

Maksim Ionov

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

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

Tytuł głównego osiągnięcia naukowego:

**Dendrymery jako potencjalne nośniki peptydów w szczepionce
przeciw wirusowi HIV**

Łódź, 2014

Spis treści

1. Życiorys i dorobek naukowy

1.1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
1.2. Zatrudnienie.....	3
1.3 Treningi i staże.....	3
1.4. Stypendia i nagrody.....	5
1.5. Osiągnięcia dydaktyczne.....	5
1.6. Recenzowanie publikacji.....	5
1.7. Recenzowanie autoreferatów prac doktorskich.....	6
1.8. Udział w projektach badawczych.....	6
1.9. Członkostwo w organizacjach naukowych.....	7
1.10. Współpraca międzynarodowa.....	7

2. Osiągnięcia naukowe

2.1. <i>Publikacje będące podstawą o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego.....</i>	8
2.2. <i>Pozostałe publikacje.....</i>	9
2.3. <i>Rozdziały w książkach.....</i>	12
2.4. <i>Prace opublikowane przed obroną pracy doktorskiej.....</i>	12

3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	15
3.2. Wstęp.....	15
3.4. Aktualny stan wiedzy w obszarze dotyczącym tematu rozprawy habilitacyjnej.....	17
3.3. Obiekt badawczy.....	19
3.5. Układ eksperymentalny.....	20
3.6. Skrócony opis wyników.....	22
3.7. Literatura uzupełniająca.....	27

4. Informacje bibliometryczne

4.1. Indeks Hirscha.....	29
4.2. Wskaźniki Impact Factor, punkty MNiSW oraz liczba cytowań.....	29

1. Życiorys i dorobek naukowy

1.1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Tytuł zawodowy magistra

1994 r. Uniwersytet w Taszkencie, Uzbekistan, Wydział Ochrony Roślin Kierunek: Fitopatologia (specjalność – fitopatologia).

Stopień doktora

2001 r. Instytut Chemii Bioorganicznej Akademii Nauk w Taszkencie, Uzbekistan, Laboratorium Fizyko-Chemicznych Metod Badań, Kierunek: Biologia (doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność – Biofizyka, Chemia Bioorganiczna).

1.2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w placówkach naukowych

2007 r.-obecnie – Uniwersytet Łódzki, Katedra Biofizyki Ogólnej, adiunkt

2005 r. -2007 r. Uniwersytet Mirzo Ulugbeka w Taszkencie, Uzbekistan, Katedra Biofizyki, adiunkt. Instytut Chemii Bioorganicznej Akademii Nauk w Taszkencie, Laboratorium Fizyko-Chemicznych Metod Badań, adiunkt

2000 r.-2005 r. – Instytut Chemii Bioorganicznej Akademii Nauk w Taszkencie, Laboratorium Fizyko-Chemicznych Metod Badań, asystent

1996 r.-2000 r. – Instytut Chemii Bioorganicznej Akademii Nauk w Taszkencie, Stacjonarne Studium Doktoranckie, Biofizyka, Chemia Bioorganiczna, doktorant

1.3. Treningi i staże

2014 Staż naukowy w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś

2014 Czterech miesięczny warsztat szkoleniowy „Asystent Innowacji-2”, Praktyka w przedsiębiorstwie. Fundacja Rozwoju Przedsiębiorczości w Łodzi, Polska

2013 Warsztat szkoleniowy, Zarządzanie projektami badawczymi. Profesjonalny Biznesplan „Komerccjalizacja drogą do sukcesu”. Instytut Fraunhofera w Magdeburgu, Niemcy.

-
- 2013 Warsztat szkoleniowy, Projekt międzynarodowy współfinansowany. Wsparcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla programów Unii Europejskiej. „Zasady pozyskiwania i rozliczania środków” 23/09/2013. Wydział Programów Międzynarodowych MNiSzW. Łódź, Polska.
- 2013 Staż naukowy w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś
- 2013 Staż naukowy w Instytucie Biologii Chemicznej i Medycyny Fundamentalnej Rosyjskiej Akademii Nauk, Nowosybirsk, Rosja
- 2012 Warsztat szkoleniowy, Profesjonalny Biznesplan „Komercjalizacja drogą do sukcesu” Wrocław, Polska
- 2011 II warsztat szkoleniowy, Dendrimers as composites of advanced drug delivery nano systems (aDDnSs) I Warsztat: “Recent advances in Dendrimeric technology” National Hellenic Research Foundation, Grecja
- 2010 Warsztat szkoleniowy, Rezonans magnetyczny w fizyce i biologii. Fundacja Ettore Majorana. NATO ASI, Erice, Włochy
- 2010 Staż naukowy, Uniwersytet im. Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki (Slovak – Polish Research and Development Cooperation), Bratysława, Słowacja
- 2010 Warsztat szkoleniowy (JASCO CD). Spektrometria dichroizmu kołowego. Teoria i praktyka. JASCO, Budapeszt, Węgry
- 2010 Warsztat szkoleniowy (ZS NANO) Zetasizer Nano Instrument (zeta rozmiar, zeta potencjał) A.P. Malvern Instruments Ltd (UK). Teoria i praktyka. Uniejów, Polska
- 2009 Szkolenie “Mechanisms and Consequences of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications” Kemer, Antalia, Turcja
- 2009 Staż naukowy w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Akademia Nauk w Mińsku, Mińsk, Białoruś
- 2009 Staż naukowy, University College London, Institute of Neurology, Department of Molecular Neuroscience. Londyn, Wielka Brytania
- 2008 Staż naukowy, COST (European Cooperation in Science and Technology), Uniwersytet w Atenach, Wydział Technologii Farmaceutycznej, Ateny, Grecja
- 2007 Staż naukowy, Institute of Environmental Sciences, Volcani Center, ARO Bet Dagan, Tel-Aviv, Izrael
- 2006 Staż naukowy, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Spain
- 2006 Staż naukowy, Institute of Environmental Sciences, Volcani Center, ARO Bet Dagan, Tel-Aviv, Izrael

2005 Staż naukowy, Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

2002 Warsztat szkoleniowy, MASHAV Science Educational Program, Bet Dagan, Izrael

1.4. Stypendia i nagrody

2013 Indywidualna nagroda przyznana przez Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ za wyniki publikacyjne w roku 2013

2013 Nagroda Rektora UŁ za osiągnięcia naukowo-badawcze

2012 Indywidualna nagroda przyznana przez Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ za wyniki publikacyjne w roku 2012

2012 grant podróżny (COST) do Laboratorio InmunoBiología Molecular, Gregorio Marañón General Hospital Universitario, Hiszpania, Madryt

2010 grant podróżny (NATO) na udział w ASI, 10th Course: Biophysics and Structure. Ettore Majorana Foundation, Erice, Włochy

2009 grant podróżny (COST) do National and Kapodistrian University of Athens, Farmaceutical Technology, School of Pharmacy, Grecja, Ateny

2008 nagroda: "Best oral presentation" Międzynarodowa konferencja naukowa „Actual problems of ecology” Grodno, Białoruś

2002 nagroda młodego naukowca przyznana przez MASHAV – A.R.O. Volkani, Bet Dagan, Izrael

1996 Dyplom z wyróżnieniem, (N007449 -1586) Uniwersytet w Taszkencie

1.5. Osiągnięcia dydaktyczne

Pomoc w przygotowaniu pracy magisterskiej obronionej z wynikiem dobrym. Dominika Popiel, 2012. „Wpływ dendrymerów GATG [G3]-Mor na proces agregacji peptydu amyloidowego A β ₁₋₄₀”.

Pomoc w przygotowaniu pracy doktorskiej obronionej z wynikiem bardzo dobrym. Mgr. Tomasz Wasiak, 2012. „Badanie dendrymerów fosforowych w aspekcie choroby Alzheimer’a”.

Pomoc w przygotowaniu pracy doktorskiej obronionej z wynikiem bardzo dobrym. Mgr inż. Dominika Wróbel, 2012. „Wpływ kationowych dendrymerów fosforowych na błony erytrocytarne oraz modelowe błony lipidowe”.

1.6. Recenzowanie publikacji

Recenzje dla: Chemical Communications (IF 6.37) 2012, 2013 r.

International Journal of Nanomedicine (IF 4.027) 2013, 2014 r.

Recent Patents on Nanomedicine (Open access) 2014 r.

Journal of Membrane Biology (IF 2.48) 2014 r.

1.7. Recenzowanie autoreferatów prac doktorskich

- 2012 Natallia Shcharbina „Нарушение процессов перекисного окисления липидов, проницаемости гематоэнцефалического барьера и их коррекция при ишемии головного мозга.” Państwowy Ośrodek Naukowo-Badawczy Neurologii i Neurochirurgii, Minsk, Belarus
- 2013 Dzmitry Madras „Функциональная роль системы протеиназы - ингибиторы протеиназ в неспецифических реакциях организма при стрессе.” Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś
- 2014 Eugenij Apartsyn „Мульти-функциональные гибриды НК-конструкций с углеродными нанотрубками.” Instytut Biologii Chemicznej i Medycyny Fundamentalnej Rosyjskiej Akademii Nauk, Nowosybirsk, Rosja.

