

Uniwersytet Łódzki, Wydział
Biologii i Ochrony Środowiska,
Instytut Biofizyki, Katedra
Termobiologii, ul. Pomorska
141/143, 90-236, Łódź

dr Magdalena
Łabieniec-Watała
AUTOREFERAT
(Załącznik nr 3)

*Tytuł osiągnięcia naukowego:
„Dendrymery PAMAM całkowitych
generacji jako nowe pro-farmaceutyki
w terapii cukrzycy – mity badań in vitro
a fakty badań in vivo”*

2014

Spis treści

Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	2
Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
Tytuł OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
Wykaz publikacji stanowiących OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE.....	5
Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.....	7
Wprowadzenie.....	7
Hipoteza badawcza.....	10
Cele badań <i>in vitro</i> oraz badań <i>in vivo</i>	12
Weryfikacja hipotezy badawczej.....	16
Podsumowanie.....	27
Ewentualne wykorzystanie wyników stanowiących moje OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE.....	29
Charakterystyka OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	31
Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	35
Zestawienie wybranych osiągnięć.....	39

POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

doktor nauk biologicznych
w zakresie biofizyki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego,
Łódź, styczeń 2006

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ wybranych polifenoli naturalnych na komórki trzustko-wątroby małża (Unio tumidus) i immortalizowane fibroblasty chomika chińskiego (Cricetulus griseus)*”

Promotor: Prof. dr hab. Teresa Gabryelak

magister w zakresie nauk biologicznych
specjalność: biofizyka

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
(obecnie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)
Uniwersytetu Łódzkiego,
Łódź, czerwiec 2001

Tytuł pracy magisterskiej: „*Oddziaływania siarczanu cholesterolu i akklarubicyny z immortalizowanymi fibroblastami chomika chińskiego (linia B14)*”

Promotor: Prof. dr hab. Zofia Józwiak

**INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH
NAUKOWYCH**

02.2011 – obecnie
Adiunkt

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Termobiologii

03.2006 – 02.2011
Adiunkt

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biofizyki Ogólnej

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

*Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład w powstanie niniejszego Osiągnięcia Naukowego zamieszczono w **Załączniku nr 5**.

**„Dendrymery PAMAM całkowitych generacji jako nowe
pro-farmaceutyki w terapii cukrzycy -
mity badań *in vitro* a fakty badań *in vivo*”**

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl 9 publikacji (6 prac oryginalnych i 3 prac przeglądowych) z lat: 2008-2014. Wyniki, które stały się częścią prezentowanego Osiągnięcia Naukowego uzyskano dzięki środkom finansowym pozyskanym na realizację 2 grantów własnych przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2009-2012¹.

¹ **Grant nr N N401 001236** „Wpływ dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) różnych generacji na normalizację wyznaczników kontroli glikemii oraz niektórych markerów powikłań późnocukrzycowych w modelu cukrzycy doświadczalnej u szczurów” (kierownik: prof. Teresa Gabryelak, UŁ, habilitantka głównym współwykonawcą grantu) oraz **Grant nr N N405 261037** „Dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) różnych generacji w modelu streptozotocynowej cukrzycy u szczurów - możliwe implikacje terapeutyczne” (kierownik: dr Magdalena Łabieniec-Watała).

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Tabela 1. Wykaz publikacji stanowiących Osiągnięcie Naukowe

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań (bez autocytowań)
PRACE ORYGINALNE				
1	Labieniec-Watała M.*² , Przygodzki T., Sebekova K., Watała C. „Can metabolic impairments in experimental diabetes be cured with poly(amido)amine (PAMAM) G4 dendrimers? – in the search for minimizing of the adverse effects of PAMAM administration”. International Journal of Pharmaceutics, 2014 , 464, 152-167.	3.458	35	0
2	Siewiera K.#, Labieniec-Watała M.*# „Ambiguous effect of dendrimer PAMAM G3 on rat heart respiration in a model of an experimental diabetes - Objective causes of laboratory misfortune or unpredictable G3 activity?” International Journal of Pharmaceutics, 2012 , 430, 258-265.	3.867	35	2
3	Labieniec M.* , Watała C. „Use of poly(amido)amine dendrimers in prevention of early non-enzymatic modifications of biomacromolecules”. Biochemie, 2010 , 92, 1296-1305.	3.787	30	2
4	Labieniec M.* , Ulicna O., Vancova O., Kucharska J., Gabryelak, T., Watała C. „Effect of poly(amido)amine PAMAM dendrimer G4 on heart and liver mitochondria in an animal model of diabetes”. Cell Biology International, 2010 , 34, 89-97.	1.747	15	5
5	Labieniec M. , Ulicna O., Vancova O., Glowacki R., Sebekova K., Bald E., Gabryelak T., Watała C*. „PAMAM G4 dendrimers lower high glucose but do not improve reduced survival in diabetic rats”. International Journal of Pharmaceutics, 2008 , 364, 142-149.	2.408	35	4

*Autor korespondencyjny pracy

Autorzy równorzędni

² W 2010 r. zmieniłam nazwisko z ‘Łabieniec’ na ‘Łabieniec-Watała’

6	Labieniec M.* , Gabryelak T. „Preliminary biological evaluation of poli(amidoamine) (PAMAM) dendrimer G3.5 on selected parameters of rat liver mitochondria”. Mitochondrion, 2008 , 8, 305-312.	4.262	35	10
PRACE PRZEGLĄDOWE				
1	Labieniec-Watała M* , Karolczak K., Siewiera K., Watała C. „The Janus face of PAMAM dendrimers used to potentially cure nonenzymatic modifications of biomacromolecules in metabolic disorders – a critical review of the pros and cons”. Molecules, 2013 , 18, 13769-13811.	2.428	30	0
2	Labieniec-Watała M* , Siewiera K, Gierszewski S, Watała C. "Mitochondria function in diabetes – from health to pathology. New perspectives for treatment of diabetes-driven disorders" book chapter in: "Biomedical Science, Engineering and Technology", 2012 . (INTECH, Open Access Publisher), pp. 123-150.	0	0	BRAK DANYCH
3	Labieniec M* , Watała C. „PAMAM dendrimers – diverse biomedical applications. Facts and unresolved questions”. Central European Journal of Biology, 2009 , 4, 434-451	0.915	20	17
RAZEM		22.872	235	40

Wartości IF zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania pracy.

Punktację MNiSW podano zgodnie z wykazem z dnia: 17.12.2014

Podana liczba cytowań (bez autocytowań) jest zgodna z danymi z dnia: 02.06.2014.

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

WPROWADZENIE

Cukrzyca

Utrzymanie właściwej homeostazy glukozy jest istotnym czynnikiem w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Główną przyczyną zaburzeń przemiany metabolicznej węglowodanów w organizmie (jeżeli za kryterium przyjmujemy częstość występowania zjawiska) jest deficyt insuliny. Niedobór lub brak tego hormonu jest przyczyną szeregu nieprawidłowości, których głównym objawem jest hiperglikemia – nadmiar glukozy we krwi krążącej. Długo utrzymujący się tkankowy deficyt czynnej biologicznie insuliny przyczynia się do powstania cukrzycy (Turner i wsp., 1999). Dziś cukrzyca określana już jest ‘epidemią XXI wieku’ i zaliczana jest do tzw. chorób cywilizacyjnych (King i wsp., 1998). Cukrzyca to przewlekła choroba metaboliczna, na którą w samej Polsce cierpi ponad 2.5 mln ludzi. Według danych WHO (Światowej Organizacji Zdrowia), co 10 sekund na świecie odnotowuje się dwa przypadki nowych zachorowań na cukrzycę. **Cukrzyca** to choroba polegająca bądź na całkowitym zaniku wytwarzania insuliny przez trzustkę (cukrzyca typu 1), bądź na niewystarczającej produkcji tego hormonu połączonej z jej niewydajnym zużyciwaniem przez tkanki (cukrzyca typu 2). W chorobie dochodzi do zaburzonego działania oraz wadliwej pracy komórek β , zlokalizowanych w wysepkach Langerhansa trzustki, które są odpowiedzialne za czynność wydzielania insuliny – hormonu regulującego stężenie prostego węglowodanu, glukozy, we krwi. Podwyższony poziom glukozy we krwi, oprócz ostrych powikłań mających miejsce w bliskiej skali czasowej, prowadzi do wystąpienia poważnych powikłań odległych w czasie. Są to mikroangiopatie (np. retinopatia, nefropatia, neuropatia), makroangiopatie (np. choroba niedokrwienna serca i jej powikłania, udar mózgu, miażdżyca zarostowa tętnic kończyn dolnych), zmiany skórne i powikłania ze strony układu kostno-stawowego (Kubik, 2004).

Ciągle nie mamy przełomu, który zmieniłby kwalifikację cukrzycy z choroby przewlekłej na uleczalną, co nie oznacza jednak, że w diabetologii panuje zastój. Wręcz przeciwnie, liczne osiągnięcia medycyny ostatnich lat zmieniły znacząco zarówno możliwości terapii, jak i obraz kliniczny statystycznego pacjenta, a także rokowania jego stanu zdrowia. Obecnie,

zasadą współczesnej terapii cukrzycy jest leczenie wszystkich zaburzeń towarzyszących chorobie, a nie tylko kontrola samej gospodarki węglowodanowej. Dążenie do normalizacji masy ciała, zwiększenie aktywności fizycznej, właściwa dieta, leczenie częstych w cukrzycy zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego i innych chorób układu krążenia oraz utrzymywanie glikemii w przedziale wartości możliwie najbardziej zbliżonych do niecukrzycowych (normoglikemii) zmniejsza ryzyko rozwoju powikłań tej choroby. Ale nie zawsze tak było. Z ‘historii diabetologii’ wiemy, że do 1921 r. jedyną formą leczenia chorych na cukrzycę było stosowanie odpowiedniej diety. Niestety, taka metoda ‘leczenia’ była wysoce nieskuteczna. Nowe perspektywy terapeutyczne pojawiły się, gdy grupa kanadyjskich uczonych doprowadziła do wyizolowania insuliny z trzustek zwierzęcych w końcu 1921 r. W styczniu 1922 r. insulinę podano z sukcesem pierwszemu choremu na cukrzycę. Osiągnięcie to uhonorowano Nagrodą Nobla w 1923 roku (Banting i MacLeod). Wprowadzenie insuliny do leczenia zintensyfikowało poszukiwania doustnych leków hipoglikemizujących. Niestety, na przestrzeni kolejnych dziesięcioleci poszukiwania te nie dały obiecujących rezultatów, czego konsekwencją było znaczące zwiększanie się częstości późnocukrzycowych powikłań u chorych na cukrzycę. Dopiero na początku lat 50. ubiegłego stulecia odnotowano postęp w leczeniu cukrzycy (zwłaszcza typu 2), po udanych próbach syntezy leków doustnych wykazujących działanie hipoglikemizujące (pochodne sulfonamidowe). Kolejne 40 lat to stopniowe poszerzenie grupy pochodnych sulfonilomocznika, ale też tzw. ‘czarny okres w diabetologii’, bowiem był to także czas wycofywania z rynku wielu leków, które nie przeszły pozytywnie egzaminu w próbach klinicznych (m.in. zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych). Pierwszy etap wyraźnego zdynamizowania osiągnięć w zakresie farmakoterapii cukrzycy to dopiero początek lat 90-tych XX wieku. Wprowadzono wówczas do leczenia insulinę ludzką oraz jej krótko działające analogi. Jednak prawdziwy przełom nastąpił w ciągu ostatnich 10 lat, kiedy to uzyskano długo działające, okołodobowe analogi insuliny. Niemniej jednak, należy tutaj podkreślić, że większość najnowszych generacji insulin oraz leków hipoglikemizujących jest trudno dostępna dla polskiego pacjenta, przede wszystkim, ze względu na ich wysoką cenę i brak refundacji. Niektóre zaś nie są jeszcze dostępne w naszym kraju (Drzewoski, 2013). W związku z powyższym, poznawanie i rozumienie procesów zachodzących w organizmie, jako podłoża procesów patofizjologicznych w cukrzycy, a także poszukiwanie nowych, skutecznych leków w odpowiedzi na zapotrzebowanie społeczne ze strony bardzo licznej

grupy pacjentów chorujących na cukrzycę, to obecnie bardzo ważna sfera badań dla chemików, biologów, biochemików, biotechnologów i farmakologów.

