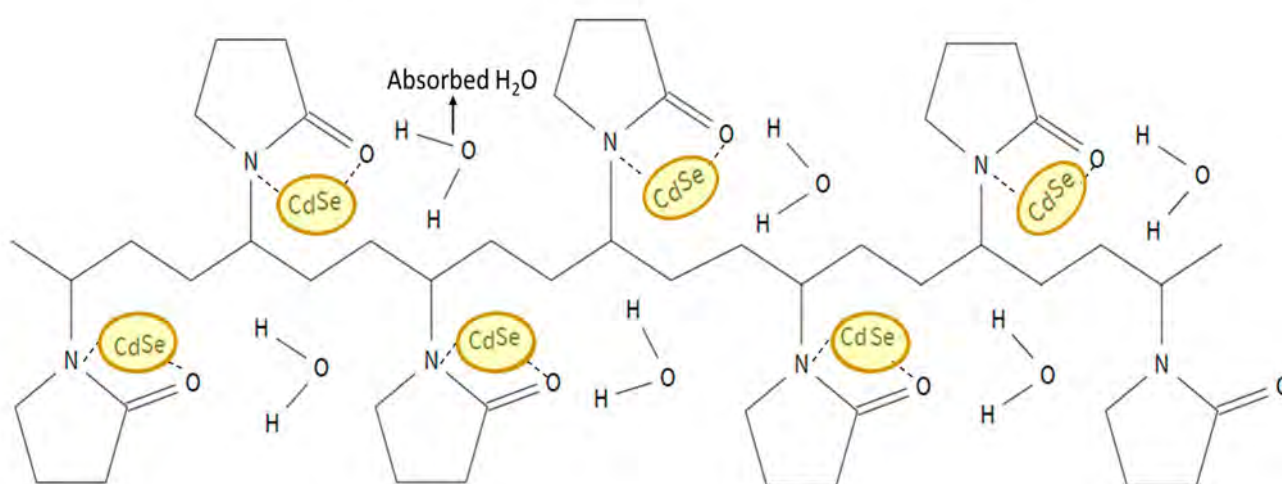
### 2.1. Materials

Cd acetate, selenium powder, PVP (Mw-250 kg) and analytical-grade solvents ethanol/chloroform were purchased from Carl Roth, Karlsruhe, Germany, while NaBH<sub>4</sub> to obtain NaHSe in ethanol suspension was obtained from Sigma Aldrich. Commercial copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -Caprolactone (70:30) (PL-b-CL) (average Mw-200 kg) was purchased from Purasorb®, Corbion, The Netherlands.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Synthesis of CdSe QDs Stabilized with PVP

PVP-stabilized CdSe QDs were synthesized via an in situ approach based on a composition demonstrated in Fahmi et al. [30]. Initially, 0.01 M Cd acetate was dissolved in polymer solution comprising of 0.07 g PVP in ethanol. The mixture was stirred vigorously under N<sub>2</sub> atmosphere at 40 °C. Simultaneously, 0.01 M Se powder was stirred and suspended in ethanol under constant flow of N<sub>2</sub>. After 1 hour, 0.3 M NaBH<sub>4</sub> was added to the solution to obtain colorless solution. As soon as the NaHSe suspension turned colorless, it was added dropwise to Cd acetate solution, which gradually turned yellowish, to give CdSe QDs coated with PVP as proposed in **Scheme 1**. Solution was left for stirring for 2 h at 40 °C. Resulting CdSe QDs were analyzed using TEM, DLS, and fluorescence/UV-Vis spectroscopy. It was observed that ethanol, which was used as solvent for synthesis QDs, leads to phase separation of co-polymer solubilized in chloroform. Therefore, to prevent phase separation, CdSe QDs were re-dispersed in chloroform before being added to electrospinning solution.



**Scheme 1.** Proposed structure of PVP and CdSe complexation during in situ synthesis.

### 2.2.2. Fabrication of the Nanofibers Immobilized with CdSe QDs

Hybrid nanofibers immobilized with CdSe QDs were prepared by mixing 2 polymer solutions containing 0.85 g PL-b-CL (L-lactide/caprolactone copolymer) in chloroform and 0.21 g PVP (polyvinylpyrrolidone) with CdSe QDs in chloroform. The ratio of weights of PVP and PL-b-CL in electrospinning solution was 4:1. Briefly, 0.21 g PVP was added to 8 mL of PVP-capped CdSe QDs, which were suspended in chloroform in previous stage. Here, PVP was utilized as co-spinning agent to stabilize the electrospinning process and provide better yield. In a separate vial, 0.85 g PL-b-CL was dissolved in 8 mL of chloroform. Then, both solutions were combined and stirred for 24 h at room temperature. After 24 h, the obtained hybrid solution was added into a syringe (5 mL) connected to a capillary (0.8 mm) via PTFE tube. The electrospinning process was carried out with optimized parameters, as presented in Table 1. Nanofibers were collected on the rotating collector covered with non-stick sheet. Similar procedure was followed to obtain pristine PL-b-CL/PVP nanofibers excluding CdSe QDs.

**Table 1.** The electrospinning parameters of nanofibers.

| Sample                    | Weight (g) |      | Voltage (kV) | Flow Rate (ml.hr <sup>-1</sup> ) | Temperature (°C) | Humidity (%) |
|---------------------------|------------|------|--------------|----------------------------------|------------------|--------------|
|                           | PL-b-CL    | PVP  |              |                                  |                  |              |
| CdSe QDs +<br>PL-b-CL/PVP | 0.85       | 0.21 | 12           | 1                                | 16               | 85           |
| PL-b-CL/PVP               | 0.85       | 0.21 | 12           | 1                                | 16               | 85           |

### 2.3. Characterization of Morphology and Size

#### 2.3.1. Morphology and Size Distribution

The morphology of nanofibers was determined using a scanning electron microscope (JSM-IT 100 InTouchScope™, Freising, Germany) at an accelerating voltage of 15 kV. TEM microscopy (JEOL 2200 fs (HR-TEM) and JEOL-10; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) was used to provide higher magnification micrographs of PVP-stabilized QDs. The QDs in PBS solution were placed on the carbon surface 200-mesh copper grid (Ted Pella., Redding, CA, USA) for 30 min and drained with blotting paper, while HR-TEM was performed on CdSe QDs suspended in ethanol using JEOL 2200 fs (HR-TEM). ImageJ® [31] was used to analyze SEM and TEM micrographs. Statistical analysis was performed using OriginLab software.

The hydrodynamic diameter of QDs was measured using dynamic light scattering (DLS) in a photon correlation spectrometer (Anton Paar Litesizer 500, Graz, Austria). The refraction factor was assumed to be 1.33, while the detection angles were 15°, 90° and 175°, and the wavelength was 658 nm. PBS was used as a solvent. The data was analyzed using Anton Paar software.

#### 2.3.2. Thermal Analysis

For thermal analysis of fibers, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) were used. Briefly, ~10 mg of solid nanofibers samples sealed in an aluminum pan were subjected to multiple heating cycles at the rate of 5 °C min<sup>-1</sup> from -60 to 200 °C in a chamber flushed with nitrogen. For TGA, ~10 mg of solid fibers were weighed in a ceramic crucible and heated at 5 °C min<sup>-1</sup> from 30 °C to 700 °C at nitrogen flow rate of 20 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 2.3.3. UV-Vis and Fluorescence Spectroscopy

Before performing spectroscopic analysis, synthesized CdSe QDs were diluted by a factor of 100. Perkin Elmer λ-25 spectrometer was used to measure peak absorbance wavelength exhibited by PVP-coated CdSe QDs. Thereafter, peak absorbance wavelength obtained from UV-Vis analysis was used as excitation wavelength in fluorescence spectrometer. The emission wavelength and photoluminance intensity of PVP-coated CdSe QDs were observed.

#### 2.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

PerkinElmer Spectrum 2000 spectrometer with an ATR assembly was used to compare changes in specific vibrational frequencies of pristine fibers, and fibers were immobilized with CdSe QDs under infrared at scanning resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. Briefly, electrospun nanofibers were cut to ~0.5 cm circle and pressed against crystal on top plate for analysis.

## 2.4. Biological Properties of Nanofibers

### 2.4.1. Antimicrobial Activity of Nanofibers

The antibacterial activity of the studied nanofibers was tested against *P. aeruginosa* (PAO1). For this purpose, the bacteria were seeded on a 96-well plate and then treated with nanofibers (size 6 mm). Bacterial growth was assessed spectrophotometrically using an optical density test (OD600) in addition to measuring the level of pyocyanin and pyoverdine production by bacterial cells treated with nanofibers. The pyocyanin level was measured at 691 nm. The pyoverdine fluorescence intensity was measured at Ex/Em = 405/460 nm. Experiments were performed in triplicate and results are presented as percentage of control.

### 2.4.2. Cytotoxic Effect of Nanofibers on Eukaryotic Cells

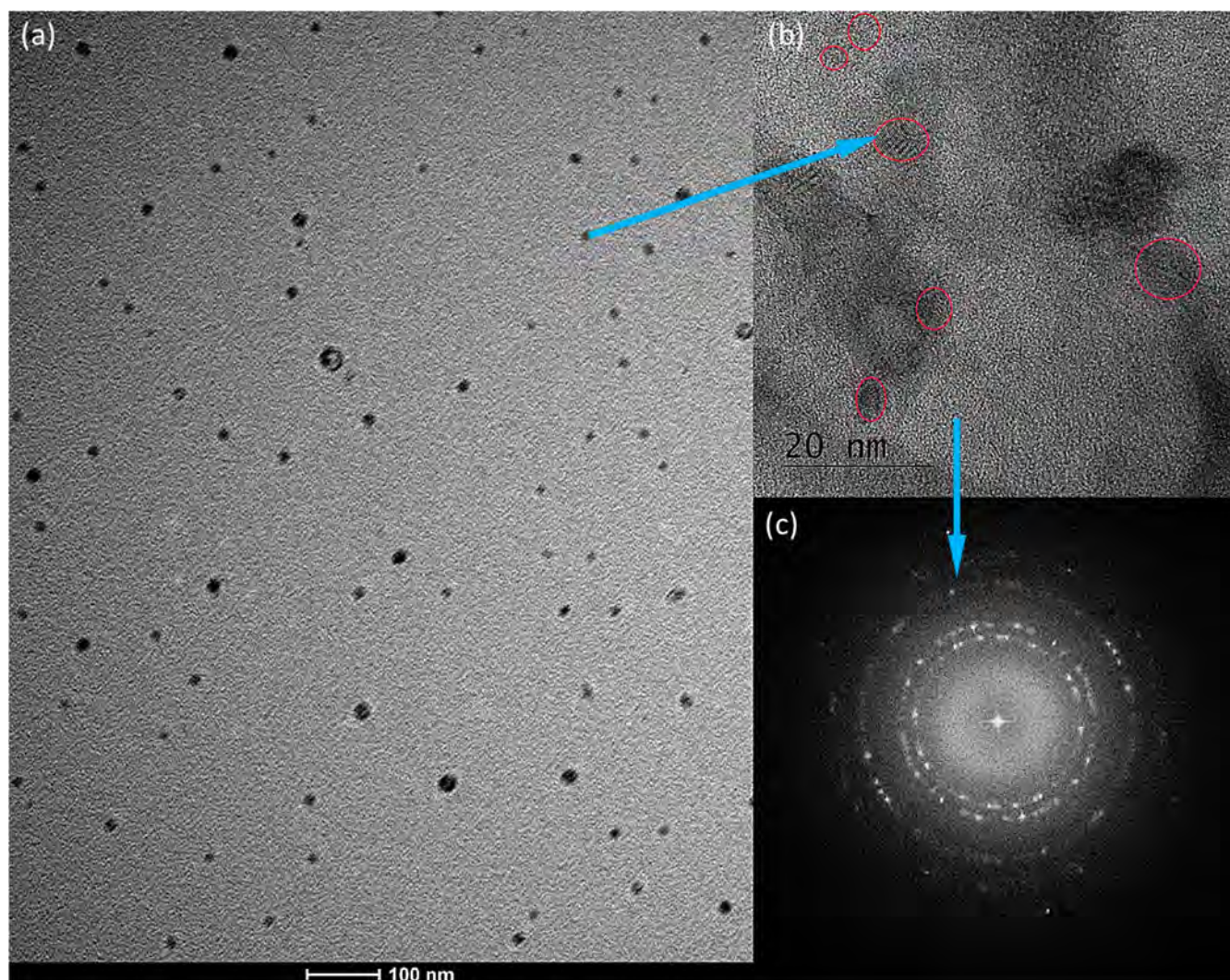
Two cell lines were used in this study. Human bronchial epithelial BEAS-2B cells (ATCC CRL-9609) were cultured in LHC-9 medium (Gibco). Human lung carcinoma A549 (CCL-185) cells were cultured in F-12K medium (Corning) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (100x antibiotic antimycotic solution, Corning). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. The level of surviving nanofiber-treated cells was assessed using the MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric) (abcam). Briefly, cells were seeded in 96-well plates and cultured for 24 h to reach the appropriate cell confluence. Next, the cells were treated for 24 h with UV-sterilized nanofibers (sterilized for 30 min). It has been reported that exposing PVP polymer to UV light (254 nm) induces crosslinking. However, the crosslinking was reported in solution phase and in the presence of crosslinking agents. Here, no noticeable crosslinking was observed as the exposure time was insufficient. Nanofibers (size 35 mm) were immobilized with inserts to achieve the appropriate cell/nanofiber contact. Untreated cells were used as control. After 24 h incubation, the nanofibers were removed, and the MTS reagent was used according to the manufacturer's instructions.

### 2.4.3. Inhibition of Proliferation of Cancer Cells

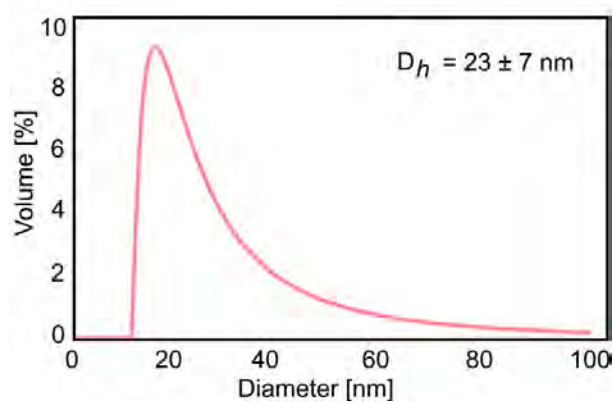
The A549 cells were seeded in 6-well plates and cultured for 72 h in the presence of tested UV-sterilized nanofibers (size 35 mm). Next, the nanofibers were removed, and cells were observed by optical microscopy (x64).

## 3. Results and Discussion

One route to obtain stable QDs colloids is to attach a large ligand, which can maintain QDs in a suspended state due to steric hindrance. Here, PVP was as an excellent candidate to be used as ligand due to its biocompatible nature and presence of a long polymer chain, which provided hindrance effect. Hence, synthesis of CdSe QDs was performed in situ with PVP and resulted in neon yellow solution, which was highly stable. Their morphological and spectroscopic properties were analyzed using TEM/DLS and fluorescence/UV-Vis spectroscopy. The TEM micrographs showed that the QDs were coated with a thin layer of PVP polymer (Figure 1). The core diameter of PVP-coated CdSe was measured to be between 5–15 nm with a mean of  $6 \pm 4$  nm, and their average hydrodynamic diameter was  $23 \pm 7$  nm. DLS data demonstrated that the synthesized QDs had fewer aggregates, possessing a polydispersity index PDI -0.27 (Figure 2). Indeed, the layer of PVP around QDs had resulted in stabilization and minimized agglomeration. Further, a typical CdSe QDs diffraction pattern was observed from the HR TEM showing the crystal structure of CdSe QDs to the third order.



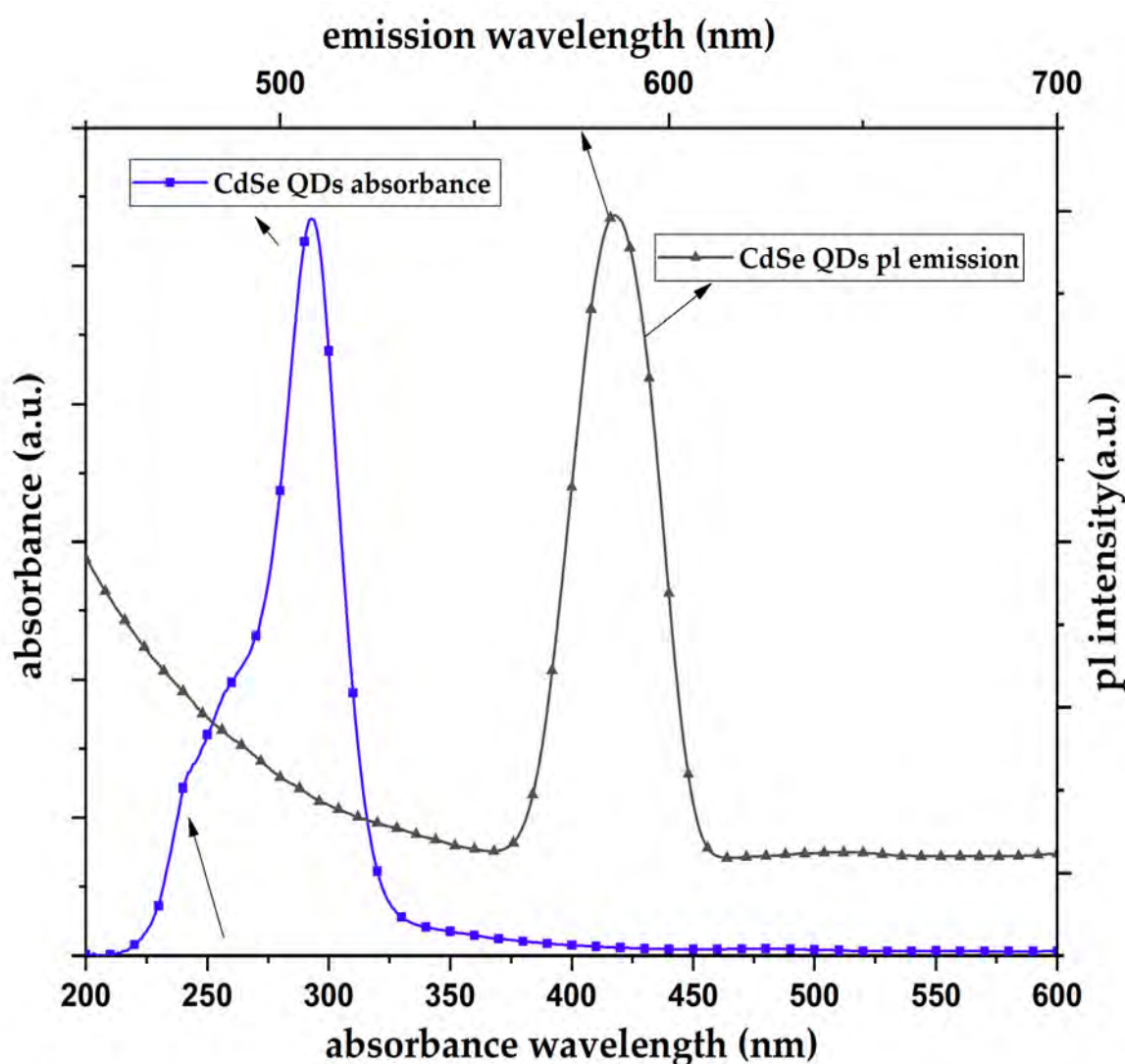
**Figure 1.** TEM micrographs of CdSe QDs displaying lattice fringes and diffraction pattern. (a) TEM overview of cluster CdSe QDs coated with PVP. (b) HR-TEM (inset) showing lattice fringes of ordered CdSe QDs. (c) Diffraction pattern showing crystal structure of CdSe QDs to third order, which is typical of CdSe crystals.



**Figure 2.** DLS graph of PVP-stabilized CdSe QDs, demonstrating homogeneity with PDI of 0.27 and average hydrodynamic diameter of  $23 \pm 7$  nm.

As seen in Figure 3, CdSe QDs showed a typical UV-visible spectroscopy absorption behavior. CdSe QDs stabilized with PVP had a relatively narrow absorption peak at 280

nm, with an absorption range from 320 to 240 nm, while no absorption peak was observed for PVP polymer solution, which was used as control.



**Figure 3.** UV–Visible spectroscopy of PVP-stabilized CdSe QDs absorbance at 280 nm and photoluminescence intensity at 580 nm when excited at 290 nm.

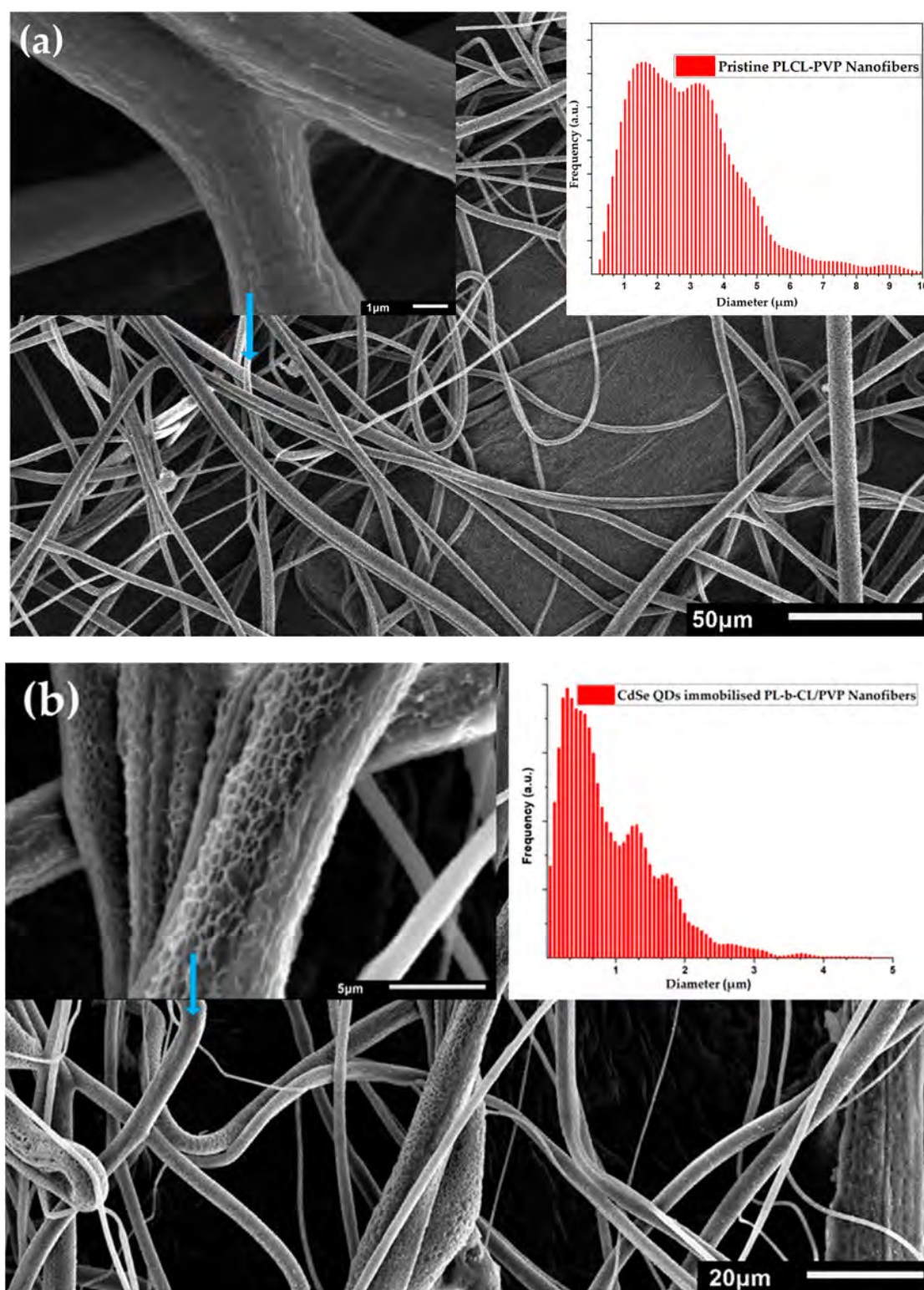
PVP-stabilized CdSe QDs showed a strong photoluminescent behavior, as seen in Figure 3. Here, QDs were excited using wavelength of 290 nm. PVP-stabilized QDs showed emission wavelength at 580 nm. Photoluminescence spectroscopy shows that CdSe QDs coated with PVP have favorable fluorescent characteristics, and they can be utilized potentially as biomarkers. For instance, functionalizing the surface of CdSe QDs with glycoproteins and utilizing their luminescence properties has been demonstrated to be a simple, cost-effective and specific method to detect  $\alpha$ -fetoproteins [32]. Here, using PVP in situ as a stabilizing and coating agent allowed a greater control over size and size distribution of CdSe QDs. Moreover, it prevented the use of surfactants, which are used as stabilizing agents and are shown to be toxic for biological applications [33]. Further, it can potentially help mask the toxicity of the QDs towards biological systems or influence the uptake of CdSe [34].

Recognizing this potential of the CdSe QDs, they were immobilized in a PVP/PL-b-CL nanofiber matrix. Electrospinning was used to fabricate hybrid nanofibers containing homogeneously distributed PVP-stabilized CdSe QDs. Electrospinning of PL-b-CL alone

was highly unstable as chloroform was required to dissolve co-polymer to obtain the electrospinning solution. Use of chloroform favored rapid evaporation at the spinneret, causing erratic jet ejection and blockage due to solidification of polymer. Hence, PVP was used to blend PL-b-CL copolymer for two reasons. Firstly, being used to stabilize CdSe QDs, it could facilitate stronger interactions among CdSe QDs and the fiber matrix. Secondly, its high molecular weight grants easy electrospinnability in addition to compatibility with the solvent, promising a homogenous blend. It was noticed that the addition of PVP as co-electrospin agent had a moderate effect on the stability of the electrospinning process. After electrospinning, fibers were obtained with an intermediate yield possessing cylindrical morphology. SEM was used to study the morphology of pristine and CdSe QDs-immobilized nanofibers, which provided micrographs, as seen in Figure 4. Using ImageJ, micrographs were analyzed to obtain information about the nanofibers' diameter. Statistical analysis of the data revealed that pristine fibers possessed a mean diameter of  $2\mu\text{m}$ , which was twice the mean diameter of the immobilized fibers at  $1\mu\text{m}$ . It is presumed that immobilization with metallic nanoparticles provided relative stability to electrospinning process, and the presence of QDs led to a change in conductivity, viscosity, and surface tension [35,36]. Interestingly, both pristine and functionalized nanofibers possessed rough surface features with dimensions below 500 nm. It is a consequence of electrospinning at high humidity and low temperature to prevent rapid evaporation of solvent at the spinneret. Electrospinning in the presence of high humidity during results in vapor-induced phase separation where during the jet formation water vapor is absorbed in the jet. Absorption of water vapor leads to phase separation in hydrophobic polymers, creating polymer-rich and polymer-deficient regions. When the highly volatile solvent (in this case chloroform) evaporates quickly, it locks the phase geometry on deposition providing porous/rough surface features, as seen in the inset of Figure 4a,b [37,38]. Such remarkable morphology can potentially be helpful for cell adhesion, and enhanced surface area can increase the surface activity of scaffolds and the effectivity of QDs [39,40]. The same process also results in high diameter distribution presumably due to the combination of highly volatile solvent, high humidity and hydrophobic polymer [38]. Due to high volatility and rapid evaporation of solvent, the solidification of the polymer was encountered at the spinneret tip, resulting in irregularity during the electrospinning process. Hence, the electrospinning was performed at low temperatures to minimize evaporation and stabilize the process. A statistical summary of the nanofiber dimensions can be seen in Table 2.

