

dr Anna Janaszewska

AUTOREFERAT

Katedra Biofizyki Ogólnej  
Instytut Biofizyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, maj 2018

## 1. Imię i nazwisko

**Anna Janaszewska**

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1998 – **magister inżynier fizyki** w zakresie fizyki ciała stałego.

Praca wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz w Instytucie Fizyki Wydziału Fizyki Technicznej, Informatyki i Matematyki Stosowanej Politechniki Łódzkiej (indywidualny tok studiów) na temat: „Określanie zdolności antyoksydacyjnej osocza krwi metodami fizycznymi” pod kierunkiem dr Danuty Ertel.

2003 – **doktor nauk biologicznych** w zakresie biofizyki.

Praca wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego na temat: „Porównanie wybranych metod oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w odniesieniu do osocza krwi i homogenatów tkanek” pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Bartosza.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1998 – 2003 **doktorantka**, Stacjonarne Studium Doktoranckie Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego

2003 – 2006 urlop macierzyński,

2006 – 2008 **adiunkt** w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

od 2008 zatrudnienie w Katedrze Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki:

2008 – 2010 **post-doc** w projekcie na rzecz Fundacji Nauki Polskiej TEAM/2008-1/5 pt. „Właściwości biologiczne i zastosowania biomedyczne dendrymerów” – kierownik projektu prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz,

2010 – 2013 **post-doc** w projekcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Biomedyczne zastosowanie dendrymerów” – kierownik projektu prof. dr hab. Maria Bryszewska,

2013 – 2016 **post-doc** w projekcie NCN Harmonia UMO-2013/08/M/NZ1/00761 – „Badanie dendrymerów fosforowych jako układów transportujących fotouczulacze” - kierownik projektu prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz,

2016 – nadal **adiunkt naukowy** w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego.

## 4. 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.)

**4a) Tytuł osiągnięcia naukowego:****„Biologiczne właściwości i potencjalne biomedyczne zastosowania modyfikowanych dendrymerów PAMAM”**

Prezentowane osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie tych publikacji zostały umieszczone w Załączniku 5 (oświadczenia współautorów) i Załączniku 4 (kopie publikacji).

**4b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

- 4b1. Ciolkowski, M., Petersen, J.F., Ficker, M., **Janaszewska, A.**, Christensen, J.B., Klajnert, B., Bryszewska, M. Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility (2012) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8 (6), 815-817 (IF 6,930, pkt. MNiSW 40)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy przy planowaniu oraz wykonaniu doświadczeń in vitro.*

*Mój udział procentowy szacuję na 20%.*

- 4b2. **Janaszewska, A.**, Ciolkowski, M., Wróbel, D., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Bryszewska, M., Klajnert, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups reveals negligible toxicity against three rodent cell lines (2013) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9 (4), 461-464 (IF 5,978, pkt. MNiSW 40)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i wyborze metodyki badań, wykonaniu części oznaczeń, analizie i opracowaniu wyników badań oraz współpracy przy przygotowaniu pracy do druku*

*Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

- 4b3. **Janaszewska, A.**, Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Klajnert-Maculewicz, B. PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone – in vitro assessment of neurotoxicity (2015) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (2), 409-411 (IF 5,671, pkt. MNiSW 40)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i wyborze metodyki badań, wykonaniu większości oznaczeń, analizie i opracowaniu wyników badań, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu pracy do druku.*

*Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

- 4b4. Svenningsen, S.W., **Janaszewska, A.**, Ficker, M., Petersen, J.F., Klajnert-Maculewicz, B., Christensen, J.B. Two for the price of one: PAMAM-dendrimers with mixed phosphoryl

choline and oligomeric poly(caprolactone) surfaces (2016) *Bioconjugate Chemistry*, 27 (6), 1547-1557 (IF 4,818, pkt. MNiSW 35)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyborze metodyki badań in vitro, wykonaniu części oznaczeń, analizie i opracowaniu wyników badań in vitro, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu części pracy do druku.*

*Mój udział procentowy szacuję na 44%.*

- 4b5. **Janaszewska, A.**, Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Paolucci, V., Christensen, J.B., Tomalia, D.A., Klajnert-Maculewicz, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups-its uptake, efflux, and location in a cell (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 211-216 (IF 3,887, pkt. MNiSW 35)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i wyborze metodyki badań, wykonaniu większości oznaczeń, analizie i opracowaniu wyników badań, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu pracy do druku.*

*Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

- 4b6. **Janaszewska A**, Gorzkiewicz M, Ficker M, Petersen JF, Paolucci V, Christensen JB, Klajnert-Maculewicz B. Pyrrolidone modification prevents PAMAM dendrimers from activation of pro-inflammatory signaling pathways in human monocytes. (2017) *Molecular Pharmaceutics* 15(1), 12-20 (IF 4,440, pkt. MNiSW 40)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części oznaczeń, analizie i opracowaniu wyników badań, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu części pracy do druku.*

*Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

- 4b7. Konopka, M, **Janaszewska, A**, Klajnert-Maculewicz, B. Intrinsic fluorescence of PAMAM dendrimers – quenching studies (2018) *Polymers* 10, 540; doi:10.3390/polym10050540 (IF 3,364, pkt. MNiSW 40)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy przy wykonaniu doświadczeń oraz na przygotowaniu części pracy do druku.*

*Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

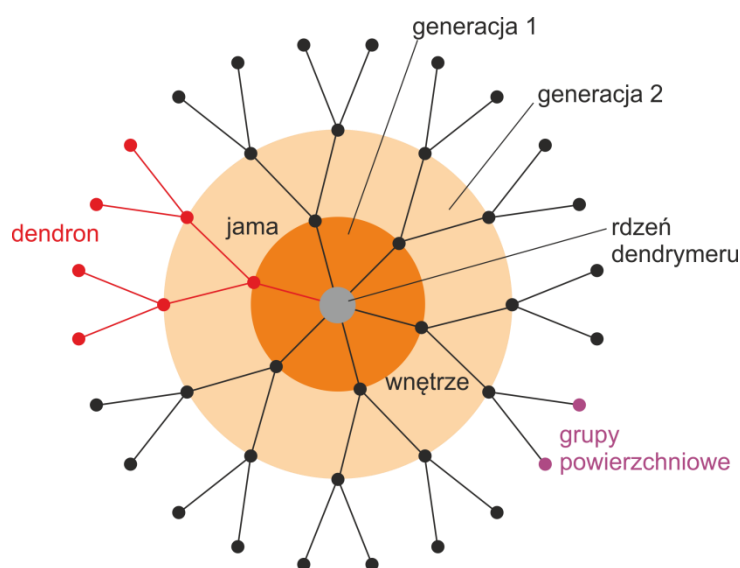
Łączny współczynnik oddziaływania (zgodny z rokiem opublikowania) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego **IF = 35,088; pkt. MNiSW 270; liczba cytowań 76.**

**4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

## Wprowadzenie do tematyki badań

Historia dendrymerów rozpoczęła się blisko 40 lat temu od pionierskich prac Tomalii [1], Newkome'a [2] i Vögtle'a [3]. Przez lata liczne grupy badaczy przyczyniły się zarówno do powstania i rozwoju nowych rodzajów dendrymerów, jak i do zbadania ich szerokich biomedycznych zastosowań. W ciągu ostatnich dziesięciu lat w tematyce dendrymerów pojawiało się średnio 1500 publikacji rocznie. Powstaje pytanie: co sprawia, że dendrymery są tak interesujące?

Po pierwsze, dendrymery mają zwartą, uporządkowaną budowę i ściśle określoną masę cząsteczkową. Są to monodispersyjne, wielowartościowe, zazwyczaj kuliste makromolekuły o regularnej i bardzo rozgałęzionej trójwymiarowej strukturze. Składają się z centralnej cząsteczki – rdzenia, otoczonego przez rozgałęzione monomery tworzące dendrony, które są zakończone funkcjonalnymi grupami powierzchniowymi. Liczba warstw przyłączonych do rdzenia determinuje generację dendrymeru, oznaczoną jako  $G_n$ , gdzie  $n$  może być w zakresie od 0 do ok. 12. Rysunek 1 ilustruje ogólną strukturę cząsteczki dendrymeru.