1.8. Udział w projektach badawczych

1. FP7-PEOPLE-2012-IRSES **NANOGENE** EU-Belarus-Russia Network in Nanomaterials-Driven Anti-Cancer Gene Therapy, 2013-2016.
2. **NCN, HARMONIA**, "Mechanizmy oddziaływań pomiędzy dendrymerami a białkami", Dwustronna współpraca polsko-białoruska, 2012 – 2015.
3. **Projekt badawczy specjalny SK-PL-0070-12**, "Badania oddziaływań pomiędzy błonami lipidowymi a peptydami HIV skompleksowanymi z dendrymerami karbokrzemowodorowymi ", Polsko-słowacka dwustronna współpraca, 2013-2014.
4. NCBiR, **ERA-NET EuroNanoMed** 2009, "Peptides-associated dendrimers in dendritic cells for the development of new nano-HIV vaccines", 2010-2013.
5. Akcja **COST TD0802**, "Biomedical applications of dendrimers", oraz towarzyszący projekt międzynarodowy niewspółfinansowany (dofinansowanie do Akcji COST) "Biomedyczne zastosowania dendrymerów", MNiSW, 2010-2013.
6. **Projekt badawczy specjalny SK-PL-0034-09**, "Dendrymery jako nośniki siRNA skierowanego przeciwko wirusowi HIV-1 – oddziaływania z błonami", Polsko-słowacka dwustronna współpraca, 2010-2011.
7. **TEAM/2008-1/5** „Biomedical properties of dendrimers”, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 2008 – 2012.
8. Projekt badawczy zamawiany MNiSW: **POL-POSTDOC III**. PBZ/MNiSW/07/2006/22, "Rola błon lipidowych i glukozaaminoglikanów w procesie tworzenia się złożeń

amyloidowych oraz wpływ obecności wolnych rodników i melatoniny na szybkość tego procesu", 2007-2010.

9. **Projekt NATO CBP.EAP.CLG 981751** "Prion proteins and Alzheimer's Peptides: Molecular Studies", 2005-2007.
10. **Projekt CDR TA-MOU-02-CA-22-020.** Israel-USA-Uzbekistan network "Irrigation of Megacarpaeae and Crambe Plants with Brackish Water and its Effect on Seed Lipids and other Lipophylic Components", 2006-2007.

Projekty Grupy Regionalnego Rozwoju Innowacyjnego w Uzbekistanie oraz projekty Uzbekiej Akademii Nauk: miejsce realizacji – Instytut Chemii Bioorganicznej w Taszkencie 1999-2007:

1. "Study of structure and molecular mechanisms of natural polyphenols and terpenes for searching the effective drugs on the base of plant raw material", 2003-2007.
2. "Comparative study of membranoactive properties of tannins", 2004-2005.
3. "The new and effective non steroid anti-inflammatory drug from local plant raw material", 2003-2004.
4. "Influence of metalloproteinase and disintegrins of snakes poison on calcium homeostasis in mammalian cells", 2002-2003.
5. "Polyphenol antioxidants as a regulators of cellular functions", 2000-2002.
6. "Structure and function of diterpenoids. Influence on thrombocyte calcium homeostasis", 1999-2001.
7. "Bioregulators isolated from domestic plants and its modification", 1998-2000.
8. "Fermentative and nonfermentative transformations of phospholipids. Regulation of membrane structure", 1997-1999.

1.9. Członkostwo w organizacjach naukowych

1. Członek Polskiego Towarzystwa Biofizycznego (2010-2013)
2. Członek Biomedexperts Network (2009-2014)
3. Członek American Nano Society (2011-2014)

1.10. Współpraca międzynarodowa

1. Współpraca z Immunomolecular Biology Laboratory w Gregorio Marañon Hospital w Madrycie, Hiszpania. Dendrymery jako nośniki materiału genetycznego
2. Współpraca z Inorganic Chemistry Dept., Uniwersytet Alcalá de Henares, Alcalá, Hiszpania. Badanie oddziaływań dendrymerów karbokszemowych z siRNA i peptydami HIV

3. Współpraca z Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Tuluza, Francja, Badanie oddziaływań dendrymerów fosforowych z biomolekułami
4. Współpraca z Uniwersytetem w Atenach, Department of Pharmaceutical Technology, Grecja. Oddziaływanie dendrymerów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie z modelowymi błonami i ocena ich toksyczności
5. Współpraca z Uniwersytetem im. Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja. Dendrymery jako nośniki siRNA skierowanego przeciwko wirusowi HIV-1 – oddziaływania z błonami
6. Współpraca z Departament de Bioquímica, Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Hiszpania. Mechanizmy agregacji białek w chorobach neurodegeneracyjnych
7. Współpraca z Leibniz Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Niemcy. Badania oddziaływań dendrymerów polipropylenoiminowych z siRNA i peptydami HIV
8. , Współpraca z Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus. Badania oddziaływań dendrymerów z siRNA
9. Współpraca z Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. Oddziaływania dendrymerów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie z antyapoptotycznymi siRNA

2. Osiągnięcia naukowe

2.1. Publikacje będące podstawą o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego

1. **Ionov M.**, Ciepluch K., Klajnert B., Glinska S., Gomez-Ramirez R., Javier de la Mata F., Munoz-Fernandez M.A., Bryszewska M. **Complexation of HIV derived peptides with carbosilane dendrimers.** *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 101 (2013) 236– 242.
IF: 3,42, MNiSW: 30, Liczba cytowań: 5.
Procentowy udział habilitanta 75%. Habilitant zaplanował i przy pomocy mgr. Karola Cieplucha wykonał wszystkie doświadczenia, napisał pierwszą wersję manuskryptu, a następnie pracował wraz z prof. M. Bryszewską nad wersją ostateczną manuskryptu.
2. **Ionov M.**, Ciepluch K., Moreno B.R., Appelhans D., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F.J., Muñoz-Fernández M.A. Bryszewska M. **Biophysical characterization of glycodendrimers as nano-carriers for HIV peptides.** *Curr. Med. Chem.* 20/31 (2013) 3935-3943.
IF: 4,86, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 0.
Procentowy udział habilitanta 75%. Habilitant zaplanował i przy pomocy mgr. Karola Cieplucha wykonał wszystkie doświadczenia, napisał pierwszą wersję manuskryptu, a następnie pracował wraz z dr. Dietmarem Appelhensem i prof. M. Bryszewską nad wersją ostateczną manuskryptu.

3. Vacas Córdoba E., Bastida H., Pion M., Hameau A., **Ionov M.**, Bryszewska M., Caminade AM., Majoral JP., Muñoz- Fernández MA. **HIV-Antigens Charged on Phosphorus Dendrimers as Tools for Tolerogenic Dendritic Cells-Based Immunotherapy.** *Curr. Med. Chem.* 21 (2014)
IF: 4,86, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 0.
Procentowy udział habilitanta 35%. Habilitant brał udział w planowaniu doświadczeń, wykonał samodzielnie biofizyczną część doświadczeń i analizę wyników. Następnie pracował wraz z prof. Marią Angeles Munoz Fernandez i prof. M. Bryszewską nad manuskryptem.
4. Ciepluch K., **Ionov M.**, Majoral JP., Muñoz- Fernández MA., Bryszewska M. **Interaction of phosphorus dendrimers with HIV peptides – fluorescence studies of nano-complexes formation.** *J. Lumin.* 148 (2014) 364-369.
IF: 2,14 MNiSW: 35, Liczba cytowań: 0.
Procentowy udział habilitanta 45%. Habilitant zaplanował i brał udział w wykonaniu doświadczeń, analizę wyników, przygotowaniu pierwszej wersji tekstu i wykresów oraz pracował nad wersją ostateczną manuskryptu wraz z mgr. Karolem Ciepluchem i prof. M. Bryszewską.
5. Vacas Córdoba E., Pion M., Rasines B., Filippini D., Komber H., **Ionov M.**, Bryszewska M., Appelhans D., Muñoz-Fernández M.A. **Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies.** *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 9/7 (2013) 972-984.
IF: 6,93, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 2
Procentowy udział habilitanta 35%. Habilitant brał udział w planowaniu doświadczeń, wykonał samodzielnie część doświadczeń dotyczącą charakterystyki kompleksowania dendrymerów z peptydami HIV. Habilitant brał udział w analizie wyników. Pracował wraz z prof. Marią Angeles Munoz Fernandez i prof. M. Bryszewską nad wersją ostateczną manuskryptu.

2.2. Pozostałe prace opublikowane w recenzowanych czasopismach polskich i zagranicznych po uzyskaniu stopnia doktora

(poniższy wykaz nie obejmuje prac stanowiących główne osiągnięcie naukowe)

1. **Ionov M.**, Garaiova Z., Waczulikova I., Wróbel D., Pędziwiatr-Werbicka E., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Klajnert B., Hianik T., Bryszewska M. siRNA carriers based on carbosilane dendrimers affect zeta potential and size of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2209–2216.
IF: 4,39, MNiSW: 35, Liczba cytowań: 5.
2. **Ionov M.**, Yuldasheva N., Ulchenko N., Glushenkova A., Bruria H. Growth, development and yield of *Crambe Abyssinica* under saline irrigation in the greenhouse. *J. Agron. Crop Sci.* 199/5 (2013) 331-339.
IF: 2,151, MNiSW: 35, Liczba cytowań: 0.
3. Wasiak T., **Ionov M.**, Nieznanski K., Nieznanska H., Klementieva O., Granell M., Cladera J., Majoral J.P., Caminade A.M., Klajnert B. Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer's (A β 1–28) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation. *Mol. Pharmaceutics* 9 (2012) 458–469.
IF: 4,57, MNiSW: 45, Liczba cytowań: 19.