**Table 2.** Diameter analysis of nanofibers.

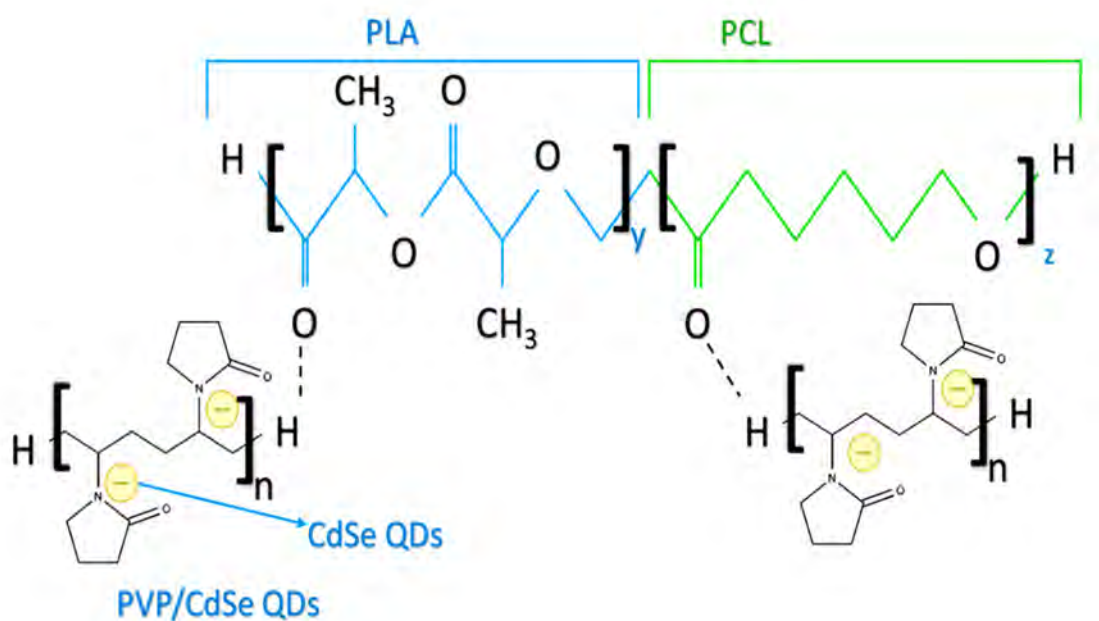
| Sample                  | Mean Diameter     | Standard Deviation |
|-------------------------|-------------------|--------------------|
| PL-b-CL/PVP             | $2.12\mu\text{m}$ | $1.07\mu\text{m}$  |
| CdSe QDs in PL-b-CL/PVP | $1.04\mu\text{m}$ | $0.7\mu\text{m}$   |



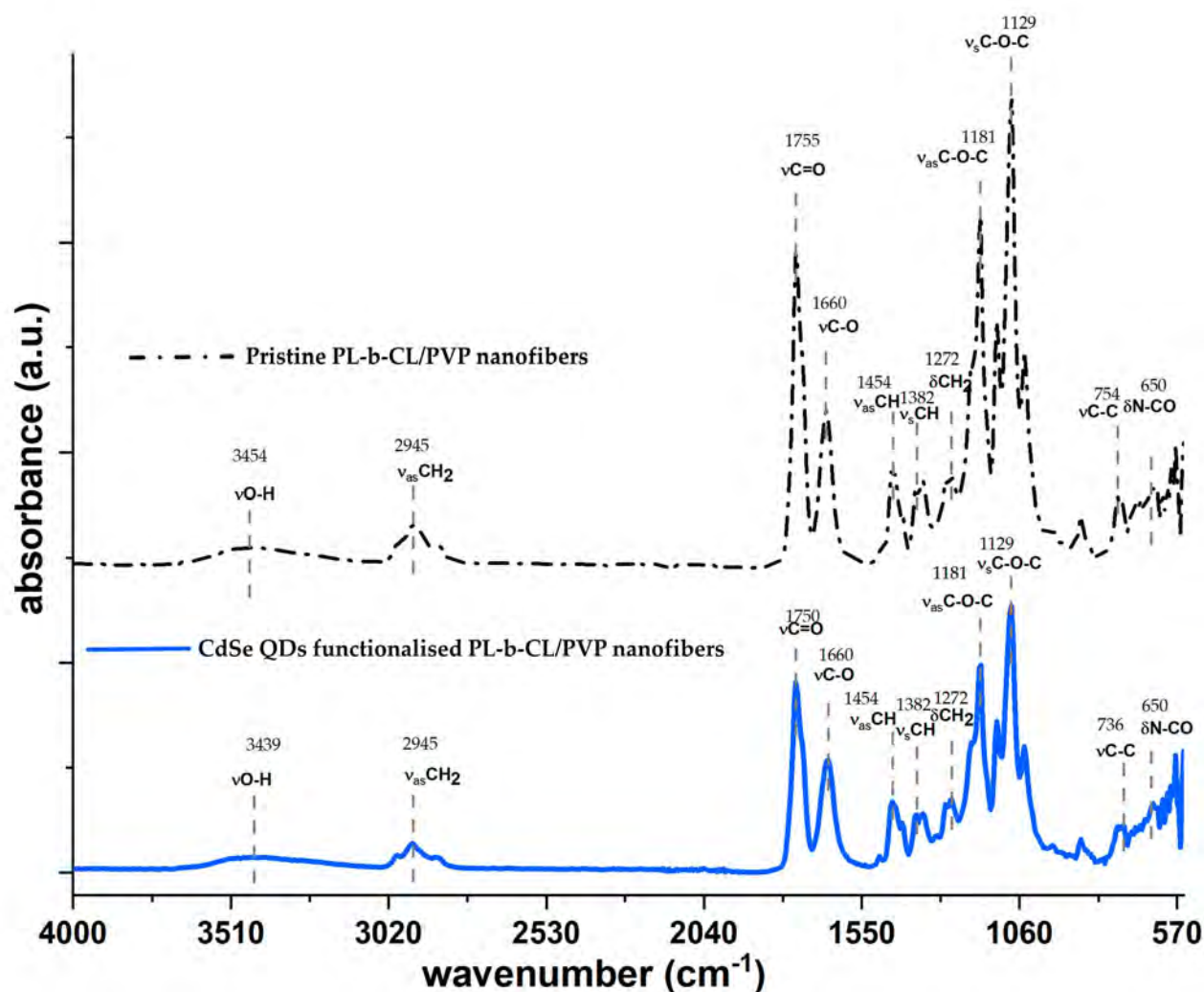
**Figure 4.** Scanning electron micrograph displaying morphology of electrospun nanofibers, their diameter distribution (inset right) and magnified view exhibiting rough/porous features on fiber surface (inset left): (a) pristine PL-b-CL/PVP nanofibers; (b) CdSe QDs-immobilized PL-b-CL/PVP nanofibers.

Nanofibers were collected as a non-woven mat and characterized with ATR-FTIR, giving spectra as seen in Figure 5. The ATR-FTIR analysis shows a slight difference between absorption spectra recorded from pristine and CdSe QDs-immobilized nanofibers. The stretching vibration of the O-H group due to absorbed H<sub>2</sub>O molecules through PVP

could be seen at  $3454\text{ cm}^{-1}$  in the pristine nanofibers sample. A similar peak at  $3439\text{ cm}^{-1}$  was observed for fibers containing PVP-capped CdSe QDs [41,42]. Here, utilization of PVP as stabilizing agent has potentially facilitated hydrogen bonding between PVP, capping CdSe QDs, and copolymer present in the fiber matrix (Scheme 2). In both samples, overlapping asymmetric stretching of C-H ( $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$ ) was represented at  $2945\text{ cm}^{-1}$  [43]. Further, at  $1755\text{ cm}^{-1}$ , a peak due to stretching of ester  $\text{C}=\text{O}$  corresponding to copolymer was noticed [44], while C-O stretching in PVP was noticeable at  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Absorption peaks at  $1454\text{ cm}^{-1}$  and  $1382\text{ cm}^{-1}$  correspond to asymmetric and symmetric C-H bending, while absorption at  $1272\text{ cm}^{-1}$  represents  $\text{CH}_2$  wagging. Asymmetric and symmetric C-O-C stretching were also present at  $1181\text{ cm}^{-1}$  and  $1129\text{ cm}^{-1}$ , respectively [43,45]. C-C breathing was restricted in samples with CdSe QDs/PVP, presumably due to its interaction with PVP and PL-b-CL/PVP matrix, shifting the peak from  $754\text{ cm}^{-1}$  in pristine samples to  $736\text{ cm}^{-1}$  in functionalized fibers [46]. Additionally, N-CO bends between  $650$  and  $533\text{ cm}^{-1}$  were similar in both samples [46,47]. Finally, the characteristic fingerprint region observed in FTIR analysis of polymers used for fabrication of nanofibers and capping CdSe QDs remained unchanged before and after inclusion of CdSe QDs. Overall, immobilization of CdSe QDs stabilized with PVP promoted weak interactions among inorganic and organic moieties. This promoted a homogenous distribution of QDs in fibers in addition to helping to minimize potential leaching of inorganic materials in biological media.



**Scheme 2.** Interactions between PL-b-CL copolymer and CdSeQDs/PVP in electrospinning solution.



**Figure 5.** FTIR (ATR) spectroscopy absorbance showing comparison between pristine and CdSe QDs-functionalized PL-b-CL/PVP nanofibers. Addition of PVP-stabilized CdSe QDs show a slight change in absorbance under infrared spectroscopy.

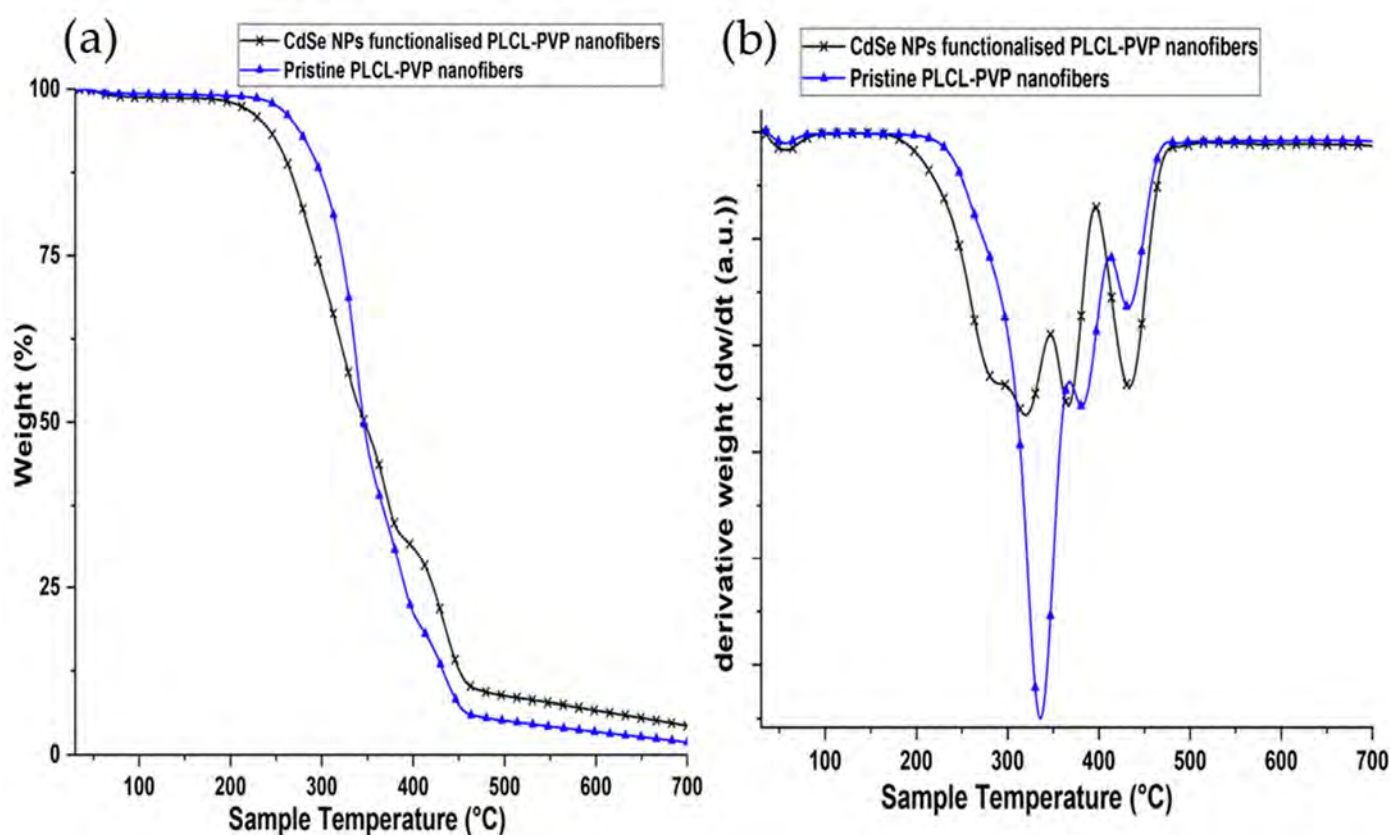
The characterization of thermal properties is relevant as immobilizing the nanofibers with QDs can affect its degradation behavior and thermal stability. Additionally, both the electrospinning process and the functionalization of nanofibers using QDs can influence the crystallinity of the semi-crystalline PL-b-CL/PVP copolymer blend. Moreover, solvent, processing temperature and humidity too can play an important role in defining the crystalline properties of both pristine and functionalized nanofibers. Initially, thermogravimetric analysis was employed to characterize the degradation behavior of pristine and functionalized nanofibers, followed by the analysis of phase change properties of nanofibers and their variations in the presence of QDs using differential scanning calorimetry. The thermogram seen in Figure 6 shows the degradation behavior of nanofibers when subjected to a temperature program from 30–700 °C. Major findings of the TGA analysis are highlighted in Table 3. Both nanofiber samples exhibited a three-step degradation profile, implying an electrospinning formulation consisting of multiple constituents such as PL-b-CL/PVP. There was no weight degradation observed until 280 °C, which was recorded as the onset temperature for immobilized nanofibers. Compared to those, the pristine nanofibers had a relatively higher onset temperature of 304 °C. This indicated that the QDs structured inside the nanofiber matrix acted as heat spots leading to a decrease in onset temperature.

**Table 3.** Data after TGA analysis of pristine and functionalized nanofibers.

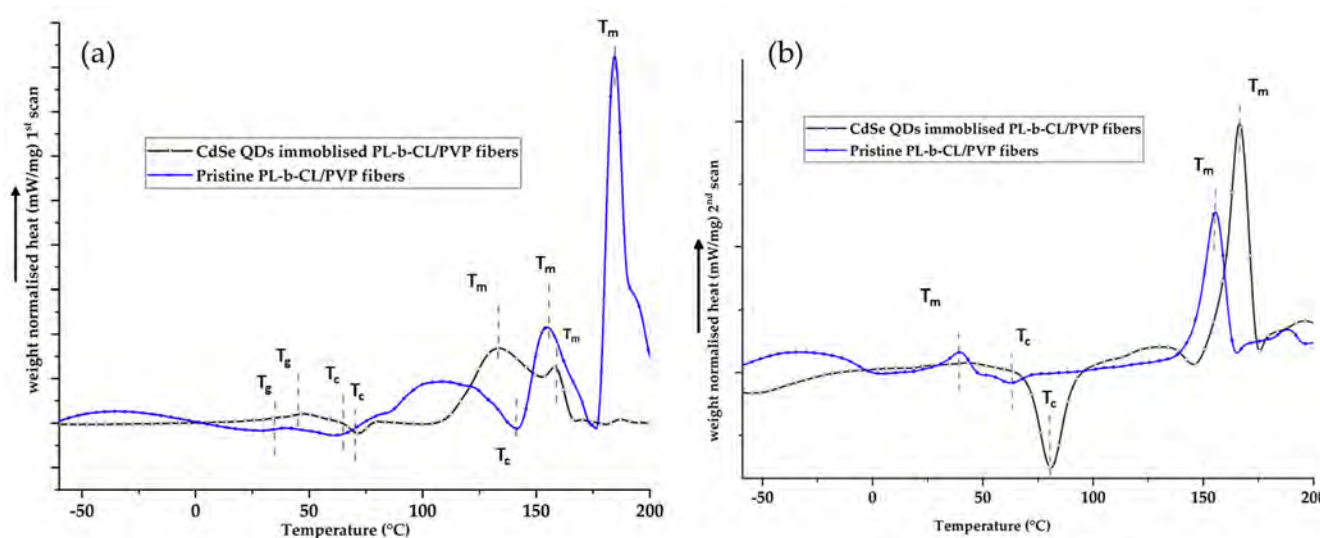
| Sample                  | Onset (°C) | End (°C) | Step Inflection Points (°C) |          |          | Total Weight Loss (%) |
|-------------------------|------------|----------|-----------------------------|----------|----------|-----------------------|
|                         |            |          | 1st Step                    | 2nd Step | 3rd Step |                       |
| PL-b-CL/PVP             | 304        | 384      | 337                         | 380      | 431      | 98.3                  |
| CdSe QDs in PL-b-CL/PVP | 280        | 429      | 327                         | 370      | 434      | 91.6                  |

For pristine nanofibers, the maximum mass degradation rate occurred at 338 °C. This degradation step corresponds to the melting and breakdown of intermingled segments. A similar step was observed at 337 °C in the thermogram of functionalized nanofibers. Further, a second degradation event occurred at 380 °C for pristine fibers and 370 °C for functionalized fibers, which corresponds to the degradation of low crystalline PCL of the PL-b-CL copolymer.

Subsequently, the end of the degradation temperature for pristine nanofibers was observed at 384 °C, where presumably most of the PL-b-CL copolymer was decomposed. Interestingly, a third degradation step was noticed at 431 °C, resulting from the condensation and cyclization of the polyromantic structures of PVP. Identical peak was noticed for functionalized nanofibers where a similar third degradation step occurs at 434 °C. However, due to the presence of QDs in functionalized nanofibers, their end of degradation temperature was delayed until 429 °C. After the end of temperature program the pristine nanofibers showed a total weight loss of 98%, whereas the total weight loss for nanofibers functionalized with CdSe QDs was significantly reduced at 91% loss [48,49].

**Figure 6.** Thermogravimetric analysis (a) and derivative thermogravimetric analysis (b) of the pristine and QDs-immobilized PL-b-CL/PVP nanofibers showing their mass degradation profile and effect of immobilization of CdSe QDs on thermal stability of nanofibers.

Further analysis of thermal characteristics and differences in phase change behavior were observed using DSC. Analysis of nanofiber samples using the DSC temperature program from  $-0$  to  $200$  °C showed a relatively complicated behavior with multiple melting and crystallization peaks (Figure 7). The samples were subjected to several heating cycles, which had impact on their phase change temperatures. As expected, the first heating cycle revealed the rapid setting of polymer during electrospinning. The DSC thermogram revealed a glass transition peak ( $T_g$ ) at  $35$  °C and  $45$  °C for pristine and functionalized fibers, respectively. A crystallization peak was observed at  $65$  °C and  $70$  °C for pristine and functionalized fibers, respectively. Cold crystallization peaks could be observed in pristine nanofibers samples at  $140$  °C. However, a similar phase change event is absent for functionalized nanofibers. Pristine PL-b-CL/PVP nanofibers exhibited two distinct melting peaks at  $156$  °C and  $184$  °C [50]. In contrast, CdSe QDs-immobilized nanofibers displayed a broad melting curve with two adjacent peaks with slight overlap  $133$  °C and  $158$  °C. As the samples went through the second heating cycle, their response was smoother with fewer phase change events. Noticeably,  $T_g$  was absent in thermogram of both samples. Here, it seems that PCL exhibited some degree of crystallinity with an individual characteristic endotherm peak around  $40$  °C, which was absent in the first heating cycle and is lower compared to PCL homopolymer [44]. A weak crystallization peak could still be observed in pristine nanofiber samples at  $63$  °C. In contrast, CdSe QDs-immobilized fibers had a sharp crystallization peak at  $80$  °C. In the second heating cycle, both pristine and CdSe QDs-functionalized fibers showed a single melting event occurring at  $156$  °C and  $166$  °C for pristine and CdSe QDs-functionalized fibers, respectively. Overall, the inclusion of CdSe QDs in the PL-b-CL/PVP nanofiber system increased their amorphosity. As expected, the PVP component in the nanofibers had no peaks largely due to its amorphous nature [51]. As observed from the first heating cycle, the presence of structured CdSe QDs within the matrix function as heating spots bringing the melting endotherm peak below by a few degrees compared to the pristine nanofiber samples. As observed in the second heating cycle, the occurrence of melting event at a slightly higher temperature indicates a loss of structure and change in distribution of CdSe QDs after the first heating cycle.



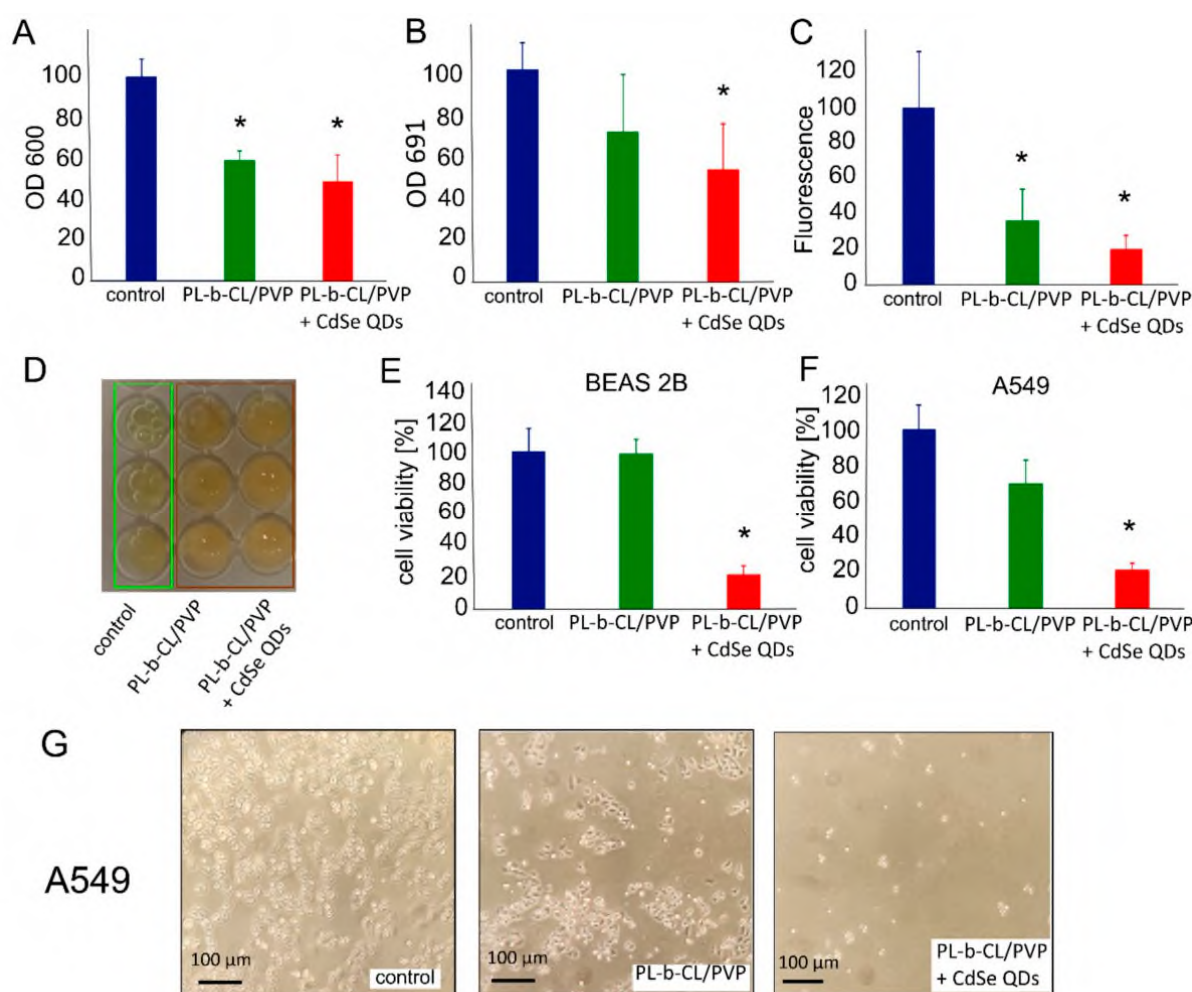
**Figure 7.** DSC curve of pristine and CdSe QDs-immobilized PL-b-CL/PVP nanofibers exhibiting difference in their phase ( $T_g$ ,  $T_m$ ) change behavior due to presence of QDs and interaction with PL-b-CL copolymer (1<sup>st</sup> scan (a) and 2<sup>nd</sup> scan (b)).  $T_g$ —glass transition temperature;  $T_c$ —crystallization temperature;  $T_m$ —melting temperature.

The results of the antibacterial test showed that the nanofibers inhibited the growth of bacteria. As shown in Figure 8A (OD600), both the pristine PL-b-CL/PVP nanofiber excluding QDs and immobilized with CdSe QDs inhibited bacterial growth by  $\sim 36\%$  and

~48%, respectively, compared to the control. The antibacterial effect is also confirmed by the results of measuring the level of two pigments produced by *P. aeruginosa*—pyocyanin and pyoverdine (Figure 8B,C, respectively). In the presence of both types of nanofibers, a decrease in the production of dyes was observed, especially for bacteria treated with CdSe QDs nanofibers. Thus, nanofibers immobilized with CdSe QDs are slightly more toxic to *P. aeruginosa* than pristine PL-b-CL/PVP nanofibers. These results are consistent with the observed change in the color of the bacterial culture media (Figure 8D). In the case of the untreated culture of *P. aeruginosa* (control), the medium was light green, which indicates the production of the primary dye and virulence factor—pyocyanin. For bacterial cells treated with nanofibers, the medium was light brown, which may indicate the blockage of the basic metabolic pathways of *P. aeruginosa* and thus explain the reduced growth of bacteria treated with nanofibers [52].

The non-cancer cells (BEAS 2B) and cancer cells (A549) were treated with tested nanofiber for 24 h, and their cytotoxicity potentials were evaluated toward those cells employing MTS assay. Figure 8E illustrates the decrease of cell viability compared to control. There is no significant decrease in samples treated with PL-b-CL/PVP nanofibers. However, in presence of PL-b-CL/PVP + CdSe QDs the decrease of cell viability to 20% was observed. Similar results were observed for cancer cells (Figure 8F) A549. The significance of cytotoxicity is shown for PL-b-CL/PVP + CdSe QDs. The cell growth inhibition of studied nanofibers against A549 cells is shown in Figure 8G. No inhibition in cell growth was observed in the control (untreated cells) after 3 days. In the presence of PL-b-CL/+PVP nanofiber, one can observe gradual growth inhibition. In the case of PL-b-CL/PVP CdSe QDs, pronounced growth inhibition was present. The obtained results indicate that loading CdSe QDs into the PL-b-CL/PVP nanofibers improves its inhibitory effects. The explanation for this is the inhibitory effect of CdSe quantum dots (QD) on cancer cells, which is very often associated with blocking many signaling pathways, e.g., Rho-associated kinase (ROCK) activity [53], or can cause ultrastructural changes in cells, such as organelle degeneration, chromatin condensation, and aggregation [54].

Here, these forms of hybrid PL-b-CL/PVP CdSe QDs nanofibers can be used as antimicrobial materials for wound infections or anticancer materials acting locally (e.g., in cancer treatment with photodynamic therapy). In addition, hybrid PL-b-CL/PVP CdSe QDs nanofibers can be used as a platform with further modifications as a biosensor for the detection of various biomacromolecules in biological fluids.



**Figure 8.** The biological properties of pristine and CdSe QDs-immobilized nanofibers. The optical density of PAO1 measured at 600 nm (A). The pyocyanin level measured at 691 nm (B) and pyoverdine level fluorescence measured at Ex/Em = 405/460 nm (C). The changes in the color of the bacterial culture media after treatment with nanofibers, where green bracket indicates untreated bacteria and brown bracket indicates bacteria treated with nanofibers (D). The cell viability of non-cancer BEAS-2 B cell line (E) and cancer cell line A549 (F) treated with nanofibers. All results are expressed as the percentage, where 100% is a non-treated control. \* indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ). The cell growth inhibition of studied nanofiber against A549 cells in optical microscopy (×64) (G).

#### 4. Conclusions

A simple concept to template CdSe QDs via in situ approach using polyvinylpyrrolidone (PVP) has been explored successfully. Use of PVP as stabilizing agents gave a higher degree of control over the size of QDs and provided exceptionally stable CdSe QDs colloid. As observed through TEM and DLS measurements, PVP-stabilized CdSe QDs had a narrow size distribution. In situ synthesized CdSe QDs exhibited a sharp photoluminescence peak at 580 nm. PVP-stabilized CdSe QDs were immobilized in the matrix of electrospun PL-b-CL/PVP nanofibers. Here, interaction between stabilizing agent, and nanofibers matrix and its effect on physicochemical properties of the nanofibers were investigated. Overall, obtained fibers were uniform cylindrical and free of beads. The fibers were decorated with rough surface features, enhancing the exposed surface area promoting QDs activity. The presence of PVP as stabilizing agents provided increased coordination domains, which delivered homogenous distribution of CdSe QDs, and stability in nanofiber matrix. Furthermore, CdSe QDs immobilized fibers had better thermal stability,

where QDs functioned as heating spots. Antimicrobial assays clearly indicate the antibacterial effect of CdSe QDs-functionalized nanofibers against drug-resistant *P. aeruginosa* PAO1. Finally, testing of pristine and functionalized scaffolds via in vitro viability assay using BEAS-2B and A549 cells showed a favorable response as compared to the control. Moreover, growth inhibition of cancer cells in the presence of functionalized nanofibers is observed. These results demonstrate the potential of CdSe QDs functionalized nanofibers for use in various biological applications, including biosensors and antibacterial, anti-cancer cell agents. The fine-tuning of the electrospinning process along with additional biological analysis of fibers will further improve and establish the potential of nanofibers in medicinal nanotechnology and diagnostics.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.F., V.P.N. and K.C.; methodology, V.P.N. and M.L.; software, V.P.N., M.L. and K.C.; validation, V.P.N., A.F., M.L. and K.C.; formal analysis, V.P.N., A.F., M.L. and K.C.; investigation, V.P.N. and M.L.; data curation, V.P.N., M.L. and K.C.; writing—original draft preparation, V.P.N. and A.F.; writing—review and editing, V.P.N., A.F., M.L. and K.C.; supervision, V.P.N., A.F. and K.C.; funding acquisition, A.F. and K.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the internal grant from Jan Kochanowski University SUPB.RN.22.126. This publication is based on work from COST Action CA 17140 “Cancer Nanomedicine from the Bench to the Bedside” supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). The work was partially supported by the Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung) BMBF BIOTENG grant 01DJ21011.