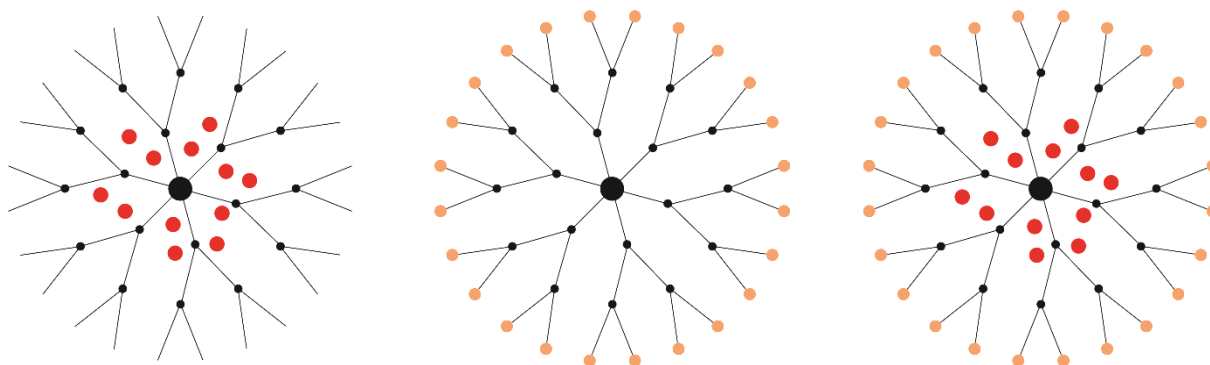


Rysunek 1. Schemat struktury dendrymeru.

Po drugie, możliwe jest precyzyjne zaprojektowanie struktury dendrymeru. Podczas syntezy dendrymeru chemicy mogą kontrolować rozgałęzianie (topologię) i wprowadzać modyfikacje powierzchniowych grup funkcyjnych.

Po trzecie, większość dendrymerów wykazuje dobrą rozpuszczalność w wodzie. Taka właściwość jest niezbędna dla potencjalnych nośników leków, decyduje też o wysokiej biodostępności. Wreszcie, wiele dendrymerów może łatwo przenikać przez błonę komórkową i ułatwiać transport leków, które tworzą z dendrymerami koniugaty bądź kompleksy. Rysunek 2

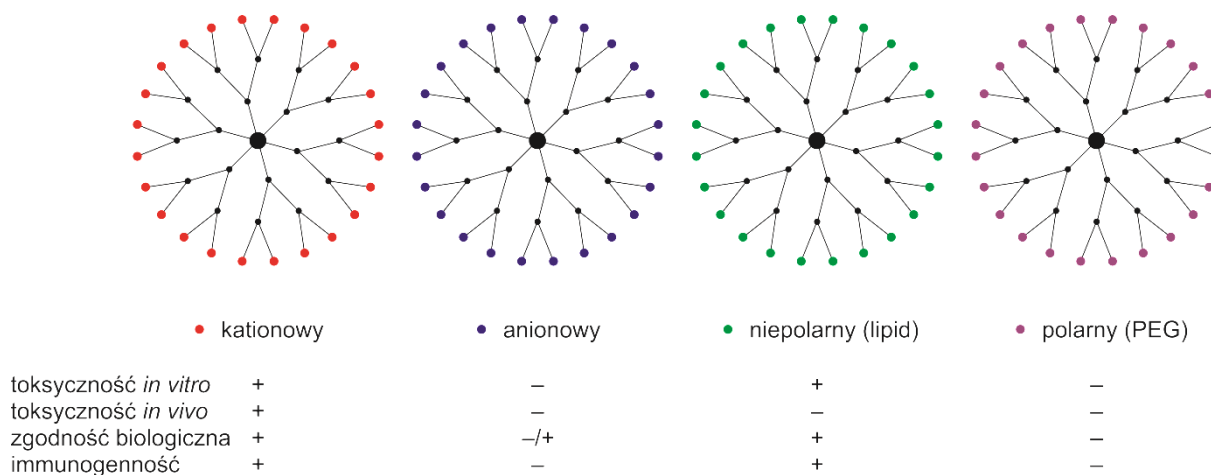
prezentuje trzy sposoby zastosowania dendrymerów jako nanonośników. Dzięki swojej specyficznej strukturze i obecności wewnętrznych jam, nanocząsteczki idealnie nadają się do enkapsulacji leków. Ponadto, związki bioaktywne mogą być przyłączone do grup aktywnych na powierzchni dendrymeru. Ta sama cząsteczka dendrymeru może służyć jako nośnik zarówno enkapsulowanych jak i powierzchniowo przyłączonych związków. Co istotne, rozmiary dendrymeru (jego średnicę) można łatwo modyfikować, tak aby poprawić takie właściwości, jak biodystrybucja lub zgodność biologiczna.



Rysunek 2. Trzy sposoby kompleksowania lub koniugacji cząsteczek np. leku z cząsteczką dendrymeru: kapsułkowanie w wewnętrznych wnękach (enkapsulacja) (A), wiązanie do powierzchni (B) lub zastosowanie obu metod jednocześnie (C).

Powyższe właściwości sprawiają, iż dendrymery są doskonałymi kandydatami do zastosowań biomedycznych i dlatego powinny spełniać kilka dodatkowych kryteriów. Powinny być nietoksyczne, nieimmunogenne, biodegradowalne, posiadać zdolność wnikania do komórek, pozostawać w układzie krążenia przez czas niezbędny do osiągnięcia pożądanego efektu oraz posiadać zdolność do docierania do konkretnych struktur biologicznych. Wiele grup dendrymerów spełnia większość tych wymagań. Spośród wymienionych wymagań, najczęstszym ograniczeniem zastosowania dendrymerów w medycynie jest ich wysoka cytotoksyczność. Cytotoksyczność dendrymerów zależy w dużej mierze od liczby i ładunku funkcyjnych grup powierzchniowych. Dendrymery kationowe zazwyczaj charakteryzują się wysoką toksycznością, podczas gdy anionowe i pozbawione ładunku dendrymery wykazują niewielkie efekty toksyczne lub ich brak. Na przykład dendrymery poli(amidoaminowe) (PAMAM) i poli(propylenoiminowe) (PPI) posiadające terminalne pierwszorzędowe aminy charakteryzują się zależną od generacji i stężenia toksycznością [4,5], podczas gdy dendrymery karbokrzemowe (CSi-PEO) modyfikowane grupami neutralnymi lub anionowymi są znacznie mniej toksyczne [5]. Zatem, jak pokazują badania, modyfikacja powierzchni kationowego dendrymeru grupami powierzchniowymi ujemnie naładowanymi lub obojętnymi zmniejsza jego cytotoksyczność [5]. Również funkcjonalizacja powierzchni dendrymeru za pomocą glikolu polietylenowego (PEG),

pirolidonu lub innego związku biologicznie zgodnego może znacznie obniżyć cytotoksyczność tych nanocząsteczek [6]. Cytotoksyczność kationowych dendrymerów spowodowana jest oddziaływaniem między ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi a dodatnio naładowaną powierzchnią dendrymeru. Taka interakcja prowadzi do tworzenia „kanałów” w błonie komórkowej, jej uszkodzenia, a w konsekwencji do wycieku zawartości komórkowej i ostatecznie do śmierci komórki. Rysunek 3 ilustruje, jak ładunek powierzchniowy wpływa na biodostępność, immunogenność, a także toksyczność *in vitro* i *in vivo* dendrymerów.



Rysunek 3. Wpływ ładunku powierzchniowego dendrymerów na ich zgodność biologiczną, immunogenność, a także toksyczność *in vitro* i *in vivo*. "+" Oznacza, że istnieje efekt, "-" brak efektu.