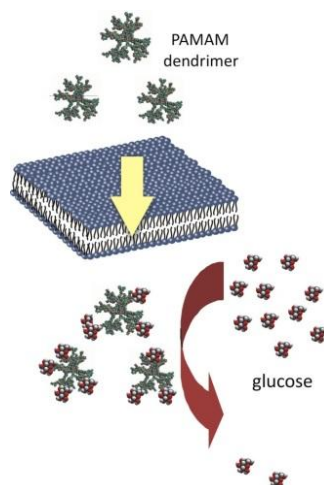
Dendrymery poli(amodo)aminowe PAMAM

Dendrymery to organiczne, wielofunkcyjne związki chemiczne o regularnej, rozgałęzionej budowie, zbudowane z przyłączonych sekwencyjnie monomerów. Ich centrum stanowi mała cząsteczka organiczna zwana rdzeniem, umożliwiającą przeprowadzenie sterowanych reakcji polimeryzacji. Dendrymery mają ściśle określoną liczbę i rodzaj grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni (Menjoge i wsp., 2010). Taka budowa dendrymerów oraz ich przewidywalna synteza sprawiły, że związki te znalazły liczne zastosowania w różnych dziedzinach naukowych. W naukach biomedycznych najpowszechniej stosowane są jako nośniki substancji leczniczych lub do tworzenia nowych leków o strukturze dendrytycznej. Ogromne zainteresowanie dendrymerami wśród badaczy na całym świecie sprawiło, że obecnie dysponujemy nie tylko dość bogatą wiedzą na temat ich potencjalnych właściwości, ale także mamy do wyboru różne rodzaje i klasy tych związków (Klajnert i Bryszewska, 2006). W swoich badaniach skupiłam uwagę na dendrymerach **PAMAM**, czyli dendrymerach **Poli(AMido)AMinowych**. Związki te po raz pierwszy zostały zsyntetyzowane przez amerykańskiego chemika, prof. Donalda Tomalię w 1979 r. Po tym, jak synteza tych związków została upubliczniona, a same dendrymery stały się komercyjnie dostępne, wielu badaczy uzyskało możliwość ich zastosowania w zaprojektowanych przez siebie układach doświadczalnych (Tomalia i wsp., 1984). Dziś jest to bodaj najczęściej badana i najlepiej przebadana grupa dendrymerów.

Dendrymery PAMAM całkowitych generacji, z uwagi na obecność licznych grup aminowych pierwszorzędowych na swojej powierzchni, charakteryzują się dużą nukleofilowością, co stawia je w grupie użytecznych związków w prewencji makrocząsteczek przed modyfikacją na drodze karbonylacji, acetylacji/acylacji, glikozylacji itp. Jako takie, mogą one stanowić ważną grupę farmaceutyków w stanach, gdzie taka nadmierna postsyntetyczna modyfikacja leży u źródeł patomechanizmu choroby lub jej powikłań. W związku z powyższym, w swoich badaniach postanowiłam wykorzystać tę właściwość dendrymerów (wynikającą z ich budowy) i zastosować je w celu ograniczania negatywnego działania nadmiaru cukrowca (nieenzymatycznej N-glikozylacji) na biomakrocząsteczki, przede wszystkim na białka. Zamysł

ten był **całkowicie nowatorski** – *żadna inna grupa badawcza nie stosowała jak dotąd dendrymerów PAMAM do ograniczania nieenzymatycznych modyfikacji biomakrocząsteczek.*

Konsekwentnie, **główną ideą** mojej pracy była ocena skuteczności i efektywności działania dendrymerów PAMAM w modulacji homeostazy metabolicznej w modelu cukrzycy doświadczalnej w warunkach *in vitro* (badania podstawowe, z użyciem białek komercyjnie dostępnych) oraz *in vivo* (z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, szczury Wistar i Sprague-Dawley z cukrzycą doświadczalną wywołaną przez iniekcję streptozotocyny). **Nadrzędnym celem** było zastosowanie dendrymerów PAMAM jako zmiataczy nadmiaru wolnej glukozy i wykazaniu, że związki te mogą chronić białko przed glikacją, a w konsekwencji potencjalnie opóźnić i/lub ograniczyć powikłania późnocukrzycowe wywołane długo trwającą, nieleczoną hiperglikemią. Idea pracy została schematycznie zaprezentowana na Ryc. 1.



Ryc. 1. Główna idea pracy: poliaminowe dendrymery PAMAM jako ‘zmiatacze’ wolnej glukozy. Rysunek zaczerpnięto z pracy **Łabieniec-Watała i wsp., 2013.**

HIPOTEZA BADAWCZA

Pracy przyświecała następująca hipoteza badawcza:

Dendrymery PAMAM, posiadające na swojej powierzchni liczne grupy aminowe, normalizują wyznaczniki kontroli glikemii oraz niektóre markery powikłań późnocukrzycowych, na drodze chemicznego współzawodnictwa z biomakrocząsteczkami. Efekt ten jest zależny od generacji dendrymerów.

Do badań zastosowano 3 generacje dendrymerów PAMAM, różniące się między sobą jedynie liczbą powierzchniowych grup aminowych. Wykorzystano zatem generację 2 (**PAMAM G2**, 16 grup aminowych), generację 3 (**PAMAM G3**, 32 grupy aminowe) oraz generację 4 (**PAMAM G4**, 64 grupy aminowe). Dawki w jakich dendrymery były stosowane w badaniach *in vivo* zamieszczono w Tabeli 2. Zgodnie z hipotezą założono, że im wyższa generacja dendrymeru, tym większa jego skuteczność w efektywnym zmiataniu glukozy i ograniczaniu nieenzymatycznych modyfikacji białek. Z uwagi na polikationowość tych związków (która wzrasta wraz ze wzrostem liczby grup aminowych) i dostępne dane literaturowe wskazujące na (cyto)toksyczność dendrymerów PAMAM zależną od stężenia i generacji, zdecydowano do badań nie stosować generacji wyższych niż PAMAM G4. Materiałem biologicznym były dostępne komercyjnie białka: albumina surowicy bydlęcej (BSA) i ludzkiej (HSA), oraz tkanki pozyskiwane od zwierząt laboratoryjnych (krew pełna, osocze, surowica, soczewki, wątroba, serce).

Tabela 2. Dawki dendrymerów PAMAM zastosowanych w badaniach *in vivo*

PAMAM G2	PAMAM G3	PAMAM G4
40 [mg/kg m.c./dzień]	20 [mg/kg m.c./dzień]	7.26 [mg/kg m.c./dzień]
12.285 [$\mu\text{mol/kg m.c./dzień}$]	2.895 [$\mu\text{mol/kg m.c./dzień}$]	0.511 [$\mu\text{mol/kg m.c./dzień}$]
197 [$\mu\text{mol NH}_2/\text{kg m.c./dzień}$]	93 [$\mu\text{mol NH}_2/\text{kg m.c./dzień}$]	33 [$\mu\text{mol NH}_2/\text{kg m.c./dzień}$]

CELE BADAŃ *IN VITRO* ORAZ BADAŃ *IN VIVO*

Tabela 3. Cele przeprowadzonych badań

Rodzaj badań	Cel
<i>in vitro</i>	a) sprawdzenie, czy dendrymery ulegają nieenzymatycznej N-glikozylacji b) ocena skuteczności dendrymerów w hamowaniu glikacji białka modelowego (BSA) c) ocena wpływu dendrymerów na zmiany konformacyjne w białku (BSA, HSA) w różnych pH (5.2 i 7.4) d) porównanie właściwości ograniczania glikacji białek przez różne generacje dendrymerów
<i>in vivo</i>	a) ocena efektywności dendrymerów w ograniczaniu nieenzymatycznych modyfikacji białek w modelu cukrzycy doświadczalnej u szczurów b) wskazanie generacji dendrymeru najskuteczniej hamującej niekorzystne działanie hiperglikemii na organizm żywy c) próba określenia, która generacja dendrymerów PAMAM jest najbardziej skuteczna w zmiataniu nadmiaru glukozy (najsilniej obniża glikację białek), a zarazem najbardziej bezpieczna (nietoksyczna, wiąże się z najniższą śmiertelnością zwierząt z cukrzycą doświadczalną) d) ocena efektywności dendrymerów w zależności od sposobu podania – próba określenia najefektywniejszego sposobu dostarczania dendrymeru do organizmu

Po uzyskaniu danych, zarówno z badań *in vitro* jak i *in vivo*, podjęto krytyczną próbę oceny użyteczności wniosków wyciąganych na podstawie badań *in vitro* w kontekście planowania badań *in vivo*. Wątek ten został bliżej omówiony w dalszej części Autoreferatu.

W celu dokonania poprawnej weryfikacji hipotezy badawczej, realizowaniu podjętej tematyki towarzyszyły pytania, na które starałam się znaleźć odpowiedź w przeprowadzonych pracach eksperymentalnych oraz dostępnej literaturze naukowej. Z punktu widzenia głównej idei pracy (Ryc. 1), czyli zastosowania dendrymerów PAMAM zakończonych grupami aminowymi jako zmiataczy nadmiaru wolnej glukozy, bardzo ważnym aspektem przeprowadzonych badań stało się sprawdzenie, **czy związki te ulegają nieenzymatycznej glikozylacji** (Ryc. 2), a jeśli tak, **to czy są one w stanie efektywnie chronić białko przed glikacją.**

2012), dotyczyły także przebadania niższych generacji dendrymerów PAMAM (G2 i G3), pod kątem oceny ich użyteczności w ograniczaniu glikacji i glikoksydacji białek w modelu cukrzycy doświadczalnej u szczurów. Głównym celem użycia niższych generacji niż generacja 4 było sprawdzenie hipotezy zakładającej, że obniżenie polikationowości dendrymeru (niższa generacja, mniej grup aminowych) pozwoli istotnie zmniejszyć negatywny efekt dendrymerów na przeżywalność zwierząt, zaobserwowany dla generacji 4. Dendrymery generacji 2, 3 i 4 zostały zastosowane w dawkach jak podano w Tabeli 2. Wszystkie badania *in vivo* przeprowadzone po roku 2009, wykonano na szczurach Sprague-Dawley (zwierzęta pochodziły z hodowli własnej Zwierzętarni Uniwersytetu Medycznego w Łodzi). Na podstawie zmian w markerach cukrzycy pod wpływem podawania dendrymerów, stwierdzono, że wszystkie badane generacje znacząco obniżają hiperglikemię (mierzoną m.in. jako zmiany w poziomie glikemii) oraz stopień glikacji białek (stężenia Hb glikowanej i AGEs), a także stopień oksydacji białek (poziom AOPP, *Advanced Oxidation Protein Products*). Niemniej jednak, wykazano, że generacja 3 dendrymerów PAMAM (w zastosowanym stężeniu) była najskuteczniejsza w redukowaniu tych markerów (Labieniec-Watała i wsp., 2013).