4. Klajnert B., Wasiak T., **Ionov M.**, Fernandez-Villamarin M., Sousa-Herves A., Correa J., Riguera R., Fernandez-Megia P.E. Dendrimers reduce toxicity of A β 1-28 peptide during aggregation and accelerate fibril formation. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 8/8 (2012)1372-1378.
IF: 4,88, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 4.
5. Olchowik E., Lotkowski K., Mavlyanov S., Abduljanova N., **Ionov M.**, Bryszewska M., Zamaraeva M. Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*Rhus typhina* L.) and grape seeds (*Vitis vinifera* L.) *Cell. Molec. Biol. Lett.* 17 (2012) 333-348.
IF: 1,45, MNiSW: 15, Liczba cytowań: 0.
6. Wrobel D., Kłys A., **Ionov M.**, Vitovic P., Waczulikowa I., Hianik T., Gomez-Ramirez R., de la Mata J., Klajnert B., Bryszewska M. Cationic carbosilane dendrimers–lipid membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 401– 407.
IF: 2,56, MNiSW: 20, Liczba cytowań: 2.
7. **Ionov M.**, Gordiyenko N., Zukowska I., Tokhtaeva E., Mareninova O., Baram N., Ziyaev K., Rezhepov K., Zamaraeva M. Stability and antioxidant activity of gossypol derivative immobilized on N-polyvinylpyrrolidone. *Int. J. Biol. Macromolec.* 51 (2012) 908– 914.
IF: 2,66, MNiSW: 25, Liczba cytowań: 0
8. **Ionov M.**, Wróbel D., Gardikis K., Hatziantoniou S., Demetzos C., Majoral J.P., Klajnert B., Bryszewska M. Effect of Phosphorus Dendrimers on DMPC Lipid Membranes. *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 408– 413.
IF: 2,56, MNiSW: 20, Liczba cytowań: 7.
9. **Ionov M.** Gardikis K, Wróbel D. Hatziantoniou S. Mourelatou H, Majoral J.P. Klajnert B, Bryszewska M. Demetzos C. Interaction of cationic phosphorus dendrimers (CPD) with charged and neutral lipid membranes. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 82 (2011) 8–12.
IF: 2,60, MNiSW: 30, Liczba cytowań: 12.
10. Gardikis, K. Fessas, D. Signorelli, M. Dimas, K. Tsimplouli, C. **Ionov, M.** Demetzos, C. A new chimeric drug delivery nano system (chi-aDDnS) composed of PAMAM G 3.5 dendrimer and liposomes as doxorubicin's carrier. In vitro pharmacological studies. *J Nanosci. Nanotechnol.* 11/5 (2011) 3764-3772.
IF: 1,45, MNiSW: 25, Liczba cytowań: 11.
11. **Ionov M.** Burchell V. Klajnert B. Bryszewska M. Abramov A. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity, *Neurosci.* 180 (2011) 229-237.
IF: 3,39, MNiSW: 30, Liczba cytowań: 14.
12. Abramov A.Y., **Ionov M.**, Pavlov E., Duchon M.R. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of b-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 10/4 (2011) 595-603.
IF: 7,55, MNiSW: 45, Liczba cytowań: 17
13. **Ionov M.** Garaiova Z. Wróbel D. Waczulikova I. Gomez-Ramirez R. De laMata R. Klajnert B. Bryszewska M. Hianik T. The carbosilane dendrimers affect the size and zeta potential of large unilamellar vesicles. *Acta Physica Universitatis Comenianae.* LII/1 (2011) 33-39.
IF: 0, MNiSW: 0, Liczba cytowań: 0

14. Waczulíková I. Bryszewska M. Klajnert B. Gomez-Ramirez R. de la Mata J. **Ionov M.** Garaiová Z. Wróbel D. Hianik T. Dendrimers as delivery systems in gene silencing studies. *Acta Physica Universitatis Comenianae*. LII/1 (2011) 3-8.
IF: 0, MNiSW: 0, Liczba cytowań: 0
15. Yuldasheva N. Ul'chenko N. Bekker N. Chernenko T. Glushenkova Heter. Mustaev F. **Ionov M.** Heuer B. Oil content and lipid composition of safflower (*Carthamus tinctorius*) irrigated with saline water under greenhouse and field conditions. *Annals of Applied Biology* 159 (2011) 169-177.
IF: 2,15, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 2
16. Wrobel D., **Ionov M.**, Gardikis K, Demetzos C., Majoral J.P., Palecz B, Klajnert B., Bryszewska M. Interactions of phosphorus-containing dendrimers with liposomes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1811 (2011) 221–226.
IF: 4,39, MNiSW: 35, Liczba cytowań: 14.
17. Yuldasheva N. Ulchenko N. Bekker N. Chernenko T. Skosyeva O. Glushenkova A. Mustaev F. **Ionov M.** Heuer B. Influence of irrigation-water salinity on lipids of *Crambe abyssinica* seeds. *Chem Nat Comp*, 46/6 (2011) 862-865.
IF: 0,59, MNiSW: 15, Liczba cytowań: 1
18. Shakhbazau A. Shcharbin D. Seviaryn I. Goncharova N. Kosmacheva S. Potapnev M. Gabara B. **Ionov M.** Bryszewska M. Use of polyamidoamine dendrimers to engineer BDNF-producing human mesenchymal stem cells. *Mol. Biol. Rep.* 37 (2010) 2003–2008.
IF: 2,56, MNiSW: 20, Liczba cytowań: 18
19. Sonkina S. Tukhfatullina I. Benseny-Cases N. **Ionov M.** Bryszewska M. Salakhutdinov B. Cladera J. Interaction of the prion protein fragment PrP 185–206 with biological membranes: effect on membrane permeability. *J. Pept. Sci.* 16 (2010) 342–348.
IF: 2,07, MNiSW: 25, Liczba cytowań: 4
20. **Ionov M.** Tukhfatullina I. Salakhutdinov B. Baram N. Bryszewska M. Aripov T. The interaction of PVP complexes of gossypol and its derivatives with an artificial membrane lipid matrix. *Cell. Molec. Biol. Lett.* 15/1 (2010) 98-117.
IF: 1,45, MNiSW: 15, Liczba cytowań: 1
21. Gardikis K. Hatziantoniou S. Bucos M. Fessas D. Signorelli M. Felekis T. Zervou M. Screttas C.G. Steele B.R. **Ionov M.** Micha-Screttas M. Klajnert B. Bryszewska M. Demetzos C. New drug delivery nanosystem combining liposomal and dendrimeric technology (Liposomal Locked-In Dendrimers) for cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 99/8 (2010) 3561-3571.
IF: 3,42, MNiSW: 45, Liczba cytowań: 20.
22. **Ionov M.** Klajnert B. Gardikis K. Hatziantoniou S. Palecz B. Salakhutdinov B. Cladera J. Zamaraeva M. Demetzos C. Bryszewska M. Effect of amyloid beta peptides A β _{1–28} and A β _{25–40} on model lipid membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* 99/3 (2010) 741-747.
IF: 1,98, MNiSW: 25, Liczba cytowań: 9
23. Klajnert B. Cangioti M. Calici S. **Ionov M.** Majoral JP. Caminade AM. Cladera J. Bryszewska M. Ottaviani MF. Interactions between dendrimers and heparin and their implications for the anti-prion activity of dendrimers. *New. J. Chem.* 33 (2009) 1087-1093.
IF: 3,06, MNiSW: 30, Liczba cytowań: 24

24. **Ionov M.** Gordiyenko N. Olchowik E. Baram N. Zijaev K. Salakhutdinov B. Bryszewska M. Zamaraeva M. The immobilization of gossypol derivative on N-polyvinylpyrrolidone increases its water solubility and modifies membrane-active properties. *J. Med. Chem.* 52 (2009) 4119–4125.
IF: 5,61, MNiSW: 45, Liczba cytowań: 5
25. Klajnert B. Appelhans D. Komber H. Morgner N. Schwarz S. Richter S. Brutschy B. **Ionov M.** Tonkikh A.K. Bryszewska M. Voit B. The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly (propylene imine) dendrimers: new effects dependent on hydrogen bonding. *Chem. Eur. J.* 14/23 (2008) 7030-7041.
IF: 5,83, MNiSW: 40, Liczba cytowań: 64
26. Gussakovsky E.E. **Ionov M.** Giller YE. Ratner K. Aripov T.F. Shahak Y. Left- and right-handed LHC II macroaggregates revealed by circularly polarized chlorophyll luminescence. *Photosynth. Res.* 87 (2006) 253-65.
IF: 3,15, MNiSW: 35, Liczba cytowań: 4
27. Pshenichnov E.A. Sultanova E.M. Veshkurova O.N. **Ionov M.** Salakhutdinov B.A. Salikhov S.I. Isolation and properties of a biological peptide from Hibiscus cannabinus seeds. *Chem. Nat. Compd.* 40/1 (2004) 7030-41.
IF: 0,59, MNiSW: 15, Liczba cytowań: 1
28. Barzda V. **Ionov M.** Amerongen HV. Gussakovsky EE. Shahak Y. The effect of pea chloroplast alignment and variation of excitation wavelength on the circularly polarized chlorophyll luminescence. *J. Fluorescence* 14/2 (2004) 207-216.
IF: 2,02, MNiSW: 25, Liczba cytowań: 3

2.3. Rozdziały w książkach

1. Gardikis K, Mourelatou E.A., **Ionov M.**, Aserin A., Libster D., Klajnert B., Bryszewska M., Garti N., Majoral J.P., Dimas K., Demetzos C. Natural and Synthetic Biomaterials as Composites of Advanced Drug Delivery Nano Systems (ADDNSS). Biomedical Applications, chapter in book: *Dendrimers in Biomedical Applications*. Copyright Year: 2013, ISBN: 978-1-84973-611-4. DOI:10.1039/9781849737296-00030. pp. 30-39.
2. **Ionov M.** Klajnert B. Tukfatulina I. Kosymbetov P. Salakhutdinov B. Merzlyak P. Bryszewska M. Interaction of β -amyloid peptides with model lipid membranes. W monografii „*Biological Membranes*”, Red. Janina Gabrielska, Copyright Year: 2008, SBN 978-83-926758-0-8. pp. 193-197.