**Institutional Review Board Statement:** Not Applicable.

**Informed Consent Statement:** Not Applicable.

**Data Availability Statement:** Not Applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge Markus Heidelmann from ICAN—Interdisciplinary Center for Analytics on the Nanoscale Cenide—Center for Nanointegration Duisburg-Essen University of Duisburg-Essen for providing HR-TEM micrographs. Hochschule Rhein-Waal for providing the labs, materials and administrative support to the work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Soloviev, V.N.; Eichhofer, A.; Fenske, D.; Banin, U. Size-dependent optical spectroscopy of a homologous series of CdSe cluster molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2354–2364. <https://doi.org/10.1021/ja003598j>.
2. Narula, C.; Chauhan, R.P. Size dependent properties of one dimensional CdSe micro/nanostructures. *Phys. B* **2017**, *521*, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2017.07.029>.
3. Zheng, W.; Strouse, G.F. Involvement of carriers in the size-dependent magnetic exchange for Mn:CdSe quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7482–7489. <https://doi.org/10.1021/ja200508e>.
4. Hildebrandt, N.; Spillmann, C.M.; Algar, W.R.; Pons, T.; Stewart, M.H.; Oh, E.; Susumu, K.; Diaz, S.A.; Delehanty, J.B.; Medintz, I.L. Energy Transfer with Semiconductor Quantum Dot Bioconjugates: A Versatile Platform for Biosensing, Energy Harvesting, and Other Developing Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 536–711. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00030>.
5. Sapsford, K.E.; Pons, T.; Medintz, I.L.; Mattoussi, H. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors* **2006**, *6*, 925–953. <https://doi.org/10.3390/s6080925>.
6. Subramanian, S.; Ganapathy, S.; Subramanian, S. Superior photocatalytic activities of p-CdTe QDs/n-NiTiO<sub>3</sub> NFs system for the treatment of hazardous dye industrial effluents. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 106941.
7. Wang, H.; Zhao, R.; Hu, H.; Fan, X.; Zhang, D.; Wang, D. 0D/2D Heterojunctions of Ti(3)C(2) MXene QDs/SiC as an Efficient and Robust Photocatalyst for Boosting the Visible Photocatalytic NO Pollutant Removal Ability. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2020**, *12*, 40176–40185. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c01013>.
8. Angel, N.; Vijayaraghavan, S.N.; Yan, F.; Kong, L. Electrospun Cadmium Selenide Nanoparticles-Loaded Cellulose Acetate Fibers for Solar Thermal Application. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1329. <https://doi.org/10.3390/nano10071329>.
9. Nozik, A.J.; Beard, M.C.; Luther, J.M.; Law, M.; Ellingson, R.J.; Johnson, J.C. Semiconductor quantum dots and quantum dot arrays and applications of multiple exciton generation to third-generation photovoltaic solar cells. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6873–6890. <https://doi.org/10.1021/cr900289f>.
10. Pastuszak, J.; Wegierek, P. Photovoltaic Cell Generations and Current Research Directions for Their Development. *Materials* **2022**, *15*, 5542. <https://doi.org/10.3390/ma15165542>.

11. Mendoza, C.; Nirwan, V.P.; Fahmi, A. Nanofabrication of hybrid nanomaterials: Macroscopically aligned nanoparticles pattern via directed self-assembly of block copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2023**, *140*(5), e53409. <https://doi.org/10.1002/app.53409>.
12. Shen, L. Biocompatible polymer/quantum dots hybrid materials: Current status and future developments. *J. Funct. Biomater.* **2011**, *2*, 355–372. <https://doi.org/10.3390/jfb2040355>.
13. Tomczak, N.; Janczewski, D.; Han, M.Y.; Vancso, G.J. Designer polymer-quantum dot architectures. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 393–430. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.11.004>.
14. Yuan, B.Z.; Zhang, X.Y.; Yu, J.H.; Zhou, L.Q.; Luo, B.S.; Liu, Y.J.; Chen, R. Optical Humidity Sensor Based on CdSe/ZnS Quantum Dots Modified by Porous Silica. *Adv. Mater. Interfaces* **2022**, *9*, 2201366. <https://doi.org/10.1002/admi.202201366>.
15. Ng, S.M.; Koneswaran, M.; Narayanaswamy, R. A review on fluorescent inorganic nanoparticles for optical sensing applications. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 21624–21661. <https://doi.org/10.1039/c5ra24987b>.
16. Gorner, S.; Hodes, G. Quantum-Size Effects in the Study of Chemical Solution Deposition Mechanisms of Semiconductor-Films. *J. Phys. Chem.-Us.* **1994**, *98*, 5338–5346. <https://doi.org/10.1021/j100071a026>.
17. Khanna, P.K.; Dhanabalan, K.; More, P.; Viswanathan, S.; Renugopalakrishnan, V. Biocompatible Hydrophilic CdSe Quantum Dots: Single-Step Synthesis. *Int. J. Green Nanotechnol.* **2012**, *4*, 62–70. <https://doi.org/10.1080/19430892.2012.654748>.
18. Schmidt, L.C.; Edelsztein, V.C.; Spagnuolo, C.C.; Di Chenna, P.H.; Galian, R.E. Light-responsive hybrid material based on luminescent core-shell quantum dots and steroidal organogel. *J. Mater. Chem. C.* **2016**, *4*, 7035–7042. <https://doi.org/10.1039/c6tc02265k>.
19. Concina, I.; Natile, M.M.; Tondello, E.; Sberveglieri, G. Growth kinetics of CdSe quantum dots generated in polar polymers. *Dalton Trans* **2012**, *41*, 14354–14359. <https://doi.org/10.1039/c2dt31364b>.
20. Bulumulla, C.; Du, J.; Washington, K.E.; Kularatne, R.N.; Nguyen, H.Q.; Biewer, M.C.; Stefan, M.C. Influence of functionalized side chains of polythiophene diblock copolymers on the performance of CdSe quantum dot hybrid solar cells. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5*, 2473–2477. <https://doi.org/10.1039/c6ta09573a>.
21. Landry, M.L.; Morrell, T.E.; Karagounis, T.K.; Hsia, C.H.; Wang, C.Y. Simple Syntheses of CdSe Quantum Dots. *J. Chem. Educ.* **2014**, *91*, 274–279. <https://doi.org/10.1021/ed300568e>.
22. Yuan, G.; Liang, T.; Liang, Y.; Pang, X.; Jia, Z. The controlled growth of conjugated polymer-quantum dot nanocomposites via a unimolecular templating strategy. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 1250–1253. <https://doi.org/10.1039/d0cc06498j>.
23. Yuan, H.; Zhao, H.; Peng, K.; Qi, R.; Bai, H.; Zhang, P.; Huang, Y.; Lv, F.; Liu, L.; Bao, J.; et al. Conjugated Polymer-Quantum Dot Hybrid Materials for Pathogen Discrimination and Disinfection. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2020**, *12*, 21263–21269. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17783>.
24. Garzoni, M.; Cheval, N.; Fahmi, A.; Danani, A.; Pavan, G.M. Ion-selective controlled assembly of dendrimer-based functional nanofibers and their ionic-competitive disassembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3349–3357. <https://doi.org/10.1021/ja206611s>.
25. Nann, T. Phase-transfer of CdSe@ZnS quantum dots using amphiphilic hyperbranched polyethylenimine. *Chem. Commun.* **2005**, *57*, 1735–1736. <https://doi.org/10.1039/b414807j>.
26. Nirwan, V.P.; Kowalczyk, T.; Bar, J.; Buzgo, M.; Filova, E.; Fahmi, A. Advances in Electrospun Hybrid Nanofibers for Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1829. <https://doi.org/10.3390/nano12111829>.
27. Soares, R.M.D.; Siqueira, N.M.; Prabhakaram, M.P.; Ramakrishna, S. Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2018**, *92*, 969–982. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.004>.
28. Nirwan, V.P.; Filova, E.; Al-Kattan, A.; Kabashin, A.V.; Fahmi, A. Smart Electrospun Hybrid Nanofibers Functionalized with Ligand-Free Titanium Nitride (TiN) Nanoparticles for Tissue Engineering. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 519–519. <https://doi.org/10.3390/nano11020519>.
29. Nirwan, V.P.; Al-Kattan, A.; Fahmi, A.; Kabashin, A.V. Fabrication of Stable Nanofiber Matrices for Tissue Engineering via Electrospinning of Bare Laser-Synthesized Au Nanoparticles in Solutions of High Molecular Weight Chitosan. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1058–1058. <https://doi.org/10.3390/nano9081058>.
30. Fahmi, A.; Pietsch, T.; Bryszewska, M.; Rodriguez-Cabello, J.C.; Koceva-Chyla, A.; Arias, F.J.; Rodrigo, M.A.; Gindy, N. Fabrication of CdSe Nanofibers with Potential for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1011–1018. <https://doi.org/10.1002/adfm.200902013>.
31. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
32. Liu, Q.; Han, M.; Bao, J.; Jiang, X.; Dai, Z. CdSe quantum dots as labels for sensitive immunoassay of cancer biomarker proteins by electrogenerated chemiluminescence. *Analyst* **2011**, *136*, 5197–5203.
33. Badmus, S.O.; Amusa, H.K.; Oyehan, T.A.; Saleh, T.A. Environmental risks and toxicity of surfactants: Overview of analysis, assessment, and remediation techniques. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 62085–62104.
34. Derfus, A.M.; Chan, W.C.W.; Bhatia, S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18.
35. Mansurov, Z.; Smagulova, G.; Kaidar, B.; Imash, A.; Lesbayev, A. PAN—Composite Electrospun-Fibers Decorated with Magnetite Nanoparticles. *Magnetochemistry* **2022**, *8*, 160.
36. Taufiq, A.; Jannah, M.A.; Hidayat, A.; Hidayat, N.; Mufti, N.; Susanto, H. Structural and Magnetic Behaviours of Magnetite/Polyvinyl Alcohol Composite Nanofibers. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Malang, Indonesia, 5 September 2019; p. 012081.

37. Nezarati, R.M.; Eifert, M.B.; Cosgriff-Hernandez, E. Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 810–819.
38. Mailley, D.; Hebraud, A.; Schlatter, G. A review on the impact of humidity during electrospinning: From the nanofiber structure engineering to the applications. *Macromol. Mater. Eng.* **2021**, *306*, 2100115.
39. Bae, H.-S.; Haider, A.; Selim, K.M.; Kang, D.-Y.; Kim, E.-J.; Kang, I.-K. Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. *J. Polym. Res.* **2013**, *20*, 1–7.
40. Lin, J.; Ding, B.; Yang, J.; Yu, J.; Sun, G. Subtle regulation of the micro-and nanostructures of electrospun polystyrene fibers and their application in oil absorption. *Nanoscale* **2012**, *4*, 176–182.
41. Sharma, A.; Jain, C.P. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, *5*, 49.
42. Kaur, R.; Tripathi, S.K. Study of conductivity switching mechanism of CdSe/PVP nanocomposite for memory device application. *Microelectron. Eng.* **2015**, *133*, 59–65.
43. Pisani, S.; Dorati, R.; Conti, B.; Modena, T.; Bruni, G.; Genta, I. Design of copolymer PLA-PCL electrospun matrix for biomedical applications. *React. Funct. Polym.* **2018**, *124*, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.011>.
44. Garkhal, K.; Verma, S.; Jonnalagadda, S.; Kumar, N. Fast degradable poly (L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) microspheres for tissue engineering: Synthesis, characterization, and degradation behavior. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2755–2764.
45. Kamaruddin, K.; Edikresnha, D.; Sriyanti, I.; Munir, M.M.; Khairurrijal, K. Synthesis of Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Green tea extract composite nanostructures using electrohydrodynamic spraying technique. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Malang, Indonesia, September 2016, 2017; pp. 1–8.
46. Basha, M.A.F. Magnetic and optical studies on polyvinylpyrrolidone thin films doped with rare earth metal salts. *Polym. J.* **2010**, *42*, 728–734. <https://doi.org/10.1038/pj.2010.60>.
47. Cotrim, M.; Oréface, R. Biocompatible and fluorescent polycaprolactone/silk electrospun nanofiber yarns loaded with carbon quantum dots for biotextiles. *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *32*, 87–96. <https://doi.org/10.1002/pat.5063>.
48. Khan, A.U.R.; Nadeem, M.; Bhutto, M.A.; Yu, F.; Xie, X.; El-Hamshary, H.; El-Faham, A.; Ibrahim, U.A.; Mo, X. Physico-chemical and biological evaluation of PLCL/SF nanofibers loaded with oregano essential oil. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 386.
49. Newsome, T.E.; Olesik, S.V. Electrospinning silica/polyvinylpyrrolidone composite nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*(21), 40966.
50. Hamley, I.; Castelletto, V.; Castillo, R.V.; Müller, A.J.; Martin, C.; Pollet, E.; Dubois, P. Crystallization in poly (L-lactide)-b-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) double crystalline diblock copolymers: A study using X-ray scattering, differential scanning calorimetry, and polarized optical microscopy. *Macromolecules* **2005**, *38*, 463–472.
51. Sheik, S.; Nagaraja, G.K.; Prashantha, K. Effect of silk fiber on the structural, thermal, and mechanical properties of PVA/PVP composite films. *Polym. Eng. Sci.* **2018**, *58*, 1923–1930. <https://doi.org/10.1002/pen.24801>.
52. Ben-David, Y.; Zlotnik, E.; Zander, I.; Yerushalmi, G.; Shoshani, S.; Banin, E. SawR a new regulator controlling pyomelanin synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* **2018**, *206*, 91–98.
53. Chen, L.; Qu, G.; Zhang, C.; Zhang, S.; He, J.; Sang, N.; Liu, S. Quantum dots (QDs) restrain human cervical carcinoma HeLa cell proliferation through inhibition of the ROCK-c-Myc signaling. *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 590–596.
54. He, S.-J.; Cao, J.; Li, Y.-S.; Yang, J.-C.; Zhou, M.; Qu, C.-Y.; Zhang, Y.; Shen, F.; Chen, Y.; Li, M.-M. CdSe/ZnS quantum dots induce photodynamic effects and cytotoxicity in pancreatic cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 5012.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

# Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages

Magdalena Lasak, Viraj P. Nirwan, Dorota Kuc-Ciepluch, Malgorzata Lysek-Gladysinska, F. Javier de la Mata, Rafael Gomez, Amir Fahmi,\* and Karol Ciepluch\*

Electrospun polymer nanofibers, due to high surface area-to-volume ratio, high porosity, good mechanical strength, and ease of functionalization, appear as promising multifunctional materials for biomedical applications. Thanks to their unidirectional structure, imitating the extracellular matrix (ECM), they can be used as scaffolds for cell adhesion and proliferation. In addition, the incorporation of active groups inside nanofiber can give properties for bactericides. The proposed nanomats incorporate nanoparticles templated within the electrospun nanofibers that prevent infections and stimulate tissue regeneration. The generated hybrid electrospun nanofibers are composed of a copolymer of L-lactide-block- $\epsilon$ -caprolactone (PL-b-CL), 70:30, blended with homopolymer polyvinylpyrrolidone (PVP) and gold (Au) nanoparticles. A low cytotoxicity and slightly increased immunoreactivity, stimulated by the nanomat, are observed. Moreover, the decoration of the hybrid nanomat with dendronized silver nanoparticles (Dend-Ag) improves their antibacterial activity against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The use of Dend-Ag for decorating offers several functional effects; namely, it enhances the antibacterial properties of the produced nanomats and induces a significant increase within macrophages' cytotoxicity. The unidirectional nanostructures of the generated hybrid nanomats demonstrate unique collective physio—chemical and biological properties suitable for a wide range of biomedical applications. Here, the antibacterial properties facilitate an optimal environment, contributing to accelerated wound healing.

## 1. Introduction

Electrospun nanofibers are becoming more popular due to their unique physico-chemical and biological properties resulting from their nanometric size and high aspect ratio.<sup>[1–3]</sup> Biocompatible and biodegradable biopolymers, such as chitosan, collagen, or hyaluronic acid, have already been subjected to electrospinning. However, natural polymers present many challenges for biomedical applications due to their low mechanical strength and difficulty in electrospinning.<sup>[1,4,5]</sup> Therefore, synthetic polymers with similar attributes have gained more attention, which; while co-spun, offer both satisfactory strength and flexibility, as well as low toxicity and biodegradability.<sup>[3,4,6–8]</sup> These features have enabled the use of electrospun nanomats as effective platforms in a controlled drug delivery system (DDS). The high surface-to-volume ratio of nanofibers and the ease of their functionalization allow for successful immobilization and transport of compounds with a different spectrum of activity; and thus, achieve better therapeutic effectiveness and biodistribution of the drug.<sup>[1,3,6,7,9,10]</sup>

Hybrid functionalized nanofibers are also

promising tools for bioimaging pathogenic changes or effective biosensors detecting a specific biological analyte.<sup>[11]</sup>

Importantly, electrospun nanofibers have gained significant popularity in the field of regenerative medicine and tissue engineering. Thanks to their structure, nanofibers mimic the fibrous (ECM), providing space for cell adhesion and proliferation as well as the circulation of oxygen and nutrients, which in turn, promotes the regeneration and repair of damaged tissues.<sup>[12–16]</sup> Moreover, their porous structure allows them to absorb excess exudate from the wound and provide the appro-

M. Lasak, D. Kuc-Ciepluch, M. Lysek-Gladysinska, K. Ciepluch  
Division of Medical Biology  
Jan Kochanowski University in Kielce  
Uniwersytecka Street 7, Kielce 25-640, Poland  
E-mail: karol.ciepluch@ujk.edu.pl

V. P. Nirwan, A. Fahmi  
Faculty of Technology and Bionics  
Rhine-Waal University of Applied Science  
Marie-Curie-Straße 1, 47533 Kleve, Germany  
E-mail: Amir.Fahmi@hochschule-rhein-waal.de

F. Javier de la Mata, R. Gomez  
Department of Organic and Inorganic Chemistry  
Research Institute in Chemistry “Andrés M. del Río” (IQAR)  
University of Alcalá  
Alcalá de Henares 28871, Spain

F. Javier de la Mata, R. Gomez  
Networking Research Center for Bioengineering, Biomaterials and  
Nanomedicine (CIBER-BBN)  
Av. Monforte de Lemos, 3–5, Madrid 28029, Spain

F. Javier de la Mata, R. Gomez  
Ramón y Cajal Institute of Health Research  
IRYCIS  
Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9, Madrid 28034, Spain

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mabi.202300513>

DOI: 10.1002/mabi.202300513

appropriate gas permeability.<sup>[17–19]</sup> The dressings based on electrospun nanofibers with biodegradable and biocompatible copolymer of poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) are easier to apply and replace, compared to the conventionally used creams and ointments that easily wipe off the body surface. In addition, their proper functionalization with therapeutic agents—that is, anti-inflammatory, anesthetics, growth factors, and antioxidants—alleviates discomfort; while, providing appropriate conditions for healing wounds.<sup>[2,7–9]</sup>

However, despite so many advantages that the nanofibers have, they must meet several stringent requirements in order to be used as a new class of dressing materials. First, the material must be non-toxic, non-immunogenic, biocompatible, and appropriately conform to the place of its application.<sup>[15]</sup> Another important issue is maintaining a barrier to external microorganisms. Open wounds create favorable conditions for the development of pathogens that can infect wounds and hinder the healing process, and they can attack nearby healthy tissues.<sup>[13,15]</sup> Thus, incorporating antimicrobial agents into electrospun nanomats is an attractive strategy for designing ideal materials to reduce pathogen colonization and promote wound healing. The above-mentioned group of antimicrobials includes antibiotics, biocides, natural bioactive compounds, and nanoparticles (NPs) of metals and their oxides.<sup>[1,5–7,9,12,13,15,20–23]</sup> For example, chitosan/polyethylene oxide biomimetic and bioactive nanofibers possess good biodegradability, increased hemocompatibility, and reduced cytotoxicity degree. They also show increased antioxidant effects in terms of radical scavenging ability and antioxidant capacity.<sup>[19]</sup> Other types of nanofibers such as antibiotic and protein-stabilized nanosilver sandwich-structured ENMs exhibit good biocompatibility and killing efficacy on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Moreover, in vivo experiment shows improved wound healing efficiency by reducing the bacterial load and inflammation.<sup>[24]</sup> The incorporation of curcumin and silver nanoparticles also enhances the antimicrobial effect of electrospun nanofibers, for example, by killing *E. coli*, *S. aureus*, and MRSA, which involves the reactive oxygen species (ROS) generation.<sup>[25]</sup> Among the latter, AuNPs and AgNPs<sup>[26–30]</sup> deserve the greatest attention due to their confirmed high antibacterial potential.

Therefore, in this study, functionalization of nanofibers PL-b-CL/PVP composed of biodegradable and biocompatible copolymer of L-lactide-block- $\epsilon$ -caprolactone (PL-b-CL, 70:30) blended with homopolymer polyvinylpyrrolidone (PVP) to stabilize nanoparticles, via in situ synthesized PVP-AuNPs using co-electrospinning, has been explored. The evaluation of their physico-chemical and biological properties was performed for the characterization of hybrid nanomats. In addition, the effect of covering the PL-b-CL/PVP-AuNPs nanomats with dendronized silver nanoparticles (Dend-AgNPs) on their antibacterial activity was investigated.

Dendronized silver nanoparticles have additional antimicrobial properties, where in addition to killing bacteria as a result of ROS production, they also have a permeabilizing effect on the outer bacterial membrane and act as transporters of antimicrobial proteins, which makes them excellent agents against Gram-negative bacteria.<sup>[31–33]</sup>

## 2. Experimental Section

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Gold Nanoparticles (AuNPs)

The gold precursor ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) used to obtain NPs was purchased from Carl Roth, Karlsruhe, Germany. Sodium Borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ) used as a reducing agent, was purchased from Sigma-Aldrich, Germany.

#### 2.1.2. Polymers

A synthetic copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone (70:30) (PL-b-CL) (average Mw 200 kg) was purchased from Purasorb, Corbion, Netherlands. PVP (Mw 250 kg) and analytical grade ethanol/chloroform used for making electrospinning solution were purchased from Carl Roth, Karlsruhe, Germany.

#### 2.1.3. Dendronized Silver Nanoparticles (Dend-AgNPs)

Dend-AgNPs were prepared following the methodology previously described elsewhere (Figure 1).<sup>[25]</sup>

Dendronized AgNPs were formed in water by the reaction of  $\text{AgNO}_3$ , cationic carboxilane dendron  $\text{HSG1}(\text{S-NMe}_3^+)_2$ ,<sup>[34]</sup> and  $\text{NaBH}_4$  acting as the reducing agent. The Ag/dendron/ $\text{NaBH}_4$  ratio was 1/1/5. The Dend-AgNPs were purified by dialysis (MWCO 10K) for 3 days.

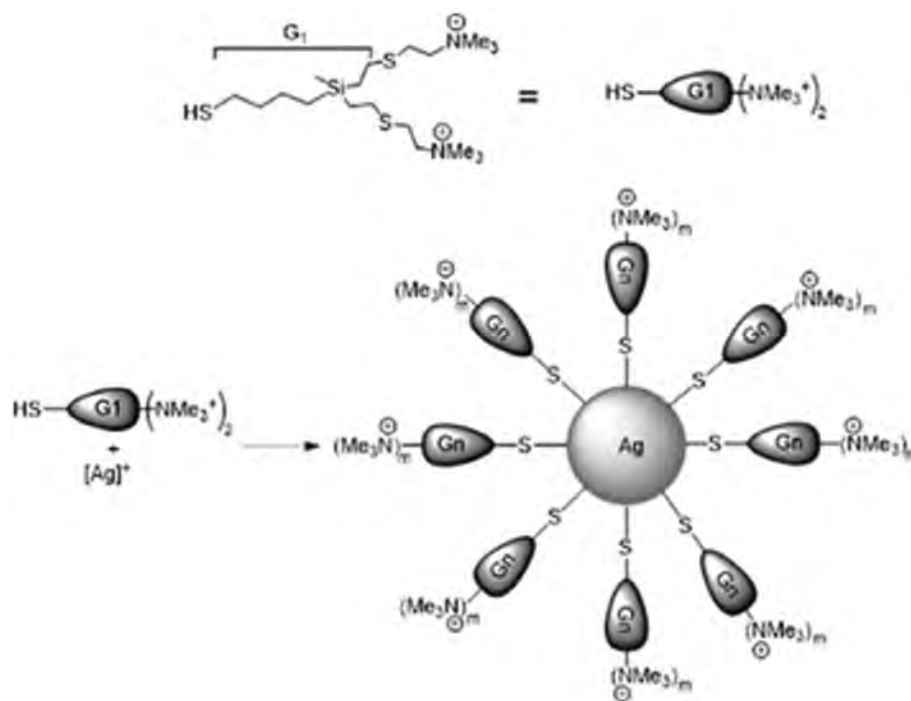
## 3. Methods

### 3.1. Synthesis of AuNPs Stabilized With PVP

In this synthesis, 0.01 mM  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $M = 393,83 \text{ g mol}^{-1}$ ) was used as a gold precursor; while 0.1 mM  $\text{NaBH}_4$  was used as a reducer and polyvinylpyrrolidone (PVP) (3.6 g) as a stabilizing agent. Briefly,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  was dissolved in PVP in ethanol and mixed to obtain a homogeneous mixture. Then, freshly prepared 0.1 mM  $\text{NaBH}_4$  was added to the reaction mixture and was stirred for  $\approx 2 \text{ h}$ . The pink color of the solution was observed, which indicates the formation of gold nanoparticles. Next, the solution was placed in an incubator to evaporate the ethanol. The synthesized PVP-coated gold nanoparticles were suspended in water and analyzed by TEM and DLS.

### 3.2. Fabrication of the Nanofibers

For the fabrication of nanofibers, the electrospinning solution was made by blending PL-b-CL and PVP polymers in chloroform. As seen in Table 1, the polymers were blended initially in the absence of AuNPs to obtain pristine nanofibers and optimize the electrospinning process. Before adding the nanoparticles into the electrospinning solution, the nanoparticles were suspended in chloroform to maintain the same solvent for the nanoparticles and polymer solution. Thereafter, functionalized nanofibers were



**Figure 1.** Reaction schemes of Dend-AgNP synthesis.<sup>[25]</sup>

**Table 1.** Parameters for electrospinning.

| Sample              | Weight [g] |      | Voltage [kV] | Flow rate<br>[mL h <sup>-1</sup> ]<br>PVP | Temperature<br>[°C] | Humidity [%] |
|---------------------|------------|------|--------------|-------------------------------------------|---------------------|--------------|
|                     | PL-b-CL    |      |              |                                           |                     |              |
| PL-b-CL/PVP         | 0.85       | 0.21 | 12           | 0.8                                       | 16                  | 85           |
| AuNPs + PL-b-CL/PVP | 0.85       | 0.21 | 12           | 1                                         | 16                  | 85           |

prepared by solubilizing 0.21 g PVP directly in 4 mL AuNPs solution in chloroform. This solution was blended with the copolymer solution dissolved in chloroform. The blend was stirred overnight before being transferred to a 5 mL syringe connected to a capillary via a PTFE tube. At the end of the PTFE tube, a capillary (0.8 mm diameter) was connected and inserted in the spinneret. The electrospinning was performed in a climate-controlled device using the optimized parameters as seen in Table 1. The nanofibers deposited as a non-woven mat on the rotating collector were peeled off before conducting the physico-chemical and biological characterizations.

### 3.3. Physico-Chemical Characterization of Fabricated Nanofibers

Initially, a scanning electron microscope (JSM-IT 100 InTouch-Scope) at an accelerating voltage of 20 kV was used to analyze the morphology of electrospun fibers. The fibers were sputtered with a thin coating of gold for SEM. The resulting micrographs were examined using the ImageJ software, which provided information about the diameter distribution of the fibers. Statistical analysis was performed using OriginLab. The non-woven mat of both pristine and functionalized nanofibers was subjected to thermal analysis. Differential scanning calorimetry (DSC) and

thermogravimetric analysis (TGA) (Perkin Elmer) were used to characterize the thermal properties of electrospun nanofibers. Nanofibers samples were cut and ≈10 mg of fibers was taken in a ceramic cuvette which was subjected to a temperature program running from 30 °C to 700 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. For performing DSC, 10 mg of fibers was cut and sealed in aluminum pans. These pans along with a blank were analyzed under alternating heating and cooling cycles from -65 °C to 200 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>. Finally, the PerkinElmer Spectrum 2000 spectrometer attached to the ATR assembly was used to perform FTIR analysis of pristine and functionalized fibers at the scanning resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. Electrospun nanofibers were simply pressed against the crystal on the top plate for analysis, and the spectra were recorded.