Jednym z ocenianych parametrów w badaniach na zwierzętach była '**przeżywalność zwierząt**'. Zaobserwowano, że dootrzewnowemu podawaniu dendrymerów towarzyszy śmiertelność u zwierząt, zarówno u osobników zdrowych, jak i zwierząt z cukrzycą. Najwyższą toksyczność stwierdzono dla dendrymeru PAMAM G3. Wpływ generacji 2 i 4 na przeżywalność był niższy: odnotowano ok. 20% spadek przeżywalności u zwierząt zdrowych suplementowanych tymi generacjami i 40-45% redukcję przeżywalności u zwierząt z cukrzycą STZ. Wyniki cząstkowe dotyczące tego parametru zostały przedstawione w następujących publikacjach: Labieniec i wsp., 2008; Siewiera i Labieniec-Watała, 2012; Labieniec-Watała i wsp., 2013 oraz w Labieniec-Watała i wsp., 2014. Biorąc pod uwagę wysoką śmiertelność wśród zwierząt (zdrowych, jak i cukrzycowych) po suplementacji dendrymerem generacji 3, wyniki pozyskane dla poszczególnych 'markerów późnocukrzycowych' wystandaryzowano uwzględniając 'przeżywalność zwierząt'. Na podstawie takiej analizy uzyskano informację, że najefektywniejszym w ograniczaniu modyfikacji białek i jednocześnie najbardziej 'bezpiecznym' okazał się dendrymer generacji 4 (Labieniec-Watała i wsp., 2013).

Toksyczność dendrymerów PAMAM została bardzo dobrze udokumentowana w literaturze (Mukherjee i wsp., 2010; Prieto i wsp., 2011; Sadekar i Ghandehari, 2012). Wyniki badań *in vitro*, ale także badań *in vivo*, wskazują, że dendrymery PAMAM całkowitych generacji są toksyczne, a toksyczność ta jest tym większa, im wyższa generacja dendrymeru jest stosowana lub im wyższe stężenia/dawki są zastosowane. Jeśli chodzi o ocenę toksyczności dendrymerów w badaniach na zwierzętach, to w ostatnich 30 latach, pojawiły się prace, które wskazywały zarówno na nietoksyczne, jak i toksyczne działanie dendrymerów PAMAM. Na rozbieżność tych wniosków duży wpływ ma rodzaj stosowanego dendrymeru, jego generacja, dawka, częstość i sposób podawania, modyfikacja grup powierzchniowych lub jej brak, czas ekspozycji, itp. Biorąc zatem pod uwagę fakt, że aktywność biologiczna dendrymeru może zależeć nie tylko od dawki, ale także od wielu innych czynników, postanowiłam sprawdzić, czy obniżona przeżywalność zwierząt zaobserwowana w badaniach *in vivo* (Labieniec i wsp., 2008; Siewiera i Labieniec-Watała, 2012; Labieniec-Watała i wsp., 2013) to kwestia jedynie zastosowanej dawki (zbyt wysoka?), czy także np. sposobu podania dendrymeru do organizmu. W związku z powyższym, przebadalam efektywność trzech różnych sposobów aplikowania dendrymeru PAMAM G4 w modulacji nieenzymatycznych modyfikacji cukrzycy doświadczalnej w odniesieniu do 3 różnych sposobów jego aplikowania. Tradycyjnie, dendrymer G4 był podawany dootrzewnowo. Sprawdzone także podawanie sondą dożołądkową oraz iniekcje podskórne. Stwierdzono, że najbezpieczniejszym sposobem podawania zwierzętom dendrymeru G4 było podanie podskórne (100% zwierząt przeżyło eksperyment), natomiast najbardziej toksyczne było podanie dootrzewnowe, dla którego odnotowano najsilniej zaznaczony spadek przeżywalności u zwierząt z cukrzycą. Zdecydowanie wyższą przeżywalność zaobserwowano dla zwierząt, którym podawano dendrymer dożołądkowo (w porównaniu z dootrzewnową suplementacją). Ponadto, stwierdzono, że najmniej skutecznym w ograniczaniu powikłań późnocukrzycowych u szczurów z cukrzycą STZ, było podawanie dendrymeru G4 sondą dożołądkową, natomiast podawanie dendrymeru podskórnie lub dootrzewnowo charakteryzowały się najefektywniejszym działaniem hipoglikemizującym (Labieniec-Watała i wsp., 2013; Labieniec-Watała i wsp., 2014).

Na podstawie uzyskanych danych, pochodzących zarówno z badań *in vitro*, jak i badań *in vivo*, ustalono, że dendrymery ulegają nieenzymatycznej glikozylacji, niemniej jednak

wciąż pozostaje otwarte pytanie, czy glikacja dendrymeru chroni białko przed konsekwencjami nadmiaru glukozy (czy to w próbówce, czy w organizmie). Temat ten zostanie jeszcze rozwinięty poniżej. Ustalono, że dendrymery PAMAM generacji 4 (uwzględniając redukcję podstawowych modyfikacji białek oraz wpływ na ogólną przeżywalność zwierząt) najefektywniej i najoptymalniej ograniczają późnocukrzycowe efekty chronicznej hiperglikemii w organizmie. Nadal trudno jest odpowiedzieć na pytanie, w jakiej dawce należałoby stosować dendrymery PAMAM w terapii przeciwcukrzycowej, tak by suplementacja tymi związkami nie tylko była efektywna i skuteczna, ale także bezpieczna (nietoksyczna). Trzeba tu jednak podkreślić, iż macierz uzyskanych wyników jest nadal jeszcze zbyt uboga, aby o taki sąd się pokusić, a liczba opublikowanych na ten temat prac zbyt niewielka by pokusić się o jakąkolwiek metaanalizę. Ponadto, stwierdzono, że sposób podawania dendrymeru ma znaczący wpływ na jego skuteczność i toksyczność. Z trzech przebadanych sposobów podawania tego związku, stwierdzono, że najmniej toksyczne (100% przeżywalność zwierząt) i najbardziej efektywne w redukcji markerów cukrzycowych, okazało się podawanie dendrymeru G4 w postaci podskórnych iniekcji.

WERYFIKACJA HIPOTEZY BADAWCZEJ

Dendrymery PAMAM, posiadające na swojej powierzchni liczne grupy aminowe, normalizują wyznaczniki kontroli glikemii oraz niektóre markery nieenzymatycznych modyfikacji białek, na drodze chemicznego współzawodnictwa z biomakrocząsteczkami (POTWIERDZONO). Efekt ten jest zależny od generacji dendrymerów (NIE POTWIERDZONO).

Trudno w chwili obecnej orzec, który z przebadanych dendrymerów PAMAM różnych generacji spełnia najlepiej warunek kompromisu między minimalną toksycznością i maksymalną skutecznością terapeutyczną. Do tego celu, macierz danych, obejmujących większe zakresy stężeń (dawek) poszczególnych generacji dendrymerów PAMAM, powinna zostać znacząco wzbogacona. W niniejszej pracy, zebranie danych dla pełnego wieloczynnikowego układu doświadczalnego nie było możliwe z uwagi na wysokie koszty badań *in vivo*.

Z punktu widzenia hipotezy badawczej i ogólnej idei pracy, najwłaściwszą i najbardziej pożądaną reakcją, w jaką powinny wchodzić dendrymery, jest ta z wolną glukozą. Obniżenie poziomu hiperglikemii, polegające na 'zmiataniu nadmiaru cukrowca' przez reszty aminowe dendrymerów, ma przyczynić się do redukcji powikłań spowodowanych przez długotrwałe stany hiperglikemii. Niemniej jednak, dendrymery PAMAM całkowitych generacji znane są z tego, że wchodzą (mogą wchodzić) w interakcje z białkiem. W związku z powyższym, prowadzonym przeze mnie badaniom zawsze towarzyszyło pytanie, o to **które interakcje w zastosowanym modelu cukrzycy eksperymentalnej mają pierwszeństwo: czy te pomiędzy 'dendrymerem i glukozą', czy te pomiędzy 'dendrymerem i białkiem'**. O ile pierwsza z reakcji prowadzi do obniżenia poziomu/stężenia glukozy w środowisku i może w ten sposób przyczynić się do ograniczenia negatywnego wpływu hiperglikemii na funkcjonowanie i właściwości białek, o tyle konsekwencją drugiej reakcji jest uszkodzenie lub zmiany w funkcjonowaniu białka, ale wywołane bardziej obecnością dendrymeru, a nie redukującego cukrowca. Podczas gdy pierwsza z reakcji jest pożądana, to druga nie.

Na podstawie badań *in vitro*, obejmujących eksperymenty w różnych pH (5.2 i 7.4), stwierdziłam, że dendrymery PAMAM (niemodyfikowane i modyfikowane glukozą), zastosowane w niskich stężeniach (G2: 120 μ M; G3: 60 μ M i G4: 30 μ M), nie przyczyniają się do zmian w konformacji białek modelowych (BSA i HSA) i nie oddziałują z nimi w sposób istotny statystycznie (**Łabieniec i Watała, 2010**). Wyniki te uzyskują swoje potwierdzenie w pracach innych autorów, w których stosowano dendrymery PAMAM w różnych stężeniach i nie obserwowano ich negatywnego wpływu na białko, jeśli związki te były stosowane w niskich stężeniach (Klajnert i wsp., 2003; Sekowski i wsp., 2011). Do ciekawych z punktu widzenia mojej pracy należą dwie publikacje wydane w latach 2007 (Shcharbin i wsp.) i 2011 (Giri i wsp.), z których jasno wynika, że w warunkach *in vitro* (szczególnie w pH fizjologicznym), wyższe generacje dendrymerów PAMAM (>3) albo oddziałują z białkiem słabo (BSA, HSA), albo wcale. Nie oznacza to jednak, że niższe generacje zupełnie nie podlegają oddziaływaniom z białkiem. Ustalono bowiem, że albumina posiada potencjalnie aż 5 miejsc wiążących dla kationowych dendrymerów PAMAM (Shcharbin i wsp., 2007; Giri i wsp., 2011).