2.4. Prace opublikowane przed obroną pracy doktorskiej

1. **Ionov M.** Hordienko N. Abramov A. Zamaraeva M. Influence of immunomodulators on Ca^{2+} homeostasis. Spectrofluorimetric application. *Chem Nat Comp.* special issue (2000) 55-57.
IF: 0,59, MNiSW: 15, Liczba cytowań: 0
2. Hordienko N. Ionov M. Abramov A. Zamaraeva M. Hagelgans A. Aripov T. The influence of immunomodulator megosin on Ca^{2+} homeostasis in rat thymocytes. *Journal of Theoretical and Clinical Medicine (Uzb.)*. 1 (2000) 38-44.
IF: 0, MNiSW: 0, Liczba cytowań: 0

3. **Ionov M.V.** Tukfatullina I.I. Salakhutdinov BA. Baram N.I. Aripov T.F. Interaction of gossypol derivatives megosine and rometine with model lipid membranes. DSC studies. Processing of Academy of Sciences of Uzbekistan (Uzb.) 10 (1998) 35-38.
IF: 0, MNiSW: 0, Liczba cytowań: 0
4. Tadjibaeva ET. **Ionov M.V.** Hordienko N.V. Antioxidant activity of megosine and its water-soluble derivative with polyvinilpirrolydone. Processing of Young Scientists of Tashkent State University (Uzb.) 2 (1997) 24-27.
IF: 0, MNiSW: 0, Liczba cytowań: 0

Tab. 1. Wskaźniki Impact Factor, podana bieżąca (z 2013 r.) wartość wskaźników IF dla czasopism, **punkty MNiSW**, podana bieżąca (z 2013 r.) wartość punktów MNiSW **oraz liczba cytowań** (na podstawie bazy Web of Science z sierpnia 2014 r.) **publikacji stanowiących główne osiągnięcie naukowe.**

Nr. publikacji	Wskaźniki IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań
1 (2013)	3,42	30	5
2 (2013)	4,86	40	0
3 (2014)	6,93	40	0
4 (2014)	4,86	40	0
5 (2013)	2,14	35	2
Suma	22,21	185	7

Niewielka liczba cytowań artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe wynika z faktu publikacji tych prac w roku 2013 i 2014.

Tab. 2. Wskaźniki Impact Factor, podana bieżąca (z 2013 r.) wartość wskaźników IF dla czasopism, **punkty MNiSW**, podana bieżąca (z 2013 r.) wartość punktów MNiSW **oraz liczba cytowań** (na podstawie bazy Web of Science z sierpnia 2014 r.) **publikacji pozostałych.**

Nr. publikacji	Wskaźniki IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań
1	4,39	35	5
2	2,15	35	0
3	4,57	45	19
4	4,88	40	4
5	1,45	15	0
6	2,56	20	2
7	2,66	25	0
8	2,56	20	7
9	2,60	30	12
10	1,45	25	11
11	3,39	30	14
12	7,55	45	17
13	0,00	0	0
14	0,00	0	0
15	2,15	40	2
16	4,39	35	14
17	0,59	15	1
18	2,56	20	18
19	2,07	25	4
20	1,45	15	1
21	3,42	45	20
22	1,98	25	9
23	3,06	30	24
24	5,61	45	5
25	5,83	40	64
26	3,15	35	4
27	0,59	15	1
28	2,02	25	3
Suma	79,08	775	261

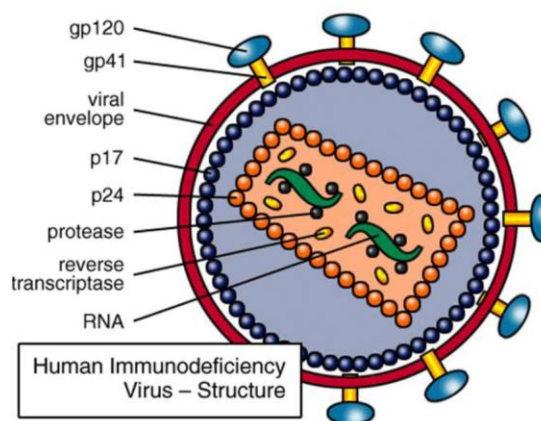
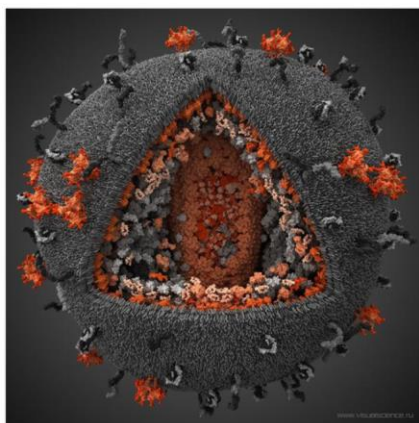
3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników prac będących podstawą o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Dendrymery jako potencjalne nośniki peptydów w szczepionce przeciw wirusowi HIV

3.2. Wstęp

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) jest retrowirusem, który został wykryty w 1980 r. i okazał się czynnikiem powodującym zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS), choroby, która doprowadziła już do około trzydziestu milionów zgonów (<http://www.who.int/GHO/hiv/pl/>, pobrano w dniu 1 października 2013). AIDS jest chorobą, która, pomimo pewnych sukcesów w jej profilaktyce i terapii, stanowi nadal wielkie zagrożenie dla ludzkości i wyzwanie dla świata nauki.



Wirus HIV

(Nature Medicine X/2010 www.nature.com/naturemedicine)

Budowa wirusa HIV

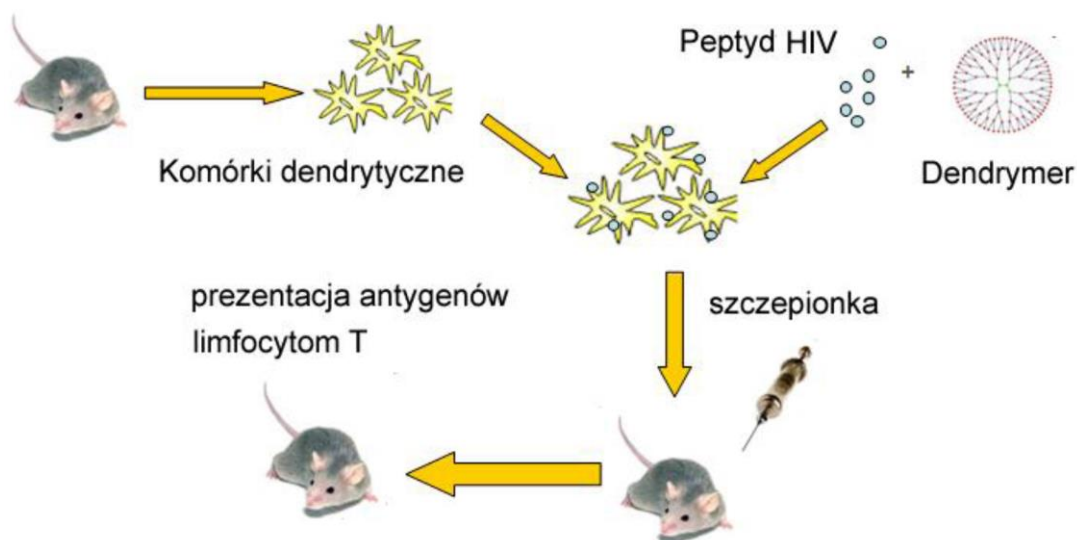
Terapia antyretrowirusowa (ART) jest dostępna od połowy lat 90-tych. Poprawia ona znacznie jakość życia osób zakażonych HIV i zmniejsza śmiertelność. Jednakże istnieje kilka ograniczeń w leczeniu zakażeń wirusem HIV. Należą do nich: oporność na leki, wysokie

tempo mutacji wirusa i niska biodostępność niektórych związków. Dlatego wynalezienie szczepionek profilaktycznych i terapeutycznych stanowi ogromne wyzwanie dla badaczy AIDS. Wprowadzenie wielolekowej terapii z użyciem ART, znacznie wydłużyło życie osobom zakażonym, ale terapia ta nie eliminuje wirusa z organizmu chorego, a jedynie spowalnia jego rozwój. Poza tym wywołuje poważne skutki uboczne (niekorzystnie wpływa na wątrobę i serce) i dostępna jest głównie w krajach wysoko rozwiniętych. Nie zmniejsza się również liczba nowych zakażeń w wielu krajach Trzeciego Świata. W walce z wirusem HIV wciąż poszukuje się innych rozwiązań, a najskuteczniejszym sposobem na powstrzymanie pandemii wydaje się być szczepionka [1]. Ostatnio dużo uwagi w zakresie immunoterapii poświęca się komórkom prezentującym antygen – APC (antigen presenting cells).