Dendrymery PAMAM i PPI są dwiema najczęściej badanymi grupami dendrymerów, prawdopodobnie ze względu na ich szeroką dostępność komercyjną. Równie szeroko zostały przebadane dendrymery fosforowe (P-dendrimers), dendrymery karbokrzemowe (CBS), dendrymery poli(L-lizynowe) (PLL), poliestry (PGLSA-OH), dendrymery kwasu poli(2,2-bis(hydroksymetylo) propionowego (bis-MPA) lub dendrymery peptydowe. Wszystkie badane grupy dendrymerów oceniano pod kątem ich potencjalnego biomedycznego zastosowania jako systemy dostarczania leków, środki kontrastowe do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI), nośniki materiału genetycznego, sztuczne białka, syntetyczne szczepionki, środki przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne lub czynniki terapeutyczne w zaburzeniach neurodegeneracyjnych.

Boas i wsp. wykazali, iż dendrymery PPI funkcjonalizowane tiomocznikiem mogą być stosowane jako nośnik leku. Małe cząsteczki leku enkapsulowane we wnętrzu dendrymerów pozostawały w nich nawet po dializie. Liczba enkapsulowanych cząstek leku była wprost proporcjonalna do wielkości i kształtu dendrymeru. Uwolnienie części lub wszystkich enkapsulowanych cząsteczek leku było możliwe w kontrolowanych warunkach częściowej lub

całkowitej hydrolizy [7]. Również enkapsulacja powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego, cisplatyny, w dendrymerach PAMAM skutkowała wolniejszym uwalnianiem leku, większą akumulacją w guzach litych oraz zmniejszeniem toksyczności ogólnej w porównaniu z wolną cisplatyną [8]. Kolhe i wsp. zastosowali dendrymery PAMAM G3 i G4 jako nośniki przeciwzapalnego leku ibuprofenu. Do jednej cząsteczki dendrymeru PAMAM-G4-NH<sub>2</sub> przyłączano poprzez oddziaływania elektrostatyczne między terminalnymi aminami dendrymerów a grupą karboksylową leku aż do 78 cząsteczek ibuprofenu. Skompleksowany lek wnikał do komórek A549 znacznie szybciej niż wolny, co potwierdza, iż dendrymery mogą być wydajnymi transporterami leków do wnętrza komórek [9].

Od czasu pionierskich prac Lauterbur'a, Wiener'a, Tomalii i wsp. [10] liczne grupy badawcze opracowały nowe substancje kontrastujące stosowane w MRI oparte na bazie dendrymerów, np. Kobayashi i Brechbiel w swoich pracach pokazali właściwości nanocząstek kontrastujących z rdzeniami dendrymerów [11,12].

Terapia fotodynamiczna (PDT) to obiecująca metoda leczenia oparta na zastosowaniu fotouczulaczy. Cząsteczka fotouczulacza, aktywowana światłem, powoduje tworzenie tlenu singletowego bądź reaktywnych form tlenu (RFT), które są toksyczne dla naświetlonych komórek nowotworowych. Jednak bardzo często zastosowanie fotouczulacza o dużej zdolności wytwarzania tlenu singletowego bądź RFT jest ograniczone ze względu na jego toksyczność ciemną (bez naświetlenia) czy hydrofobowość. Dlatego stosuje się dendrymery do poprawy rozpuszczalności i zwiększenia efektywności działania tych związków. Przykładowo, dendrymery fosforowe stosowano jako nośniki różu bengalskiego (RB) i błękitu metylenowego (BM) do komórek raka podstawnokomórkowego skóry. Kompleks dendrymer-RB charakteryzował się wysoką fototoksycznością jasną w stosunku do badanej linii komórkowej, a system dostarczania oparty na dendrymerze zmniejszał ciemną toksyczność fotouczulaczy dzięki obniżeniu stosowanej dawki [13].

Co ciekawe, dendrymery są czasami określane jako sztuczne białka. Dzięki swoim nanometrowym wymiarom, kulistemu kształtowi i innym właściwościom mogą naśladować wiele ważnych białek. Na przykład, wielkość insuliny wynosi 3 nm, co jest porównywalne z dendrymerami PAMAM G3, cytochrom C ma średnicę 4 nm, podobnie jak w przypadku dendrymeru G4, podczas gdy wielkość hemoglobiny wynosi 5,5 nm tak jak cząsteczka PAMAM G5. Ponadto, można porównać wymiary dendrymerów do innych struktur biologicznych, na przykład: generacje 5 i 6 dendrymerów PAMAM mają średnicę w przybliżeniu równą grubości dwuwarstwy lipidowej błony komórek eukariota, podczas gdy dendrymery PAMAM G2 odpowiadają szerokości dupleksów DNA [14].



Dendrymery i kompleksy dendrymerów okazały się również skutecznymi środkami przeciwpatogennymi *in vitro*. Niemodyfikowane i modyfikowane maltozą dendrymery PPI testowano pod kątem ich potencjału przeciwko zestawowi patogennych mikroorganizmów – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*. Wykazano, że dendrymery PPI modyfikowane maltozą charakteryzują się najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną i selektywnością wobec bakterii Gram dodatnich *S. aureus*. Jednocześnie te nanocząsteczki wykazywały niewielką toksyczność dla komórek eukariotycznych [15]. Ponadto, enkapsulowanie soli srebra w dendrymerach PAMAM zwiększało aktywność bakteriobójczą w stosunku do różnych bakterii Gram dodatnich w porównaniu do niezwiązanych soli srebra [16]. Najbardziej zaawansowane badania nad dendrymerami jako środkami antywirusowymi dotyczą dendrymerów PLL modyfikowanych sulfonowymi grupami naftylu. Zostały one szeroko przebadane jako miejscowy mikrobiocyd do zapobiegania chorobom przenoszonym drogą płciową. Nanolek wykazuje aktywność przeciwko wirusowi niedoboru odporności (HIV), wirusowi opryszczki pospolitej HSV i bakteryjnym zakażeniom pochwy. Produkt oparty na PLL, o nazwie VivaGel<sup>®</sup>, został opracowany przez Starpharma (Melbourne, Australia). W 2012 roku firma rozpoczęła badania kliniczne III fazy w leczeniu bakteryjnego zakażenia pochwy. Badania przedkliniczne wykazały, iż VivaGel<sup>®</sup> jest bardzo skuteczny w zapobieganiu infekcjom humanizowanym szczepem małpiego wirusa niedoboru odporności (SHIV) [17].

Dendrymery są również badane jako potencjalne czynniki terapeutyczne w zaburzeniach neurodegeneracyjnych. Badania *in vitro* wykazały, że dendrymery mogą hamować tworzenie struktur amyloidowych typowych dla zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona i prionowa. Wasiak i wsp. wykazali, że kationowe dendrymery fosforowe G3 i G4 mogą hamować proces agregacji białka A $\beta$  i białka MAP-Tau. Ocenę cytotoksyczności produktów agregacji białka A $\beta$  1–28 przeprowadzono dla linii komórkowej neuroblastomy (N2a). Uzyskane wyniki pokazują, iż dendrymery fosforowe wpływały na obniżenie toksyczności zagregowanych form białka A $\beta$  1–28 [18].

Równie wiele badań poświęcono wykorzystaniu zakończonych grupą aminową dendrymerów PAMAM lub PPI jako niewirusowych czynników przenoszących siRNA i zwiększających wydajność transfekcji [19,20]. Stwierdzono również, iż dendrytyczne PLL mogą dostarczyć siRNA z taką samą wydajnością jak standardowo stosowana Lipofektamina 2000. Co więcej, dendrymery PLL posiadały doskonałą zdolność do wiązania się z siRNA i zapewniały ochronę przed atakiem DNazy I oraz internalizacji oligonukleotydu przez komórki [21].

Jak wynika z przytoczonych przykładów, dotychczas wynalezione dendrymery mają już szeroką gamę zastosowań biomedycznych. Jednak wiele z nich wymaga ulepszeń, dlatego ciągle

syntezowane są nowe rodzaje dendrymerów, bądź modyfikowane już istniejące. Wiedza na temat biologicznych właściwości dendrymerów ma duże znaczenie w kontekście poszukiwania nietoksycznych nanocząsteczek o potencjalnym zastosowaniu jako systemy dostarczania leków, środki kontrastowe do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego, nośniki materiału genetycznego, sztuczne białka, syntetyczne szczepionki, środki przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne lub czynniki terapeutyczne w zaburzeniach neurodegeneracyjnych. Poznanie nowo zsyntezowanych nanocząsteczek i ich interakcji z różnymi liniami komórkowymi może wskazać kierunek dalszych ulepszeń dendrymerów i wyłonić spośród nich te o najbardziej obiecujących właściwościach umożliwiając ich zastosowanie w medycynie.