Nawet jeśli, uda się potwierdzić w warunkach *in vitro*, że uprzywilejowaną reakcją w warunkach fizjologicznych jest powinowactwo dendrymeru do glukozy, a nie do białka, to najważniejsza wydaje się odpowiedź na pytanie, **która z tych reakcji zachodzi w organizmie**

jako pierwsza. Z pomocą 'przychodzą' wyniki badań pozyskane przez badaczy, którzy próbowali ocenić biodystrybucję i farmakokinetykę dendrymerów PAMAM, wykorzystując do tego różne modele zwierzęce (szczury, myszy). Dziś wiadomo, że im niższa generacja dendrymeru, tym krócej związek przebywa w krwioobiegu. Niemniej jednak, ustalono, że nawet wyższe generacje (>5) nie krążą we krwi dłużej niż godzinę. Po tym czasie następuje wychwytywanie dendrymerów przez inne organy, takie jak śledziona, płuca, nerki, serce czy mózg. W narządach tych dendrymery mogą kumulować się nawet do 24 godzin, zanim zostaną zupełnie usunięte z organizmu (Lesniak i wsp., 2013).

W związku z powyższym, wielce prawdopodobnym wydaje się scenariusz, wg którego dendrymer PAMAM w warunkach *in vivo* szybciej wejdzie w interakcję z glukozą aniżeli z białkiem. Należy również wziąć pod uwagę fakt, że w organizmie, albuminy zazwyczaj nie występują w krwioobiegu jako wolne cząsteczki, lecz z racji swoich funkcji, są związane z innymi cząsteczkami, np. z lekami, które transportują. W takiej sytuacji, prędzej można sobie wyobrazić interakcję pomiędzy dendrymerem a glukozą lub składnikami krwi (erytrocyty, białe krwinki, płytki krwi), aniżeli pomiędzy dendrymerem a białkiem, pomimo, iż niektóre doniesienia badań *in vitro* wskazują na silne interakcje pomiędzy dendrymerem PAMAM a białkiem w środowisku bogatym w erytrocyty (Halets i wsp., 2013). Niekorzystny wpływ dendrymerów PAMAM na składniki krwi jest odnotowywany od wielu lat i konsekwentnie prowadzone są dalsze badania oraz publikowane są nowe prace świadczące o hemotoksycznej aktywności tych związków (Dobrovolskaia i wsp., 2012; Jones i wsp., 2012). Wyniki uzyskane na podstawie własnych badań *in vivo* również wskazują na to, że dendrymery przyczyniają się do hemocytotoksyczności elementów (nawet jeśli w krwioobiegu występują krótko) i mogą powodować uszkodzenia narządów (wątroba, serce), w których następnie się kumulują. Dane przemawiające na korzyść tej tezy przedstawiono i przedyskutowano w pracy **Łabieniec-Watała i wsp., 2013.**

DENDRYMERY A MITOCHONDRIA

Mitochondria to wielofunkcyjne organelle komórkowe, których prawidłowe funkcjonowanie jest kluczowe dla działania całej komórki. Odpowiedzialne są nie tylko za dostarczanie komórce energii zmagazynowanej w postaci wysokoenergetycznych wiązań ATP, ale również decydują o apoptotycznej lub nekrotycznej śmierci komórki. Mitochondria w komórkach organizmów z cukrzycą są upośledzone w dwojaki sposób. Charakteryzują się pogorszeniem

parametrów mitochondrialnych, co nierozzerwalnie wiąże się z obniżoną zdolnością do wytwarzania ATP, ale także – co nie mniej istotne – cechuje je zwiększone powstawanie reaktywnych form tlenu oraz upośledzenie ochrony antyoksydacyjnej komórek (**Łabieniec-Watała i wsp., 2012**). Mitochondria stanowią doskonały model do badań, bowiem dyskryminacja ich podstawowych funkcji pomiędzy komórkami u osobników ‘chorych/z cukrzycą’ i ‘zdrowych’ jest na tyle zauważalna, iż ewentualne korzystne działanie badanych związków na funkcjonowanie mitochondriów nie mogłoby pozostać niezauważone.

Głównym celem badań, których się podjęłam, było przetestowanie hipotezy zakładającej, iż domniemane ‘hipoglikemizujące działanie’ dendrymerów PAMAM ochroni mitochondria przed negatywnym wpływem podwyższonego stężenia glukozy w organizmie (model nieleczonej, długotrwałej cukrzycy) i usprawni funkcjonowanie mitochondriów w warunkach patologii (cukrzycy).

W związku z powyższym, od zwierząt, którym podawano dendrymery przez 60 dni (w dawkach jak podano wyżej), pobierano serca oraz wątrobę, izolowano mitochondria i oceniano stan bioenergetyki mitochondrialnej. Do podstawowych parametrów podlegających ocenie należały: a) integralność błony mitochondrialnej (wskaźnik RCR), b) sprawność fosforylacji oksydacyjnej, czyli ocena wydolności mitochondrialnej (wskaźnik P/E), c) stopień uszkodzenia mitochondriów (wskaźnik L/E) i d) produkcja ATP (wskaźnik ADP/O). Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, co następuje:

1. Mitochondria hepatocytarne są mniej wrażliwe na działanie wysokich stężeń glukozy (stan nieleczonej hiperglikemii) w porównaniu z mitochondriami kardiomiocytarnymi;
2. Dendrymery PAMAM nie wpływają na bioenergetykę mitochondriów hepatocytarnych, ale pogarszają parametry oddechowe w mitochondriach kardiomiocytarnych;
3. Dendrymery PAMAM, bez względu na generację i zastosowaną dawkę, nie są w stanie poprawić funkcjonowania mitochondriów ‘cukrzycowych’.

Wnioski przedstawione powyżej wysunięto na podstawie danych opublikowanych w następujących publikacjach: **Łabieniec i Watała, 2009; Łabieniec i wsp., 2010; Siewiera i Łabieniec-Watała, 2012; Łabieniec-Watała i wsp., 2012; Łabieniec-Watała i wsp., 2013.**

**OBSERWACJE DOTYCZĄCE WPŁYWU ZMIENNOŚCI BIOLOGICZNEJ I FENOLOGICZNEJ NA
BADANE PARAMETRY**

Prowadząc badania na modelu zwierzęcym z pewnością zwraca się uwagę na te czynniki/warunki eksperymentalne, z którymi nie ma się do czynienia podczas prowadzenia badań w systemie *in vitro*. W tej części mojego Autoreferatu, zwrócę uwagę na dwa zagadnienia, które w mojej opinii powinny zostać omówione z uwagi na ich znaczący wpływ na interpretację danych i budowanie końcowych wniosków. Warto wspomnieć, że większość badań, w jakie byłam zaangażowana w okresie podoktorskim, oscylowała wokół modelu cukrzycy doświadczalnej (cukrzycy indukowanej STZ) z wykorzystaniem szczurów. Pracując równoległe przy realizacji trzech projektów, z których każdy trwał 3 lata, wykonywałam badania *in vivo* w różnych porach roku (na przestrzeni całego roku kalendarzowego), badając różne związki (dendrymery PAMAM; β -rezorcylidenoaminoguanidynę, RAG, czy ekstrakty polifenolowe). Badania prowadziłam z wykorzystaniem szczurów reprezentujących dwa różne stada krewniacze (szczury Wistar i Sprague-Dawley). Zebrawszy wszystkie dane, które pozyskałam w trakcie tych kilku lat, oraz wykonawszy mini-metaanalizę tych wyników, stwierdziłam co następuje:

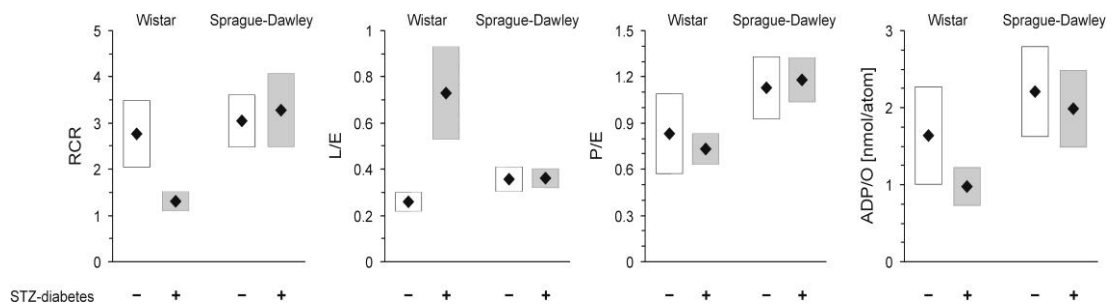
1. Pora roku, w czasie której wykonuje się eksperyment ma bardzo istotny wpływ na jakość pozyskiwanych danych. Wydaje się to zastanawiające, aby prowadzenie badań laboratoryjnych w 'zamkniętych' zwierzętarniach, w których teoretycznie powinny panować identyczne warunki środowiskowe bez względu na zmieniającą się porę roku, obciążone było tak dużymi różnicami w wartościach uzyskiwanych danych. Niemniej jednak, wydaje się wielce uzasadniony podział danych ze względu na 'czas', w którym zostały one zebrane, tym bardziej, jeśli chcemy między sobą porównać dane pochodzące z różnych okresów trwania badania i wykonywania eksperymentów.

Stwierdzono, że parametry wydajności oddechowej mitochondriów izolowanych od zwierząt pobieranych z hodowli jesienią i zimą są nie tylko obniżone w porównaniu z tymi ocenianymi u zwierząt pozyskiwanych w okresie wiosennym, ale też łatwiej jest odrzucić hipotezę zerową o braku różnic tzn. udowodnić wpływ (zarówno pozytywny jak i negatywny) badanych związków u tych pierwszych. Zaobserwowano, że mitochondria pozyskiwane/izolowane i badane w okresie wiosenno-letnim charakteryzują się sprawniejszą

wydajnością bioenergetyczną i nie są wrażliwe na działanie innych czynników w takim stopniu, jak mitochondria pozyskiwane w okresie jesienno-zimowym. Innym przykładem potwierdzającym tę tezę jest ocena parametru IC_{50} zmian potencjału mitochondrialnego pod wpływem czynników cytotoksycznych. Wartości IC_{50} okazały się diametralnie różne w zależności od tego, w jakim sezonie zostały zebrane dane. Wpływ sezonowości na wybrane parametry bioenergetyki mitochondrialnej został szczegółowo omówiony w pracach **Siewiera i Łabieniec-Watała, 2012; Łabieniec-Watała i wsp., 2014 oraz Łabieniec-Watała i Watała, 2014** (w recenzji).

Pierwsze dane literaturowe świadczące o potencjalnym wpływie sezonowości na zwierzęta laboratoryjne pojawiły już się w latach 40-tych ubiegłego stulecia (Davis i Hall, 1948). Kolejne prace na ten temat pochodzą z lat 70-tych (Mock i Frankel, 1972). Później, przez długie lata problem „nie był zauważany”, ale w ostatnim czasie coraz więcej badaczy zwraca uwagę na rozbieżność pozyskiwanych danych w zależności od pory roku, w jakiej wykonują swoje badania z udziałem zwierząt laboratoryjnych (myszy, szczury, króliki) (Masumara i wsp., 1992; Mujkosova i wsp., 2008; Konior i wsp., 2011).