W odpowiedzi na zakażenie bakteryjne lub wirusowe dochodzi do aktywacji limfocytów. Pierwotnie limfocyty dojrzewają w szpiku kostnym i grasicy (odpowiednio limfocyty B i T), a końcowy etap dojrzewania przechodzą pod wpływem swoistych antygenów w śledzionie i węzłach chłonnych. Warunkiem tego procesu jest otrzymanie „odpowiednich sygnałów” od komórek prezentujących antygen, wśród których centralne miejsce zajmują komórki dendrytyczne DC (dendritic cells) [2]. Komórki dendrytyczne dzieli się na dwa podstawowe typy: mieloidalne i plazmacytoidalne. Do miejsca, gdzie doszło do inwazji mikroorganizmów i gdzie toczy się reakcja zapalna, przyciągane są przez odpowiednie chemokiny. Po wychwyceniu antygeny, drogą naczyń limfatycznych wędrują do węzłów limfatycznych, aby tam prezentować antygeny limfocytom T, albo drogą krwi migrują w tym celu do śledziony. Pełnią rolę wartowników, odbierających „sygnały niebezpieczeństwa”. Komórka dendrytyczna pochłaniając antygeny z zewnątrz może je prezentować nie tylko w kontekście cząsteczek MHC klasy II, ale także (co nie jest typowe) w kontekście cząsteczek MHC klasy I limfocytom T CD8+. Zjawisko to określane jest jako prezentacja krzyżowa (cross-presentation) [1]. Dlatego DCs mogą stanowić dobre narzędzie immunoterapii nowotworów i infekcji wirusowych np. HIV. DC po infekcji wirusem HIV regulują ważne funkcje tj. neutralizację za pośrednictwem przeciwciał, cytotoksyczność, lizę zależną od komplementu i inne reakcje przeciwwirusowe. Pożądanym krokiem w terapii przeciw wirusowi HIV byłoby ograniczenie niespecyficznego aktywacji limfocytów T oraz indukcja aktywacji komórek T CD8+ i CD4+ specyficznej dla szerokiego zakresu epitopów Gag [3].

Zastosowanie komórek dendrytycznych (DC) jako adiuwantów szczepionki stanowi obiecujące narzędzie w terapii zaburzeń funkcji układu immunologicznego u osób zarażonych HIV-1 [4,5], jednakże wybór drogi (sposobu) dostarczania DC z antygenami jest trudnym zadaniem. W celach terapeutycznych, antygen (pochodna peptydu HIV) powinien być transportowany przez błonę komórkową do cytoplazmy. Z tego względu badane były różne rodzaje nośników: liposomy, nanocząstki, micelle polimerowe i nanożele [6-13]. W tym

kontekście pojawiają się również dendrymery jako alternatywny transporter pochodnej peptydu HIV do komórek dendrytycznych.



Schemat tworzenia się szczepionki przeciw wirusowi HIV opartej o komórki dendrytyczne, prezentujące antygeny

Dendrymery są dobrymi kandydatami na nośniki peptydów i innych biomolekuł ze względu na ich wyjątkowe właściwości, takie jak monodispersyjność, obecność licznych grup powierzchniowych obdarzonych ładunkiem, możliwość modyfikacji grup chemicznych. Stwierdzono, że dendrymery ułatwiają transport peptydów HIV do komórek dendrytycznych i podnoszą efektywność prezentacji antygenów limfocytom T [45]. Model ten może stanowić dobre narzędzie immunoterapii skuteczne w walce z wirusem HIV.

Jednym z celów przedstawionej pracy habilitacyjnej była charakterystyka kompleksu (dendrymer – antygen) jako szczepionki przeciw wirusowi HIV opartej o komórki dendrytyczne, prezentujące antygeny.

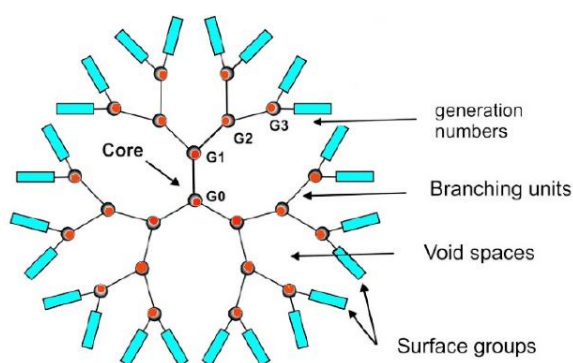
3.3. Aktualny stan wiedzy w obszarze dotyczącym tematu pracy habilitacyjnej

Ze względu na efektywność w prezentowaniu antygenów limfocytom T, komórki dendrytyczne zawierające antygen próbuje się wykorzystać jako szczepionki. Jednak duża różnorodność wirusa HIV sprawia trudności w wyborze odpowiedniego peptydu (antygeny). W badaniach wykorzystywano już dezaktywowane wiriony HIV pozyskane od pacjentów [14,15], komórki T zainfekowane HIV, egzosomy (nanocząstki 30-100 nm) pochodzące z komórek zainfekowanych HIV [16], rekombinowane białka wirusowe [17], mieloidalne DC

transfekowane mRNA kodującym białka HIV [18,19], plazmidy kodujące antygeny HIV [20]. Efektywność transportu HIV DNA czy RNA do DC zwiększano stosując mikrocząsteczki tj. poli-beta amino estry [21], wektory wirusowe: adenowirusy, wirus ospy wietrznej, lentiwirusy, Semliki Forest wirus czy drożdże i bakterie [22-25]. Próbną szczepionką profilaktyczną Merc STEP zawierającą wektory gag, pol i nef została wycofana, gdyż okazała się nieskuteczna [26]. Nadzieję dla immunoterapii przyniosło wprowadzenie do DC cząsteczek przypominających wirusy VLP (virus like particles) [27].

Jak dotąd jednak żadne z wymienionych rozwiązań nie spełnia wszystkich niezbędnych warunków dobrego, tzn. immunogenego, bezpiecznego, łatwego i niedrogiego w produkcji narzędzia immunoterapii.

Spośród licznych systemów, takich jak: liposomy, nanocząstki, nanożele, micelle, spełniających funkcje transporterów leków i innych biomakroczałek [28-33], dendrymery są dobrymi kandydatami na nośniki peptydów HIV do DCs. W swoim centrum posiadają cząsteczkę rdzeniową, do której warstwami przyłączone są rozgałęzione monomery. Im więcej warstw monomerów tym wyższa jest tzw. generacja dendrymeru. Konsekwencją takiej budowy jest obecność wolnych przestrzeni wewnątrz molekuly oraz liczne grupy funkcyjne na powierzchni, które mogą przenosić wiele cząsteczek leku, co intensyfikuje efekt terapeutyczny. Są monodispersyjne, co pozwala na dokładną charakterystykę systemu i poprawną analizę odpowiedzi biologicznej [34].



Budowa dendrymeru trzeciej generacji.

Badano wpływ dendrymerów na linie komórkowe i komórki monojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) i stwierdzono, że związki te nie indukują proliferacji PBMC, przenoszą kwasy nukleinowe i chronią je przed oddziaływaniami z białkami osocza i działaniem nukleaz

[35-37]. Pierwsze doniesienia o zastosowaniu dendrymerów poliamidoaminowych PAMAM do transfekcji pojawiły się w 1993 roku [38].

Od tego momentu podejmowano intensywne studia [39] aktywując dendymery ciepłem [40], stosując różne typy i generacje dendrymerów. Potencjalnym czynnikiem transfekcyjnym są dendymery fosforowe, które mogą być syntezowane nawet do 12 generacji. Modyfikowano ich powierzchnię i sprawdzano efektywność transfekcji genu lucyferazy do komórek 3T3.

Efektywność transfekcji wzrastała wraz ze wzrostem generacji dendrymeru, ale wartości stałe uzyskano dla generacji 3-5. Dendymery te mają zdolność transfekcyjną również w obecności osocza [41]. Kolejną grupę stanowią dendymery karbokrzemowe, które w badaniach okazały się dobrymi kandydatami na nośniki leków czy kwasów nukleinowych [37, 42]. Zdolność transfekcji posiadają również dendymery polilizynowe [43] czy polipropylenoiminowe PPI, ale wyższe generacje PPI okazały się cytotoksyczne, co ogranicza możliwości ich zastosowania [44]. Badania *in vitro* z użyciem mikrosfer PLGA i peptydów (pochodnych antygenów nowotworowych) pokazały, że to właśnie komórki dendrytyczne odgrywają zasadniczą rolę w aktywacji limfocytów T [45]. Inne badania z wykorzystaniem dendrymerów i DC [46, 47] sugerują, że połączenie właściwości i działania komórek dendrytycznych i dendrymerów może dostarczyć znakomitego narzędzia immunoterapii skierowanej przeciw wirusowi HIV.

3.4. Obiekt badawczy

Praca została wykonana na syntetycznych peptydach syntezowanych przez firmę "Eurogentec" (Belgia): Gp160, HIV-HXB2, Gp160 (634e648): NH-EIDNYTNTIYTLLEE-COOH, 15 aminokwasów, ładunek (-4); Gag-P24, HIV-HXB2, P24 (71e80): NH-DTINEEAAEW-COOH, 10 aminokwasów, ładunek (-4); Nef, HIV-HXB2, Nef (172-191): NHGMDDPEREVLE WRFDSRLAF-COOH, 20 aminokwasów, ładunek (-3).

W pracy były użyte dendymery karbokrzemowe (CBD) drugiej generacji o dwóch typach gałęzi terminalnych, zawierających albo wiązanie Si-C (CBD-CS) albo Si-O (CBD-OS). Struktura CBD-CS: $C_{128}H_{316}I_{16}N_{16}O_8Si_{13}^{+16}$ ($M_w = 4\ 603.56$ g/mol), CBD-OS: $C_{144}H_{348}I_{16}N_{16}Si_{13}^{+16}$ ($M_w = 4\ 699.99$ g/mol). Dendymery były syntezowane w Departamento de Quimica Inorganica, Universidad de Alcalá (Hiszpania) [48-50].