#### Literatura

- [1] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. New class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal* 1985;17(1) 117-132
- [2] Newkome GR, Yao Z, Baker GR, Gupta VK. Cascade molecules: A new approach to micelles. *Journal of Organic Chemistry* 1985;50(11) 2003-2004
- [3] Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. "'Cascade"- and "Nonskid-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies". *Synthesis* 1978;2 155-158
- [4] Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm.* 2003;252(1-2) 263-6
- [5] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W, Duncan R. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release.* 2000;65(1-2) 133-48
- [6] Ciolkowski M, Petersen JF, Ficker M, Janaszewska A, Christensen JB, Klajnert B, Bryszewska M. Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility. *Nanomedicine.* 2012;8(6) 815-7
- [7] Boas U, Karlsson AJ, de Waal BF, Meijer EW. Synthesis and properties of new thiourea-functionalized poly(propylene imine) dendrimers and their role as hosts for urea functionalized guests. *J Org Chem.* 2001;66(6) 2136-45
- [8] Malik N, Evagorou EG, Duncan R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 1999;10(8) 767-76
- [9] Kolhe P, Misra E, Kannan RM, Kannan S, Lieh-Lai M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int J Pharm.* 2003;259(1-2) 143-60
- [10] Wiener EC, Brechbiel MW, Brothers H, Magin RL, Gansow OA, Tomalia DA, Lauterbur PC. Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn Reson Med.* 1994;31(1) 1-8
- [11] Kobayashi H, Brechbiel MW. Dendrimer-based nanosized MRI contrast agents *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5(6) 539-49
- [12] Kobayashi H, Brechbiel MW. Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(15) 2271-86

- [13] Dabrzalska, M., Janaszewska, A., Zablocka, M., Mignani, S., Majoral, J.P., Klajnert-Maculewicz, B. Cationic phosphorus dendrimer enhances photodynamic activity of rose bengal against basal cell carcinoma cell lines. *Mol. Pharm.* 2017; 14 (5) 1821-1830
- [14] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000;3(7) 232-245
- [15] Felczak A, Wronska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, Voit B, Rozalska S, Lisowska K. Antimicrobial activity of poly(propylene imine) dendrimers. *New Journal of Chemistry.* 2012;36(11) 2215-2222
- [16] Balogh L, Swanson DR, Tomalia DA, Hagnauer GL, McManus AT. Dendrimer-silver complexes and nanocomposites as antimicrobial agents. *Nano Letters* 2001;1(1) 18-21
- [17] <http://www.starpharma.com/vivagel>
- [18] Wasiak T, Ionov M, Nieznanski K, Nieznanska H, Klementieva O, Granell M, et al. Phosphorus dendrimers affect alzheimer's (A $\beta$  1-28) peptide and MAP-tau protein aggregation. *Molecular Pharmaceutics.* 2012;9(3) 458-69
- [19] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000;3(7) 232-245
- [20] Tack F, Bakker A, Maes S, Dekeyser N, Bruining M, Elissen-Roman C, Janicot M, Brewster M, Janssen HM, De Waal BF, Fransen PM, Lou X, Meijer EW. Modified poly(propylene imine) dendrimers as effective transfection agents for catalytic DNA enzymes (DNAzymes). *J Drug Target.* 2006;14(2) 69-86
- [21] Hofman J, Buncek M, Haluza R, Streinz L, Ledvina M, Cigler P. In vitro transfection mediated by dendrigraft poly(L-lysines): The effect of structure and molecule size. *Macromolecular Bioscience.* 2013;13(2) 167-76

### **Cel naukowy prac stanowiących osiągnięcie naukowe**

Celem naukowym prowadzonych badań była **analiza właściwości biologicznych dendrymerów PAMAM o zmodyfikowanej powierzchni w aspekcie potencjalnych zastosowań biomedycznych.**

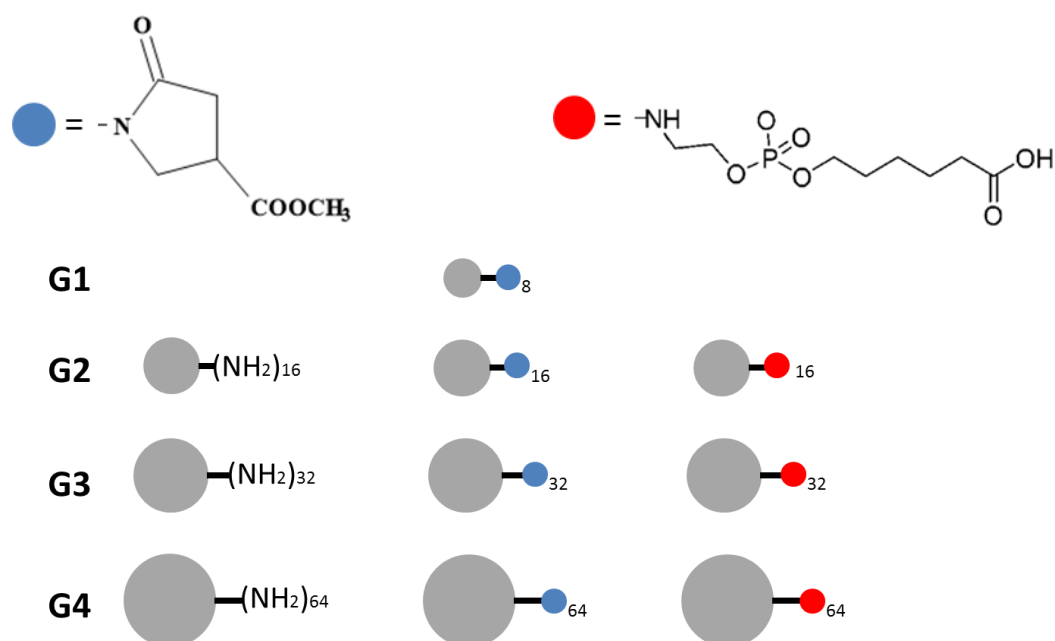
Problematyka prowadzonych przeze mnie badań, w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej, dotyczy analizy wpływu modyfikacji powierzchniowych grup aminowych komercyjnie dostępnych dendrymerów PAMAM na ich molekularne mechanizmy działania. Podjęte działania badawcze polegały na:

- (i) określeniu wpływu modyfikacji pirolidonom i fosfocholiną powierzchniowych grup aminowych dendrymerów PAMAM na ich cytotoksyczność,
- (ii) sprawdzeniu możliwości zastosowania modyfikowanych dendrymerów PAMAM jako potencjalnych czynników do bioobrazowania,
- (iii) określeniu wpływu modyfikacji pirolidonom dendrymerów PAMAM na odpowiedź prozapalną komórek w aspekcie zastosowania tych dendrymerów jako nośników leków.

## Material badawczy

Material do badań stanowiło dziesięć związków: cztery dendrymery PAMAM generacji 1, 2, 3 i 4 modyfikowane pirolidonem i trzy dendrymery PAMAM generacji 2, 3 i 4 modyfikowane fosfocholimą (zsyntezowane przez zespół prof. Jørna B. Christensena z Wydziału Chemii Uniwersytetu w Kopenhadze, Dania) oraz komercyjnie dostępne dendrymery PAMAM generacji 2, 3 i 4 (Sigma Aldrich 412406, 412422, 412449).

Do modyfikacji powierzchni komercyjnych dendrymerów PAMAM użyto związków biologicznie zgodnych tj. pirolidon (Rysunek 4 - kolor niebieski) czy fosfocholina (Rysunek 4 - kolor czerwony). Pirolidon jest stosowany jako obojętny rozpuszczalnik polimerów i składnik preparatów farmaceutycznych natomiast fosfocholina jest produktem pośrednim syntezy fosfatydylocholiny w tkankach.