2. Szczep krewniaczy szczurów, który wykorzystuje się do badań, może wpłynąć na interpretację działania badanych związków. Udało mi się zauważyć, że bez względu na porę roku, szczury Wistar okazały się wrażliwsze, zarówno na tę dawkę STZ stosowaną do indukowania cukrzycy, jak i na działanie badanych związków, w porównaniu ze szczurami Sprague-Dawley. Jako potwierdzenie dla tych obserwacji, na Ryc. 3 przedstawiono różnice wartości niektórych parametrów bioenergetyki mitochondrialnej u szczurów ww. stad krewniaczych, którym podawano streptozotocynę. Dane pochodzą z eksperymentu, w którym badania prowadzono równolegle na szczurach Wistar i Sprague-Dawley, wiosną 2010 r.



Ryc. 3. Wpływ streptozotocyny (STZ) na wybrane parametry bioenergetyki mitochondriów kardiomiocytarnych u szczurów Wistar i Sprague-Dawley. Wykres pochodzi z pracy **Łabieniec-Watała i Watała, 2014** (w recenzji).

3. Stwierdzono, że u szczurów Wistar większość przebadanych parametrów bioenergetyki mitochondrialnej uległa zmianie pod wpływem podania STZ oraz indukcji cukrzycy w porównaniu z parametrami mitochondriów izolowanych od zwierząt nietraktowanych STZ. Ponadto, zauważono, że o ile u szczurów Wistar można udowodnić negatywny wpływ cukrzycy streptozotocynowej na wydajność oddechową kardiomiocytów, o tyle u szczurów Sprague-Dawley nie obserwuje się negatywnego wpływu podanej STZ (i cukrzycy) na mitochondria.
4. W literaturze panuje pogląd, że szczury Sprague-Dawley są zwierzętami mniej wrażliwymi na zmienne warunki środowiskowe i dlatego jest uzasadnione stosowanie ich w badaniach dotyczących takiego modelu, jak cukrzyca długotrwała i nieleczona³ (Przygodzki i wsp., 2010). Niemniej jednak, warto podkreślić fakt, iż wśród badaczy indukujących cukrzycę za pomocą streptozotocyny w modelach zwierzęcych, częstość korzystania ze szczurów Wistar i szczurów Sprague-Dawley, jest mniej więcej jednakowa.

BADANIA *IN VITRO* A BADANIA *IN VIVO* – PRZEMYŚLENIA

Po wielu latach prowadzenia prac doświadczalnych w systemie *in vitro*, jak i *in vivo* oraz po zebraniu oraz porównaniu danych z obu sposobów prowadzenia badań, zaczęłam się zastanawiać nad użytecznością badań *in vitro* w kontekście badań *in vivo*. Najczęściej,

³ Korzystając ze szczurów Sprague-Dawley w doświadczeniach dotyczących tego typu patologii zyskujemy większą gwarancję, że zwierzęta dożyją do końca eksperymentów, na czym zależy każdemu badaczowi. Zbyt wysoka śmiertelność, spowodowana na przykład podwyższoną wrażliwością na indukowaną przez streptozotocynę cukrzycę, może przyczynić się do zbyt niskiej (z punktu widzenia statystyki) liczby danych uzyskanych na etapie zakończenia prac eksperymentalnych, i tym samym obniżyć wiarygodność wyciąganych wniosków (Siewiera i Łabieniec-Watała, 2012).

wiedzę o badanych przez nas zjawiskach oraz testowanych związkach czerpiemy – przynajmniej na początku, z badań *in vitro*, czyli tzw. badań podstawowych, w których wiele zmiennych z reguły jesteśmy w stanie bardzo dokładnie określić już na etapie planowania. Zaletą takiego sposobu prowadzenia prac eksperymentalnych jest kontrola nad warunkami, w których pracujemy (np. temperaturą, wilgotnością, pH środowiska, czasem inkubacji, wyborem stężeń, itp.). Łatwiej wówczas ‘wyeliminować’ udział wszystkich tych zmiennych, które mogą - w naszej opinii, stanowić tzw. zmienne zakłócające (*confounders*), a zatem, mogą w jakiś sposób wpływać na jakość pozyskiwanych danych, a tym samym często na wiarygodność budowanych wniosków. Nieco trudniej pracuje się z materiałem biologicznym pozyskiwanym od organizmów żywych (zwierzęta, człowiek), gdy prowadzimy badania *in vivo*. Nawet jeśli nadal staramy się sprawować kontrolę nad warunkami naszych badań eksperymentalnych, to na wiele zmiennych nie mamy wpływu. Tym bardziej, gdy testujemy nowo badane związki, aplikując je organizmom żywym (poziom badań przedklinicznych czy klinicznych), wówczas często możemy się jedynie domyślać, w jaki sposób działa badana substancja. Dysponujemy efektem jej aktywności, ale nie jesteśmy często w stanie jednoznacznie wypowiedzieć się np. o mechanizmie działania, biodystrybucji, farmakokinetyce czy metabolizmie badanego związku. Mając to na uwadze, z pewnością warto równolegle prowadzić badania zarówno w systemie *in vitro*, jak i *in vivo*. Niemniej jednak, co zauważa już wielu badaczy, trudno jest przekładać wyniki pozyskiwane z badań *in vitro* na badania *in vivo*, czy planować badania *in vivo* w oparciu o te dane, które pozyskujemy w badaniach *in vitro*. Z tego samego powodu, jakakolwiek bezkrytyczna ekstrapolacja wyników badań modelowych na układy badawcze *in vivo* może się okazać dalece zwodnicza. Główny problem polega na tym, że do doświadczeń eksperymentalnych *in vitro* bardzo często stosujemy związki w stężeniach dużo wyższych, aniżeli dawki, w jakich będą one później aplikowane w badaniach *in vivo*. Wyciągając zatem wnioski z badań *in vitro* trzeba być świadomym tego, że przedstawiamy interpretacje dotyczącą aktywności biologicznej związku, której nigdy (lub prawie nigdy) nie uda nam się potwierdzić w badaniach *in vivo* replikując warunki badania/pomiaru.

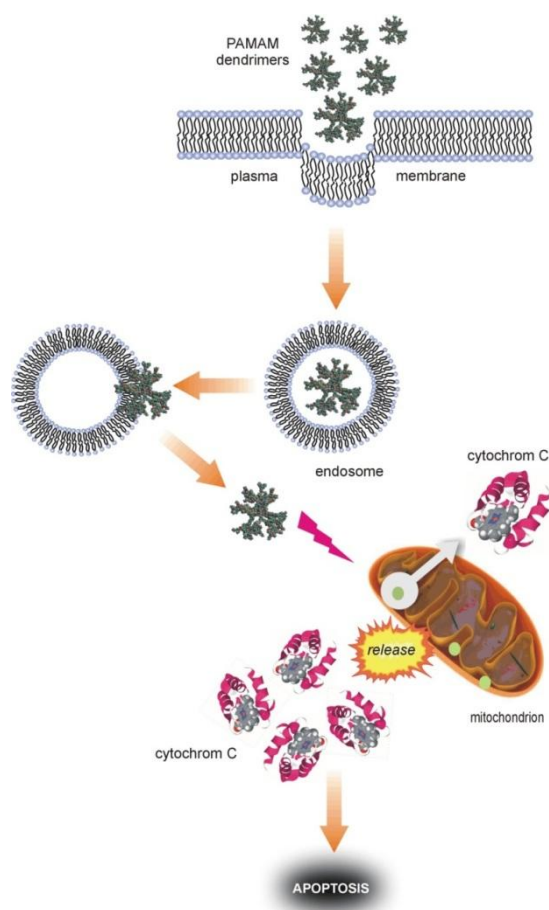
Wiedzę o dendrymerach PAMAM pozyskiwano jak dotąd głównie z badań *in vitro*. Do chwili obecnej pojawiło się w literaturze ok. 2500 prac nt. dendrymerów PAMAM, z czego jedynie

niecałe 200 prac (niespełna 8%) dotyczy ich wykorzystania w badaniach *in vivo*⁴. W związku z tym, trzeba mieć świadomość tego, że niektóre informacje dotyczące aktywności dendrymerów i ich właściwości mogą nie znaleźć swojego potwierdzenia w badaniach o charakterze przedklinicznym i klinicznym.

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem wśród badaczy cieszą się mitochondria. Dlatego również dendrymery PAMAM zostały przebadane w aspekcie ich potencjalnych oddziaływań z tymi organellami komórkowymi. Istnieją dwie odmienne strategie badań dendrymerów w takich badaniach. Po pierwsze, niejako z racji funkcji, jakie dendrymery mają pełnić w organizmie (przenośniki leków, przenośniki genów, leków samych w sobie, itp.) ważne jest aby udowodnić, że dendrymery nie wpływają negatywnie na funkcjonowanie mitochondriów (działanie niepożądane). Z drugiej strony, gdy dendrymerom stawia się za zadanie udział lub współudział w terapii przeciwnowotworowej i oczekuje się po tych związkach, że wykażą się one aktywnością anty-nowotworową (m.in. pro-apoptotyczną), wówczas wskazane jest wykazanie, że dendrymery uszkodzając mitochondria (poprzez obniżenie potencjału mitochondrialnego czy zahamowanie wydajności oddechowej mitochondriów), przyczyniają się do przyspieszonej śmierci komórki nowotworowej (działanie pożądane). Obecnie, dysponujemy wiedzą, która wskazuje na to, że dendrymery PAMAM są w stanie oddziaływać bezpośrednio z mitochondriami i przyczyniać się do zaburzenia ich funkcjonowania. Konsekwencją tych interakcji jest uszkodzenie mitochondriów i śmierć komórki (nekroza i apoptoza). Idea aktywności pro-apoptotycznej dendrymerów PAMAM została przedstawiona na Ryc. 4, w oparciu o dane literaturowe, które pojawiły się na ten temat (Lee i wsp., 2009). Stwierdzono, że dendrymery po wnikięciu przez błonę komórkową zamykane są w endosomie i transportowane do wnętrza komórki. W pobliżu mitochondriów opuszczają endosom i gdy są w odpowiednio wysokim stężeniu przyczyniają się do obniżenia potencjału mitochondrialnego i uwolnienia cytochromu c oraz innych czynników pro-apoptotycznych, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Takie działanie dendrymerów PAMAM może być uważane zarówno za zjawisko pozytywne, jak i negatywne. Niemniej jednak, gdy zadamy sobie pytanie, 'w jakich stężeniach musimy zastosować dendrymery', aby uzyskać opisywany wyżej efekt, uznamy, że uzyskanie takich dawek w organizmie nie jest raczej możliwe. Lee i wsp. (2009) musieli użyć dendrymer PAMAM G4 w stężeniu 2-4 mg/ml aby zaobserwować spadek potencjału mitochondrialnego. Aby

⁴ Stan wiedzy z czerwca 2014 r. na podstawie Web of Science.

zaobserwować jego działanie pro-apoptotyczne, dendrymer G4 musiałby zostać zastosowany w stężeniu co najmniej 20 mg/ml, a inkubacja z dendrymerem musiałaby trwać od 24 do 48 godzin. Przyglądając się tym stężeniom oraz stężeniom stosowanym w innych pracach (Mukherjee i wsp., 2010; Halets i wsp., 2013), nietrudno jest się domyślić, że efekty aktywności dendrymerów PAMAM, obserwowane w warunkach *in vitro*, trudno będzie powielić w warunkach *in vivo*. Na potwierdzenie tego stwierdzenia, przedstawiam wpływ dendrymeru PAMAM G2 na wybrane parametry bioenergetyki mitochondriów kardiomiocytarnych izolowanych od zwierząt zdrowych i zwierząt z cukrzycą. Dendrymer był podawany dootrzewnowo szczurom Sprague-Dawley, przez 60 dni w dawce 40 mg/kg m.c. (Łabieniec-Watała i wsp., 2013).