### 3.4. Biological Properties of Nanofibers

#### 3.4.1. Cytotoxic Effect of Nanofibers on Eukaryotic Cells

Human bronchial epithelial BEAS-2B cells (ATCC CRL-9609) were cultured in LHC-9 medium (Gibco). Human lung carcinoma A549 cells (CCL-185) were cultured in F-12K medium (Corning) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, South America, Biowest) and 1% penicillin/streptomycin (100×

antibiotic antimycotic solution, Corning). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. The level of surviving nanofibers-treated cells was assessed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA). Cells were seeded in 6-well plates and cultured until they reached the appropriate confluency. After that, the cells were treated for 24 h with UV-sterilized nanofibers (nanofibers with an area of ≈9 cm<sup>2</sup> to cover the surface of the well).<sup>[35]</sup> After 24 h incubation, the nanofibers were removed, cells were washed three times with PBS, they were harvested by trypsinization, and centrifuged. The pellet was resuspended in 100 µL 1×binding buffer (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM, and CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), and then, incubated with 5 µL of PI (propidium iodide) and 5 µL of Annexin V at room temperature for 15 min in the dark. Fluorescence was evaluated using a LSR II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were acquired and analyzed using BD FACS DiVa (v 6.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data from 20 000 events were stored.

### 3.4.2. Level of Reactive Oxygen Species (ROS) in Eukaryotic Cells

ROS production in cells was quantified using a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate fluorescent marker (Sigma–Aldrich) after 24 h incubation of cells with nanofibers (nanofibers with an area of ≈0.3 cm<sup>2</sup> to cover the surface of the well). The fluorescence intensity was measured after 60 min incubation with a fluorescent marker. The experiment was done in triplicate.

### 3.4.3. Antibacterial Activity of Nanofibers

The antibacterial activity of the produced nanofibers was tested against *Pseudomonas aeruginosa* (PAO 1). The antibacterial potential of the produced nanofibers was assessed spectrophotometrically using the optical density test (OD 600) and by measuring the level of two pigments produced by *P. aeruginosa* – pyocyanin and pyoverdine. The pyocyanin production was measured at 691 nm and the pyoverdine fluorescence intensity was measured at Ex/Em = 405/460 nm.<sup>[36]</sup> All measurements were performed after 24 h incubation with nanofibers (nanofibers with an area of ≈0.3 cm<sup>2</sup> to cover the surface of the well), in triplicate, and the results were presented as a percentage of control.

### 3.4.4. Antibacterial Activity of Nanofibers Modified With Dend-AgNPs

First, previously obtained nanofibers were covered by the solution of Dendronized AgNPs ((5 µL, 40 µg mL<sup>-1</sup>) and left for drying for 2 h. Then, the antibacterial activity of the produced nanofibers modified with Dend-AgNPs was tested against *P. aeruginosa* (PAO 1). In the beginning, bacteria were diluted to OD<sub>600</sub> around 0.02. The antibacterial potential of the produced nanofibers (nanofibers with an area of ≈0.3 cm<sup>2</sup> to cover the surface of the well) was assessed spectrophotometrically using the optical density test (OD 600). The diffusion test on the agar plate and visual observation of bacterial growth on and under the

nanofibers were also carried out. Measurement of the zone of inhibition of bacterial growth was presented as the average of three measurements [mm].

### 3.4.5. Biofilm Inhibition Assay

The inhibition of *P. aeruginosa* biofilm by free Dend-AgNPs was tested using the crystalviolet (CV) assay. This method quantifies the total biofilm mass based on the CV dye's binding ability to the extracellular polymeric substances (EPS) and both live and dead bacterial cells. The 24 h biofilms were gently washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4) to remove unbound bacteria. The biofilms were stained for 20 min with 0.1% crystal violet solution and then washed three times with PBS to remove the excess dye. Next, CV was dissolved in 96% ethanol. After 15 min incubation, the solution was transferred to a new 96-well plate and the absorbance at 570 nm was measured. The optical density of the de-staining solution represented the biofilm mass.

### 3.4.6. Determination of Reactive Oxygen Species (ROS) in Bacteria

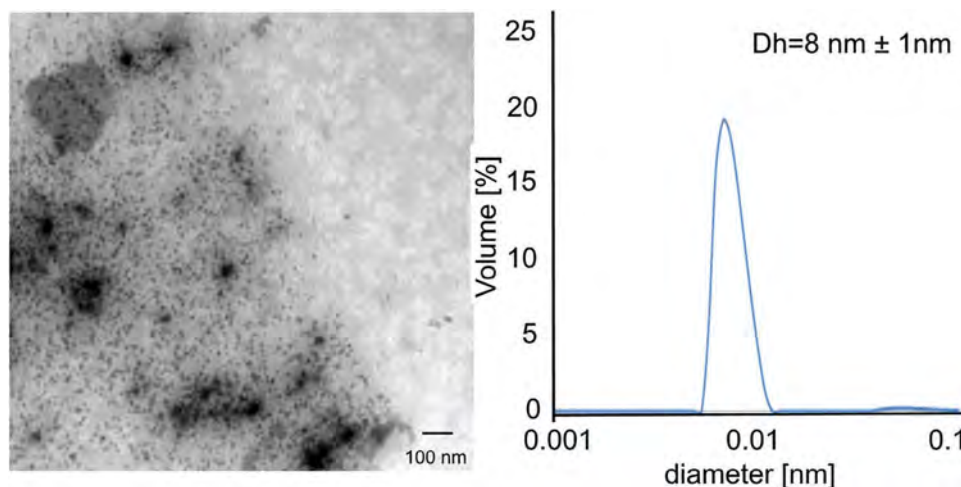
One mL of bacteria *P. aeruginosa* (10<sup>6</sup> cells per mL) obtained in the exponential growth phase was washed with PBS and resuspended in 1 mL of 10 mM phosphate buffer. The mixtures were treated or untreated with nanofibers (nanofibers with an area of ≈0.3 cm<sup>2</sup> to cover the surface of the well) and/or Dend-AgNPs. After that, CM-H2DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate) (1 µM) was added. Subsequently, 100 µL of the bacteria was transferred to black 96-well microplates, and the fluorescence was measured every 5 min using a TECAN Spark Fluorometer with 485/535 nm excitation/emission wavelengths.<sup>[33]</sup> The experiment was done in triplicate. The presented data shows the average.

### 3.4.7. Release Profile of Dendronized Silver Nanoparticles from Nanofibers

The nanofibers were placed in a 96-well plate and treated with Dend-AgNPs (5 µL, 40 µg mL<sup>-1</sup>) for 40 min to obtain dried Dend-AgNPs nanofibers. Then, 100 µL of PBS was added and the absorbance at 560 nm was measured immediately after adding the nanoparticles, 15 min, 30 min, 2 h, and 24 h.

### 3.4.8. Viability and Proliferation of Fibroblasts

Human fibroblast cell line VH10 (ATCC, Manassas, VA, USA, catalogue number PCS-201-012) was maintained and cultured in DMEM medium (Sigma–Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, South America, Biowest) and 1% penicillin/streptomycin (100× antibiotic antimycotic solution, Corning) at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. Cell growth and proliferation in the presence of nanofibers mats were observed in 6-well plates under an optical microscope (64×) after 24 and 72 h of treatment.



**Figure 2.** TEM micrograph and DLS size distribution of AuNPs used for nanomat.

The viability of fibroblast cells treated with nanofibers and/or Dend-AgNPs was determined by the MTS test. Fibroblasts were seeded in a 96-well plate. After reaching the appropriate confluence, the cells were treated with nanofibers, Dend-AgNPs, and nanofibers covered by Dend-AgNPs for 24 h. After that, the MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric) (abcam) was used according to the manufacturer's recommendations, and the absorbance at 490 nm was measured.

#### 3.4.9. Viability and Determination of IL-1 $\beta$ Expression from THP-1 Cells

THP-1 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA, catalogue number TIB-202) and cultured in ATTC modified RPMI 1640 medium (Gibco, A10491-01), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, South America, Biowest) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 3 days. THP-1 cells were seeded at  $1 \times 10^6$  cells per well into 96 well plates, treated with nanofibers, Dend-AgNPs, and nanofibers covered by Dend-AgNPs for 24 h, and washed. After the fourth pass, the monocytes differentiated to macrophages by being incubated for 24 h with PMA at 50 ng mL<sup>-1</sup> final concentration. Next, for 48 h, the cell culture rested with new medium. The supernatants were collected and cell culture was used for the MTS test. The levels of IL-1 $\beta$  in supernatants were measured using the Human IL-1 beta (Abcam100562) ELISA kit, according to the manufacturer's protocol. The concentration of IL-1 $\beta$  (as pg mL<sup>-1</sup>) was calculated relative to the standard curve.

## 4. Results and Discussion

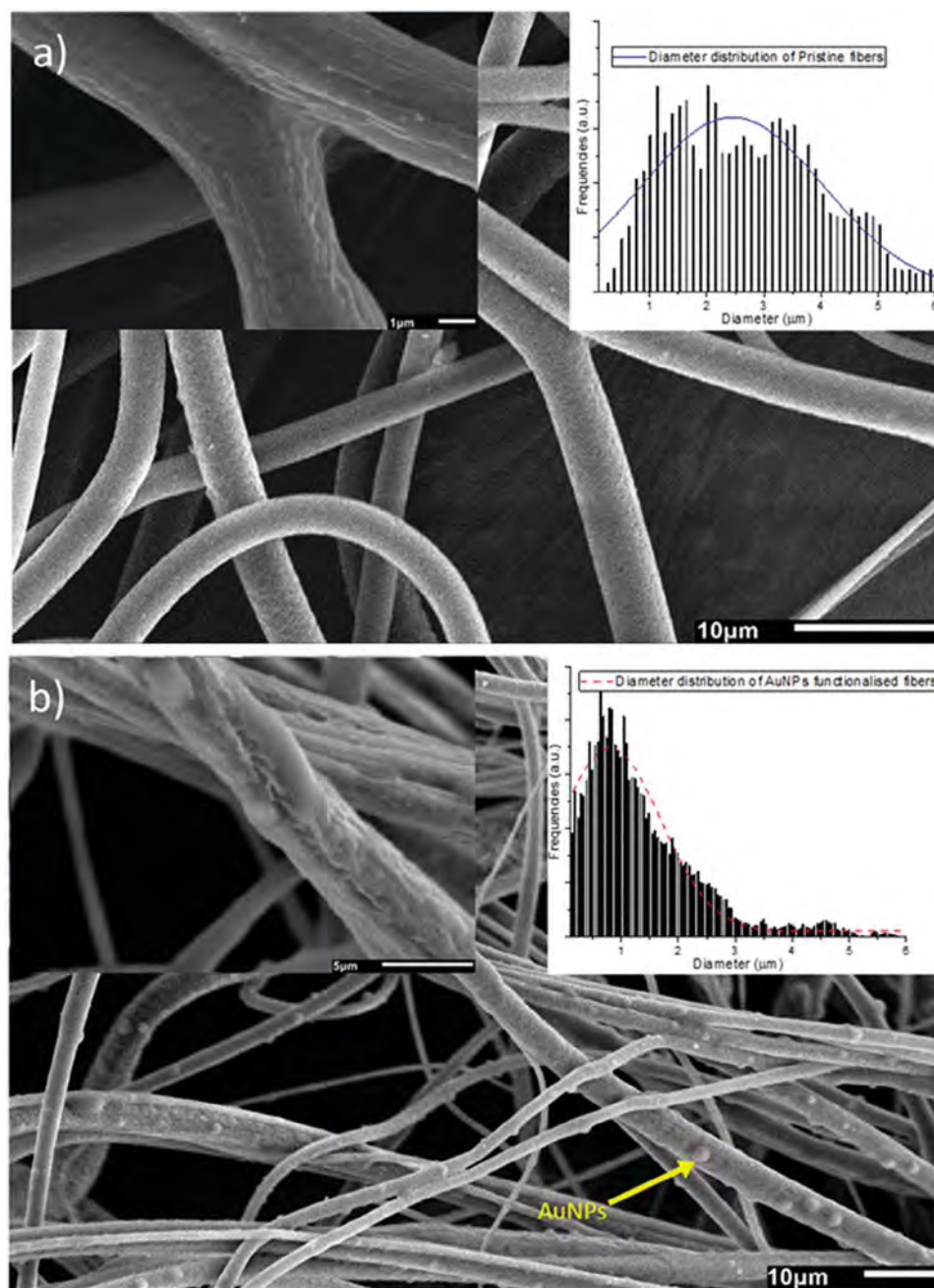
### 4.1. Physico-Chemical Properties of Electrospun Nanofibers

Electrospun nanofibers have widely been explored for various biomedical applications such as tissue engineering,

wound dressings, controlled drug delivery systems, and biosensors.<sup>[2,9–11,37–40]</sup> In this study, we fabricated multifunctional hybrid nanofibers using PL-b-CL, a biocompatible polymer blended with PVP. The nanofibers were functionalized initially via PVP in situ templated AuNPs. Subsequently, the fibers were coated with Dend-AgNPs. The electrospun fibers were analyzed using multiple physico-chemical and biological assays to establish their potential for multifunctional accelerated wound healing scaffolds with antibacterial properties.

Synthesis of AuNPs via in situ reduction within PVP polymer solution provided an excellent ligand to cap the growth and agglomeration of AuNPs. PVP is made of long monomer chains, which are biologically compatible and act as hindrances to the agglomeration of AuNPs. The size and size distribution of synthesized nanoparticles was studied using TEM and DLS. As seen in **Figure 2**, the results obtained from TEM show that the average diameter of the particles was  $\approx 10$  nm. The particles were mostly homogenous. DLS indicates an average size of  $\approx 8$  nm. Further, PVP was blended with the copolymer solution. Here, the utilization of PVP as a blend for electrospinning solution and coating nanoparticles increased homogeneity and interactions among inorganic moieties and the polymeric matrices. This facilitated a uniform distribution of functional agents throughout the fiber matrix.

Fabrication of fibers using electrospinning resulted in two distinctly colored non-woven mats. The pristine fibers were white whereas the functionalized fibers carried a pinkish tinge due to the presence of AuNPs. Analysis of deposited fibers under SEM helped identify the optimized parameters for the stable fabrication of nanofibers. During the electrospinning, it was observed that the use of chloroform as the solvent had a negative impact on the electrospinnability of the solution and yield. The electrospinning process was not continuous and there was an occurrence of solidification at the spinneret tip due to the rapid evaporation of solvent. As a result, the fibers had a wide diameter distribution as seen in **Figure 3a,b**. The diameter of pristine fibers was significantly higher than that of the AuNPs functionalized nanofibers. The presence of the nanoparticles in the electrospinning solution led to a change in viscosity, surface tension, and distribution



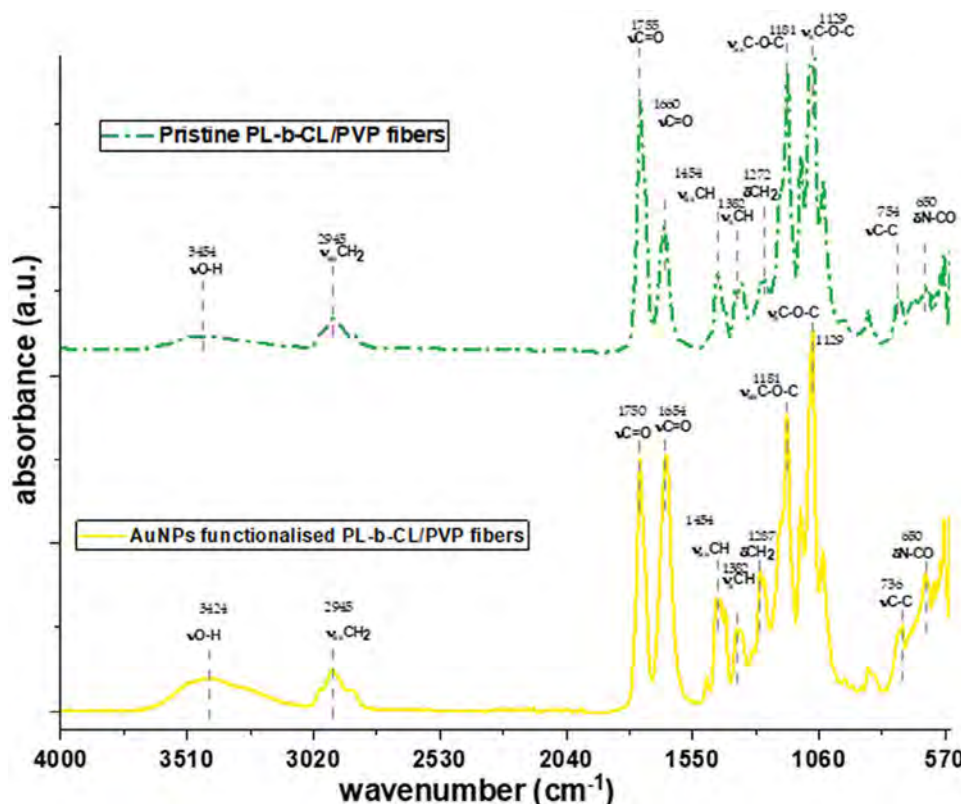
**Figure 3.** Scanning electron micrograph of electrospun nanofibers to analyze their morphology, diameter distribution (inset right), and magnified view exhibiting rough/porous features on fiber surface (inset left): a) pristine PL-b-CL/PVP nanofibers and b) AuNPs/PVP functionalized PL-b-CL/PVP nanofibers.

of applied voltage favorably toward diameter reduction. However, the particles suspended in solution tended to agglomerate due to inherent high surface energy in the absence of constant mixing, which could in effect, lead to the presence of high variability in diameter.<sup>[41]</sup>

The statistical analysis of the diameter distribution and their differences due to functionalization with AuNPs can be seen in Table 2. The morphology of fibers was uniform and mostly cylindrical, and the fibers appeared ridged when observed under SEM,

which could be due to the rapid evaporation of solvents. Further, AuNPs could be observed distinctly on the surface of the fibers.

Using ATR-FTIR analysis, the absorption spectra of nanofibers were obtained to determine the influence of the addition of AuNPs in the matrix (Figure 4). The observed spectra contained the standard peaks for a combination of co polymer PL-b-CL and PVP homopolymer<sup>[35]</sup> after electrospinning. As seen in Figure 4, the —OH stretching<sup>[42,43]</sup> vibration due to the presence of PVP could be observed at  $3454\text{ cm}^{-1}$  in the case



**Figure 4.** FTIR (ATR) spectroscopy absorbance results for comparing the influence of the addition of AuNPs/PVP to the PL-b-CL/PVP nanofiber system.

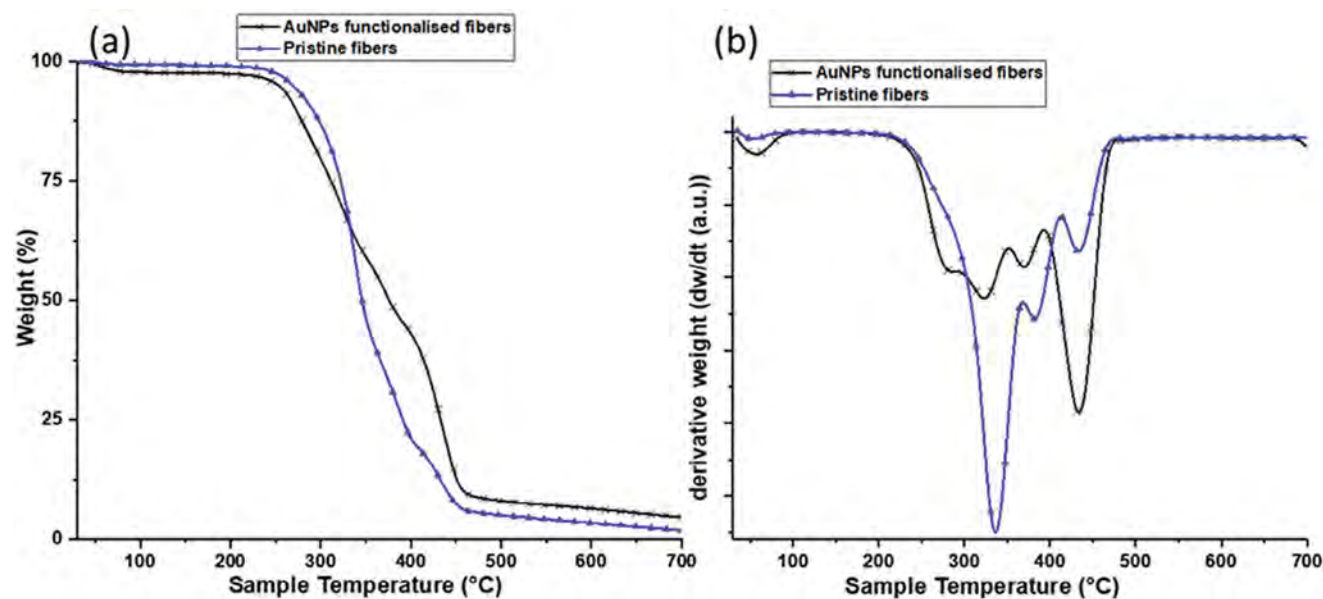
**Table 2.** Statistical analysis of the nanofiber's diameter measured through ImageJ.

| Sample              | Mean diameter      | Standard deviation |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| PL-b-CL/PVP         | 2.12 $\mu\text{m}$ | 1.6 $\mu\text{m}$  |
| AuNPs + PL-b-CL/PVP | 0.95 $\mu\text{m}$ | 0.7 $\mu\text{m}$  |

of pristine nanofibers. This peak was slightly red shifted to  $3424\text{ cm}^{-1}$  in AuNPs functionalized nanofibers, presumably due to the increased amount of PVP and causing restriction of O—H stretching. Asymmetric C—H stretching of  $\text{CH}_2$  could be observed in both samples at  $2945\text{ cm}^{-1}$ . The symmetric and asymmetric C=O associated vibrations at  $1755$  and  $1660\text{ cm}^{-1}$  showed a small red shift ( $\approx 5\text{ cm}^{-1}$ ) in the C=O stretching vibration from  $1750$  to  $1654\text{ cm}^{-1}$  in the presence of AuNPs. This implied weak adsorption of PVP molecules on the Au surface via the O atom of the C=O group.<sup>[44,45]</sup> Absorption peaks associated with the asymmetric and symmetric C—H bending were observed at  $1454$  and  $1382\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[46]</sup>  $\text{CH}_2$  wagging or twisting could be observed at  $1272\text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[47]</sup> along with symmetric and asymmetric C—O—C stretching (amorphous) present at  $1181$  and  $1129\text{ cm}^{-1}$ , respectively.<sup>[35,46]</sup> Finally, C—C breathing observed through absorbance at  $754\text{ cm}^{-1}$  in pristine nanofibers was restricted in AuNPs functionalized nanofibers, and the peak was red shifted to  $736\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[48]</sup> The N—CO bend absorbance peak between  $650$  and  $533\text{ cm}^{-1}$  was observed in both samples.<sup>[48]</sup>

Overall, the FTIR spectra have confirmed the presence of AuNPs with PVP, absorbed on its surface, and their interaction with the matrix of copolymer in nanofibers. Here, the presence of PVP-AuNPs seems to promote interaction among inorganic and organic parts of the fibers and provide overall stability to the composition.

It is known that the functionalization of nanofibers with inorganic moieties can influence their thermal behavior, which includes properties such as phase transitions and mass degradation. Here, the thermal degradation behavior of the fibers was analyzed using thermogravimetric analysis including, the influence of the presence of AuNPs in the nanofibers' matrix (Figure 5). The thermogram as seen in Figure 5a shows a standard degradation curve of the copolymer PL-b-CL/PVP blend. As seen from the thermograms, both pristine and functionalized nanofibers display multi-step degradation behavior due to the presence of various constituents with varying degrees of degradation profiles. In Table 3, the data from multiple degradation profiles of the nanofibers has been provided. Interestingly, only the thermogram of functionalized nanofibers shows a slight mass loss around  $100^\circ\text{C}$ , which is associated with loss of water in the samples. Compared to pristine nanofibers, the presence of inorganic moieties in the matrix of the functionalized nanofibers has raised the degradation onset temperature to  $345^\circ\text{C}$  from  $304^\circ\text{C}$ . A similar trend can be observed at the end of the degradation temperature of the samples, which increases from  $384^\circ\text{C}$  to  $457^\circ\text{C}$ . The DTG (derivative thermogravimetric analysis) curves in Figure 5b show multiple inflection points



**Figure 5.** a) Thermogravimetric analysis (TGA) and b) Derivative thermogravimetric analysis (DTG) of the pristine and AuNPs/PVP immobilized PL-b-CL/PVP nanofibers.

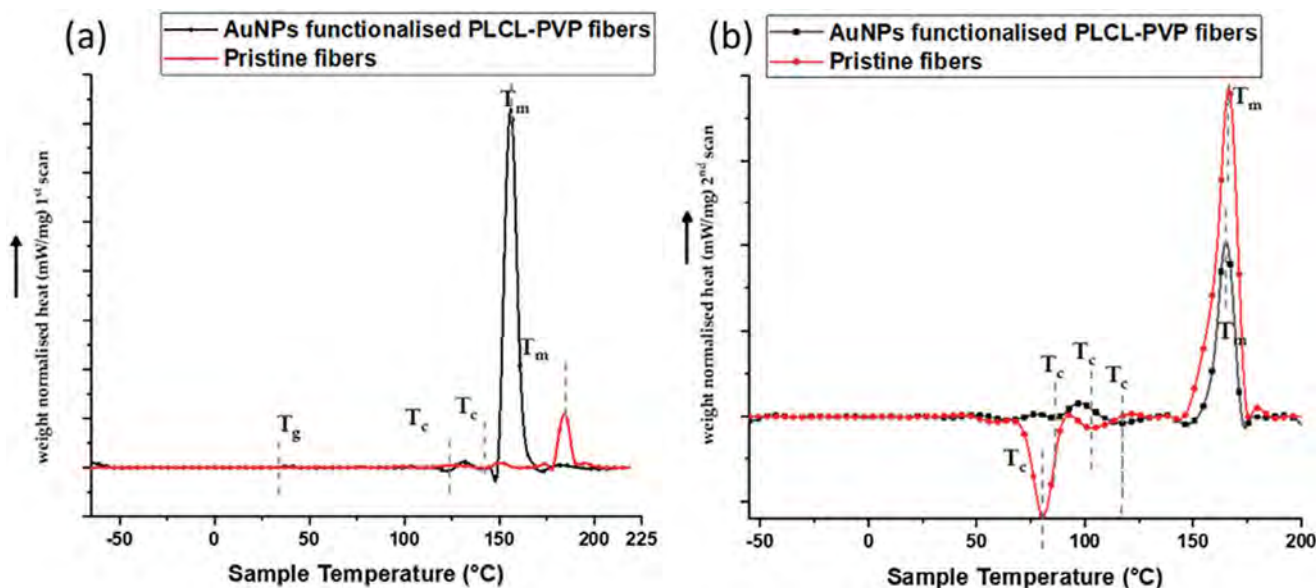
**Table 3.** Data after TGA analysis of pristine and functionalized nanofibers.

| Sample              | Onset [°C] | End [°C] | Step inflection points [°C] |          |          | Total weight loss [%] |
|---------------------|------------|----------|-----------------------------|----------|----------|-----------------------|
|                     |            |          | 1st step                    | 2nd step | 3rd step |                       |
| PL-b-CL/PVP         | 304        | 384      | 337                         | 380      | 431      | 98.3                  |
| AuNPS + PL-b-CL/PVP | 345        | 457      | 323                         | 371      | 434      | 95.7                  |

where the major degradation of the samples happens, which does not change significantly after functionalization. The melting and breakdown of intermingled segments are observed at 337 °C and 323 °C for pristine and functionalized nanofibers, respectively; whereas, the degradation corresponding to low crystalline caprolactone in PL-b-CL is observed at 380 °C and 371 °C for pristine and functionalized nanofibers, respectively. However, it is to be noted that the third inflection step resulting from condensation and cyclization of polyaromatic structures of PVP is slightly higher for functionalized nanofibers, which can be due to a slightly increased amount of PVP present as AuNPs ligand. Again, due to the presence of AuNPs, the total weight loss at the end of the temperature program is reduced slightly from 98% for pristine nanofibers to 95% for functionalized fibers.

In addition, electrospinning and functionalization of nanofibers with inorganic AuNPs influence the crystallinity of the semi-crystalline PL-b-CL/PVP copolymer blend. Moreover, the solvent, processing temperature, and humidity can affect the crystalline properties. Here, the analysis of these changes was performed using DSC (Figure 6). The samples were subjected to multiple heating and cooling cycles from −65 °C to 200 °C. A few notable differences were observed between the phase transition of the pristine and functionalized nanofibers. Further, the two heating cycles displayed a change in phase transitions

confirming the rapid transition of the polymer during the fabrication process from the solution phase to the solid nanofibers. The DSC analysis of the nanofibers revealed their  $T_g$  to be at  $\approx 35$  °C for both pristine and functionalized fibers. During the first heating cycle (Figure 6a), crystallization peaks could be seen at 123 °C and 141 °C for AuNPs functionalized nanofibers. The melting transition ( $T_m$ ) in functionalized nanofiber was observed at 156 °C with a very strong peak. A similar transition was observed at 186 °C in pristine nanofibers. Comparatively, the behavior of nanofiber samples in Figure 6b after the second heating cycle was smoother, and few phase changes were observed, presumably due to controlled cooling during the DSC temperature program. Here, distinct  $T_g$  peaks were absent in both samples. However, as the temperature increased, a sharp crystallization peak could still be observed in the pristine sample at 80 °C, and a shallow crystallization peak for AuNPs functionalized samples at 85 °C. A second crystallization transition was also observed for the fiber's samples at 103 °C and 117 °C, for pristine and AuNPs functionalized nanofibers, respectively. In contrast to the first heating cycle, the melting transitions for pristine and AuNPs functionalized nanofibers almost coincided with similar peaks at 166 °C. Through the DSC analysis, it was evident that the inclusion of AuNPs as functional agents in the matrix of nanofibers influenced the thermal behavior of the nanofibers. The inclusion of the nanoparticles increased



**Figure 6.** a) DSC curve of pristine and AuNPs immobilized PL-b-CL/PVP nanofibers highlighting the difference in their phase change behavior due to inclusion of NPs, and interaction with PL-b-CL copolymer after first heating scan, b) second heating scan after controlled cooling of the samples.  $T_g$  – glass transition temperature,  $T_c$  – crystallization temperature,  $T_m$  – melting temperature.

the thermal stability of the nanofibers and increased their crystallinity. Moreover, the presence of AuNPs as functional agents in the matrix of nanofibers lowered the melting endotherm peak.