Rysunek 4. Wizualizacja związków użytych do badań: komercyjne dendrymery PAMAM (kolor szary), modyfikowane pirolidonem (kolor niebieski) i fosfocholimą (kolor czerwony).

## Wyniki

### (i) wpływ modyfikacji pirolidonem i fosfocholimą powierzchniowych grup aminowych dendrymerów PAMAM na ich cytotoksyczność

4b1. Ciolkowski, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Janaszewska, A., Christensen, J.B., Klajnert, B., Bryszewska, M. Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility (2012) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8 (6), 815-817

- 4b2. Janaszewska, A., Ciolkowski, M., Wróbel, D., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Bryszewska, M., Klajnert, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups reveals negligible toxicity against three rodent cell-lines (2013) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9 (4), 461-464
- 4b3. Janaszewska, A., Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Klajnert-Maculewicz, B. PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone-In vitro assessment of neurotoxicity (2015) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (2), 409-411
- 4b4. Svenningsen, S.W., Janaszewska, A., Ficker, M., Petersen, J.F., Klajnert-Maculewicz, B., Christensen, J.B. Two for the price of one: PAMAM-dendrimers with mixed phosphoryl choline and oligomeric poly(caprolactone) surfaces (2016) *Bioconjugate Chemistry*, 27 (6), 1547-1557

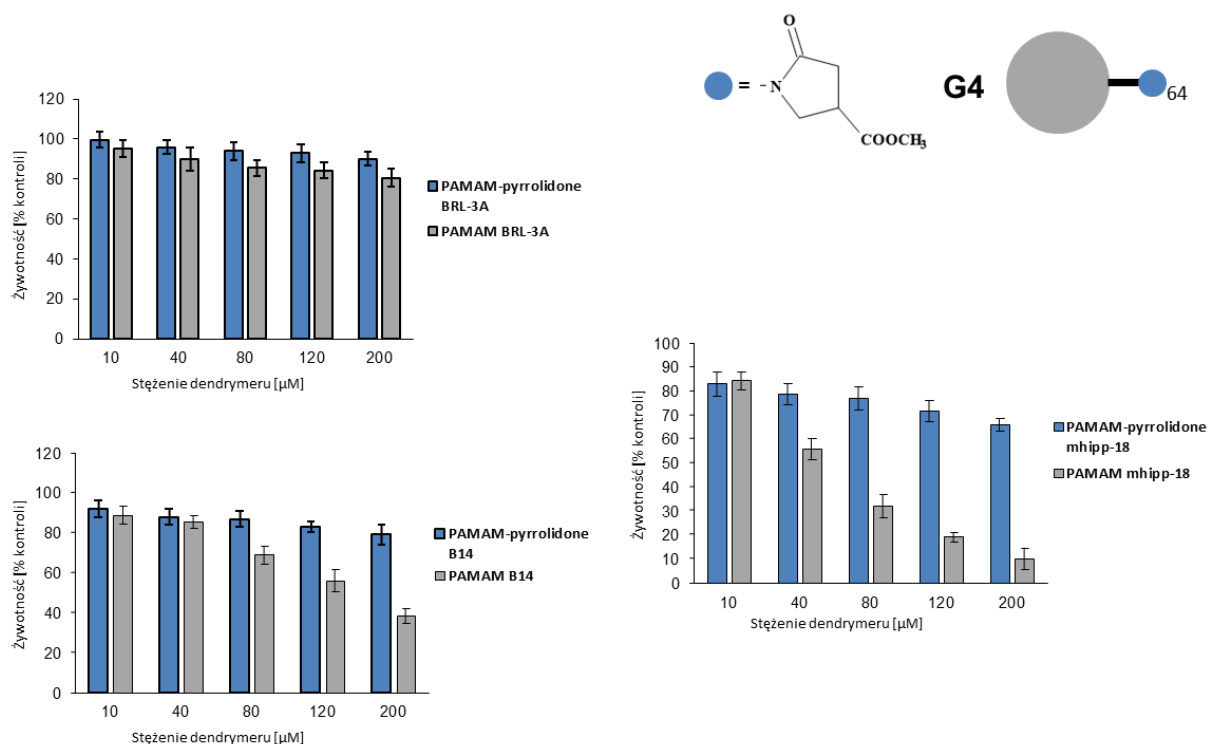
Nanocząstki o potencjalnym zastosowaniu biologicznym prócz nieimmunogenności, biodegradowalności i zdolności przenikania barier biologicznych, powinny być przede wszystkim nietoksyczne. Ponieważ cytotoksyczność dendrymerów kationowych zależy od liczby i charakteru funkcyjnych grup powierzchniowych, dąży się do modyfikacji ich powierzchni obojętnymi lub ujemnie naładowanymi grupami, tak aby cytotoksyczność zmniejszyć. Również **dendrymery PAMAM posiadające terminalne pierwszorzędowe aminy charakteryzują się toksycznością zależną od generacji i stężenia, dlatego celem funkcjonalizacji powierzchni tych dendrymerów związkami biologicznie zgodnymi pirolidonom czy fosfocholimą było obniżenie ich cytotoksyczności.**

Cytotoksyczność zmodyfikowanych dendrymerów została oceniona względem trzech linii komórek gryzoni (fibroblastów chomika chińskiego: B14, embrionalnych mysich komórek hipokampu: mHippoE-18 i komórek wyprowadzonych z wątroby szczura: BRL-3A) oraz trzech ludzkich linii komórek nowotworowych (wywodzących z raka sutka: SKBR3, raka szyjki macicy: HeLa i raka wątroby: Hep G2). Linie komórkowe zostały dobrane według rosnącej wrażliwości na niemodyfikowane dendrymery PAMAM.

Cytotoksyczność dendrymerów badano za pomocą testu MTT oraz uwalniania LDH, prowadząc hodowlę komórek w podłożu z FBS i pozbawionym ochronnej roli płodowej surowicy wołowej (FBS). Analizę procesu tworzenia reaktywnych form tlenu, zmian potencjału mitochondrialnego oraz frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych przeprowadzono z zastosowaniem cytometrii przepływowej z odpowiednimi sondami fluorescencyjnymi: H<sub>2</sub>DCF-DA, JC-9 i YO-PRO/PI. Wizualizację frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i sond fluorescencyjnych: bromku etydyny i oranżu akrydyny [4b2].

Uzyskane wyniki pokazały skuteczność obu sposobów modyfikacji. Generacja 2 i 3 dendrymerów PAMAM modyfikowanych pirolidonom nie była toksyczna względem badanych linii, dlatego w publikacji zamieszczono tylko wyniki dla generacji 4. **Dendrymery**

**modyfikowane pirolidonem** generacji 4 w najwyższym badanym stężeniu 200  $\mu\text{M}$  również były praktycznie nietoksyczne wobec komórek BRL-3A. Natomiast dla komórek B14 i mHippoE-18 żywotność komórek była obniżona tylko do 80 – 70%. To samo stężenie dendrymeru PAMAM niemodyfikowanego powodowało duży spadek żywotności komórek, w przypadku najwrażliwszych komórek mHippoE-18, nawet do 10% (Rysunek 5).



Rysunek 5. Wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego pirolidonem dendrymeru PAMAM G4 na żywotność komórek linii BRL-3A, B14 i mHippoE-18.