Ryc. 4. Graficzna prezentacja pro-apoptotycznej aktywności dendrymerów PAMAM. Rysunek ten został zaczerpnięty z Łabieniec-Watała i wsp., 2013.

Pomimo, że dendrymer PAMAM G2 został zastosowany w dość wysokiej dawce, a w dodatku podawany był codziennie, nie wykazano jego pro-apoptotycznej aktywności. Zaobserwowano jedynie podwyższony poziom ADP/O u zwierząt z cukrzycą suplementowanych dendrymerem G2 w porównaniu z grupą zwierząt cukrzycowych, które nie przyjmowały dendrymeru. Jak to już zostało wspomniane wcześniej, w prowadzonych przeze mnie badaniach *in vivo*, nie wykazałam nigdy aż tak destrukcyjnego działania dendrymerów PAMAM na mitochondria, jakie wyłania się na podstawie badań *in vitro* wykonywanych z wykorzystaniem tych związków. Należy się zatem głęboko zastanowić, czy formułowanie stwierdzeń na temat pro-apoptotycznych właściwości dendrymerów PAMAM jest tylko 'modelową fikcją', czy też faktem, który rzeczywiście może wydarzyć się w organizmie. Sugestia ta prawdopodobnie nie dotyczy tylko omówionych tu oddziaływań dendrymerów z mitochondriami, ale wszystkich innych badań, np. oceny toksyczności czy interakcji z białkiem.

Od dawna istnieje tendencja, zauważana powszechnie w artykułach opisujących wyniki badań *in vitro*, polegająca na tym, iż na podstawie tak zebranych danych, konstruuje się wnioski, które wskazują na pozornie możliwe kliniczne wykorzystanie dendrymerów w niedalekiej przyszłości. Niemniej jednak, osobiście uważam, że są to zbyt daleko posunięte dywagacje, które w wielu przypadkach mogą nie znaleźć lub już nie znajdują potwierdzenia w badaniach o wyższym stopniu praktyczności (np. klinicznych). Stwierdzam zatem, że warto planować badania *in vitro* korzystając z danych badań *in vivo*. Można wówczas z większą precyzją ustalić wybór stężeń do badań, czy czas inkubacji z materiałem biologicznym, nie narażając się na wykonywanie kosztownych badań, które mogą niewiele wnieść do wiedzy o testowanych związkach czy badanych zjawiskach. Porównanie wyników pozyskanych w modelu *in vitro* z wynikami modelu *in vivo* przedstawiono i opisano w **Siewiera i Labieniec-Watała, 2012.**

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie całkowitych generacji dendrymerów PAMAM w terapii cukrzycy w modelu eksperymentalnej hiperglikemii było nowatorskim pomysłem nie podjętym jak dotąd przez żadne inne laboratorium⁵. W ciągu kilku ostatnich lat, dużą przygodą intelektualną i wyzwaniem było dla mnie prowadzenie badań z wykorzystaniem tych związków właśnie w takim modelu. W następstwie prowadzonych przez kilka lat badań znaleziono wiele argumentów przemawiających na niekorzyść dendrymerów PAMAM, w kontekście przedstawionej idei ich wykorzystania i obecnego stanu wiedzy na ich temat. Udało się wprawdzie wykazać, iż dendrymery PAMAM są w stanie znacząco obniżyć markery hiperglikemii (co wiele razy udowodniłam zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*), a to mogłoby potencjalnie implikować wymierną korzyść w postaci znaczącego opóźnienia występowania powikłań późnocukrzycowych), jednak ich toksyczny wpływ w dużej mierze umniejsza znaczenie praktyczne takiej korzyści. U źródeł niepowodzenia w pełnej optymalizacji warunków takiej potencjalnej terapii może leżeć kilka czynników. Po pierwsze, to sama polikationowa budowa tych związków. Polikationowość, która jest „niekłamanym utrapieniem” dla jakichkolwiek planów farmakoterapeutycznych, stanowiąc najprawdopodobniej w najpoważniejszym stopniu o toksyczności dendrymerów PAMAM pełnych generacji, jest jednocześnie warunkiem ich dużej skuteczności w minimalizowaniu skutków hiperglikemii. Jakikolwiek modyfikacje powierzchniowych grup aminowych i redukcja tym sposobem toksyczności dendrymerów PAMAM, wiąże się nieuchronnie z mniejszą nukleofilowością związków i gorszym wiązaniem wolnej glukozy. Po drugie, do pełnego obrazu na pewno brakuje zweryfikowania jeszcze innych sposobów podawania dendrymerów, poza tymi, które przebadalam i porównalam w moich badaniach. Dobierając trzy przykładowe sposoby administracji badanych związków (najczęściej spotykane w literaturze przedmiotu) wskazałam, że czynnik taki jak sposób podawania istotnie waży, zarówno w kwestii minimalizacji toksyczności, jak i optymalizacji skuteczności tych związków. Po trzecie, na pewno pożądanym byłoby przeprowadzenie równoległych badań porównujących działania pożądane i niepożądane PAMAM G2, G3 i G4 w celu optymalizacji stężenia dendrymerów PAMAM jako czynnika hipoglikemizującego. Mam bowiem

⁵ W 2011 r. Dong i wsp., w pracy „Polyamidoamine dendrimers can improve the pulmonary absorption of insulin and calcitonin in rats”, *J.Pharm.Sci.*, 100, 1866-1878, wykazali, że dendrymery PAMAM wspomagają wchłanianie insuliny z płuc, bez uszkodzenia błony komórkowej. Badania przeprowadzono na szczurach Wistar.

świadomość, że do zaobserwowanej toksyczności badanych dendrymerów mogła się także przyczynić zbyt wysoka zastosowana dawka jednorazowa lub kumulatywna. Z drugiej strony, na podstawie zebranych wyników mogę stwierdzić, że dendrymery PAMAM, aby skutecznie obniżały markery hiperglikemii w cukrzycy, powinny raczej być stosowane w wyższych, aniżeli w zbyt niskich dawkach. Ogólnie, te dwie strategie: (a) wystarczającej skuteczności w procesie 'zmiatania' nadmiaru wolnej glukozy oraz (b) minimalnej (cyto)toksyczności trudno w chwili obecnej pogodzić.

EWENTUALNE WYKORZYSTANIE WYNIKÓW STANAOWIĄCYCH MOJE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Potencjalnym zastosowaniem dendrymerów PAMAM w terapii przeciwcukrzycowej zainteresowanych jest wiele firm farmaceutycznych, zarówno w Polsce, jak i zagranicą. Pomysł ten został dobrze przyjęty także przez obecnych na Międzynarodowych Targach BioForum, które odbyły się w Łodzi (maj, 2010). Podczas spotkań partnerskich Bio-Partnering, które były składową BioForum, udało mi się zorientować, że wola stworzenia i zastosowania nowych związków, które dobrze rokują w leczeniu zaburzeń metabolizmu glukozy, jest duża. A każda nowa substancja, która w leczeniu cukrzycy (nawet jeśli tylko na poziomie eksperymentalnym) daje obiecujące wyniki, staje się w oczach przedsiębiorców, potencjalnym farmaceutykiem. Mam zatem świadomość, że moje badania wpisują się w działania na polu biomedycznym, a cukrzyca jest chorobą cywilizacyjną, na którą cierpią miliony osób na całym świecie. Wykazanie zatem na żywym organizmie, że dendrymery PAMAM całkowitych generacji posiadają aktywność hipoglikemizującą, czyni z tych związków ciekawy obiekt zainteresowania, nie tylko dla uczonych, ale także dla firm, które poszukują nowych rozwiązań w leczeniu chorób, takich m.in. jak cukrzyca. Jeszcze w latach 50-tych XX wieku⁶, wyniki stanowiące 'Osiągnięcie Naukowe', opisane na stronach tego Autoreferatu, mogłyby stanowić podstawę do nowych, innowacyjnych formułacji farmakoterapeutycznych, i zyskać zainteresowanie wśród lekarzy diabetologów oraz osób chorujących na cukrzycę. W tamtych czasach bowiem, zdecydowanie mniejszą uwagę zwracano na tzw. efekty uboczne, jakie towarzyszyły przyjmowaniu niektórych farmaceutyków. „Czarny okres w diabetologii” właśnie stąd wzięła swoją nazwę, iż wprowadzono wtedy na rynek wiele leków, które pomimo swych hipoglikemizujących właściwości, wykazywały także niepożądane działania kardiotoxyczne, hepatotoxyczne, czy nefrotoksyczne. Dzisiaj bardzo dużą uwagę przywiązuje się do tego, by nowy produkt - zanim pojawi się w sprzedaży jako 'lek', był poddany wielu badaniom i testom oraz spełnił wiele ostrych kryteriów bezpieczeństwa. Biorąc takie kryteria pod uwagę, należy uznać, że dendrymery PAMAM nie spełniają obecnie podstawowych wymagań stawianym grupie potencjalnych związków, które

⁶ Dendrymery PAMAM całkowitych generacji po raz pierwszy zostały zsyntetyzowane dopiero w 1979 r.

w przyszłości mogłyby zaistnieć w świadomości lekarzy jako farmaceutyki przydatne w ograniczaniu, zapobieganiu i leczeniu powikłań związanych z cukrzycą.

Niemniej jednak, wartością samą w sobie zaprezentowanych badań, jest wskazanie na zupełnie nowe wykorzystanie tych związków i zwrócenie uwagi na to, że dendrymery PAMAM to nanocząstki o wielu możliwościach aplikacyjnych. **Pozyskane wyniki stanowią ponadto, bardzo bogate i ważne źródło wiedzy na temat wpływu dendrymerów na organizm żywy, tym bardziej, że wciąż dysponujemy stosunkowo małą liczbą prac na temat aktywności dendrymerów w badaniach *in vivo*.** Cenne są zwłaszcza te dane, które odnoszą się nie tylko do oceny toksyczności (przeżywalność zwierząt, pomiar masy), ale także do określenia wpływu tych związków na inne parametry, takie jak: morfologia krwi, biochemia, markery glikemii i stresu oksydacyjnego, czy pomiary bioenergetyki mitochondrialnej. Jak do tej pory, badania, które przeprowadziłam z udziałem dendrymerów PAMAM, to jedyne takie doświadczenia, w których dendrymer podawany był codziennie przez kolejnych 60 dni. Taki sposób przeprowadzenia eksperymentów, pozwala zorientować się z jakimi objawami i/lub skutkami ubocznymi należałoby się liczyć, gdyby dendrymery miały być stosowane systematycznie przez dłuższy czas.