Użyto również dendrymerów fosforowych drugiej i trzeciej generacji CPD-G3, $C_{624}H_{1104}N_{183}C_{148}O_{42}P_{45}S_{42}$ (generacja 3, 48 kationowych grup powierzchniowych ($M_w: 16\ 280$ g/mol), CPD-G4, $C_{1296}H_{2256}N_{375}C_{196}O_{90}P_{93}S_{90}$ (generacja 4, 96 kationowych grup

powierzchniowych ($M_w = 33\,702$ g/mol) syntezowanych w Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS (Francja) [51,52].

Zastosowano też dendrymery hybrydowe poli(propyleno iminowe) PPI czwartej generacji, z dołączonymi resztami maltozy (Stp2711, Stp2712) oraz hybrydowe glikodendrymery PPI czwartej generacji, z dołączonymi dendronami karbokrzemowymi drugiej generacji gliko PPI-CBD (Stp2750, Stp 2752) z dodatnim ładunkiem powierzchniowym, syntezowane w Leibniz Institute of Polymer Research, Dresden (Niemcy) [53].

3.5. Układ eksperymentalny

- **Spektrofluorymetria. Polaryzacja fluorescencji**

Przeprowadzono pomiary zmian polaryzacji fluorescencji znakowanych fluoresceiną peptydów pod wpływem dodawanego dendrymeru, gdzie wzrost wartości polaryzacji fluorescencji świadczył o istnieniu oddziaływania peptyd-dendrymer. $\lambda_{exc}=542$ nm, $\lambda_{em}=573$ nm. Analiza zależności zmian polaryzacji fluorescencji znakowanych peptydów od stężenia dendrymerów pozwoliła oszacować maksymalną liczbę cząsteczek dendrymeru łączących się z peptydem.

- **Dichroizm kołowy (CD)**

Dzięki zastosowaniu CD były określone zmiany w strukturze drugorzędowej peptydów w obecności dendrymerów. Wykorzystany został fakt, iż inny kształt ma widmo dla struktury α -helikalnej i dla struktury β . Ta metoda pozwoliła zastosować niskie stężenia peptydów, podobne do tych, które były stosowane w technice spektrofluorymetrycznej. Zastosowanie CD pozwoliło określić oddziaływanie dendrymerów z peptydami.

- **Elektroforeza laserowa Dopplera (Zeta Size)**

Zmiany średnicy hydrodynamicznej peptydów pod wpływem wzrastającego stężenia dendrymerów świadczyły o istnieniu oddziaływań pozwalając określić warunki tworzenia kompleksów w zależności od stosunku molowego dendrymer/peptyd.

- **Potencjał zeta**

Wyznaczanie ładunku powierzchniowego cząstek było uzyskane z wykorzystaniem metody PALS (phase analysis light scattering). Zaletą metody jest fakt, że ładunek

powierzchniowy uzyskany jest na podstawie ruchu cząstek w zawiesinie, co zapewnia poprawną analizę mieszaniny cząstek różnych typów. Zatrzymanie zmian wartości potencjału zeta mimo dodawanego dendrymeru wskazuje na maksymalną liczbę cząsteczek dendrymeru przyłączonego do jednej cząsteczki peptydu. Dendrypleks taki ma swój potencjał zeta wyrażony w mV.

- **Elektroforeza w żelu agarozowym**

Charakter oddziaływań pomiędzy peptydami HIV a dendrymerami został zbadany przy użyciu techniki elektroforetycznej. Wykorzystano zdolność migracji peptydów znakowanych fluoresceiną w żelu agarozowym (7%). Szybkość przemieszania się cząstek w żelu zależała od ich ładunku, wielkości i kształtu. Najszybciej poruszały się cząstki małe o większym ładunku. W żelu agarozowym siła rozdziału jest stosunkowo niska w porównaniu z żelem poliakryloamidowym, co daje możliwość zbadania migracji dendrypleksów. Zastosowanie tej metody pozwoliło określić oddziaływanie dendrymerów i peptydów HIV mających ładunek ujemny.

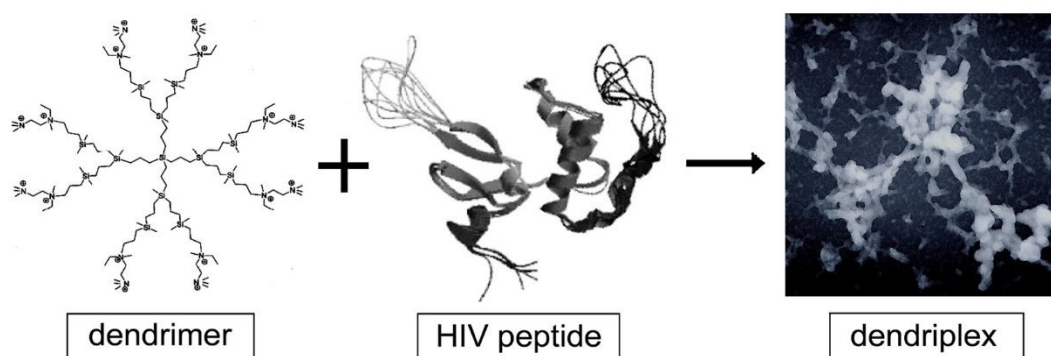
- **Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)**

Powstałe kompleksy dendrymer/peptyd były obserwowane pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Uzyskane obrazy były wykorzystane dla określenia morfologii cząstek i ich rozmiaru.

3.6. Skrócony opis wyników

Głównym celem pracy było zbadanie możliwości wykorzystania dendrymerów jako nano-transporterów peptydów HIV do komórek dendrytycznych. Niezwykle ważnym etapem, pozwalającym na wybór właściwego transportera antygenów do komórek, było przebadanie różnych typów dendrymerów. W pracy wykorzystano dendrymery fosforowe, dendrymery karbokrzemowe oraz dendrymery polipropylenoiminowe różnej generacji, obdarzone ładunkiem dodatnim. W oparciu o oddziaływania elektrostatyczne były tworzone kompleksy dendrymer-peptyd (dendrypleks) w różnych stosunkach ładunkowych/molowych i scharakteryzowane parametry takie jak: siła wiązania, stabilność, rozmiar czy potencjał zeta kompleksów oraz ich oddziaływanie z białkiem i błonami. Badania te mają ważne znaczenie, bowiem analiza wyników pozwoliła na dokonanie wyboru najlepszych kandydatów na nośniki antygenów wirusowych.

W celu sprawdzenia oddziaływań pomiędzy dendrymerami a peptydami wykorzystano metody: fluorymetryczną, dichroizmu kołowego, elektroforezę w żelu agarozowym, metodę dynamicznego rozpraszania światła oraz elektroforezę laserową Dopplera. Metody te posłużyły do określenia w jakich stosunkach molowych powstają elektrostabilne kompleksy peptyd- dendrymer (dendrypleks). Dodatkowo zbadano oddziaływania pomiędzy dendrypleksami a białkiem osocza (albuminą ludzką) z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym. Kompleksy w odpowiednim stosunku molowym poddane zostały sprawdzeniu pod względem stabilności w czasie oraz w zależności od wzrastającej temperatury, gdzie została wykorzystana metoda polegająca na mierzeniu zmian polaryzacji fluorescencji peptydu znakowanego fluoresceiną. Ponadto sprawdzono stabilność kompleksów w buforach o różnym pH mierzącą średnicę hydrodynamiczną. Kolejnym etapem było przeprowadzenie testu hemolizy. Miało to na celu określenie stopnia hemotoksyczności kompleksów.



Schemat tworzenia kompleksu dendrymer/peptyd na przykładzie dendrymeru karbokrzemowodorowego BDBR0011 i peptydu HIV, P24 (*mikrozdjęcie TEM, x 50, 000. UŁ. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 101 (2013) 236– 242.*)

Badania rozpoczęto od dendrymerów karbokrzemowych, które zostały zsyntezowane w zespole Gomeza i de la Maty (Katedra Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu w Alcalá de Henares- Hiszpania). Materiał badawczy stanowiły dwa dendrymery generacji drugiej: NN16 (posiadający wiązania Si-O) oraz BDBR0011 (posiadający wiązania Si-C). Dendrymery były kompleksowane z trzema różnymi peptydami HIV: Gag-P24 o długości 10 aminokwasów i ładunku -4 oraz Gp160 o długości 15 aminokwasów i ładunku -4 oraz Nef o długości 20 aminokwasów i ładunku -3. Kompleksowanie było badane poprzez pomiar zmian polaryzacji

fluorescencji peptydów znakowanych fluoresceiną dokonujących się pod wpływem oddziaływań z dendrymerami.

Stabilność powstałych kompleksów (dendrypleksów) mierzono za pomocą elektroforezy laserowej Dopplera, jako zmiany potencjału zeta kompleksu dendrymer-peptyd. Ujemny potencjał zeta peptydów malał wraz z rosnącym stężeniem dodawanych dendrymerów i osiągał wartości dodatnie. Stwierdzono, że oba dendrymery NN16 i BDBR0011 tworzą kompleksy z peptydami w stosunku molowym (1,5-2):1 (dendrymer : peptyd), o średnim potencjale zeta powyżej +10 mV.

Metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) zmierzono średnicę hydrodynamiczną utworzonych kompleksów, otrzymując wartości z zakresu (90 – 230) nm w zależności od peptydu i dendrymeru. Największe dendrypleksy tworzył dendrymer BDBR0011 z peptydem Gag-P24 (230 nm). Zarówno dodatni potencjał zeta, jak i rozmiar kompleksów nieprzekraczający 250 nm, to główne cechy jakie musi posiadać dobry nośnik ligandów do komórek. W celu zobrazowania zmian zachodzących podczas kompleksowania zrobione zostały zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Uzyskane obrazy potwierdziły kompleksowanie obu typów dendrymerów z badanymi peptydami. Obrazy mikroskopowe pokazały formowanie dendrypleksów o rozmiarach 150-450 nm.

Wyniki wskazywały na elektrostatyczny charakter oddziaływań pomiędzy dendrymerami karbokrzemowymi i peptydami HIV oraz tworzenie dodatnio naładowanych kompleksów, co powinno ułatwiać transport peptydów do komórek. Charakterystyka kompleksu tworzonego przez dendrymer NN16 z peptydami została następnie wykorzystana do badań mających na celu rozstrzygnięcie, czy skompleksowanie peptydów z dendrymerami podniesie efektywność wnikania peptydów do komórek dendrytycznych (DC). Stwierdzono znacznie większą wydajność transfekcji peptydów HIV do komórek dendrytycznych po skompleksowaniu ich z dendrymerem NN16, co świadczy o tym, że ten dendrymer może być dobrym niewirusowym wektorem dostarczającym peptydy HIV do komórek.

W kolejnym etapie w analogiczny sposób przeprowadzono badania oddziaływań hybrydowych dendrymerów poli(propyleno iminowych) (PPI) z dołączonymi resztami maltozy (Stp2711, Stp2712) oraz hybrydowych glikodendrymerów z dołączonymi dendronami karbokrzemowymi glikoPPI-CBD (Stp2750, Stp 2752) z peptydami HIV. Stp2711 i Stp2712 były syntezowane w zespole dr D. Appelhansa w Instytucie Badań Polimerów w Dreźnie, zaś syntezy Stp2750 i Stp2752 były rezultatem wspólnego wysiłku laboratorium niemieckiego i hiszpańskiego (Alcala).

Wykonano badania tworzenia kompleksów i ich stabilności mierząc zmiany polaryzacji fluorescencji znakowanych peptydów podczas ich kompleksowania z dendrymerami oraz zmiany rozmiaru i potencjału zeta tworzonych kompleksów. Wykonano również zdjęcia mikroskopowe (TEM) utworzonych dendrypleksów.

Wyniki pokazały, że hybrydowe dendrymery glikoPPI-CBD znacznie efektywniej niż same glikoPPI oddziaływały ze wszystkimi peptydami. Utworzone dendrypleksy miały średnicę 90-230 nm oraz nieznacznie ujemny potencjał zeta - (1-2) mV. Stosunek molowy w dendrypleksie wynosił (1,5-2) : 1 (dendrymer : peptyd).

Dendrymery glikoPPI, niezawierające dendronu CBD, bardzo słabo kompleksowały ze wszystkimi peptydami, co było szczególnie widoczne przy pomiarach zmian polaryzacji fluorescencji. Wyniki te zostały potwierdzone badaniami elektroforetycznymi i mikroskopowymi. Wyniki pokazały, że hybrydowe dendrymery glikoPPI-CBD znacznie efektywniej niż glikoPPI oddziaływały ze wszystkimi peptydami. Kompleksy z tymi dendrymerami tworzą się przy podobnych stosunkach molowych jak dla dendrymerów karbokrzemowych. W tym jednak przypadku kompleksy wykazywały potencjał nieznacznie ujemny. Dokonując więc wyboru dobrego przenośnika, należy mieć na uwadze ujemny potencjał kompleksów tworzonych przez dendrymery hybrydowe, który może utrudnić transport peptydów przez ujemnie naładowane błony biologiczne.

Wykonano również pomiary elektroforetyczne kompleksowania peptydów z dendrymerami (elektroforeza w żelu agarozowym) w obecności i nieobecności ludzkiej albuminy osocza (HSA). Dla wszystkich trzech peptydów wykonano również badania zmian ich widm dichroizmu kołowego pod wpływem oddziaływania z dendrymerami glikoPPI i glikoPPI-CBD.

Wszystkie badane dendrymery PPI miały zdolność tworzenia kompleksów z peptydami P24, Gp160 i Nef, jednakże hybrydowe dendrymery glikoPPI-CBD znacznie efektywniej oddziaływały ze wszystkimi peptydami, zaś dendrymery glikoPPI, niezawierające dendronów CBD, słabo kompleksowały z peptydami. Glikodendrymer PPI-CBD (Stp2750) tworzył kompleksy z peptydami w najniższych stosunkach molowych peptyd/dendrymer. W szczególności potwierdziły to badania fluorymetryczne, elektroforetyczne oraz dichroizmu kołowego. Stwierdzono również że badane dendrymery PPI znacznie silniej oddziaływały z peptydem P24, w porównaniu do Gp160 i Nef.

Nie stwierdzono oddziaływania powstałych dendrypleksów z albuminą, co może wskazywać na to, że albumina, główne białko osocza, nie będzie wiązać transportowanych w krwiobiegu kompleksów i zmniejszać ich efektywnego stężenia.

Najlepszym, spośród zbadanych, nośnikiem peptydów HIV okazał się glikodendrymer PPI-CBD, Stp2750, zaś z peptydów - P24, jako najlepiej kompleksujący.

Badano również stabilność powstałych dendrypleksów w czasie, temperaturze oraz pH. Zależność stabilności kompleksów od czasu i temperatury zbadano metodą pomiaru polaryzacji fluorescencji znakowanych fluorescencyjnie peptydów, zaś, ze względu na wrażliwość natężenia fluorescencji fluoresceiny od pH, zależność od pH mierzono poprzez pomiar dynamicznego rozpraszania światła. Stwierdzono, że dendrypleksy utworzone przez glikodendrymery PPI-CBD są stabilne w czasie (do 8-9 godzin), temperaturze (do 50 °C) i niezależne od pH (w przedziale 5,5 – 8,5).

Następny etap pracy polegał na sprawdzeniu kompleksowania dendrymerów fosforowych z peptydami HIV. Dendrymery fosforowe posiadają dużą liczbę dodatnio naładowanych grup powierzchniowych (48 lub 96 w zależności od generacji G3 lub G4). Nadmiar ładunku dodatniego na powierzchni umożliwił kompleksowanie już przy stosunku molowym 1:1,5 (peptyd: dendrymer). Wysoce dodatni potencjał zeta kompleksów powinien mieć kluczowe znaczenie dla transfekcji komórkowej. Jednakże tak duży nadmiar ładunków dodatnich może również powodować większą cytotoksyczność stosowanych kompleksów.

Zbadano również oddziaływania kompleksów (CPD G3; G4/peptyd) z błonami biologicznymi. Zaobserwowano, że w wyniku działania dendrypleksów procent hemolizy erytrocytów wzrastał powyżej 80.

Stabilność dendrypleksów (w temperaturze, czasie oraz pH) mierzono za pomocą polaryzacji fluorescencji znakowanych fluoresceiną peptydów oraz za pomocą metody dynamicznego rozpraszania światła. Zaobserwowano, że stabilność kompleksów w czasie wynosi 2-3 godziny, dendrypleksy są stabilne w zakresie temperaturowym 25-45 °C oraz stabilność kompleksów nie zależy od zmian pH w przedziale 5,5-8,5.

Dla wszystkich peptydów i ich kompleksów z trzema grupami dendrymerów przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie oddziaływań kompleksów z ludzką albuminą (HSA). Podczas testów okazało się, że żaden z badanych układów nie oddziałuje z białkiem.

Dodatkowo przebadano kompleksy pod względem hemotoksyczności. Okazało się, że kompleksy z dendrymerami fosforowymi wykazują bardzo dużą hemotoksyczność. Znacznie mniejszą hemotoksyczność wykazują kompleksy z dendrymerami karbokrzemowymi i to te dendrymery wydają się być bezpieczniejszym przenośnikiem peptydów do komórek, gdyż cytotoksyczność i hemotoksyczność są bardzo ważnymi czynnikami transportu ligandów do komórek.

Dobry przenośnik powinien tworzyć kompleks, który nie rozpada się zbyt szybko oraz powinien być trwały w zakresie temperatur 37-42 °C. Najstabilniejszymi w czasie

kompleksami okazały się kompleksy z dendrymerem BDBR0011. Kompleksy te są również trwałe w temperaturze i w buforach o różnym pH.

Podsumowując przeprowadzone badania można stwierdzić, że najlepszymi dendrymerami w celu kompleksowania ich z peptydami są dendrymery karbokrzemowe i hybrydowe. Jednakże, ze względu na trudności w syntezie dendrymerów hybrydowych, najlepszymi nośnikami mogą okazać się dendrymery karbokrzemowe : NN16 oraz BDBR0011.

Wyniki przedstawionej pracy będą mogły służyć do opracowania nowego typu szczepionki przeciwko wirusowi HIV, opartej na zbudowaniu kompleksów odpowiednio dobranych zmodyfikowanych dendrymerów z peptydami HIV i kierunkowym dostarczeniu powstałych kompleksów do komórek dendrytycznych w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów dokonano wyboru dendrypleksów najlepszych dla immunoterapii. Dodatkowo, co należy podkreślić, idea pracy, jako bardzo ogólna, pozwala na zastosowanie tej strategii terapeutycznej w innych infekcjach wirusowych i chorobach nowotworowych, poprzez wykorzystanie komórek dendrytycznych prezentujących odpowiedni antygen dostarczany do nich przez specjalnie w tym celu skonstruowany dendrymer, może więc stymulować badania mające na celu opracowanie innych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych.