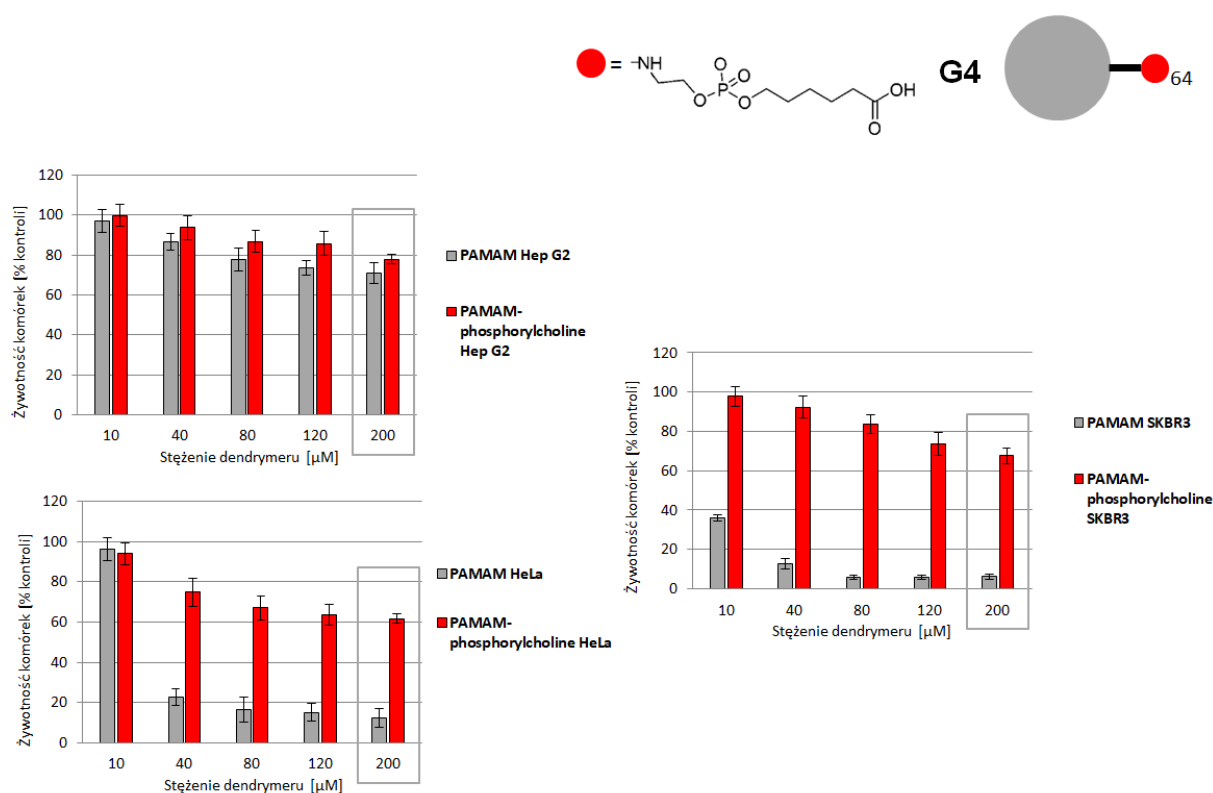
Analiza zmian potencjału mitochondrialnego i poziomu reaktywnych form tlenu nie wykazała znamienych statystycznie różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi hodowanymi bez dendrymeru i komórkami inkubowanymi 24 godziny z najwyższym badanym stężeniem 200  $\mu\text{M}$  dendrymeru. Cytometryczna analiza frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych pokazała, iż dendrymery modyfikowane pirolidonem kierują komórki na drogę apoptozy, jednakże w stopniu nie większym niż kilka procent całej populacji, co potwierdziły zdjęcia wczesnej apoptozy pojedynczych komórek, wykonane po wybarwieniu bromkiem etydyny i oranżem akrydyny [4b2].

Usunięcie z hodowli komórkowej pełniącej ochronną rolę płodowej surowicy wołowej nie miało znamienego wpływu na żywotność badanych linii komórkowych i w przypadku najwrażliwszych komórek mHippoE-18 żywotność komórek dla najwyższego użytego 200  $\mu\text{M}$  stężenia dendrymeru modyfikowanego pirolidonem wynosiła 60% (spadek o 10% w porównaniu

do wyników hodowli z FBS-em). Również zastosowanie testu uwalniania LDH wykazało niską cytotoksyczność badanego dendrymeru (kilkanaście procent) w porównaniu do dendrymeru niemodyfikowanego (prawie 80%) [4b3].

W przypadku zastosowań biologicznych i przy potencjalnym podaniu związku drogą dożylną bardzo istotny jest brak jego hemolityczności. Modyfikacja piroolidonem znosiła wysoką hemotoksyczność niemodyfikowanych dendrymerów PAMAM. Obserwowano również bardzo słabe oddziaływania z ludzką albuminą surowicy (HSA) – głównym białkiem osocza krwi [4b1].

Drugą grupą badanych związków były **dendrymery modyfikowane fosfocholiną** generacji 1, 2, 3 i 4. Ponownie, jak w przypadku modyfikacji piroolidonem, niższe generacje cechowały się brakiem lub bardzo niską toksycznością względem komórek Hep G2, HeLa i SKBR3 – różniących się wrażliwością na niemodyfikowane dendrymery PAMAM. Rysunek 6 przedstawia oznaczony metodą MTT wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego fosfocholiną dendrymeru PAMAM generacji 4 na żywotność komórek.

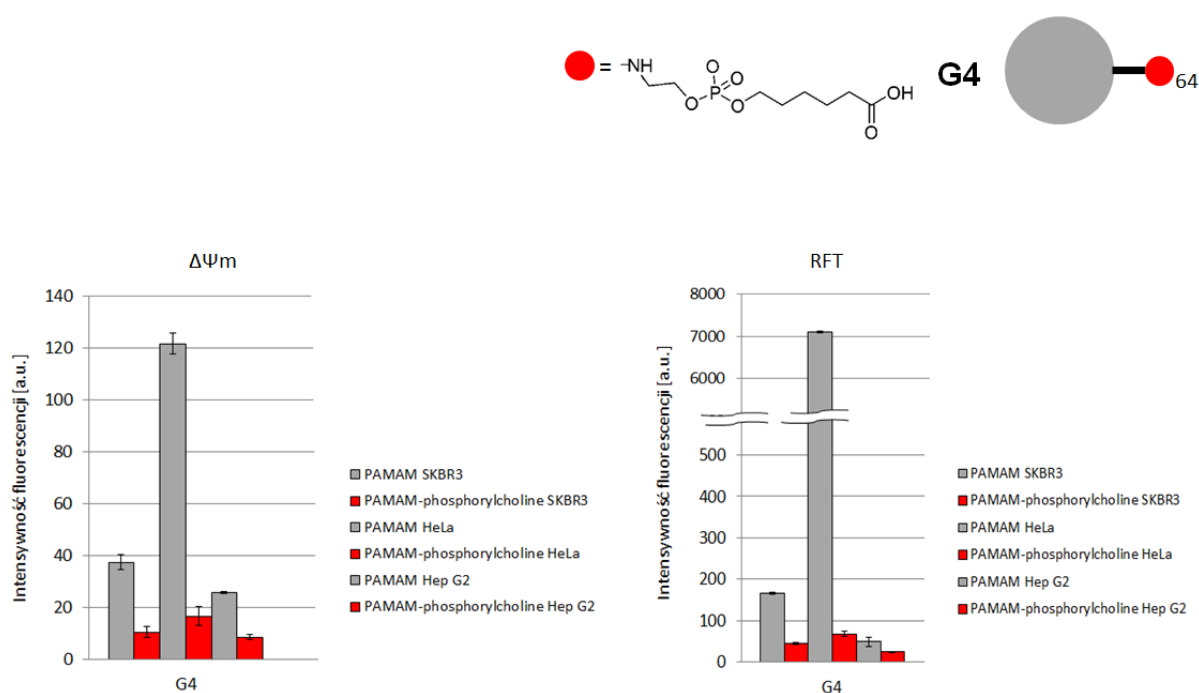


Rysunek 6. Wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego fosfocholiną dendrymeru PAMAM G4 na żywotność komórek linii Hep G2, HeLa i SKBR3.

Najbardziej toksyczna generacja 4 dendrymeru modyfikowanego fosfocholiną, użyta w najwyższym stężeniu 200 μM, powodowała spadek żywotności komórek Hep G2 do 80%, SKBR3 do 70% a HeLa do 60%. Zastosowanie testu uwalniania LDH potwierdziło wyniki

cytotoksyczności uzyskane testem MTT i wykazało toksyczność dendrymerów PAMAM generacji 4, użytych w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  po 24 godzinach inkubacji, modyfikowanego fosfocholiny na poziomie 20-40% oraz niemodyfikowanego dendrymeru na poziomie prawie 100%. Ze względu na bardzo wysoką cytotoxyczność niemodyfikowanego dendrymeru PAMAM względem badanych linii komórkowych do dalszych badań wybrano stężenie 40  $\mu\text{M}$ .