#### 4.2. Cytotoxicity of Electrospun Nanofibers

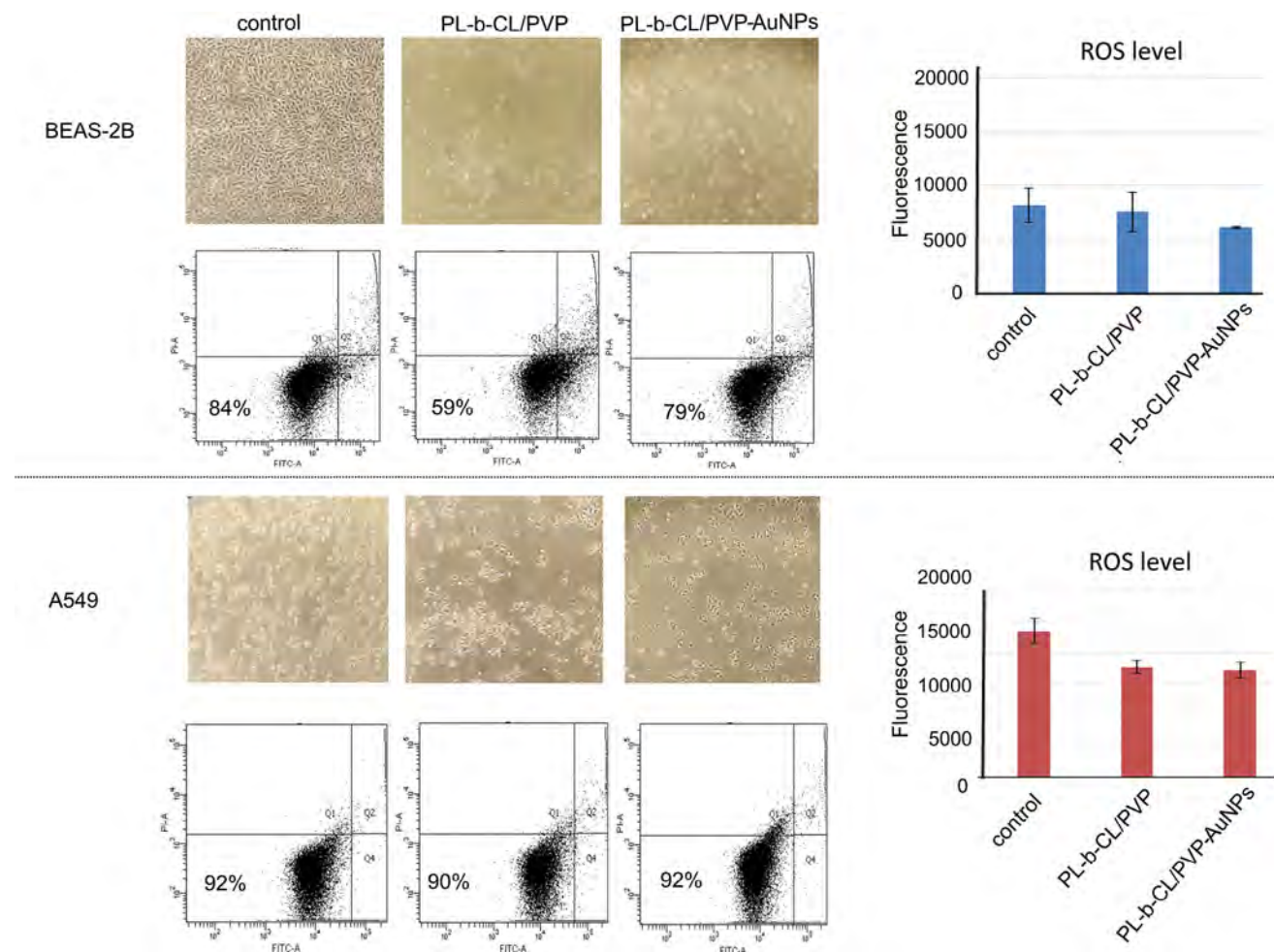
The next step was to evaluate the biological properties of the obtained nanofibers. In the beginning, the assessment of the cytotoxicity of the fabricated nanofibers against non-cancer cells (BEAS-2B) and cancer cells (A549) was done. Observations of cells' growth under an optical microscope and an Annexin V-FITC Apoptosis Staining Assay were performed after 72 h incubation with various types of nanofibers. As shown in Figure 7, nanofibers with metal nanoparticles (PL-b-CL/PVP-AuNPs) to a lesser extent inhibited the growth of normal BEAS-2B cells, compared to nanofibers without nanoparticles (PL-b-CL/PVP). The observed slight cytotoxicity of nanofibers with gold nanoparticles creates promising opportunities for their further research in terms of possible biomedical applications. In the presence of pristine PL-b-CL/PVP nanomats, the viability of non-cancer cells decreased to 59%. However, the observed cytotoxicity was not associated with increased production of ROS in cells and the occurrence of oxidative stress, which was reported as one of the main causes of cytotoxicity induced by exposure to nanomaterials.<sup>[49,50]</sup> Therefore, reduced cell viability was related to the toxicity mechanism of nanomaterials other than excessive production of ROS, or may also result from a longer phase of cells' adaptation to PL-b-CL/PVP nanofibers compared to PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers; and thus, result from surface structure of the nanofibers.<sup>[49,51]</sup> Preliminary studies also did not show a significant anti-cancer potential of the tested nanofibers (Figure 7).

#### 4.3. Antimicrobial Properties of Electrospun Nanofibers

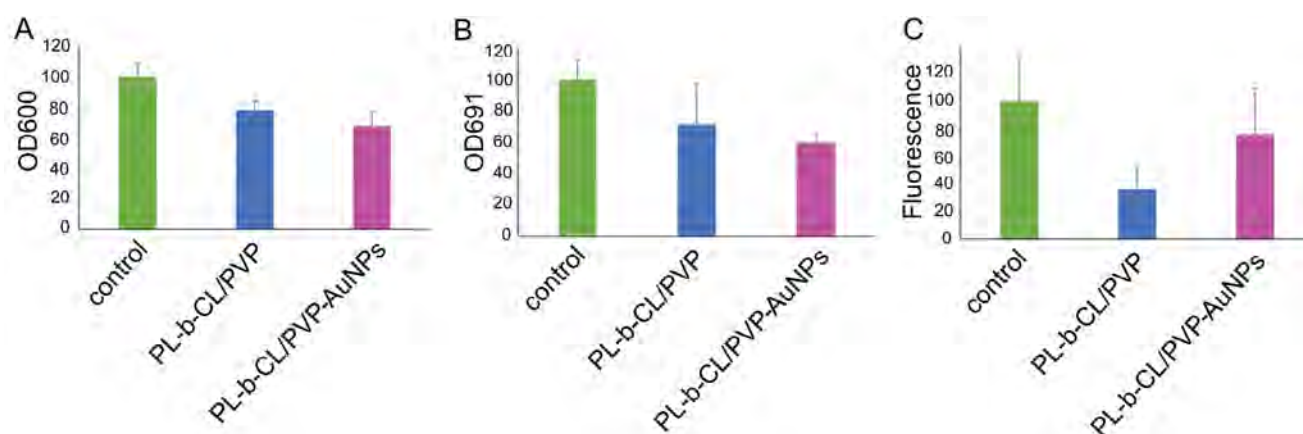
In the next step, the antibacterial properties of the fabricated nanofibers against antibiotic-resistant Gram-negative pathogen – *P. aeruginosa* were assessed.<sup>[52]</sup> Figure 8a (OD 600) presents the inhibited bacterial growth after 24 h treatment of the nanofibers. PL-b-CL/PVP and PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers limited the growth of *P. aeruginosa* to 80% and 68%, respectively, compared to the untreated control. Both nanofibers also reduced the production of two basic pigments and virulence factors produced by *P. aeruginosa* – pyocyanin (Figure 8b) and pyoverdine (Figure 8c). Thus, it is likely that the nanofibers may block important metabolic pathways of *P. aeruginosa*, which in turn, may result in reduced growth of bacteria exposed to the nanofibers and confirm their high antibacterial potential.<sup>[36,52,53]</sup>

#### 4.4. Antimicrobial Properties of Electrospun Nanofibers Covered by Dend-AgNPs

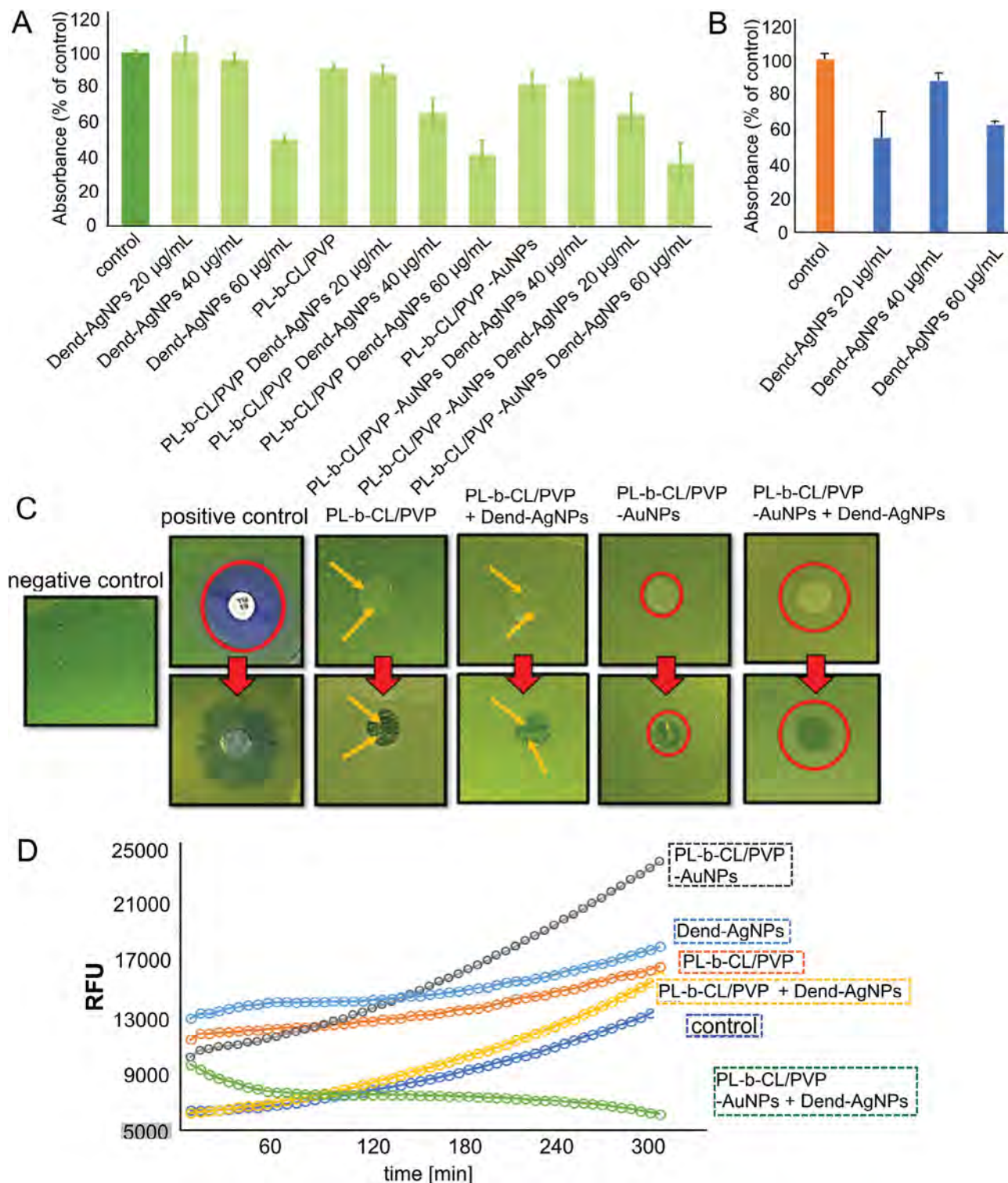
Due to the promising results of the antibacterial scaffolds, further measurements are conducted to reveal the influence of the dendronized silver nanoparticles (Dend-AgNPs) with modified nanomat. The antimicrobial properties of Dend-AgNPs are well known and confirmed by different mechanisms including interactions with the bacterial cell membrane and its permeabilization, ROS production, disrupting DNA replication, and many metabolic pathways.<sup>[27,28]</sup> Based on the previous studies, three different concentrations of Dend-AgNPs are selected (20, 40, and 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) to confirm the bacterial activity of nanofibers covered by Dend-AgNPs.<sup>[27,54]</sup> As observed, a biofilm inhibition assay using CV staining show that the use of Dend-AgNPs inhibits the formation and growth of *P. aeruginosa* biofilm (Figure 9b).



**Figure 7.** BEAS-2B and A549 cells culture after 24 h incubation with various types of nanofibers. Untreated cells were used as control. The reactive oxygen species (ROS) level was measured in cell culture after 24 h incubation with nanofibers.



**Figure 8.** a) The optical density of *P. aeruginosa* PAO1 measured at 600 nm without and in the presence of various types of nanofibers after 24 h incubation. b) Pyocyanin production of *P. aeruginosa* PAO1 measured at 691 nm without and in the presence of various types of nanofibers after 24 h incubation. c) Pyoverdine production of *P. aeruginosa* PAO1 without and in the presence of various types of nanofibers after 24 h incubation. An untreated bacterial culture was used as a control.



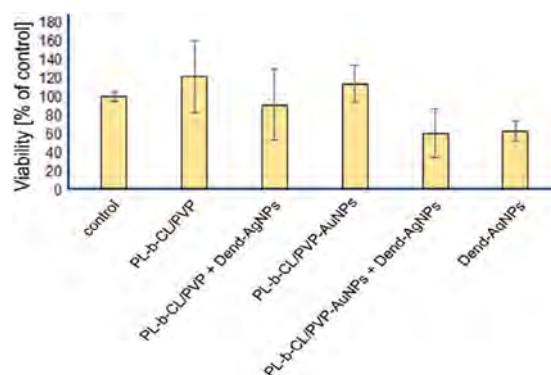
**Figure 9.** a) The optical density of *P. aeruginosa* PAO1 measured at 600 nm without and in the presence of various types of nanofibers and dendronized silver nanoparticles after 24 h incubation. b) The inhibition of biofilm formation was measured as crystal violet absorbance without and in the presence of various concentrations of dendronized silver nanoparticles after 24 h incubation. c) Assessment of the antibacterial effect of fabricated nanofibers using diffusion test on an agar plate by visual assessment and observing the bacterial growth on and under the nanofibers. The absence of bacterial colonies and inhibited bacterial growth on and under PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers indicates their antibacterial activity (red circle). The golden arrows indicate bacterial colonies present on and under the PL-b-CL/PVP nanofibers. Untreated bacterial culture was used as a negative control. A bacterial culture treated with an antibiotic (*Tobromycin*) was used as the positive control (c). d) Influence of nanofibers and modified Dend-AgNPs nanofibers on intracellular ROS generation. ROS levels were determined after 15 min of treatment with CM-H2DCFDA.

**Table 4.** Measurement of the zone of inhibition of bacterial growth.

| Sample                                    | Average of inhibited growth zone [mm] |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| Negative control                          | —                                     |
| Positive control (antibiotic)             | 7.7                                   |
| PL-b-CL/PVP nanofibers                    | 2.0                                   |
| PL-b-CL/PVP nanofibers + Dend-AgNPs       | 2.7                                   |
| PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers              | 2.3                                   |
| PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers + Dend-AgNPs | 3.7                                   |

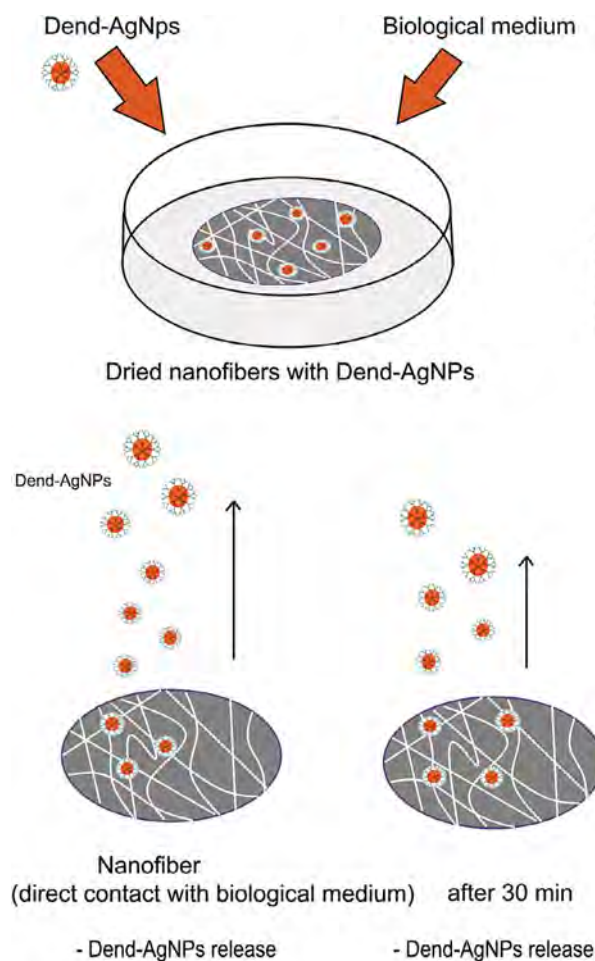
In the optical density testing (Figure 9a), nanofibers in combination with Dend-AgNPs show a slightly stronger antibacterial effect against *P. aeruginosa* compared to unmodified nanofibers. For subsequent research, the Dend-AgNPs concentration of  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  is used, which shows both satisfactory antibacterial activity and relatively low toxicity to human cells.

The results are consistent with the diffusion test on the agar plate (Figure 9c). As expected, one can observe an absence of bacterial colonies on and under the PL-b-CL/PVP-AuNPs

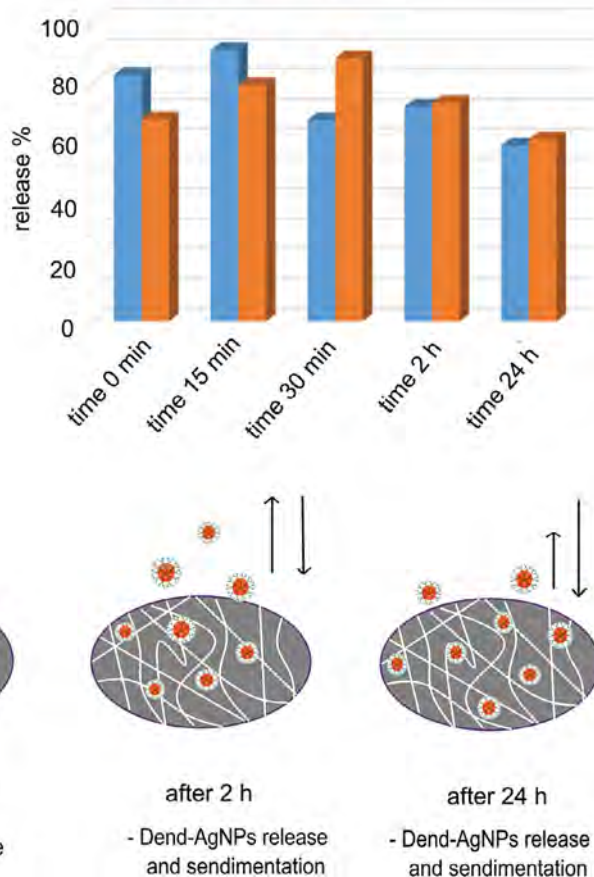


**Figure 11.** The cell viability of VH10 cells treated with nanofibers or Dend-AgNPs. Untreated cells were used as control. Experiments were performed in triplicate, and the results are presented as a percentage of control.

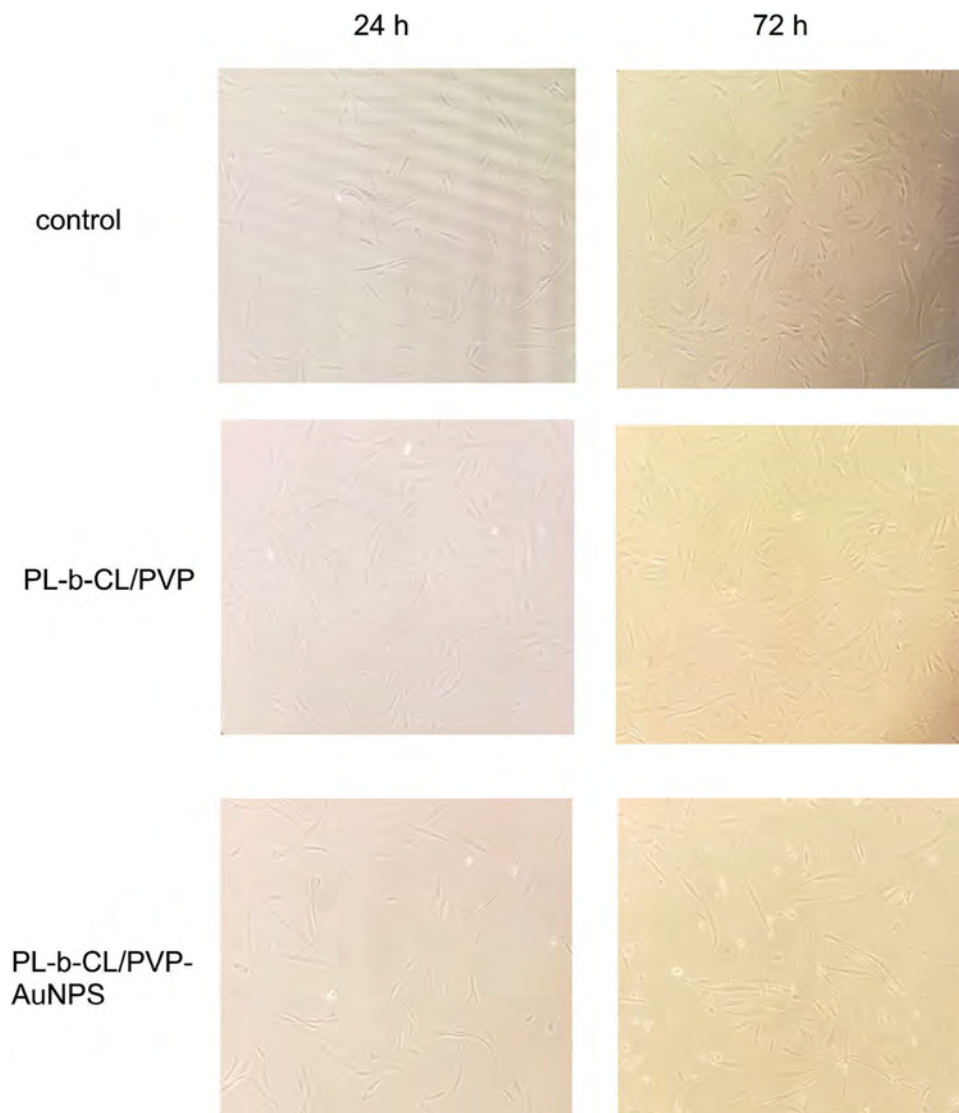
nanofibers and a larger zone of bacterial growth inhibition when treating the bacteria with PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers in combination with dendronized silver nanoparticles. The average zone of inhibition of bacterial growth for tested nanofibers is pre-



**Dend-AgNPs release from nanofibers in biological medium**



**Figure 10.** The mechanism of release of dendronized silver nanoparticles from nanofibers in time in biological medium. The percentage of nanoparticles released from nanofiber in biological medium is depicted in the left corner, where blue bars correspond to PL-b-CL/PVP and orange bars correspond to PL-b-CL/PVP-AuNPs, both modified with dendronized AgNPs.



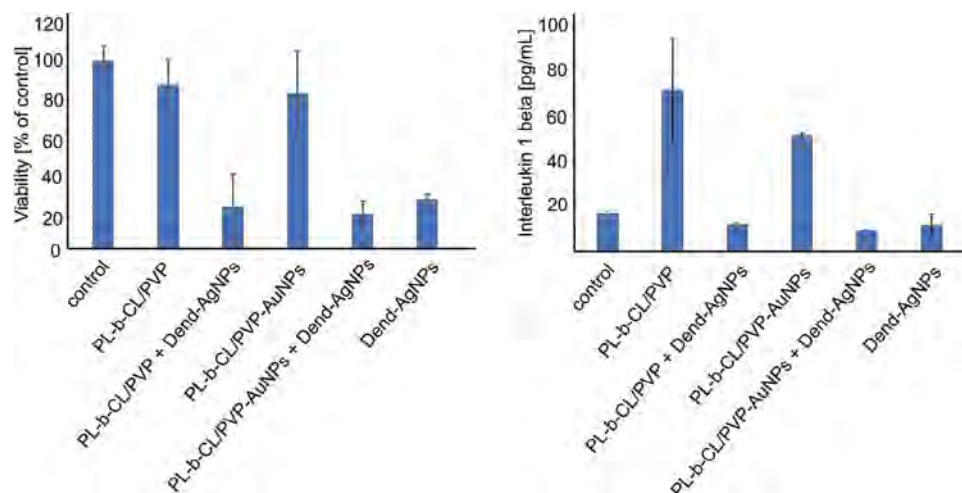
**Figure 12.** VH10 cells culture after 24 and 72 h incubation with various types of nanofibers. Untreated cells were used as control.

sented in **Table 4** and for PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs nanofibers, it is 3.7 mm. Thus, one can suggest that the use of nanofibers modified with dendronized silver nanoparticles limits the growth of bacteria, which can be used to inhibit potential infection.

Considering the antibacterial efficacy of metal ion-generated reactive oxygen species, the investigation of the level of ROS induction over time in the presence of modified and unmodified nanofibrous scaffolds in the tested bacteria was done (Figure 9d). Treatment of *P. aeruginosa* with nanofibers (PL-b-CL/PVP-AuNPs) or Dend-AgNPs resulted in the overproduction of ROS in bacterial cells compared to untreated control, confirming their cytotoxic effect on bacteria. Interestingly, contrary to expectations, a decrease in ROS production was observed in bacterial cells treated with PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers modified with Dend-AgNPs, which, taking into account the previous positive results of antibacterial tests, suggests a different mechanism of antibacterial action. As it has been shown, the bactericidal ef-

fect of nanofibers may result from their surface chemistry and small diameters. It has been confirmed that nanofibers with diameters of 300–1000 nm, that is, not larger than the dimensions of bacteria, lead to conformational changes in bacterial cells and their lysis. In turn, increased surface roughness may promote bacterial adhesion and induce their disintegration as a result of direct contact.<sup>[5]</sup>

For this reason, a further step is to investigate the mechanism of Dend-AgNPs release from nanofibers over time in a biological medium (Figure 10). The initial increased absorbance indicates a rapid release of weakly bound Dend-AgNPs on the nanofibers' surface. After 2 and 24 h, the absorbance decreases, which can be explained by the sedimentation of the released nanoparticles and their penetration inside the nanofibers. This process can also occur during the treatment of bacterial cells with PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers modified with Dend-AgNPs. The penetration of Dend-AgNPs inside the nanofibers can limit the contact of nanoparticles with bacteria, which



**Figure 13.** The cells' viability and interleukin 1 beta production of THP-1 cells treated with nanofibers or Dend-AgNPs. Untreated cells were used as control. Experiments were performed in triplicate, and the results are presented as percentage of control.

could have been the cause of previously observed decreased production of ROS in cells treated with PL-b-CL/PVP-AuNPs nanofibers modified with Dend-AgNPs. On the other hand, this can result in the release of the Dend-AgNPs during longer periods.

#### 4.5. Cytotoxicity, Proliferation, and Inflammatory Properties of Electrospun Nanofibers Covered by Dend-AgNPs

As fibroblasts play a key role in regeneration and wound healing,<sup>[55]</sup> fibroblast viability and proliferation in the presence of nanofibers with or without Dend-AgNPs were investigated. The MTS test results showed increased cytotoxicity of Dend-AgNPs and modified nanofibers with Dend-AgNPs (Figure 11). However, importantly, treatment with unmodified nanofibers neither reduced fibroblast viability nor inhibited their growth (Figure 12). This confirms that the observed cytotoxicity of the modified nanofibers results mainly from the action of Dend-AgNPs.