CHARAKTERYSTYKA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. Wskazano nowe biomedyczne zastosowanie dla całkowitych generacji dendrymerów PAMAM.
 2. Opisano działanie dendrymerów PAMAM jako inhibitorów postsyntetycznych, nieenzymatycznych modyfikacji biomakrocząsteczek oraz zgromadzono dane badań podstawowych i przedklinicznych wspierających tę ideę.
 3. Wykazano, że sposób podawania dendrymerów, a nie jedynie ich dawka może mieć istotny wpływ na skuteczność ich działania.
 4. Po raz pierwszy oceniono wpływ dendrymerów na funkcjonowanie i bioenergetykę mitochondriów w modelu *in vivo* (zwierzęta zdrowe i z modelową patologią).
 5. Zaobserwowano, że odpowiedź zwierząt na badane związki zależy od pory roku. Zwierzęta są bardziej wrażliwe gdy podaje im się związki jesienią i zimą oraz bardziej odporne na terapię, gdy badania prowadzone są wiosną i latem.
-

Literatura:

- Barnaby, O.S., Cerny, R.L., Clarke, W., Hage, D.S. (2011). Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 412, 277-285.
- Davis, D. E., Hall, O. (1948). The seasonal reproductive condition of male brown rats in Baltimore, *Maryland Physiology and Zoology*, Vol. 21, 272-282.
- Dobrovolskaia, M.A., Patri, A.K., Simak, J., Hall, J.B., Semberova, J., De Paoli Lacerda, S.H., McNeil, S.E. (2012). Nanoparticle Size and Surface Charge Determine Effects of PAMAM Dendrimers on Human Platelets in Vitro. *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 9, 382-393.
- Dong, Z., Hamid, K.A., Gao, Y., Lin, Y., Katsumi, H., Sakane, T., Yamamoto, A. (2011). Polyamidoamine dendrimers can improve the pulmonary absorption of insulin and calcitonin in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 100, 1866-1878.
- Drzewoski, J. (2013). Racjonalne podstawy stosowania doustnych leków przeciwcukrzycowych. *Termedia Wydawnictwa Medyczne*, ISBN: 9788363622220.
- Giri, J., Diallo, M.S., Simpson, A.J., Liu, Y., Goddard III, W.A., Kumar, R., Woods, G.C. (2011). Interactions of poly(amidoamine) dendrimers with human serum albumin: Binding constants and mechanisms. *ACS Nano*, Vol. 5, 3456-3468.
- Gupta, U., Agashe, H.B., Asthana, A., Jain, N.K. (2006). A review of in vitro-in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Vol. 2, 66-73.
- Halets, I., Shcharbin, D., Klajnert, B., Bryszewska, M. (2013). Contribution of hydrophobicity, DNA and proteins to the cytotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 454, 1-3.
- Jones, C.F., Campbell, R.A., Franks, Z., Gibson, C.C., Thiagarajan, G., Vieira-de-Abreu, A., Sukavaneshvar, S., Mohammad, S.F., Li, D.Y., Ghandehari, H., Weyrich, A.S., Brooks, B.D., Grainger, D.W. (2012). Cationic PAMAM Dendrimers Disrupt Key Platelet Functions. *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 9, 1599-1611.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, Vol. 21, 1414-1431.
- Klajnert, B., Stanisławska, L., Bryszewska, M., Palecz, B. (2003). Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1648, 115-126.
- Klajnert, B., Bryszewska, M. (2006). Dendrimers in Medicine. ISBN: 9781600216640.
- Konior, A., Klemenska, E., Brudek, M., Podolecka, E., Czarnowska, E., Beresewicz, A. (2011). Seasonal Superoxide Overproduction and Endothelial Activation in Guinea-Pig Heart; Seasonal Oxidative Stress in Rats and Humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 50, 686-694.
- Kubik, L. (2004). The metabolic syndrome – Epidemic of XXI century. *Polski Merkuriusz Lekarski*, Vol. 17, 109-113.
- Łabieniec, M., Ulicna, O., Vancova, O., Glowacki, R., Sebekova, K., Bald, E., Gabryelak, T., Watała, C. (2008). PAMAM G4 dendrimers lower high glucose but do not improve reduced survival in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 364, 142-149.
- Łabieniec, M., Watała, C. (2009). PAMAM dendrimers - diverse biomedical applications. Facts and unresolved questions. *Central European Journal of Biology*, Vol. 4, 434-451.

- Łabieniec, M., Watała, C. (2010). Use of poly(amido)amine dendrimers in prevention of early non-enzymatic modifications of biomacromolecules. *Biochemie*, Vol. 92, 1296-1305.
- Łabieniec, M., Ulicna, O., Vancova, O., Kucharska, J., Gabryelak, T., Watała, C. (2010). Effect of poly(amido)amine (PAMAM) G4 dendrimer on heart and liver mitochondria in an animal model of diabetes. *Cell Biology International*, Vol. 34, 89-97.
- Łabieniec-Watała, M., Siewiera, K., Gierszewski, S., Watała, C. (2012). Mitochondria Function in Diabetes – From Health to Pathology – New Perspectives for Treatment of Diabetes-Driven Disorders. W "Biomedical Science, Engineering and Technology", 123-150. (INTECH, Open Access Publisher).
- Łabieniec-Watała, M., Karolczak, K., Siewiera, K., Watała, C. (2013). The Janus Face of PAMAM Dendrimers Used to Potentially Cure Nonenzymatic Modifications of Biomacromolecules in Metabolic Disorders—A Critical Review of the Pros and Cons. *Molecules*, Vol. 18, 13769-13811.
- Łabieniec-Watała, M., Przygodzki, T., Sebekova, K., Watała, C. (2014). Can metabolic impairments in experimental diabetes be cured with poly(amido)amine (PAMAM) G4 dendrimers? - In the search for minimizing of the adverse effects of PAMAM administration. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 464, 152-167.
- Łabieniec-Watała, M., Watała, C. PAMAM dendrimers: destined for success or doomed to fail? Opportunities, limitations, challenges and perspectives of plain and modified amine-terminated PAMAM dendrimers in the context of their biomedical applications. (under review).
- Lee, J-H., Cha, K.A., Kim, S.A., Hong, H.W., Chung, D.J., Ryu, G., Myung, H. (2009). Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, Vol. 190, 202-207.
- Lesniak, W.G., Mishra, M.K., Jyoti, A., Balakrishnan, B., Zhang, F., Nance, E., Romero, R., Kannan, S., Kannan, R.M. (2013). Biodistribution of fluorescently labeled PAMAM dendrimers in neonatal rabbits: Effect of neuroinflammation. *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 10, 4560-4571.
- Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., Duncan, R. (200). Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release*, Vol. 65, 133-148.
- Masumura, S., Furui, F., Hashimoto, M., Watanabe, T. (1992). The Effects of Season and Exercise on the Levels of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids and Lipoprotein Cholesterol in Young Rats. *Biochimica and Biophysica Acta: Lipids and Lipid Metabolism*, Vol. 1125, 292-296.
- Menjoge, A.R., Kannan, R.M, Tomalia, D.A. (2010). Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*, Vol. 5, 171-185.
- Mock, E.J., Frankel, A.I. (1978). A Seasonal Influence on Testes Weight and Serum Gonadotropin Levels of the Mature Male Laboratory Rat. *Biology Reproduction*, Vol. 18, 772-778.
- Mujkosova, J., Ferko, M., Humenik, P., Waczulikova, I., Ziegellhofer, A. (2005). Seasonal variations in properties of healthy and diabetic rat heart mitochondria: Mg²⁺-ATPase activity, content of conjugated dienes and membrane fluidity. *Physiological Research*, Vol. 57, S75-S82.
- Mukherjee, S.P., Davoren, M., Byrne, H.J. (2010). In vitro mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers – Towards quantitative structure activity relationships. *Toxicology in Vitro*, Vol. 24, 169-177.
- Navarro, G., de Ilarduya, C.T. (2009). Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Vol. 5, 287-297.

- Okuda, T., Kawakami, S., Maeie, T., Niidome, T., Yamashita, F., Hashida, M. (2006). Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration. *Journal of Controlled Release*, Vol. 114, 69-77
- Piwowar, A. (2010). Zaawansowane produkty utleniania białek. Część I. Mechanizm powstawania, struktura i właściwości. *Polski Merkuriusz Lekarski*, Vol. 28, 166-169.
- Prieto, M.J., Temprana, C.F., del Río Zabala, N.E., Marotta, C.H., del Valle Alonso, S. (2011). Optimization and in vitro toxicity evaluation of G4 PAMAM dendrimer-isperidone complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 46, 845-850.
- Przygodzki, T., Kazimierczak, P., Sikora, J., Watała, C. (2010). 1-methylnicotinamide effects on the selected markers of endothelial function, inflammation and haemostasis in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 640, 157-162.
- Ravelojaona, V., Peterszegi, G., Molinari, J., Gesztesi, J.L., Robert, L. (2007). Demonstration of the cytotoxic effect of Advanced Glycation Endproducts (AGE-s). *Journal de la Societe de Biologie*, Vol. 201, 185-188.
- Roberts, J.C., Bhalgat, M.K., Zera, R.T. (1996). Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 30, 53-65.
- Sadekar, S., Ghandehari, H. (2012). Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: Implications for oral drug delivery. *Advances Drug Delivery Reviews*, Vol. 64, 571-588.
- Sell, D.R., Lane, M.A., Johnson, W.A., Masoro, E.J., Mock, O.B., Reiser, K.M., Fogarty, J.F., Cutler, R.G., Ingram, D.K., Roth, G.S., Monnier, V.M. (1996). Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 93, 485-490.
- Sekowski, S., Buczkowski, A., Palecz, B., Gabryelak, T. (2011). Interaction of polyamidoamine (PAMAM) succinamic acid dendrimers generation 4 with human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 81, 706-710.
- Siewiera, K., Labieniec-Watała, M. (2012). Ambiguous effect of dendrimer PAMAM G3 on rat heart respiration in a model of an experimental diabetes - Objective causes of laboratory misfortune or unpredictable G3 activity? *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 430, 258-265.
- Shcharbin, D., Janicka, M., Wasiak, M., Palecz, B., Przybyszewska, M., Zaborski, M., Bryszewska, M. (2007). Serum albumin have five sites for binding of cationic dendrimers. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1774, 946-951.
- Tomalia, D.A., Baker, J.R., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1984). New class of polymers: STARBURST-dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, Vol. 17, 117-132.
- Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., Holman, R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA*, Vol. 281, 2005-2012.
- Urios, P., Grigorova-Borsos, A.M., Peyroux, J., Sternberg, M. (2007). Inhibition of advanced glycation by flavonoids. A nutritional implication for preventing diabetes complications?. *Journal de la Societe de Biologie*, Vol. 201, 189-198.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Studia ukończyłam w roku 2001 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) na Uniwersytecie Łódzkim. Pracę magisterską wykonałam w **Katedrze Termobiologii** pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Józwiak i opieką dr Marii Przybylskiej. W czasie studiów uczestniczyłam w działalności *Koła Młodych Biofizyków*, a moje zainteresowania naukowe dotyczyły zagadnień związanych z rolą siarczanu cholesterolu w modulowaniu aktywności przeciwnowotworowej akklarubicyny. Badania wykonywałam na linii komórkowej B14 (immortalizowane komórki chomika chińskiego).