Ogromną różnicę pomiędzy działaniem modyfikowanego fosfocholiny i niemodyfikowanego dendrymeru PAMAM generacji 4 pokazała analiza zmian potencjału mitochondrialnego i poziomu reaktywnych form tlenu (Rysunek 7) [4b4].



Rysunek 7. Wpływ niemodyfikowanych i modyfikowanych fosfocholiny dendrymerów PAMAM G4 na zmianę potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi\text{m}$  – oznaczonego sondą MitoTrackerRed) i poziomu reaktywnych form tlenu (RFT – oznaczonego sondą  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) w komórkach linii Hep G2, HeLa i SKBR3.

Uzyskane wyniki pokazały, iż **modyfikacja aminowych grup powierzchniowych dendrymerów PAMAM, związkami zgodnymi biologicznie – piperolidonem i fosfocholiny – jest skutecznym sposobem na obniżenie cytotoxyczności natywnych dendrymerów PAMAM umożliwiającym ich zastosowanie w biologii.**

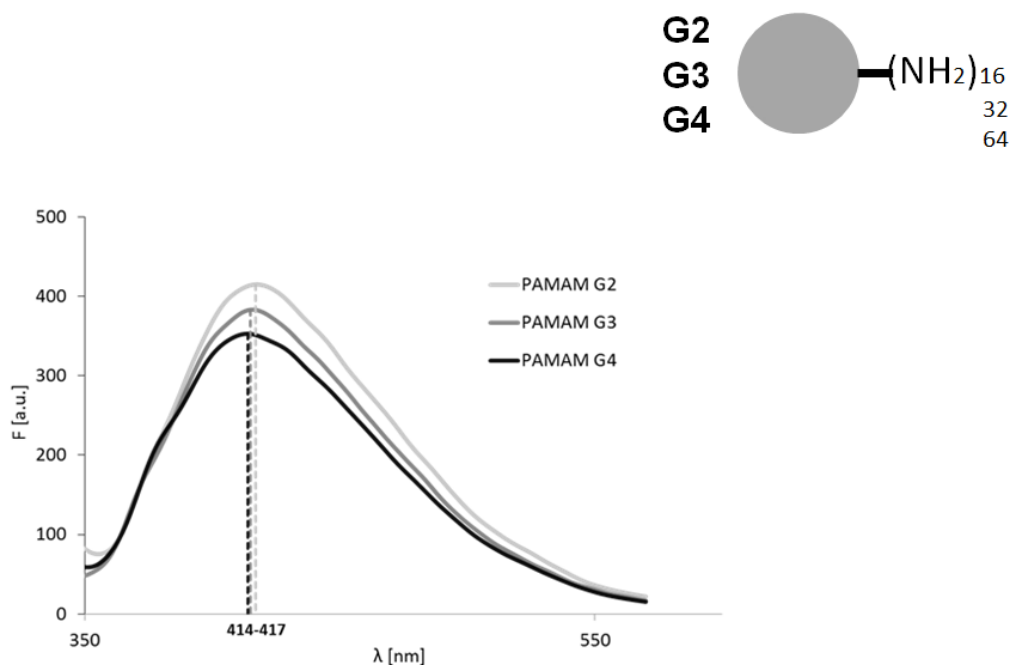


## (ii) zastosowanie modyfikowanych dendrymerów PAMAM jako potencjalnych biologicznych czynników do bioobrazowania

4b5. Janaszewska, A., Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Paolucci, V., Christensen, J.B., Tomalia, D.A., Klajnert-Maculewicz, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups-its uptake, efflux, and location in a cell (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, pp. 211-216.

4b6. Konopka, M., Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B. Intrinsic fluorescence of PAMAM dendrimers – quenching studies (2018) *Polymers* 10, 540; doi:10.3390/polym10050540

Dendrymery PAMAM posiadają bardzo ważną właściwość. Mimo, iż w swojej strukturze nie posiadają typowych fluoforów, emitują niebieską fluorescencję. Zjawisko to określa się jako NTIF (z ang. non-traditional intrinsic fluorescence). Dotychczas najbardziej zaawansowane badania nad naturą niespecyficznego fluorescencji dendrymerów PAMAM, prowadzone przy użyciu metod teoretycznej chemii kwantowej [22], wykazały, iż zarówno kwas imidowy, jak i trzeciorzędowa sól amonowa mogą być źródłem fluorescencji dendrymerów PAMAM. Składniki te są produktami transformacji grup amidowych znajdujących się w każdej warstwie struktury dendrymeru i trzeciorzędowych amin obecnych w rdzeniu dendrymeru. Nasze badania z zastosowaniem wygaszaczy, które są zwykle używane do badania własnej fluorescencji białek (tj. KI, CsCl i akryloamid), również potwierdziły, iż w dendrymerach PAMAM występują dwa odrębne, różniące się lokalizacją ośrodki fluorescencji [4b6].



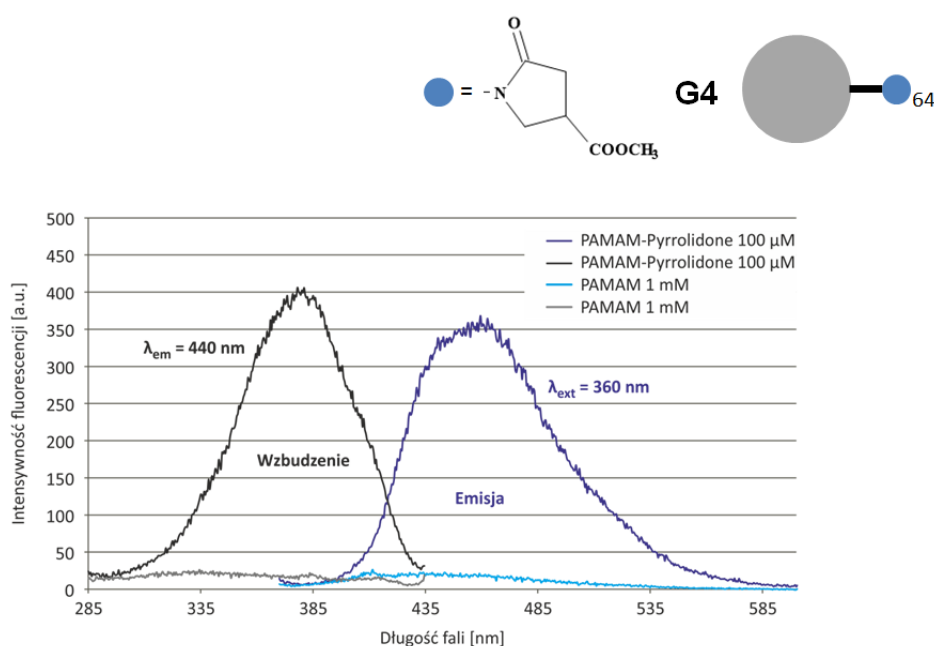
Rysunek 8. Widma emisji dendrymerów PAMAM ( $c = 1 \text{ mM}$ ).  $\lambda_{\text{wzb}} = 333 \text{ nm}$ ,  $330 \text{ nm}$  i  $334 \text{ nm}$  odpowiednio dla PAMAM G2, PAMAM G3 i PAMAM G4.

Dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym między anionowymi jonami jodu a kationowymi grupami dendrymerów, jodek potasu wygaszał zlokalizowane bliżej powierzchni dendrymeru grupy amidowe. Natomiast polarny, ale nienaładowany akryloamid wygaszał również wewnętrzną fluorescencję dendrymeru pochodzącą od trzeciorzędowych amin. Dla neutralnego pH 7,4 maksymalna intensywność fluorescencji była odwrotnie proporcjonalna do generacji dendrymeru i najsilniejszą fluorescencję obserwowano dla PAMAM G2, a najsłabszą dla PAMAM G4 (Rysunek 8). I odwrotnie, przy niskich wartościach (pH < 5) najsilniejszą fluorescencję obserwowano dla wyższych generacji [4b6]. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami przeprowadzonymi przy podobnych pH [23].