Stimulating the immune system is one of the most important issues in wound healing. Therefore, the effect of nanofibers on the cytotoxicity of macrophages and the production of pro-inflammatory interleukins was tested (Figure 13). No cytotoxic effect of nanofibers on macrophages was observed. However, a clear increase in cytotoxicity was visible in the presence of Dend-AgNPs. The dendronized silver nanoparticles themselves also showed high cytotoxicity. Therefore, the results of cytotoxicity were compared with the level of interleukin 1 $\beta$  as a marker of immunoreactivity. To test this, an ELISA assay was used. In Figure 13, a high concentration of IL-1 $\beta$  (45–70 pg mL<sup>-1</sup>) in the supernatants could be observed after incubation with nanofibers alone (with and without AuNPs), whereas incubation with nanoparticles resulted in a low level of IL-1 $\beta$  ( $\approx$ 11 pg mL<sup>-1</sup>). Thus, it was clearly visible that the level of interleukin was correlated with cytotoxicity. Where there was a high toxic effect, there was a small amount of interleukin, and vice versa, where there was a low toxic effect, the level of interleukin was significant.

This suggests that high cytotoxicity may have led to the complete destruction of cells that were unable to produce IL-1 $\beta$ . This was the case in the studies by Smela et al. (2022), who showed that the SiO<sub>2</sub> nanofibers alone were not cytotoxic and the IL-1 $\beta$  level was not significantly high,<sup>[56]</sup> that TiO<sub>2</sub> nanobelts<sup>[57]</sup> and silver nanowires<sup>[58]</sup> in contrast can be toxic. They showed that the level of IL-1 $\beta$  after treatment with SiO<sub>2</sub> nanofibers strictly depends on the length and concentration of the nanofibers. A high level of interleukin was observed only at a very high concentration of 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.<sup>[56]</sup> What was also interesting in our obtained results was that the Dend-AgNPs used to modify nanofibers were less toxic, in the case of fibroblast. This is in agreement with the literature where one can find similar observations in Bonan et al. (2019); they showed that cytotoxicity in mouse macrophages treated with Ag/TiO<sub>2</sub> silver nanofibers depended on the concentration of Ag/TiO<sub>2</sub> nanofibers and that cells of the immune response were more sensitive to AgNPs compared to other cell lines.<sup>[59]</sup>

## 5. Conclusion

Herein, a comprehensive investigation has been carried out on the physico-chemical and biological properties of electrospun hybrid nanomat based on copolymer L-lactide-block- $\epsilon$ -caprolactone (PL-b-CL) blended with homopolymer polyvinylpyrrolidone (PVP) charged with AuNPs. Dendronized silver nanoparticles (Dend-AgNP) adsorbed on nanofibers and enhanced their antibacterial properties against *P. aeruginosa*. The generated hybrid nanomats retained their collective activities and showed relatively low cytotoxicity with a slightly increased immunoreactivity where the rate of fibroblast proliferation was not reduced. Modification with dendronized silver nanoparticles increased antibacterial effectiveness but may also significantly increase macrophage cytotoxicity. These hybrid nanomats can be considered for wound healing applications specifically, to inhibit bacterial growth, and against antibiotic-resistant bacteria for future clinical practice.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Aneta Wegierek-Ciuk for her help in performing the flow cytometry analysis. This research was supported by the Jan Kochanowski University grant no. SUPB.RN.22.126. This work has been supported by grants PID2020-112924RB-I00 (MINECO, Spain), Radioprotect P2022BMD-7406 (Comunidad de Madrid Spain). CIBER-BBN is an initiative funded by VI National R-D-I Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and financed by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with assistance from the European Regional Development Fund.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Author Contributions

M.L., K.C., V.N. and A.F. contributed equally to this work. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Keywords

antimicrobial, carbosilane dendrimer, metal nanoparticles, nanofibers, wound healing

Received: November 11, 2023

Revised: February 6, 2024

Published online:

- [1] I. Maliszewska, T. Czapka, *Polymers* **2022**, *14*, 1661.
- [2] V. P. Nirwan, T. Kowalczyk, J. Bar, M. Buzgo, E. Filová, A. Fahmi, *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1829.
- [3] A. Al-Abduljabbar, I. Farooq, *Polymers* **2023**, *15*, 65.
- [4] S. Parham, A. Z. Kharazi, H. R. Bakhsheshi-Rad, M. Kharaziha, A. F. Ismail, S. Sharif, M. Razzaghi, S. RamaKrishna, F. Berto, *Adv. Eng. Mater.* **2022**, *24*, 2101460.
- [5] N. Hamdan, A. Yamin, S. A. Hamid, W. K. W. A. Khodir, V. Guarino, *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, 59.
- [6] N. Ditaranto, F. Basoli, M. Trombetta, N. Cioffi, A. Rainer, *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 643.
- [7] X. Liu, H. Xu, M. Zhang, D.-G. Yu, *Membranes* **2021**, *11*, 770.
- [8] Y. Liu, T. Li, Y. Han, F. Li, Y. Liu, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2021**, *17*, 100247.
- [9] S. Chen, B. Liu, M. A. Carlson, A. F. Gombart, D. A. Reilly, J. Xie, *Nanomedicine* **2017**, *12*, 1335.
- [10] D. Kulkarni, S. Musale, P. Panzade, A. C. Paiva-Santos, P. Sonwane, M. Madibone, P. Choundhe, P. Giram, S. Cavalu, *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3899.
- [11] L. A. Mercante, A. Pavinatto, T. S. Pereira, F. L. Migliorini, D. M. dos Santos, D. S. Correa, *Sens. Actuators Rep.* **2021**, *3*, 100048.
- [12] S. Jin, J. Li, J. Wang, J. Jiang, Y. Zuo, Y. Li, F. Yang, *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 4591.
- [13] S. Abid, T. Hussain, A. Nazir, A. Zahir, S. Ramakrishna, M. Hameed, N. Khenoussi, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *135*, 1222.
- [14] A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, N. Radacsi, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *12*, e1626.
- [15] A. M. Al-Enizi, M. M. Zagho, A. A. Elzatahry, *Nanomaterials* **2018**, *8*, 259.
- [16] K. Ghosal, C. Agatemor, Z. Špitálský, S. Thomas, E. Kny, *Chem. Eng. J.* **2019**, *358*, 1262.
- [17] G. S. Liu, X. Yan, F. F. Yan, F. X. Chen, L. Y. Hao, S. J. Chen, T. Lou, X. Ning, Y. Z. Long, *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 309.
- [18] O. M. Ionescu, A. Mignon, A. T. Iacob, N. Simionescu, L. G. Confederat, C. Tuchilus, L. Profire, *Polymers* **2021**, *13*, 1291.
- [19] O. M. Ionescu, A. T. Iacob, A. Mignon, S. Van Vlierberghe, M. Baican, M. Danu, C. Ibănescu, N. Simionescu, L. Profire, *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 996.
- [20] V. P. Nirwan, E. Filova, A. Al-Kattan, A. V. Kabashin, A. Fahmi, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 519.
- [21] A. D. Salle, G. Viscusi, F. D. Cristo, A. Valentino, G. Gorrasi, E. Lamberti, V. Vittoria, A. Calarco, G. Peluso, *Molecules* **2021**, *26*, 4866.
- [22] A. F. De Faria, F. Perreault, E. Shaulsky, L. H. Arias Chavez, M. Elimelech, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 12751.
- [23] P. Pascariu, C. Cojocar, A. Airinei, N. Olaru, I. Rosca, E. Koudoumas, M. P. Suche, *Catalysts* **2021**, *11*, 1234.
- [24] L. Cai, L. Zhang, J. Yang, X. Zhu, W. Wei, M. Ji, H. Jiang, J. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15*, 48978.
- [25] L. Cai, X. Zhu, H. Ruan, J. Yang, W. Wei, Y. Wu, L. Zhou, H. Jiang, M. Ji, J. Chen, *J. Hazard. Mater.* **2023**, *42*, 131290.
- [26] L. J. Villarreal-Gómez, G. L. Pérez-González, N. Bogdanchikova, A. Pestryakov, V. Nimaev, A. Soloveva, J. M. Cornejo-Bravo, Y. Toledano-Magaña, *J. Nanomater.* **2021**, *2021*, 9920755.
- [27] C. E. Peña-González, E. Pedziwiatr-Werbicka, T. Martín-Pérez, E. M. Szweczyk, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, J. Pérez-Serrano, R. Gómez, M. Bryszewska, J. Sánchez-Nieves, F. J. de la Mata, *Int. J. Pharm.* **2017**, *528*, 55.
- [28] N. Rabiee, S. Ahmadi, O. Akhavan, R. Luque, *Materials* **2022**, *15*, 1799.
- [29] X. Gu, Z. Xu, L. Gu, H. Xu, F. Han, B. Chen, X. Pan, *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 167.
- [30] S. Shama, N. Zafar, S. Riaz, R. Sharif, J. Nazir, S. Naseem, *Nanomaterials* **2016**, *6*, 71.
- [31] K. Ciepluch, K. Skrzyniarz, J. Zdańska, A. Barrios-Gumiel, J. Sánchez-Nieves, F. J. de la Mata, B. Maciejewska, Z. Drulis-Kawa, M. Bryszewska, M. Arabski, *J. Mol. Liq.* **2020**, *319*, 114339.
- [32] K. Ciepluch, K. Skrzyniarz, A. Barrios-gumiel, S. Quintana, J. Sánchez-nieves, F. J. D. Mata, B. Maciejewska, Z. Drulis-kawa, M. Arabski, *Front. microbiol.* **2019**, *10*, 2271.
- [33] K. Skrzyniarz, J. Sanchez-Nieves, F. J. de la Mata, M. Łyseck-Gładysinska, K. Lach, K. Ciepluch, *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *237*, 124239.
- [34] E. Fuentes-Paniagua, C. E. Peña-González, M. Galán, R. Gómez, F. J. De La Mata, J. Sánchez-Nieves, *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- [35] V. P. Nirwan, M. Lasak, K. Ciepluch, A. Fahmi, *Nanomaterials* **2023**, *13*, 630.
- [36] G. W. Lau, D. J. Hassett, H. Ran, F. Kong, *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 599.
- [37] C. Cleeton, A. Keirouz, X. Chen, N. Radacsi, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 4183.
- [38] M. Khodadadi, S. Alijani, M. Montazeri, N. Esmaeilzadeh, S. Sadeghi-Soureh, Y. Pilehvar-Soltanahmadi, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2020**, *108*, 1444.
- [39] R. Contreras-Cáceres, L. Cabeza, G. Perazzoli, A. Díaz, J. M. López-Romero, C. Melguizo, J. Prados, *Nanomaterials* **2019**, *9*, 656.
- [40] P. P. Mehta, V. S. Pawar, *Electrospun Nanofiber Scaffolds: Technology and Applications*, Elsevier Inc., Amsterdam, the Netherlands **2018**.

- [41] Y. Zare, *Composites, Part A* **2016**, *84*, 158.
- [42] K. Naveen Kumar, K. Sivaiah, S. Buddhudu, *J. Lumin.* **2014**, *147*, 316.
- [43] S. Selvasekarapandian, R. Baskaran, O. Kamishima, J. Kawamura, T. Hattori, *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *65*, 1234.
- [44] M. K. Abyaneh, D. Paramanik, S. Varma, S. W. Gosavi, S. K. Kulkarni, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2007**, *40*, 3771.
- [45] M. Behera, S. E. Ram, *Int. Nano Lett.* **2013**, *3*, 17.
- [46] K. K. Kumar, M. Ravi, Y. Pavani, S. Bhavani, A. K. Sharma, V. V. R. Narasimha Rao, *J. Non-Cryst. Solids* **2012**, *358*, 3205.
- [47] X. G. Li, I. Kresse, J. Springer, J. Nissen, Y. L. Yang, *Polymer* **2001**, *42*, 6859.
- [48] M. A. F. Basha, *Polym. J.* **2010**, *42*, 728.
- [49] C. Egbuna, V. K. Parmar, J. Jeevanandam, S. M. Ezzat, K. C. Patrick-Iwuanyanwu, C. O. Adetunji, J. Khan, E. N. Onyeike, C. Z. Uche, M. Akram, M. S. Ibrahim, N. M. El Mahdy, C. G. Awuchi, K. Saravanan, H. Tijjani, U. E. Odoh, M. Messaoudi, J. C. Ifemeje, M. C. Olisah, N. J. Ezeofor, C. J. Chikwendu, C. G. Ibeabuchi, *J. Toxicol.* **2021**, *21*, 2021.
- [50] V. Valdiglesias, *Nanomaterials* **2022**, *12*, 12.
- [51] R. Podgórski, M. Wojasiński, T. Ciach, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9047.
- [52] S. Qin, W. Xiao, C. Zhou, Q. Pu, X. Deng, L. Lan, H. Liang, X. Song, M. Wu, *Signal Transduction Targeted Ther.* **2022**, *7*, 199.
- [53] Y. Ben-David, E. Zlotnik, I. Zander, G. Yerushalmi, S. Shoshani, E. Banin, *Microbiol. Res.* **2018**, *206*, 91.
- [54] K. Ciepluch, K. Skrzyniarz, A. Barrios-Gumiel, S. Quintana, J. Sánchez-Nieves, F. J. de la Mata, B. Maciejewska, Z. Drulis-Kawa, M. Arabski, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02771>.
- [55] M. V. Plikus, X. Wang, S. Sinha, E. Forte, S. M. Thompson, E. L. Herzog, R. R. Driskell, N. Rosenthal, J. Biernaskie, V. Horsley, *Cell* **2021**, *184*, 3852.
- [56] D. Smela, C. J. Chang, L. Hromadko, J. Macak, Z. Bilkova, A. Taniguchi, *Molecules* **2022**, *27*, 4456.
- [57] R. F. Hamilton, N. Wu, D. Porter, M. Buford, M. Wolfarth, A. Holian, *Part. Fibre Toxicol.* **2009**, *6*, 35.
- [58] A. Schinwald, F. A. Murphy, A. Prina-Mello, C. A. Poland, F. Byrne, D. Movia, J. R. Glass, J. C. Dickerson, D. A. Schultz, C. E. Jeffree, W. Macnee, K. Donaldson, *Toxicol. Sci.* **2012**, *128*, 461.
- [59] R. F. Bonan, M. F. Mota, R. M. da Costa Farias, S. D. da Silva, P. R. F. Bonan, L. Diesel, R. R. Menezes, D. E. da Cruz Perez, *Mater. Sci. Eng., C* **2019**, *104*, 109876.

# Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against *Pseudomonas aeruginosa*

Magdalena Lasak<sup>1,\*</sup>, Małgorzata Łysek-Gładysińska<sup>1</sup>, Karolina Lach<sup>1</sup>, Viraj P Nirwan<sup>2</sup>, Dorota Kuc-Ciepluch<sup>3</sup>, Javier Sanchez-Nieves<sup>4-6</sup>, Francisco Javier de la Mata<sup>4-6</sup>, Amir Fahmi<sup>2</sup>, Karol Ciepluch<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Biology, Jan Kochanowski University in Kielce, Kielce, Poland; <sup>2</sup>Faculty of Technology and Bionics, Rhine-Waal University of Applied Science, Kleve, Germany; <sup>3</sup>Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medical Sciences and Health Sciences, Casimir Pulaski University of Radom, Radom, Poland; <sup>4</sup>Department of Organic and Inorganic Chemistry, Research Institute in Chemistry "Andrés M. del Río" (IQAR), University of Alcalá (UAH), Alcalá de Henares, Spain; <sup>5</sup>Networking Research Center for Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain; <sup>6</sup>Ramón y Cajal Institute of Health Research, (IRYCIS), Madrid, Spain

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence: Karol Ciepluch, Division of Medical Biology, Jan Kochanowski University in Kielce, Uniwersytecka Street 7, Kielce, 25-640, Poland, Email karol.ciepluch@ujk.edu.pl

**Purpose:** As bacterial resistance to antibiotics increases, there is an urgent need to identify alternative antibacterial agents and improve antibacterial materials. One is the controlled transport of antibacterial agents that prevents infection with drug-resistant bacteria, especially in the treatment of wounds.

**Methods:** This work presents the use of electrospun PLCL/PVP (poly(L-lactide-co-ε-caprolactone/polyvinylpyrrolidone) with two agents with antibacterial properties but with different mechanisms of action, that is, dendritic silver nanoparticles (Dend-AgNPs) and endolysin.

**Results:** The nanomat prepared in this manner showed antibacterial activity against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, inhibiting their growth and production of key pigments and virulence factors. Moreover, the use of as carriers of the selected factors reduced their cytotoxicity towards human

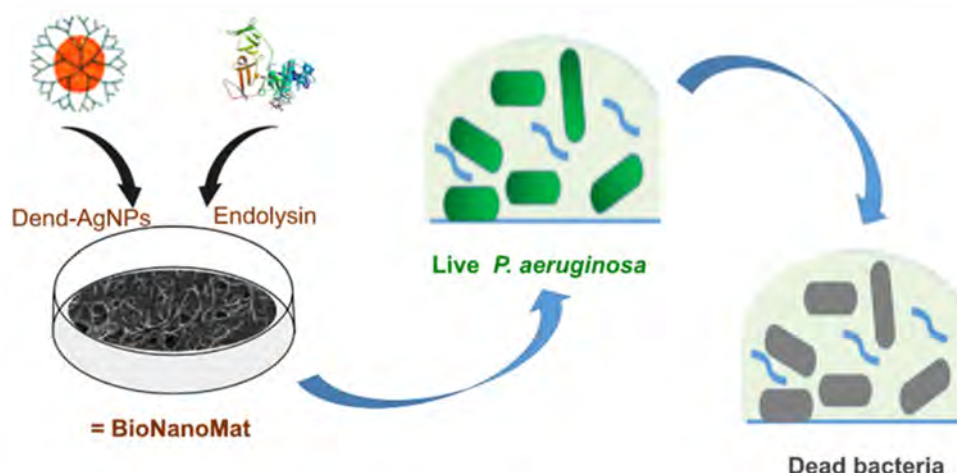
**Conclusion:** The results the possibility of using the presented product as an innovative dressing material, opening new perspectives for the treatment of wounds and combating bacterial infections with drug-resistant bacteria.

**Keywords:** dendritic nanoparticles, endolysin, antibacterial agents

## Introduction

Effective platforms for antimicrobial agents based on nanomaterials should be characterized by special physicochemical properties that allow easy functionalization and immobilization for the transport of compounds with a different spectrum of activities. This type of platform allows better therapeutic effectiveness and biodistribution of drug.<sup>1-4</sup> Among the most popular nanomaterials, both natural and synthetic nanomaterials exhibit unique physicochemical and biological properties.<sup>4-8</sup> Synthetic nanomaterials have properties similar to those of natural polymers, but are more popular owing to their satisfactory strength and , as well as low cytotoxicity and biodegradability. One method for obtaining synthetic nanomaterials with the previously presented properties is electrospinning.<sup>4,8-11</sup> Nanomats based on electrospun with a biodegradable and biocompatible poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) copolymer have been widely used in the creation of engineering materials in bionanotechnology and medicine, for example, in regenerative medicine, tissue formation, and antimicrobial properties.<sup>5,6,12,13</sup> Appropriate functionalization with therapeutic agents, such as antibacterial agents, anti-agents, anesthetics, growth factors, and antioxidants, alleviates discomfort, while ensuring appropriate

## Graphical Abstract



conditions for wound healing. However, in addition to the aforementioned features, additional aspects must be considered during the wound healing process. First, the material must be nontoxic, nonimmunogenic, biocompatible, and appropriately conform to the location of its application.<sup>14,15</sup> These aspects are important because open wounds create favorable conditions for the development of pathogens that can infect wounds, impede the healing process, and attack nearby healthy tissues. Thus, incorporation of antimicrobial agents into electrospun nanofibers is an attractive strategy for designing ideal materials to reduce pathogen colonization and promote wound healing. Loading just one type of antimicrobial into a nanofibers does not always provide the expected antimicrobial activity, especially when it comes to fighting drug-resistant bacteria such as gram-negative bacteria. Therefore, combinations of agents in the form of antibacterial complexes are often used to enhance antibacterial effect.<sup>16–19</sup> This is especially important in third-world countries, where the risk of infection with resistant bacteria is high and results from poorly developed healthcare systems. In many cases, wound formation or surgery often leads to bacterial infections. Undoubtedly, one of the main pressures for the production of nanomaterials with unique antibacterial properties is increasing bacterial resistance to antibiotics.<sup>20–22</sup> This can be achieved by selecting antibacterial agents with different properties, which together provide a synergistic effect and allow the defeat of drug-resistant bacteria, which, according to the WHO, are responsible for almost five million deaths each year. Therefore, the selection of appropriate ingredients for a antimicrobial nanomaterial is crucial. Among the large libraries of potential agents, metal nanoparticles and antibacterial proteins are worthy of attention.

Dendritic metal NPS, such as silver nanoparticles (AgNPs) decorated with dendrimers or dendrons, in addition to the well-known properties of silver, also support positive charges on the surface of NPs owing to the presence of cationic dendritic systems. This combination facilitates their interaction with the negatively charged outer membrane of bacteria and the many proteins located on their surface.<sup>23–25</sup> The mechanism of action of AgNPs usually involves the production of reactive oxygen species (ROS) that affect the outer bacterial membrane (increase permeability, cause lipid peroxidation), damage the bacterial cell wall, and can bind or inhibit enzymes. Additionally, reactions with the thiol groups of cysteine and phosphorus compounds influence the processes of bacterial respiration and replication.<sup>9,10</sup> Additional destabilization of the membrane is caused by reactive functional groups, particularly the positively charged amino groups of the dendronized NPs.<sup>23</sup> Thus, they can often create a path for antibacterial proteins to digest bacterial peptidoglycans located between the outer and inner membranes of gram-negative bacteria.<sup>25</sup>

Antimicrobial proteins (AMPs), which include lysines (eg, lysozyme and endolysin), have enzymatic properties that involve the lysis of peptidoglycan components. In Gram-positive bacteria, the peptidoglycan layer is located on the outside, facilitating degradation by endolysin.<sup>26–28</sup> However, challenges arise for gram-negative bacteria because of their additional outer membrane, which hinders endolysin access. To address this limitation, dendritic metal NPs are often

combined with endolysins to form dual-acting complex.<sup>29,30</sup> In our previous study, we investigated the hybrid electrospun nanomat based on L-lactide-block- $\epsilon$ -caprolactone copolymer (PL-b-CL) mixed with polyvinylpyrrolidone (PVP) homopolymer loaded with AuNPs. Dendronized silver nanoparticles (Dend-AgNPs) were adsorbed onto the nanofibers and enhanced their antibacterial properties against *P. aeruginosa*. In addition to low cytotoxicity, it only slightly increased immunoreactivity without reducing the proliferation rate of fibroblasts.<sup>13</sup> However, the antibacterial effect against gram negative bacteria is required to be even better.

Therefore, loading the dendritic metal NP/lysin complex into a nanomaterial may lead to the creation of a nanomaterial with unique properties as a dressing aimed mainly at infections with gram-negative bacteria, which belong to the group of antibiotic-resistant bacteria. Additionally, attention should be paid to its low cytotoxicity towards skin cells, which accelerates wound healing.

For this purpose, we have developed electrospun nanofibers loaded with a dendronized AgNP/endolysin complex with triple action against the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which inhibits biofilm formation and inhibits the growth and destruction of planktonic bacteria. Moreover, the cytotoxic properties of the developed nanomat were tested to assess its potential use as an innovative dressing material.

## Materials and Methods

### Synthesis of Electrospun Nanofibers

The nanofibers were fabricated as previously described in Lasak et al, 2024.<sup>13</sup> Copolymer of L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone (PLCL) was obtained from Purasorb, Corbion, Netherlands. Whereas PVP ( $M_w$  250) and analytical grade chloroform used to dissolve polymers were purchased from Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany. For preparing an electrospinnable solution, 17% w/v PLCL polymer was dissolved in chloroform. To this solution, 0.21g PVP was added to improve the electrospinnability of the solution. The solution was transferred to a 5mL syringe and placed on the programmable pump with a flow rate of  $0.8\text{ mL hr}^{-1}$ . At the spinneret end a metal capillary (0.8mm inner diameter) was connected via a PTFE tube for transferring the solution from the syringe. The metal capillary was charged with +12kV leading to the formation of Taylor's cone, and eventually, a jet could be observed moving towards the collector connected to a negative potential of -4kV. The electrospinning was performed in a closed climate-controlled chamber with an average temperature of  $16^\circ\text{C}$  and relative humidity of 85%. The fibers were peeled from the collector for further analysis and application.

### Dendronized Silver Nanoparticles (Dend-AgNPs)

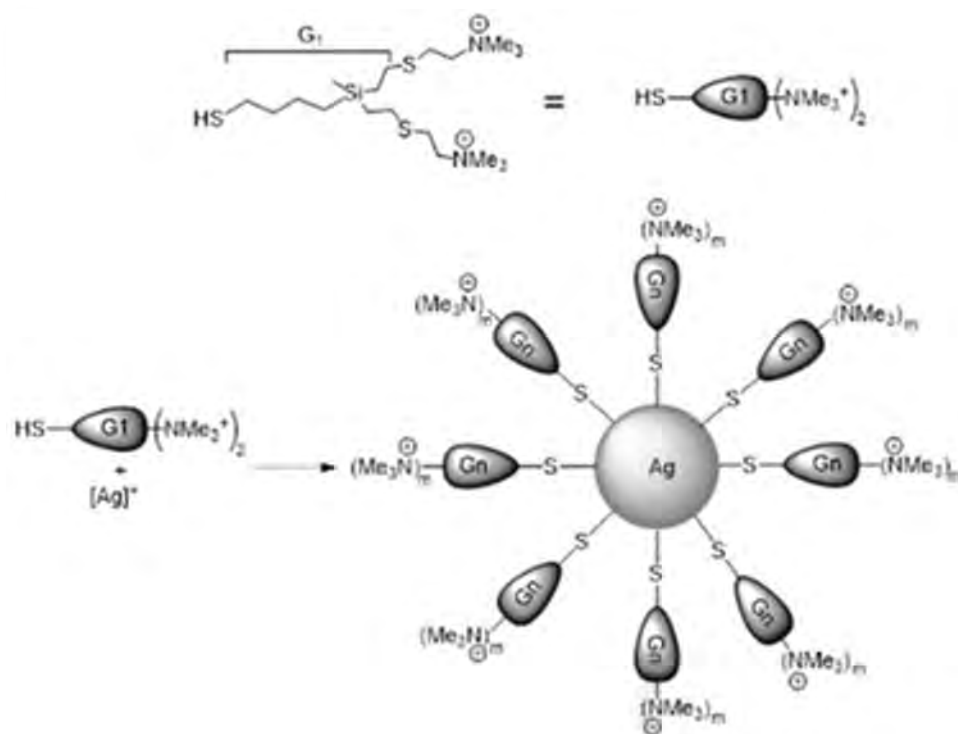
Dend-AgNPs were prepared as previously described elsewhere<sup>24</sup> (Figure 1). Dendronized AgNPs were formed in water by the reaction of  $\text{AgNO}_3$ , a small cationic carbosilane dendron,  $\text{HSG1}(\text{S-NMe}^+)_2$ ,<sup>31</sup> and  $\text{NaBH}_4$ , which acted as the reducing agent. The Ag/dendron/ $\text{NaBH}_4$  ratio was 1/1/5. The Dend-AgNPs were purified by dialysis (MWCO 10 K) for three days.

### Recombinant Endolysin

The recombinant CHAP endolysin fragment of the phage  $\hat{\text{I}}812$  catalytic domain was purchased from Protean, Czech Republic.

### Morphology of Nanofibers

The morphologies of the unmodified and modified nanofibers were determined using scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-7100F, Belgium) at an accelerating voltage of 15 kV. The samples were placed on carbon-coated 300 mesh copper grids, left to dry completely, coated with gold spray using a JEOL JFC 110E Fine Coat Ion Sputter, and analyzed by SEM. Dendronized silver nanoparticles at concentrations of  $1.6\text{ mg/mL}$  were placed on nanofiber discs in an amount of  $4\text{ }\mu\text{L}$  and left to dry for 15 minutes. Then, endolysin at a final concentration of  $3\text{ }\mu\text{g/mL}$  in a volume of  $1.2\text{ }\mu\text{L}$  was spotted on the dried disc with Dend-AgNPs and left to dry for 10 min. Subsequently, the discs were covered with gold using a JEOL JFC 110E Fine Coat Ion Sputter and analyzed using SEM.



**Figure 1** Reaction schemes of Dend-AgNP synthesis.

## Antimicrobial Assay and Measurement of Pyocyanin and Pyoverdin

The antimicrobial activity of the nanofiber alone and the complex with Dend-AgNPs+endolysin was carried out using wild-type *P. aeruginosa* PAO1 and evaluated spectrophotometrically using an optical density test (OD 600). The levels of the dyes produced by PAO1, pyocyanin, and pyoverdin were measured. The level of pyocyanin production was measured at a wavelength of 691 nm, whereas the level of pyoverdin production was measured by fluorescence using an Ex/Em wavelength of 405/460 nm. In addition, antimicrobial activity was measured in an exponentially growing culture of PAO1 using spectrometry at a wavelength of 600 nm. The effect was expressed as absorbance of the *P. aeruginosa* culture (optical density). A TECAN SPARK Magellan V2.2 STD spectrometer (Tecan Group Ltd., Switzerland) was used. Each measurement was performed after 24 h of incubation with the test compounds, and the results represent the percentage of the control. The experiment was repeated three times.