W roku 2001 zostałam słuchaczką *Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii* Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską wykonałam w **Katedrze Biofizyki Ogólnej** pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Gabryelak. Celem moich badań była ocena wpływu trzech wybranych polifenoli (kwasów fenolowych: taninowego, elagowego i galusowego) na podstawowe parametry funkcji komórek małży (*Unio tumidus*) oraz immortalizowanych komórek chomika chińskiego (linia komórkowa B14). Swoją uwagę skupiałam na oddziaływaniach polifenoli z błoną komórkową, białkami i DNA (**Labieniec i wsp., 2003; Labieniec i Gabryelak, 2003; Labieniec i Gabryelak, 2004; Labieniec i Gabryelak, 2006a**). Ponadto, oceniałam charakter i mechanizm interakcji badanych kwasów fenolowych, także w obecności jonów Ca^{2+} i H_2O_2 , z białkami i DNA ww. komórek (**Labieniec i Gabryelak, 2005; Labieniec i Gabryelak, 2006b; Labieniec i Gabryelak, 2006c; Labieniec i Gabryelak, 2007**). W czasie realizowania tematu związanego z moją pracą doktorską, odbyłam krótki staż naukowy (3 tygodnie) we Włoszech na Uniwersytecie w Camerino u prof. Giancarlo Falcioniego. W trakcie pobytu w tym laboratorium wypełniałam zadania badawcze, które były przedmiotem wspólnie realizowanego grantu NATO (No LST.CLG. 978856). Prace eksperymentalne polegały na ocenie wpływu wybranych tanin na erythrocyty izolowane z krwi obwodowej pstrąga. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy Fedeli i wsp., 2004. W 2003 odbyłam kolejny krótki staż naukowy (2 tygodnie) we Francji, w Stacji Morskiej Instytutu Fizjologii i Biologii Morza w Tamaris (filia Uniwersytetu w Lyonie), pod kierunkiem prof. G. Brichona. Moje badania polegały na oszacowaniu wpływu tanin na wybrane parametry komórkowe zwierząt morskich (małże i ryby). W 2004 r. otrzymałam wyróżnienie (nagrodę naukową) przyznaną przez *The Society for Free Radical Research* –

Europe in Recognition of Extraordinary Scientific Achievements in the Field of Free Radical Research za wysoką jakość zaprezentowanych wyników badań doświadczalnych podczas konferencji SFRR-E Summer Meeting: Reactive Oxygen Species and Antioxidants, która odbyła się na UŁ w Łodzi. Pracę doktorską, zatytułowaną „Wpływ wybranych polifenoli naturalnych na komórki trzustko-wątroby małża (*Unio tumidus*) i immortalizowane fibroblasty chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*)”, obroniłam w grudniu 2005 r., a za cykl publikacji związanych z doktoratem zostałam wyróżniona nagrodą naukową III stopnia, przyznaną przez Rektora UŁ w październiku 2006 r.

Literatura:

Fedeli, D., Berrettini, B., Gabryelak, T., Falcioni G. (2004). The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutation Research*, Vol. 11, 89-96.

Łabieniec, M., Gabryelak, T., Falcioni, G. (2003). Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research*, Vol. 539, 19-28.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2003). Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutation Research*, Vol. 539, 127-35.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2004). Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. *Toxicology in Vitro*, Vol. 18, 773-81.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2005). Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicology Letters*, Vol. 155, 15-25.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2006a). Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method, *Journal of Photochemical and Photobiological B*. Vol. 82, 72-78.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2006b). Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives. *Mutation Research*, Vol. 603, 48-55.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2006b). Study of interactions between phenolic compounds and H₂O₂ or Cu(II) ions in B14 Chinese hamster cells. *Cell Biology International*, Vol. 230, 761-768.

Łabieniec, M., Gabryelak, T. (2007). Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu(2+) ions. *Toxicology in Vitro*, Vol. 21, 146-56.

PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA⁷

W marcu 2006 r. zostałam zatrudniona na etacie adiunkta w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. W tym samym roku, w dniach 9-17 czerwca, wzięłam udział w warsztatach naukowych organizowanych przez Instytut Nenckiego w Warszawie (FEBS Advanced Course, "Frontiers in Molecular Biochemistry of Mitochondria"), podczas których „złapałam bakcyła” do badań związanych z mitochondriami. Po powrocie ze szkolenia, swoją aktywność naukową skierowałam m.in. na badania różnych aspektów zaburzeń funkcji mitochondriów w stanach patologicznych. Głównym celem moich badań była ocena wpływu badanych związków (dendryмеры PAMAM, RAG – β -rezorcylidenowa pochodna aminoguanidyny, ekstrakty polifenoli roślinnych) na mitochondria izolowane z tkanek (wątroba, serce i mózg) zwierząt doświadczalnych (szczury Wistar i Sprague-Dawley). Badania prowadziłam zarówno w systemie *in vivo*, jak i *in vitro*. Wspólnym mianownikiem tych badań było zastosowanie tego samego zwierzęcego modelu streptozotocynowej cukrzycy doświadczalnej. Publikacje dotyczące oceny użyteczności dendrymerów PAMAM w ograniczaniu powikłań późnocukrzycowych stanowią moje **OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE** (opisane szczegółowo w pierwszej części Autoreferatu), podczas gdy wyniki badań nad RAG i ekstraktami polifenolowymi (publikacje i zgłoszenia patentowe) stanowią mój *dotatkowy dorobek habilitacyjny*⁸.

W okresie podoktorskim wzięłam udział w 4 warsztatach naukowych (3 w Austrii, 1 w Holandii) dotyczących fizjologii mitochondriów i obsługi oksygrafu Oroboros-2k (instrument wykorzystywany przeze mnie do oceny bioenergetyki mitochondriów) oraz w 2 krótkich stażach podoktorskich (2-4 tygodnie, Francja i Słowacja). Wzięłam także udział w 2 szkoleniach dotyczących podstawowych i zaawansowanych analiz statystycznych organizowanych przez firmę StatSoft Polska w Krakowie. W roku 2011 (Spała/k. Łodzi) i w roku 2012 (Warszawa) uczestniczyłam w szkoleniach dotyczących odpowiednio: przygotowywania ofert biznesowych i umiejętności zarządzania projektami naukowo-biznesowymi oraz w kursach przygotowujących do pisania projektów i artykułów naukowych. W roku 2007 na konferencji w Bratysławie (Słowacja) wygłosiłam wykład o dendrymerach PAMAM w terapii przeciwnowotworowej, w 2012 r. na konferencji w Innsbrucku (Austria)

⁷ Szczegółowe informacje na temat mojej aktywności naukowo-badawczej i organizacyjno-dydaktycznej zamieściłam w Załączniku nr 4.

⁸ Wykaz prac, które stanowią dorobek nie wchodzący w skład 'Osiągnięcia Naukowego' zamieściłam w Załączniku nr 4.

wygłosiłam wykład nt. wpływu zmian warunków laboratoryjnych na metabolizm zwierząt doświadczalnych, natomiast w 2014 r. na konferencji w Utrechcie (Holandia) wygłosiłam wykład nt. wpływu dendrymerów PAMAM na bioenergetykę mitochondriów kardiomiocytarnych izolowanych od szczurów zdrowych i zwierząt z cukrzycą.

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Od początku zatrudnienia na Wydziale BiOŚ UŁ jestem zaangażowana w przygotowanie i realizację zajęć dla studentów z kierunków: *Biologia* (w trybie stacjonarnym i niestacjonarnym), *Biotechnologia* (w trybie stacjonarnym), Genetyka (w trybie stacjonarnym) oraz studiów podyplomowych '*Biologia sądowa*'. Do najważniejszych prowadzonych przeze mnie zajęć należą: ćwiczenia ze '**Statystyki**' (prowadzone na poziomie podstawowym, jak i zaawansowanym), '**Projekty badawcze**' oraz zajęcia fakultatywne dla doktorantów pt. "**Finansowanie badań naukowych**". W roku akademickim 2013/2014 po raz pierwszy zaczęłam prowadzić zajęcia '**Zastosowanie statystyki w kryminalistyce i administracji sądowej**' (ćwiczenia i wykłady) dla słuchaczy kierunku 'Biologia sądowa'. Pragnę podkreślić, że wymienione przedmioty prowadzę zgodnie z zaproponowanymi przez siebie programami autorskimi.

W latach 2009-2012 prowadziłam zajęcia z przedmiotu '**Biologia medyczna**' (wykłady i ćwiczenia) ze słuchaczami kierunku *Fizjoterapii* w Społecznej Wyższej Szkole Przedsiębiorczości i Zarządzania w Łodzi (obecnie Społeczna Akademia Nauk).

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

Od 2006 r. jestem członkiem Zespołu ds. Promocji na Wydziale BiOŚ UŁ (od 2012 r. jest to Komisja ds. Promocji). W ramach pracy w tej Komisji jestem zaangażowana w większość odbywających się imprez o charakterze popularno-naukowym promujących nasz Wydział. Do najważniejszych, w których biorę udział, należą: **Noc Biologów** (jako współorganizator), akcja **UZO** (Uniwersytet Zawsze Otwarty), skierowany do szkół ponadgimnazjalnych), **Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki** w Łodzi (koordynator i uczestnik), **Piknik Naukowy, Salon Maturzysty** i **Targi Wiedzy** (Łódź, Hala EXPO). Ponadto, na bieżąco wygłaszam wykłady o charakterze popularno-naukowym (zarówno na terenie Wydziału jak i poza nim).

ZESTAWIENIE WYBRANYCH OSIĄGNIĘĆ

Całkowity dorobek publikacyjny	32
Dorobek stanowiący OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	9
Liczba prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	10
Liczba prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora (bez dorobku stanowiącego OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE)	13
Sumaryczny <i>impact factor</i> według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania	58.410
Sumaryczny <i>impact factor</i> według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania dla prac stanowiących OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	22.872
Liczba punktów MNiSW (cały dorobek/dorobek OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO)	726/235
Liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science (bez autocytowań)	276
Indeks Hirscha wg bazy Web of Science	11
Liczba projektów (jako koordynator/współwykonawca)	4/3
Udział w radach redakcyjnych czasopism/liczba zrecenzowanych prac	5/21
Liczba zgłoszeń patentowych (krajowe/międzynarodowe)	3/1
Referaty ustne zaprezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych	2/3
Liczba komunikatów zaprezentowana na zjazdach krajowych i zagranicznych	4/5
Współpraca naukowa z ośrodkami w kraju i za granicą	4/4

Łódź, dn. 13.06.2014

M. Łabieniec-Watała