Wyniki badań opublikowano w 5 artykułach zamieszczonych w impaktowanych czasopismach międzynarodowych (wykaz publikacji p. 2.1.1.). Wyniki prezentowano również na międzynarodowych konferencjach naukowych (9 komunikatów).

3.7. Literatura uzupełniająca

1. Gołąb J, Jakóbiśiak M, Lasek W, Stokłosa T: Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, ISBN: 978-83-01-15154-6.
2. Steinman RM, Banchereau J 2007. Nature; 449: 419-426
3. Rinaldo CR. 2008. J. Int. Med. Jan; 265(1):138-58
4. Huang X., Fan Z., Colleton BA., Buchli R., H. Li, W.H. Hildebr, C.R. Rinaldo, 2005. J. Virol. 79: 3052–3062.
5. Van Compernelle SE., Taylor RJ., K. Oswald-Richter, J. Jiang, B.E. Youree, J.H. Bowie, M.J. Tyler, J.M. Conlon, D. Wade, C. Aiken, T.S. Dermody, K.V.N. Ramani, L.A. Rollins-Smith, D. Unutmaz, 2005. J. Virol. 79: 11598-11606.
6. Aliabadi HM., Lavasanifar A., 2006. Expert Opin. Drug. Deliv. 3: 139-162.
7. Gardikis K., Fessas D., Signorelli M., K. Dimas, C. Tsimplouli, M. Ionov, C. Demetzos, 2011. J. Nanosci. Nanotechnol. 11: 3764-3772.
8. Ionov M., Klajnert B., Gardikis K, Hatziantoniou S., B. Palecz, B. Salakhutdinov, J. Cladera, M. Zamaraeva, C. Demetzos, M. Bryszewska, 2010. J Therm Anal Calorim. 99: 741-747.
9. Pastor E., Matveeva E., A. Valle-Gallego, F.M. Goycoolea, M. Garcia-Fuentes, 2011. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 88/2: 601–609.
10. El-Ridy M.S., Abdelbary A., Essam T., Abd EL-Salam RM., Kassem AA. 2011. Drug Dev. Ind. Pharm. 37: 1491-1508.

11. Ionov M., Gardikis K., Wróbel D, S. Hatziantoniou, H. Mourelatou, J.P. Majoral, B. Klajnert, M. Bryszewska, C. Demetzos, 2011. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 82: 8- 12.
12. Padamwar MN., Patole MS., Pokharkar VBJ. 2011. *Lip. Res.* 21: 324-332.
13. Gardikis K., Hatziantoniou S., Signorelli M., Pusceddu M., Micha-Screttas M., Schiraldi A., Demetzos C., Fessas D. 2010 *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 81/1: 11-19.
14. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. 2003. *Curr Top Microbiol Immunol.* 276: 261-75
15. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. 2004. *Nat Med.* Dec; 10(12): 1359-65
16. Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. 2006. *J Cell Mol Med.* Apr-Jun;10(2): 364-75
17. Zhang H et al. 2009. *J Bio Chem.* Feb 4
18. Weissman D et al. 2000. *J. Immunol.* Oct; 165(8): 4710-7
19. Van Gulck ERA et al. 2006. *Blood.* Mar 107(5):1818-27
20. Hokey DA, Larregina AT, Erdos G, Watkins SC, Falo LD Jr. 2005. *Cancer Res.* Nov; 65(21): 10059-67
21. Little SR and Langer R. 2005. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 99: 93-118
22. Tan PH et al. 2005. *Blood.* 105(10): 3824-32
23. Duerr A, Wasserheit JN, Corey L. 2006. *Clin Infect Dis.* Aug; 43(4): 500-11
24. Barouch DH and Nabel GJ. 2005. *Hum Gene Ther.* Feb; 16(2): 149-56
25. Yang L, Yang H et al. 2008. *Nat Biotechnol.* March; 26(3): 326-34
26. Sekaly RP. 2008. *J Exp Med.* Jan; 205(1): 7-12
27. Doan LX, Li M, Chen C, Yoa Q. 2005. *Rev Med Virol.* Mar-Apr; 15(2): 75-88
28. Kabanov and Gendelman 2007. *Prog Polym Sci* 32:1054-1082
29. Maurer N, Fenske DB, Cullins PR 2001. *Expert Opin Biol Ther* 1:923-947
30. Lockman et al. 2002. *Drug Dev Ind Pharm* 28:1-13
31. Kreuter et al. 2003. *Pharm Res.* 20:409-416
32. Aliabadi and Lavasanifar 2006. *Expert Opin Drug Deliv* 3:139-162
33. Danso et al. 2004. *Br J Cancer* 90:2085-2091
34. Svenson S., Tomalia D. A., 2005. *Adv Drug Deliv Rev* 57:2106-2129
35. Boas U., Heegaard P. M. H. 2004. *Chem. Soc. Rev.* 33: 43-63
36. a) Padié C et al. 2009, *New J. Chem.*, 33, 318, b) Rolland O et al. 2009, *New J. Chem.*, DOI:10.1039/b901054h
37. a) Bermejo JF et al. 2007. *Chem. Eur. J.* 13: 483-495 b) Shcharbin D., Pedziwiatr E. et al. 2007. *Biomacromolecules* 8: 2059-2062 c) Chonco L et al. 2007. *Org. & Biomol. Chem.*, 5: 1886-1893
38. Haensler F., Szoka Jr. F. C, 1993. *Bioconjugate Chem.* 4: 372-379
39. For some examples see: a) Bielinska A. U. et al. 1999. *Bioconjugate Chem.*, 10: 843-850 b) Dennig J., Duncan E., 2002. *Rev. Mol. Biotech.* 90: 339-347 c) Dennig, J., 2003. *Top. Curr. Chem.* 228: 227-236
40. Tang M. X., Redemann C. T., Szoka Jr. F. C., 1996. *Bioconjugate Chem.* 7: 703-714
41. Caminade A. M., Majoral J. P., 2005. *Progr. Polym. Sci.*, 30: 491-505
42. Ortega P. et al. 2006. *Eur. J. Inorg. Chem.* 7: 1388-1396.
43. a) Niidome T. et al. 2002. *J. Pep. Sci.* 6: 271-279 b) Ohsaki M. et al. 2002. *Bioconjugate Chem.* 13: 510-517
44. Zinselmeyer B. H., Mackay S. P., Schatzlein A. G., Uchegbu I. F., 2002. *Pharm. Res.*, 19: 960-967
45. Waeckerle-Men Y and Groettrup. 2004. *Adv Drug Deliv Rev.* Jan; 57(3): 475-82
46. Niederhafner, P., Reins M., Sebestik J. et al, 2008. *J. Pep. Sci.* 14 (5): 556-587
47. Poupot, M., Griffe, L., Marchand P., 2006. *FASEB J*, 20 (13): 2339-2351
48. Bermejo JF., Ortega P., Chonco L., R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. De Jesus, F.J. De la Mata, J.C. Flores, Gomez R., Munoz-Fernandez MA., *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 483-495.
49. Ortega P., Bermejo JF., Chonco, L., E. De Jesus, F.J. De la Mata, G. Fernandez, J.C. Flores, R. Gymez, M.E. Serramha, M.A. Munoz-Fernandez, *Eur. J. Inorg. Chem.* 1 (2006) 1388–1396.
50. Rasines B., Hernández-Ros JM., de las Cuevas N., J.L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M.A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F.J. de la Mata, 2009. *Dalton, Trans.* 40: 8704-8713.
51. Caminade AM., Majoral JP., 2005. *Progr. Polym. Sci.* 30: 491.
52. Solassol, J. Crozet, C., V. Perrier, J. Leclair, F. Beranger, A.M. Caminade, B. Meunier, D. Dormont, J.P. Majoral, S. Lehmann, 2004. *J. Gen. Virol.* 85: 1791–1799.
53. Ionov M., Ciepluch K., Moreno B.R., Appelhans D., Sánchez-Nieves J., Gómez R., de la Mata F.J., Muñoz-Fernández M.A. Bryszewska M. 2013. *Curr. Med. Chem.* 20: 3935-3942.
54. Bryszewska, M. & Palecz, B. 1994. *Acta Univ. Lodz. Folia Biochim. Biophys.* 10: 53-69.

4. Informacje bibliometryczne

4.1. Indeks Hirscha

(wg bazy Web of Science z sierpnia 2014 r.)

$$H = 10$$

4.2. Wskaźniki Impact Factor, punkty MNiSW oraz liczba cytowań

Tab. 3. Wskaźniki Impact Factor, podana bieżąca (za 2013) wartość wskaźników IF dla czasopism, punkty MNiSW (z 2013), oraz liczba cytowań (na podstawie bazy Web of Science z sierpnia 2014) **całego dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora.**

Podsumowanie działalności publikacyjnej	Wskaźniki IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań
Główne osiągnięcia naukowe	22,21	185	7
Pozostałe publikacje	79,08	775	261
Komunikaty zjazdowe opublikowane w czasopismach punktowanych	13,23	85	0
Cały dorobek naukowy	114,52	1045	268

Niewielka liczba cytowani artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe wynika z faktu publikacji większości tych prac w latach 2013 i 2014.

Łódź, dnia _____ 17.09.2014 _____



.....
(podpis habilitanta)