## Morphology of Bacteria Cells Incubated with Nanofibers by SEM Microscopy

Morphology of wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 after nanofiber (NF) (area  $\approx 0.3 \text{ cm}^2$ ) unmodified and modified, with NPs (Dend-AgNPs), or endolysin, and NPs complex (DendAgNPs+endolysin) was verified by Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM-7100F, Belgium) at 15 kV accelerating voltage. Bacteria was centrifuge (9000 rpm, 3 min), washed twice in PBS, fixated in 3% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylic buffer for 1 h, washed twice in 0.1 M cacodylic buffer, pre-fixated in 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M cacodylic buffer for 60 min, washed twice in 0.1 M cacodylic buffer, dehydrated in increasing ethanol concentration (50, 60, 70, 80, 90, 99.9%) for 10 min each, incubated in solution of ethanol and propylene oxide 1:1 for 15 min, and suspended in pure propylene oxide. The samples were placed on carbon-coated 300 – mesh copper grids, left to dry completely, covered with gold using a JEOL JFC 110E Fine Coat Ion Sputter, and analyzed by SEM.

## Bacteria LIVE/DEATH Assay

The bacterial viability under the conditions presented above was examined by fluorescence microscopy using a LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, ThermoFisher). Dead bacteria and those with damaged membranes

were stained red with propidium iodide, whereas living cells were stained green with SYTO 9. Experiments were conducted in accordance with the manufacturer's recommendations. *P. aeruginosa* PAO1 was used in this experiment. A different combination of unmodified and modified NPs, Endolysin, was placed in a 96-well plate along with the bacterial suspension. The experiments were performed in triplicates. Viability was examined in an exponentially growing PAO1 culture after 24 h of incubation. The dyes were mixed in a 1:1 ratio. After 24 h, the nanofibers were removed from the well and the entire liquid was poured into suitable Eppendorf tubes. The liquid was centrifuged (9000 rpm/ 10 min) and the supernatant was removed and washed twice with 0.85% NaCl. Finally, the pellet was resuspended in 0.85% NaCl, the dye mixture was added and incubated for 15 min in the dark. The solution was applied to a base slide, covered with a coverslip, and then observed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Scope.A1) and ZEN microscopic analysis program using filters (green set 44: excitation BP 475/40, FT 500, emission BP 530/50; red set 20: excitation BP 546/12, FT 560, emission BP 575–640).

## Biofilm Inhibition Assay

Inhibition of *P. aeruginosa* biofilms was assessed using a crystal violet (CV) assay. This method quantifies the total biofilm mass based on the binding ability of the CV dye to extracellular polymeric substances (EPS) and both live and dead bacterial cells. The 24 h biofilms were gently washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) to remove unbound bacteria. PBS was removed, and the biofilms were left to dry. Next, the biofilms were stained for 15 min with 0.1% crystal violet solution and then washed three times with PBS to remove the excess dye. Next, CV was dissolved in 99.9% ethanol. After 15 min of incubation, the solution was transferred to a new 96-well plate, and the absorbance at 570 nm was measured using a TECAN SPARK Magellan V2.2 STD spectrometer (Tecan Group Ltd., Switzerland). The optical density of the de-staining solution represents the biofilm mass.

## Cytotoxic Effects on Fibroblasts

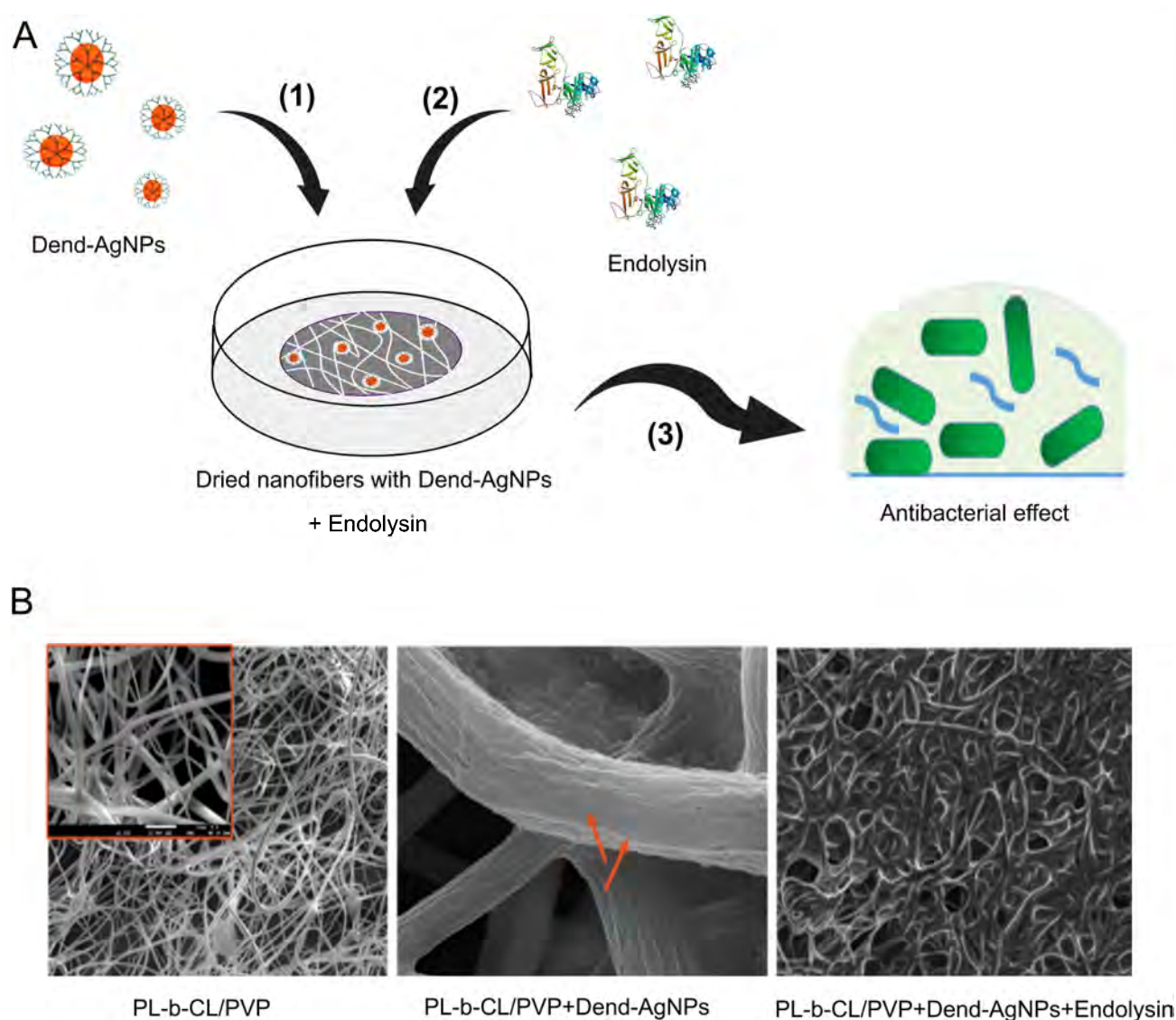
The human fibroblast cell line, VH10 (ATCC, Manassas, VA, USA; catalogue no. PCS-201-012) were maintained and cultured in medium (Fibroblast Growth medium, Cat no. 116–500, Cell Application, Inc). at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was changed every 2 days. The viability of fibroblast cells treated with nanofibers and/or dend-AgNPs was determined using an MTS assay. The fibroblasts were seeded in 96-well plates. After reaching the appropriate confluence, the cells were treated with NF, Dend-AgNPs, endolysin, NF+Dend-AgNPs, NF+endolysin, Dend-AgNPs+endolysin, and NF+Dend-AgNPs+endolysin for 24 h. The MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric) (Abcam) was used according to the manufacturer's recommendations, and absorbance at 490 nm was measured using a TECAN SPARK Magellan V2.2 STD spectrometer (Tecan Group Ltd., Switzerland).

## Results and Discussion

### Preparation and Physicochemical Characterization of Nanofibers Loaded with Dend-Ag NPs and Endolysin

In the first stage, previously prepared UV-sterilized nanofibers were used to load dendronized silver nanoparticles (Dend-Ag NPs) and endolysin. Dend-Ag NPs were loaded into the nanofibers at a volume of approximately 4 µL at a concentration of 1.6 mg/mL. This resulted in a final concentration of approximately 32 µg/mL after the placement of nanofibers in 200 µL of the biological medium. The modified nanofibers were left to dry and the solvent containing the nanoparticles was evaporated. The nanofibers had a burgundy color. Next, 4 µL endolysin was added to the nanofibers. This step led to a concentration of 5 µg/mL in 200 µL of biological medium (Figure 2A). After a few minutes, the NanoMat was used for the experiments.

Figure 2B shows the SEM images of the PLCL/PVP nanofiber structure alone (left), with Dend-AgNPs (middle), and with Dend-AgNP-endolysin modification (right). The addition of the dendronized nanoparticles did not change the morphology of the nanofibers; however, some lumps resulting from the attached nanoparticles were visible. An interesting photograph was obtained after the addition of endolysin. The morphology of the nanofibers changed. It was easy to observe the “film” of endolysin on nanofibers. This may be due to attractive interactions between the

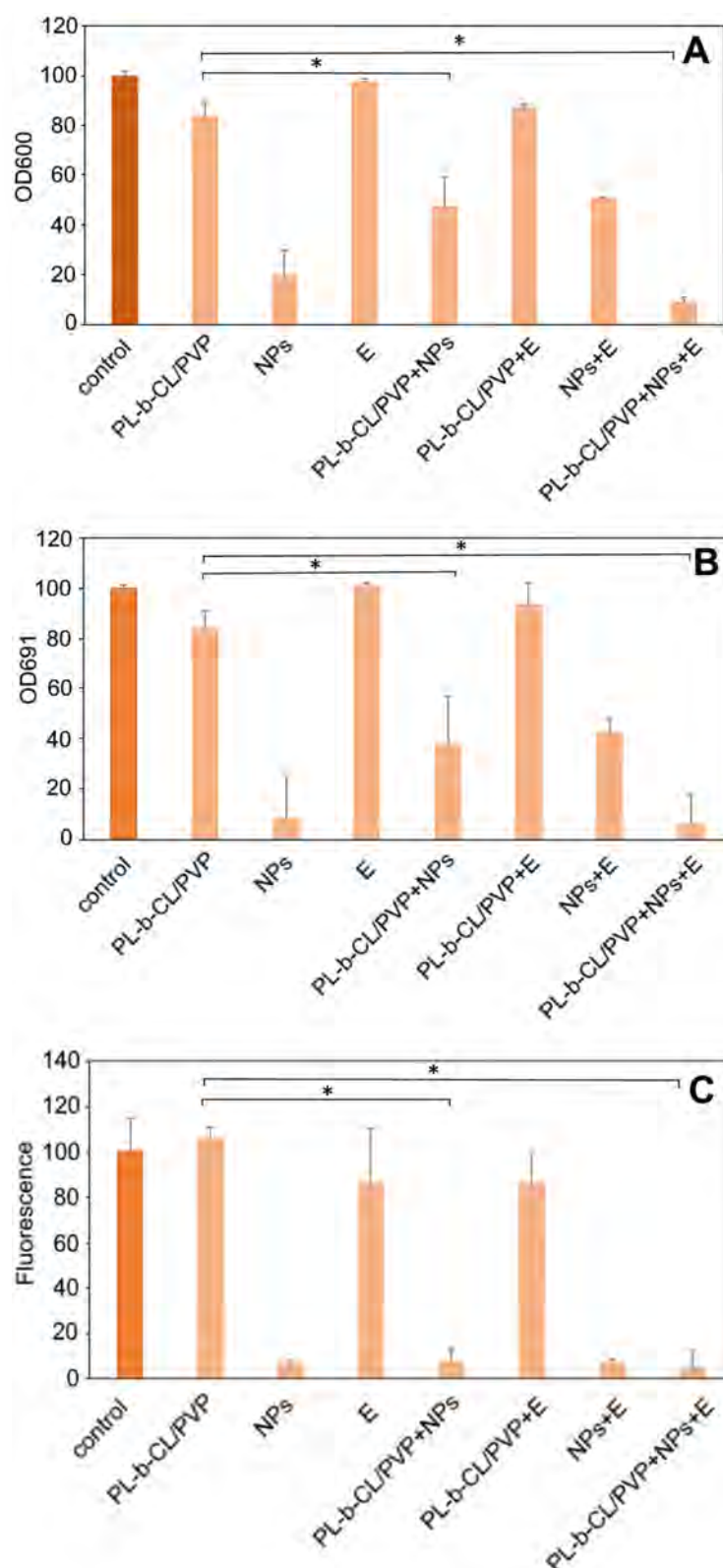


**Figure 2** Schematic presentation of preparing nanofibers (A). Preparation and condition of experiment in text. (B) SEM photos of unmodified nanofibers (PLCL/PVP) (left), nanofibers modified with dendronized silver nanoparticles (PLCL/PVP + Dend-AgNPs) (middle) and nanofibers modified with dendronized silver nanoparticles and endolysin (PLCL/PVP + Dend-AgNPs + Endolysin) (right).

attached nanoparticles and proteins, forming an additional scaffold between the electrospun nanofibers. However, this does not lead to visible deformation or shrinkage of the NanoMat. After placing NanoMat in a biological medium, the morphology of the nanofibers returned to its previous state because of the release of endolysin into the solvent.

### Antimicrobial Properties of Nanofibers Against *Pseudomonas aeruginosa*

The antibacterial properties of the nanofibers produced against the antibiotic-resistant gram-negative pathogen, *P. aeruginosa* PAO1, were tested. Figure 3A (OD 600) shows the inhibition of bacterial growth after 24-h treatment of with nanofibers. The PLCL/PVP nanofibers reduced slightly the growth of *P. aeruginosa* ~83% of control. Additional modification of the nanofibers with Dend-Ag NPs resulted higher inhibition of bacterial growth up to 47%. NF modification with endolysin slightly reduced bacterial growth to 87%. In addition, modification with both compounds (Dend-AgNPs and endolysin) resulted in the inhibition of bacterial growth to ~9% compared to the untreated control. In contrast, similar assays without NF showed that bacterial growth in the presence of Dend-AgNPs alone was inhibited by 13%, in the presence of endolysin, no significant effect on bacterial growth, and The simultaneous presence of Dend-



**Figure 3** The optical density of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI measured at 600 nm without and in the presence of unmodified and modified nanofibers, Dend-AgNPs, Endolysin and Dend-AgNPs + Endolysin after 24h incubation (A). Pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI measured at 691 nm without and in the presence of unmodified and modified nanofibers, Dend-AgNPs, Endolysin and Dend-AgNPs + Endolysin after 24h incubation (B). Pyoverdine production of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI without and in the presence of unmodified and modified nanofibers, Dend-AgNPs, Endolysin and Dend-AgNPs + Endolysin after 24h incubation (C). Untreated cells were used as control. \*  $p < 0.05$  (PL-b-CL/PVP+NPs+E versus PL-b-CL/PVP) and (PL-b-CL/PVP+NPs versus PL-b-CL/PVP).

AgNPs and endolysin inhibited bacterial growth to 50%. Clearly, the combination of Dend-AgNPs and endolysin was the most active system when incorporated into the nanofibers.

Next, the production of two key pigments and virulence factors produced by *P. aeruginosa* - pyocyanin (Figure 3B) and pyoverdine (Figure 3C) were checked. The reduction in these factors indicated the blocking of important metabolic pathways in *P. aeruginosa*.<sup>32–34</sup> The presence of unmodified nanofibers reduced pyocyanin production to a level of 84%, whereas with modification of Dend-AgNPs, production dropped to ~38%, and modification with endolysin showed no significant effect on pigment production. However, nanofiber modification with dend-AgNPs and endolysin resulted in a decrease in production to 6%. It should be noted, the presence of the dendrimer alone caused a drop in production to 8%, whereas the presence of endolysin alone had no effect on pyocyanin production.

In contrast, the presence of nanofibers did not affect the pyoverdine production (Figure 3C). In contrast, modification of nanofibers with Dend-Ag NPs caused a significant decrease in the production of the dye, up to 6%), modification with endolysin caused a slight decrease to 86%, and modification with both compounds caused a decrease in the production of pyoverdine to 5%. It should also be noted that the presence of nanoparticles alone caused a decrease in pyoverdine to 6%, in the presence of endolysin alone, it was preserved at 86%, and in the presence of both compounds, the level was at 7%. Considering the above observations, we found that the Dend-AgNP/endolysin complex is responsible for a significant reduction in the bacterial growth and production of key pigments by *P. aeruginosa*, such as pyocyanin and pyoverdine. This suggests an additional mechanism of direct destruction of the bacterial outer membrane and cell wall in addition to inhibiting certain metabolic processes in cells that lead to reduced bacterial growth, which reduces their ability to maintain infection and promotes the inflammatory process, thus confirming antibacterial properties.<sup>10,13,35</sup>

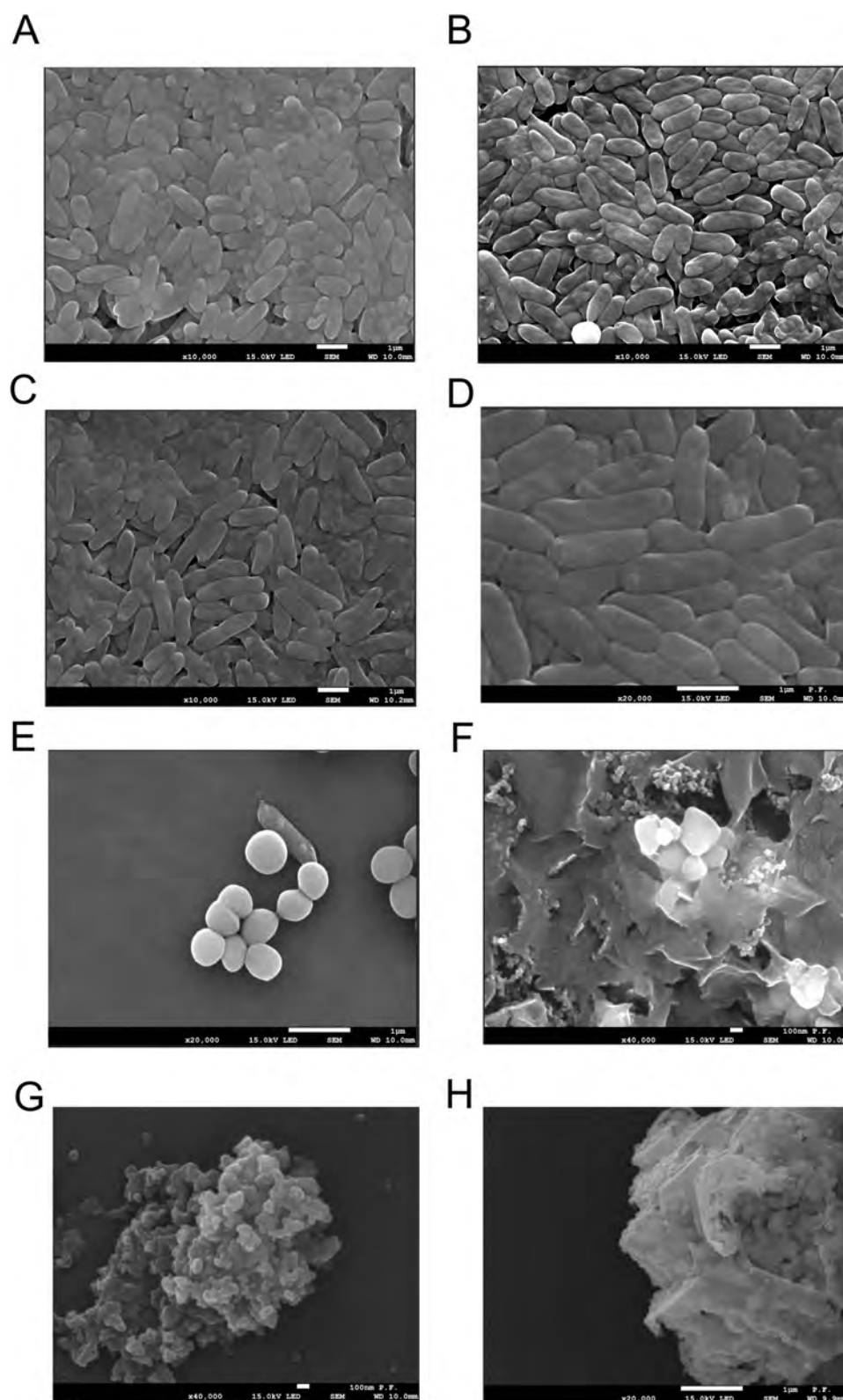
Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe bacterial morphology after incubation with NanoMat (Figure 4).

The morphology of the bacterial cells remained intact and a normal structure was observed. In contrast, image E (bacteria treated with Dend-AgNPs alone) shows shrunk round bacterial cells. No bacteria-like shape was observed in photographs F (bacteria treated with nanofibers and nanoparticles), G (bacteria treated with nanofibers and endolysin), and H (bacteria treated with completed NanoMat), which may indicate the complete destruction of cells and the presence of debris Dend-AgNPs. Dendronized AgNPs alone, in complex with endolysin, and modified Dend-AgNPs+endolysin nanofibers inhibited bacterial growth by altering their cell wall morphology. The interaction of these complexes with bacterial cells causes leakage of the cell wall, release of cellular components, and production of ROS.<sup>36</sup> These actions are responsible for the inhibition of bacterial growth. In general, the toxicity of NPs to bacteria is due to loss of cellular integrity, cell wall disruption or physical damage.<sup>36–38</sup>

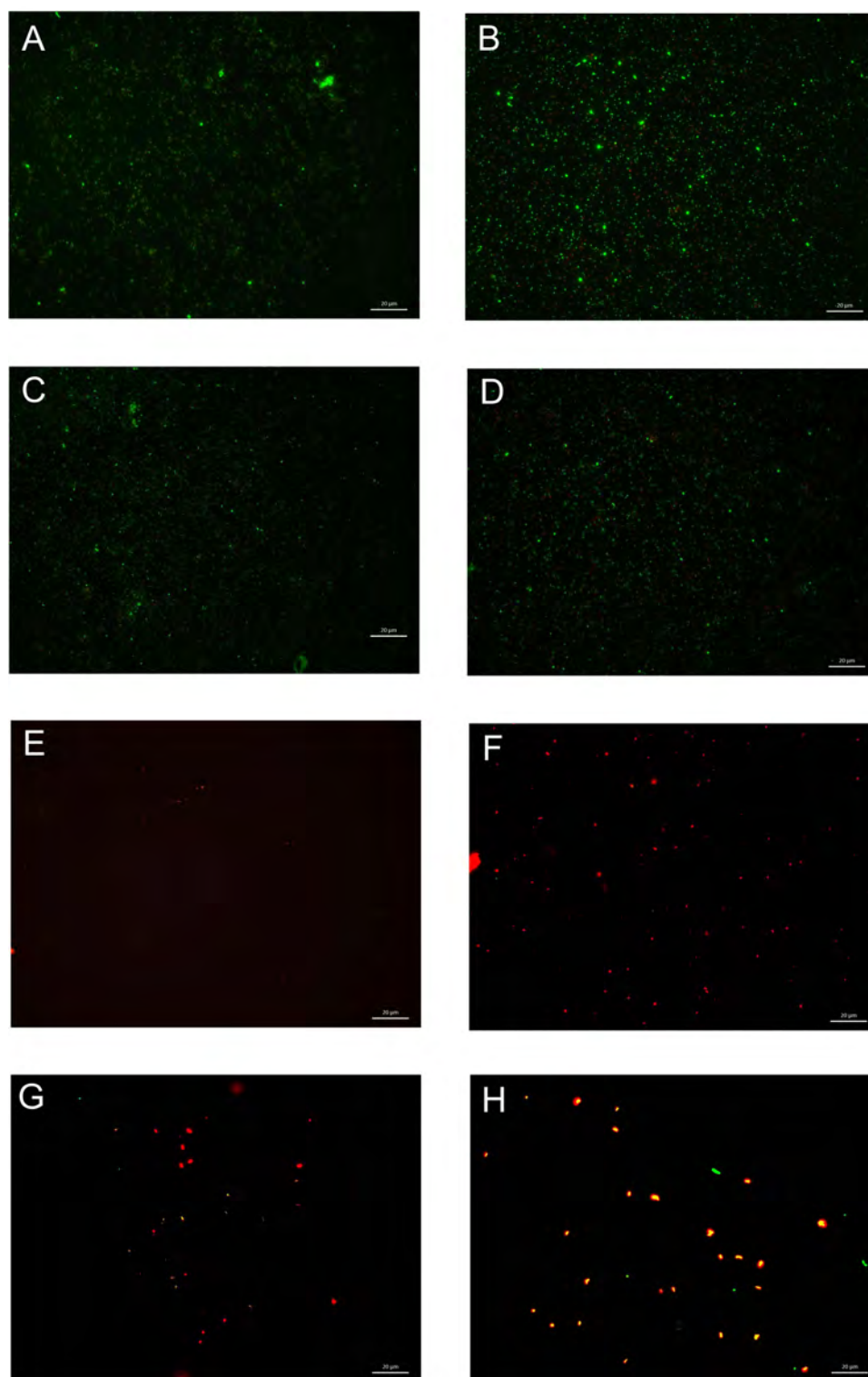
To confirm the reduced viability of bacteria due to nanofibers, a LIVE/DEAD assay was performed (Figure 5). Figure 5A shows images of bacteria treated with unmodified and modified nanofibers obtained using fluorescence microscopy (LIVE/DEAD assay). Figure 5A shows the untreated bacteria used as a control. Figure 5B shows living bacteria in the presence of the unmodified nanofibers. A similar effect was observed for bacteria in the presence of endolysin (Figure 5C) and in nanofibers with endolysin (Figure 5D). Figure 5E, on the other hand, shows bacteria in the presence of Dend-AgNPs: no visible green living bacteria; only red dots suggesting dead bacteria are present. A similar image was obtained for nanofibers modified with Dend-Ag NPs (Figure 5F), Dend-AgNPs complexed with endolysin (Figure 5G), and nanofibers modified with both compounds (Dend-AgNPs+endolysin) (Figure 5H). The nanofibers modified with the Dend-Ag NP-endolysin complex showed a significant reduction in the number of living cells and a concomitant increase in the number of dead cells, indicating strong antimicrobial synergy.

All the above methods definitively indicate the great antimicrobial effect of the Dend-Ag NP/endolysin complex that is not embedded in the nanofibers. Moreover, the obtained results suggest that the pristine NFs have no significant antibacterial effect.

Previous tests were performed to evaluate antimicrobial activity against planktonic bacteria. However, it must be note that *P. aeruginosa* can create a biofilm. A bacterial biofilm is a complex structure of microorganisms embedded in the extracellular matrix that provides protection and promotes survival under adverse conditions, such as the presence of antibiotics or the immune system. Biofilms often found in wounds contribute to their chronicity, impeding healing and increasing the risk of infection.<sup>39,40</sup>



**Figure 4** The SEM picture presents the morphology of bacteria cell untreated (A), treated nanofiber NF (B), endolysin (C), NF+endolysin (D), Dend-AgNPs (E), NF+Dend-AgNPs (F), Dend-AgNPs+endolysin (G) and NF+Dend-AgNPs+endolysin complex (H). The scale bar is 1  $\mu$ m.

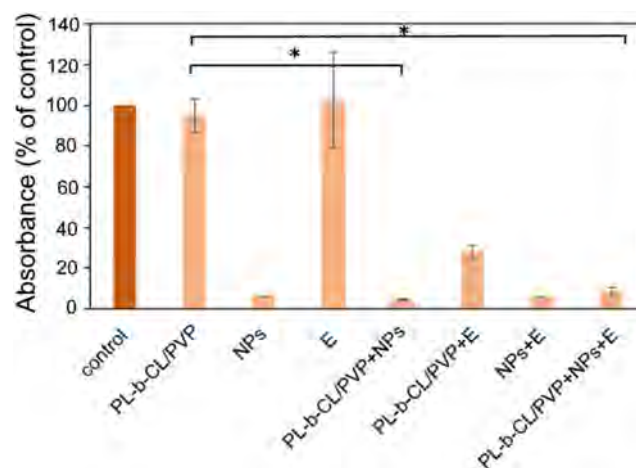


**Figure 5** LIVE/DEAD staining results. Untreated bacterial culture was used as control (A), after 24h treatment with unmodified nanofiber NF (B), with endolysin (C), with modified NF with endolysin (D), with Dend-AgNPs (E), with modified NF with Dend-AgNPs (F), with Dend-AgNPs+endolysin (G) and modified NF with Dend-AgNPs +endolysin complex (H). The scale bar is 20 μm.

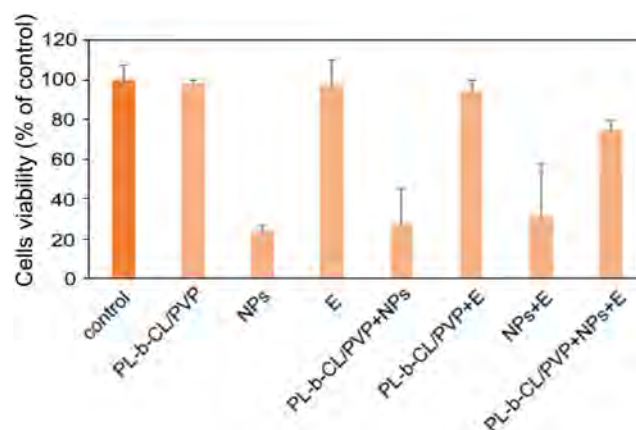
The inhibition of biofilm formation by *P. aeruginosa* PAO1 with the different nanomaterials described here is shown in Figure 6. However, nanofibers and endolysin alone did not inhibit bacterial biofilm formation. However, modification of the nanofiber with Dend-AgNPs significantly inhibited biofilm formation to 4.5%, with endolysin to 28%, while modification with both Dend-AgNPs/endolysin complexes inhibited biofilm formation to ~9%. It is worth noting that the presence of the endolysin complex and Dend-AgNPs inhibited biofilm formation to a level of 5%. In addition to directly damaging cells and limiting their growth, the suggested mechanism to explain the reduction in biofilm formation is the binding of silver ions to cysteine residues present in several enzymes associated with exopolysaccharide metabolism, which in turn may decrease or inhibit bacterial adhesion to the matrix or disrupt quorum sensing. Additionally, exopolysaccharide as the main component of the EPS matrix is mainly negatively charged, which facilitates the attachment of positively charged nanoparticles.<sup>41,42</sup>

## Cytotoxicity of NanoMat

Nanomaterials used in wound healing must possess antimicrobial properties; however, additional aspects, including cytotoxicity to the skin tissue, must be considered. Therefore, the viability and proliferation capacity of fibroblast cells in the presence of unmodified nanofibers and nanofibers modified with silver dendrimers and endolysins have been studied. The results of the MTS (Figure 7) test indicated a low cytotoxic effect of the unmodified nanofibers (~98% of viability) and endolysin alone (~98%). In contrast, the presence of Dend-Ag NPs showed ~24% survival of VH10 cells. Cell



**Figure 6** The inhibition of biofilm formation was measured as crystal violet absorbance without and with the presence of unmodified and modified nanofibers with Dend-AgNPs and/or endolysin after 24 h incubation. \*  $p < 0.05$  (PL-b-CL/PVP+NPs+E versus PL-b-CL/PVP) and (PL-b-CL/PVP+NPs versus PL-b-CL/PVP).



**Figure 7** The cells viability of VH10 cells treated with unmodified and modified PLCL/PVP nanofibers, Dend-AgNPs, Endolysin and Dend-AgNPs + Endolysin after 24h incubation. Untreated cells were used as control. Experiments were performed in triplicate and results are presented as a percentage of control.

**Table 1** Comparison of Antibacterial and Cytotoxic Properties

|                                      | <b>Bacteria Growth<br/>(Percentage of Control)</b> | <b>Inhibition of Biofilm Formation<br/>(Percentage of Control)</b> | <b>Fibroblast Cell Viability<br/>(Percentage of Control)</b> |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Nanofibers                           | 83%                                                | 92%                                                                | 98%                                                          |
| Dend-Ag NPs                          | 13%                                                | 10%                                                                | 24%                                                          |
| Endolysin                            | 100%                                               | 100%                                                               | 98%                                                          |
| Nanofibers + Dend-Ag NPs             | 47%                                                | <b>4.5%</b>                                                        | 26%                                                          |
| Nanofibers+ Endolysin                | 87%                                                | 28%                                                                | 92%                                                          |
| Dend-ag NPS + Endolysin              | 50%                                                | <b>5%</b>                                                          | 39%                                                          |
| Nanofibers + Dend-Ag Nps + Endolysin | <b>9%</b>                                          | <b>9%</b>                                                          | <b>74%</b>                                                   |

viability in the presence of nanofibers modified with Dend-AgNPs reduces viability to 26%. A similar effect was observed with the dend-AgNP/endolysin complex. Unexpectedly, nanofibers with nanoparticles and endolysin showed a low cytotoxic effect of 74% compared to the control. Taken together, these results indicate that the triple nanofiber Dend-Ag NP/endolysin nanomat not only exhibits strong antimicrobial activity, but also shows reduced cytotoxicity against human fibroblasts, making it a promising safe and effective medical application in wound therapy. A complex of nanoparticles with endolysin without nanofibers also shows excellent antimicrobial properties; however, it possesses relatively high cytotoxicity. It seems that nanofibers help cells to proliferate, and embedded NPs and endolysin into nanofibers led to slower release<sup>13</sup> and more effective killing of bacteria without a high cytotoxic effect.

## Conclusion

The present study highlights the significant potential of using PL-b-CL/PVP nanofibers enriched with dendritic silver nanoparticles (Dend-AgNPs) and the antibacterial protein endolysin as a modern approach to combat bacterial resistance in potent wound-healing bandages and reduce the risk of surgical site infection (Table 1). The nanofibers of PL-b-CL/PVP were modified with Dend-AgNPs/endolysin complex. In comparison with the nanomat without endolysin, the obtained antibacterial properties are much more visible. The presented material exhibited effective antimicrobial activity against wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteria, which are resistant to many antibiotics, effectively reducing their proliferation and production of pathogenically relevant pigments. The proposed mechanism of action is based on the damage of the outer bacterial membrane by dendritic silver nanoparticles and increasing the permeability to endolysin to digest peptidoglycan. Additionally, the use of these modified nanofibers as a support medium for dend-AgNPs significantly reduced their potential toxicity to human fibroblast cells, suggesting their potential safety in medical applications. These results underscore the prospects for using such a configured complex as a dressing material that not only counteracts infections, but also promotes tissue regeneration. A platform with such properties could be used in the future as a basis for the production of new bone cells and the creation of new blood vessels. In this way, it facilitates the manipulation of cell behavior and thus facilitates tissue regeneration. Due to the ease of preparation of nanomaterials and their properties, the most reasonable clinical application may be to reduce pathogen colonization and promote wound healing in open wounds. To fully exploit the potential of this discovery, further studies are necessary to thoroughly understand the action of this complex and confirm its efficacy and safety in various clinical applications, especially in terms of inducing an immune response, to ensure ideal biocompatibility.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Polish National Science Center Research Grant No. 2021/43/D/NZ6/00560. PID2020-112924RB-I00 (MINECO, Spain), and EPU-INV2020014 (Comunidad de Madrid, Spain). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R-D-I Plan 2008-2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and financed by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with assistance from the European Regional Development Fund.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Maliszewska I, Czapka T. Electrospun polymer nanofibers with antimicrobial activity. *Polymers*. 2022;14(9):1–32. doi:10.3390/polym14091661
- Sousa MGC, Rezende TMB, Franco OL. Nanofibers as drug-delivery systems for antimicrobial peptides. *Drug Discov Today*. 2021;26(8):2064–2074. doi:10.1016/j.drudis.2021.03.008
- Laffleur F, Keckeis V. Advances in drug delivery systems: work in progress still needed? *Int J Pharm*. 2020;590:119912. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119912
- Nirwan VP, Kowalczyk T, Bar J, Buzgo M, Filov E, Fahmi A. Advances in electrospun hybrid nanofibers for biomedical applications. *Nanomaterials*. 2022;12:1829. doi:10.3390/nano12111829
- Sethuram L, Thomas J. Biomedicine & pharmacotherapy therapeutic applications of electrospun nanofibers impregnated with various biological macromolecules for effective wound healing strategy – a review. *Biomed Pharmacother*. 2023;15:113996. doi:10.1016/j.biopha.2022.113996
- Wang Z, Wang Y, Yan J, Zhang, K, Lin, F, Xiang, L, Deng, L, Guan, Z, Cui, W, Zhang, H Pharmaceutical electrospinning and 3D printing scaffold design for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;174:504–534. doi:10.1016/j.addr.2021.05.007
- Serio F, Fraga A, Chandra A, Nobile, C, Rossi, GR, D'Amone, E, Gigli, G, del Mercato, LL, de Oliveira, CC. international journal of biological macromolecules electrospun polyvinyl-alcohol / gum arabic nanofibers: biomimetic platform for in vitro cell growth and cancer nanomedicine delivery. *Int J Biol Macromol*. 2021;188:764–773. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.069
- Liu Y, Li T, Han Y, Li F, Liu Y. Recent development of electrospun wound dressing. *Curr Opin Biomed Eng*. 2021;17:100247. doi:10.1016/j.cobme.2020.100247
- Abadi B, Goshtasbi N, Bolourian S, Tahsili J, Adeli-Sardou M, Forootanfar H. Electrospun hybrid nanofibers: fabrication, characterization, and biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10. doi:10.3389/fbioe.2022.986975
- Nirwan VP, Lasak M, Ciepluch K, Fahmi A. Hybrid nanomat: copolymer template cdse quantum dots in situ stabilized and immobilized within nanofiber matrix. *Nanomaterials*. 2023;13(4):630. doi:10.3390/nano13040630
- Kulkarni D, Musale S, Panzade P, Paiva-Santos, AC, Sonwane, P, Madibone, M, Choundhe, P, Giram, P, Cavalu, S. Surface functionalization of nanofibers: the multifaceted approach for advanced biomedical applications. *Nanomaterials*. 2022;12(21):3899. doi:10.3390/nano12213899
- Yan D, Yao Q, Yu F, Chen, L, Zhang, S, Sun, H, Lin, J, Fu, Y. Surface modified electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold with cellulose nanofibrils and Ag nanoparticles for ocular cell proliferation and antimicrobial application. *Mater Sci Eng C*. 2020;111:110767. doi:10.1016/j.msec.2020.110767
- Lasak M, Nirwan VP, Kuc-Ciepluch D, Lysek-Gładysinska, M, Javier de la Mata, F, Gomez, R, Fahmi, A, Ciepluch, K. Dendronized Ag/Au nanomats: antimicrobial scaffold for wound healing bandages. *Macromol Biosci*. 2024;24(6):2300513. doi:10.1002/mabi.202300513
- Chen X, Feng B, Zhu DQ, Chen, YW, Ji, W, Ji, TJ, Li, F. Characteristics and toxicity assessment of electrospun gelatin/PCL nanofibrous scaffold loaded with graphene in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*. 2019;14:3669–3678. doi:10.2147/IJN.S204971
- Chakravorty A, Biswas B, Sankar Sana S, Rayan RA, Lala NL, Ramakrishna S. A review on toxicity of turmeric derived Nano-Formulates against bacterial and fungal cells with special emphasis on electrospun nanofibers. *Mater Today Proc*. 2019;46:6358–6362. doi:10.1016/j.matpr.2020.05.820
- Malekian M, Fahimi H, Niri NM, Khaleghi S. Development of novel chimeric endolysin conjugated with chitosan-zn-metal-organic framework nanocomposites with antibacterial activity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2024;196(2):616–631. doi:10.1007/s12010-023-04514-w
- Ciepluch K, Maciejewska B, Gałczyńska K, Kuc-Ciepluch, D, Bryszewska, M, Appelhans, D, Drulis-Kawa, Z, Arabski, M The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorg Chem*. 2019;91:103121. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103121
- Abbasi P, Fahimi H, Khaleghi S. Novel chimeric endolysin conjugated chitosan nanocomplex as a potential inhibitor against gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Biochem Biotechnol*. 2024;196(1):478–490. doi:10.1007/s12010-023-04484-z
- Ye L, He X, Obeng E, Wang, D, Zheng, D, Shen, T, Shen, J, Hu, R, Deng, H. The CuO and AgO co-modified ZnO nanocomposites for promoting wound healing in *Staphylococcus aureus* infection. *Mater Today Bio*. 2023;18:100552. doi:10.1016/j.mtbio.2023.100552
- Chakraborty N, Jha D, Roy I, Kumar, P, Singh Gaurav, S, Marimuthu, K, Ng, O, Lakshminarayanan, R, Verma, N, Gautam, H. Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(375). doi:10.1186/s12951-022-01573-9
- Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2017;10(4):369–378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007
- Rhodes NJ, Cruce CE, O'Donnell JN, Wunderink RG, Hauser AR. Resistance trends and treatment options in gram-negative ventilator-associated pneumonia. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(2). doi:10.1007/s11908-018-0609-x
- de la Mata FJ, Gómez R, Cano J, Sánchez-Nieves J, Ortega P, Gallego SG. Carbosilane dendritic nanostructures, highly versatile platforms for pharmaceutical applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2022;e1971. doi:10.1002/wnan.1871
- Peña-González CE, Pedziwiatr-Werbicka E, Martín-Pérez T, Szewczyk, E, Copa-Patiño, J, Soliveri, J, Pérez-Serrano, J, Gómez, R, Bryszewska, M, Sánchez-Nieves, J, Javier de la Mata, F. Antibacterial and antifungal properties of dendronized silver and gold nanoparticles with cationic carbosilane dendrons. *Int J Pharm*. 2017;528:55–61. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.067
- Ciepluch K, Skrzyniarz K, Barrios-gumiel A, Quintana, S, Sánchez-Nieves, J, Javier de la Mata, F, Maciejewska, B, Drulis-Kawa, Z, Arabski, M. Dendronized silver nanoparticles as bacterial membrane permeabilizers and their interactions with *P. aeruginosa* Lipopolysaccharides. *Endolysins*. 2019;10:1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.02771
- Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses*. 2021;13(680):680. doi:10.3390/v13040680
- Zhang H, Zhang X, Liang S, Wang, J, Zhu, Y, Zhang, W, Liu, S, Shwarz, S, Xie, F Bactericidal synergism between phage endolysin Ply2660 and cathelicidin LL-37 against vancomycin-resistant enterococcus faecalis biofilms. *NPJ biofilms microbiomes*. 2023;9(1):16. doi:10.1038/s41522-023-00385-5

28. Rahman MU, Wang W, Sun Q, Ali Shah, J, Li, C, Sun, Y, Li, Y, Zhang, B, Chen, W, Wang, S. Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance. *Antibiotics*. 2021;10(11):1–23. doi:10.3390/antibiotics10111277
29. Quintana-Sanchez S, Gómez-Casanova N, Sánchez-Nieves J, Gómez, R, Rachuna, J, Wąsik, S, Semaniak, J, Maciejewska, B, Drulis-Kawa, Z, Ciepluch, K, Javier de la Mata, F, Arabski, M. The antibacterial effect of PEGylated carbosilane dendrimers on *P. aeruginosa* alone and in combination with phage-derived endolysin. *Int J mol Sci*. 2022;23(3):1–18. doi:10.3390/ijms23031873
30. Skrzyniarz K, Takvor-mena S, Lach K, Lysek-Gładysińska, M, Barrios-Gumiel, O, Cano, J, Ciepluch, K. Molecular mechanism of action of imidazolium carbosilane dendrimers on the outer bacterial membrane – from membrane damage to permeability to antimicrobial endolysin. *J Colloid Interface Sci*. 2024;665:814–824. doi:10.1016/j.jcis.2024.03.130
31. Fuentes-Paniagua E, Sánchez-Nieves J, Hernández-Ros JM, Fernández-Ezequiel, A, Soliveri, J, Copa-Patiño, J, Gómez, R, Javier de la Mata, F. Structure-activity relationship study of cationic carbosilane dendritic systems as antibacterial agents. *RSC Adv*. 2016;6(9):7022–7033. doi:10.1039/c5ra25901k
32. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004;10(12):599–606. doi:10.1016/j.molmed.2004.10.002
33. Ben-david Y, Zlotnik E, Zander I, Yerushalmi G, Shoshani S, Banin E. SawR a new regulator controlling pyomelanin synthesis in *pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2018;206:91–98. doi:10.1016/j.micres.2017.10.004
34. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(199). doi:10.1038/s41392-022-01056-1
35. Hedayatyanfard K, Bagheri-Khoulenjani S, Hashemi A, Ziai SA. Semi-IPN films and electrospun nanofibers based on chitosan/PVA as an antibacterial wound dressing. *Iran J Pharm Res*. 2019;18(3):1156–1167. doi:10.22037/ijpr.2019.1100712
36. Patil MP, Seo YB, Do KG. Morphological changes of bacterial cells upon exposure of silver-silver chloride nanoparticles synthesized using *Agrimonia pilosa*. *Microb Pathog*. 2018;116:84–90. doi:10.1016/j.micpath.2018.01.018
37. El-Newehy MH, Al-Deyab SS, Kenawy ER, Abdel-Megeed A. Fabrication of electrospun antimicrobial nanofibers containing metronidazole using nanospider technology. *Fibers Polym*. 2012;13(6):709–717. doi:10.1007/s12221-012-0709-4
38. Acharya D, Singha KM, Pandey P, Mohanta B, Rajkumari J, Singha LP. Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11. doi:10.1038/s41598-017-18590-6
39. Su Y, Yrastorza JT, Matis M, Cusick, J, Zhao, S, Wang, G, Xie, J, et al. Biofilms: formation, research models, potential targets, and methods for prevention and treatment. *Adv Sci*. 2022;9(29):1–36. doi:10.1002/advs.202203291
40. Omran BA, Tseng BS, Baek KH. Nanocomposites against *pseudomonas aeruginosa* biofilms: recent advances, challenges, and future prospects. *Microbiol Res*. 2024;282:127656. doi:10.1016/j.micres.2024.127656
41. Zapata PA, Larrea M, Tamayo L, Rabagliati FM, Azócar MI, Páez M. Polyethylene / silver-nano fiber composites: a material for antibacterial films. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;69:1282–1289. doi:10.1016/j.msec.2016.08.039
42. Gounani Z, Pourianejad S, Asadollahi MA, Meyer RL, Rosenholm JM, Arpanaei A. Polycaprolactone-gelatin nanofibers incorporated with dual antibiotic-loaded carboxyl-modified silica nanoparticles. *J Mater Sci*. 2020;55(36):17134–17150. doi:10.1007/s10853-020-05253-7

## Nanotechnology, Science and Applications

### Publish your work in this journal

Nanotechnology, Science and Applications is an international, peer-reviewed, open access journal that focuses on the science of nanotechnology in a wide range of industrial and academic applications. It is characterized by the rapid reporting across all sectors, including engineering, optics, bio-medicine, cosmetics, textiles, resource sustainability and science. Applied research into nano-materials, particles, nano-structures and fabrication, diagnostics and analytics, drug delivery and toxicology constitute the primary direction of the journal. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/nanotechnology-science-and-applications-journal>

**Dovepress**  
Taylor & Francis Group

## **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI**

Kielce, dnia 16.05.2025r.

Imię i nazwisko współautora pracy: **Magdalena Lasak**  
(doktoranta/uczestnika studiów doktoranckich/kandydata)

**Rada Naukowa Instytutu Biologii  
Uniwersytetu Jana Kochanowskiego  
w Kielcach**

#### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Nirwan Viraj Pratap, Lasak Magdalena, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, Nanomaterials, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630* mój udział polegał na: syntezie nanowłókien, przeprowadzeniu charakterystyki fizykochemicznej CdSe QDs i wytworzonych nanowłókien oraz wykonaniu eksperymentów, pozwalających na ocenę ich właściwości biologicznych, w tym cytotoksyczności, aktywności przeciwnowotworowej i testów przeciwbakteryjnych. Ponadto, brałam udział w opracowaniu i analizie wyników oraz przygotowaniu akapitów do manuskryptu.

*Lasak Magdalena*  
.....  
podpis

Kleve, 15.04.2025

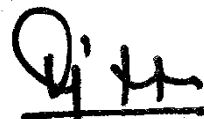
Place and date

Name: Dr. Viraj Pratap Nirwan

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Nirwan Viraj Pratap, Lasak Magdalena, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, Nanomaterials, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630.* My contribution was to support the fabrication of nanofibers, synthesize the nanoparticles, and characterize their physicochemical properties. Additionally, writing the draft, editing, and correcting the manuscript.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'V. Nirwan', written over a horizontal line.

Signature

Radom, 14.04.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: Karol Ciepluch

Afiliacja: Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Nirwan Viraj Pratap, Lasak Magdalena, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, Nanomaterials, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630* mój udział polegał na .koordynowaniu prac eksperymentalnych w tym związanych z badaniami biologicznymi, zapewnienia finansowania badań oraz recenzji manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma.

.....*Karol Ciepluch*.....

Podpis

Kleve, 28.04.2025

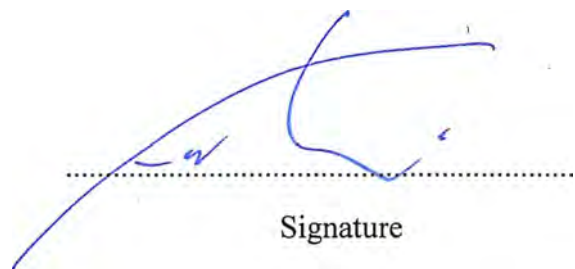
Place and date

Name: Prof. Dr. Amir Fahmi

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Nirwan Viraj Pratap, Lasak Magdalena, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix, Nanomaterials, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630* my contribution was beside developing the concept is to supervise the practical work conductive in the lab. Additionally, supporting in editing, writing, and corrections.



Signature

Kielce, dnia 16.05.25r.

Imię i nazwisko współautora pracy: **Magdalena Lasak**  
(doktoranta/uczestnika studiów doktoranckich/kandydata)

Rada Naukowa Instytutu Biologii  
Uniwersytetu Jana Kochanowskiego  
w Kielcach

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* mój udział polegał na: syntezie nanocząstek złota i nanowłókien oraz przeprowadzeniu ich charakterystyki fizykochemicznej; wykonaniu eksperymentów, pozwalających na ocenę właściwości biologicznych opracowanych nanomateriałów, w tym ich cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych i testów przeciwbakteryjnych; przeprowadzeniu modyfikacji otrzymanych nanomateriałów Dend-AgNPs oraz wykonaniu eksperymentów, takich jak ocena profilu uwalniania nanocząstek z nanowłókien, wszystkich testów antybakteryjnych oraz ocenie ich cytotoksyczności wobec linii komórkowej VH10. Ponadto, brałam udział w opracowaniu i analizie wyników oraz przygotowaniu koncepcji artykułu i pisaniu manuskryptu.

*Lasak Magdalena*  
podpis

Kleve, 15.04.2025

Place and date

Name: Dr. Viraj Pratap Nirwan

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages**, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513.* My contribution was to support the fabrication of nanofibers and their physicochemical characterization. Additionally, assisting in editing, writing, and corrections in the draft.



Signature

Radom, 15.04.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: *Dorota Kuc-Ciepluch*

Afiliacja: Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* mój udział polegał na recenzji manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma oraz po recenzjach.

*Dorota Kuc-Ciepluch*.....

Podpis

Kielce, 11.04.2025r.

Małgorzata Łysek-Gładysińska

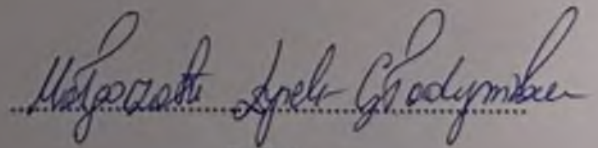
Zakład Biologii Medycznej

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513, mój udział polegał na przygotowaniu materiału do analiz ultrastrukturalnych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i jej ocenie.*



Podpis

Alcalá de Henares, April 17, 2025

Place and date

Name: F. Javier de la Mata

Affiliation: University of Alcalá, Spain.

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages**, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* my contribution was conceptualization of the work, funding acquisition, resources for synthesis of NPs and supervision of the final draft of the paper.

.....  
Signature

.....Alcalá de Henares , April 21<sup>th</sup>, 2025

Place and date

Name: .....Rafael Gómez Ramírez.....

Affiliation: ....University of Alcalá.....

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages**, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* my contribution was: conceptualization of the work, funding acquisition, synthesis of NP.

Rafael Gómez Ramírez

Signature

Kleve, 28.04.2025

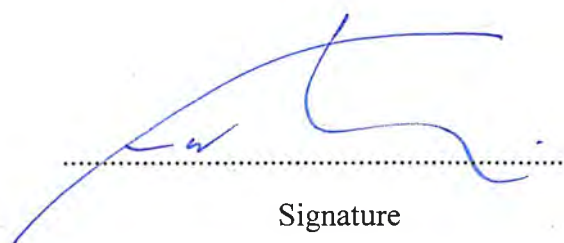
Place and date

Name: Prof. Dr. Amir Fahmi

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* my contribution was beside evolving the concept is to supervise the practical work conductive in the lab. Additionally, supporting in editing, writing, and corrections for submission .



Signature

Radom, 15.04.2025

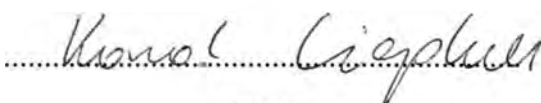
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: Karol Ciepluch

Afiliacja: Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Lysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages, Macromolecular Bioscience, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513* mój udział polegał na .koordynowaniu prac eksperymentalnych w tym związanych z badaniami biologicznymi, zapewnienia finansowania badań oraz recenzji manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma.

  
Podpis

Kielce, dnia 16.05.2025r.

Imię i nazwisko współautora pracy: **Magdalena Lasak**  
(doktoranta/uczestnika studiów doktoranckich/kandydata)

Rada Naukowa Instytutu Biologii  
Uniwersytetu Jana Kochanowskiego  
w Kielcach

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* mój udział polegał na: **syntezie nanowłókien i wykonaniu eksperymentów, pozwalających na ocenę ich właściwości fizykochemicznych; przeprowadzeniu modyfikacji nanowłókien Dend-AgNPs oraz endolizyną. Brałam również udział w przygotowaniu otrzymanych nanomateriałów do analizy SEM. Ponadto, byłam odpowiedzialna za wykonanie wszystkich testów przeciwbakteryjnych oraz badań cytotoksyczności badanych nanomateriałów wobec linii komórkowej VH10. Brałam udział w opracowaniu i analizie wyników oraz przygotowaniu koncepcji artykułu i akapitów do manuskryptu.**

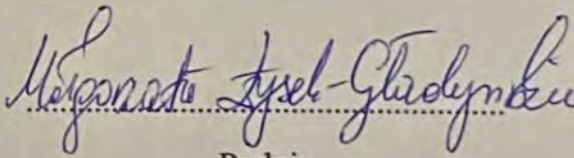
*Lasak Magdalena*  
podpis

Kielce, 11.04.2025r.

Małgorzata Łysek-Gładysińska  
Zakład Biologii Medycznej  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
Ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* mój udział polegał na analizie mikroskopowej próbek oraz jej interpretacji z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej.

  
Podpis

Kielce, 9 kwietnia 2025 r.

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: Karolina Lach

Afiliacja: Zakład Biologii Medycznej

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa. Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* mój udział polegał na opracowaniu metodyki wraz z przeprowadzeniem badań z wykorzystaniem mikroskopii (Bacteria LIVE/DEATH Assay – mikroskopia fluorescencyjna, obrazowanie morfologii bakterii – skaningowa mikroskopia elektronowa) oraz przygotowaniu manuskryptu.



Podpis

Kleve, 15.04.2025

Place and date

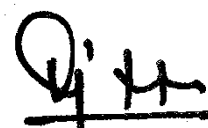
Name: Dr. Viraj Pratap Nirwan

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa**, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942*

My contribution was to assist the fabrication of nanofibers and their physicochemical characterization. Additionally, assisting in editing, and correcting some part of the manuscript related to nanofibers fabrications.



Signature

Radom, 14.04.2025

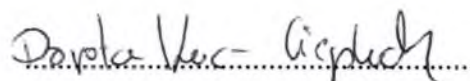
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: Dorota Kuc-Ciepluch

Afiliacja: Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* mój udział polegał na recenzji manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma oraz po recenzjach.



Podpis

.....  
Place and date

Name: Javier Sánchez-Nieves Fernández

Affiliation: .Dpt. of Organic and Inorganic Chemistry, University of Alcala, Alcalá de Henares (Madrid) Spain.

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa**, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* my contribution was: synthesis of nanoparticles and writing–review & editing.

.....  
Signature

Alcalá de Henares, April 17, 2025

Place and date

Name: F. Javier de la Mata

Affiliation: University of Alcalá, Spain.

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. **Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa**, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* my contribution was conceptualization of the work, funding acquisition, resources for synthesis of NPs and supervision of the final draft of the paper.

.....  
Signature

Kleve, 28.04.2025

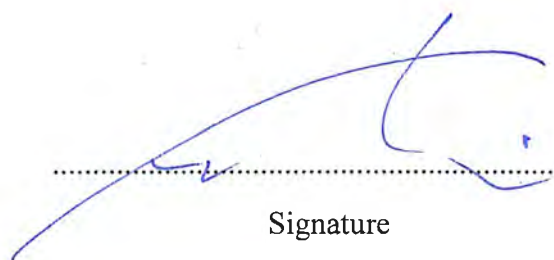
Place and date

Name: Prof. Dr. Amir Fahmi

Affiliation: Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Germany

### STATEMENT OF CONTRIBUTION

I declare that in the work: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* my contribution was designing the concept and to supervise the work conductive in the lab. Additionally, supporting in editing, writing, and corrections.



Signature

Radom, 14.04.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: Karol Ciepluch

Afiliacja: Uniwersytet Radomski im. Kazimierza Pułaskiego

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: *Lasak Magdalena, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa, Nanotechnology, Science and Applications, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942* mój udział polegał na .koordynowaniu prac eksperymentalnych w tym związanych z badaniami biologicznymi, zapewnienia finansowania badań oraz recenzji manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma.



Podpis