Niestety wysokie, toksyczne 1 mM stężenie niemodyfikowanych dendrymerów PAMAM potrzebne do uzyskania mierzalnej fluorescencji oraz konieczność zastosowania niskiego, niefizjologicznego pH ograniczają możliwość zastosowania tych dendrymerów jako znaczników fluorescencyjnych w układach biologicznych. Rozwiązaniem może być zastosowanie modyfikacji chemicznych. Badania pokazały, iż intensywność fluorescencji dendrymerów PAMAM może wzrosnąć po utlenieniu oksydazą czy nadsiarczaniem amonu trzeciorzędowych amin, co umożliwi ich ograniczone zastosowanie jako nośników oligonukleotydów antysensowych, łącząc funkcję nośnika i jednoczesnego bioobrazowania [24,25]. Również użycie do modyfikacji dendrymerów PAMAM zgodnych biologicznie grup powierzchniowych, z jednej strony redukując toksyczność dendrymerów, z drugiej może zwiększać ich autofluorescencję, umożliwiając śledzenie ich losów w układach biologicznych. Dlatego **celem modyfikacji dendrymerów PAMAM pirolidonom i fosfocholimą, oprócz obniżenia cytotoxyczności, było wzmocnienie niespecyficznego fluorescencji tych dendrymerów.**

Analiza widm emisji modyfikowanych i niemodyfikowanych dendrymerów pokazała, iż tylko **modyfikacja pirolidonom skutecznie wzmacnia niespecyficzną fluorescencję dendrymerów PAMAM.** Co istotne, dla neutralnego pH 7,4 maksymalna intensywność fluorescencji była wprost proporcjonalna do generacji dendrymeru. Rysunek 9 przedstawia porównanie widm emisji dendrymerów PAMAM generacji 4 – niemodyfikowanych i modyfikowanych pirolidonom. Tak duże wzmocnienie intensywności fluorescencji umożliwiło obserwację modyfikowanych pirolidonom dendrymerów PAMAM w komórkach (Rysunek 10 – zamieszczony na osobnej stronie).

Modyfikowany pirolidonom dendrymer PAMAM generacji 4 lokował się w różnych przedziałach komórek (endolizosomalnych mHippoE-18 i B14 oraz w jądrze BRL-3A (Rysunek 10)), a szybkość jego wnikania zależała od pochodzenia tkankowego komórek. Analiza cytometryczna szybkości wnikania pokazała, iż dendrymer najszybciej był transportowany do komórek mHippoE-18, a najwolniej do komórek B14 [4b5].

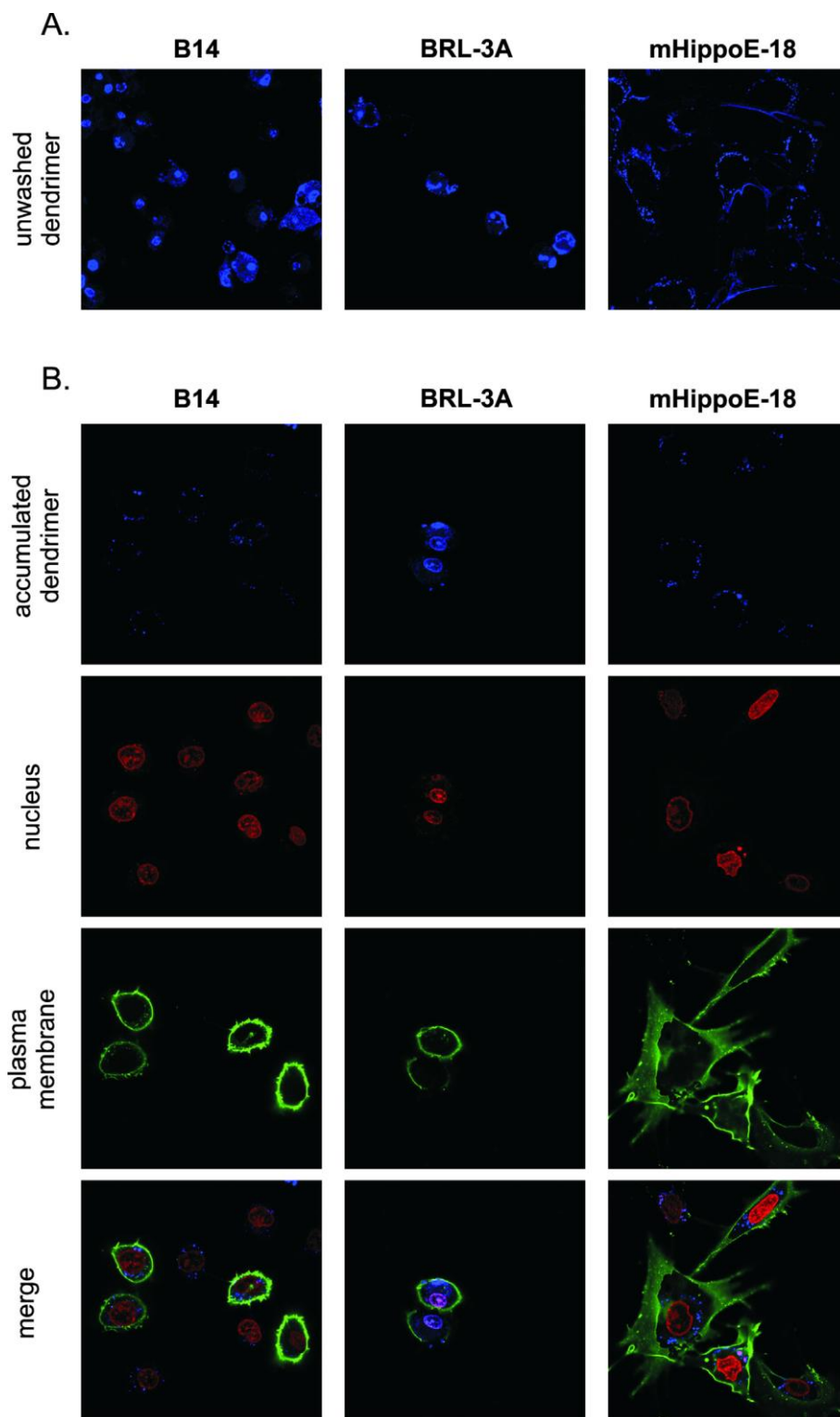


Rysunek 9. Widma wzbudzenia i emisji dendrymerów PAMAM G4 niemodyfikowanych ( $c = 1 \text{ mM}$ ) i modyfikowanych pirolidonem ( $c = 0,1 \text{ mM}$ ) – pH 7,4.

Podsumowując, badany dendrymer PAMAM generacji 4 modyfikowany pirolidonem posiada trzy wyróżniające właściwości: (1) autofluorescencję wystarczająco intensywną, aby można ją było obserwować *in vitro* (2) bardzo niską cytotoksyczność, oraz (3) zdolność do wnikania do komórek. Dzięki unikatowej autofluorescencji możliwe jest prowadzenie dalszych badań różnorodnych mechanizmów biologicznych regulujących transport tej klasy nanocząsteczek. A ponadto, **jednoczesne połączenie dwóch funkcji: nośnika i bioobrazowania ma szczególne zastosowanie biologiczne, gdyż może być pomocne w skutecznej i szybkiej ocenie efektywności transportu leków do komórek czy tkanek.**

#### Literatura

- [22] Ji, A., Qian, Y. A study using quantum chemical theory methods on the intrinsic fluorescence emission mechanism of PAMAM. RSC Advances 2014, 4, 58788-58794
- [23] Wang, D., Imae, T. Fluorescence emission from dendrimers and its pH dependence. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 13204-13205
- [24] Wang, D., Imae, T., Miki, M. Fluorescence emission from PAMAM and PPI dendrimers. J Colloid Interface Sci. 2007, 306, 222–227
- [25] Tsai, Y.J., Hu, C.C., Chu, C.C., Imae, T. Intrinsically fluorescent PAMAM dendrimers as gene carrier and nanoprobe for nucleic acids delivery: bioimaging and transfection study. Biomacromolecules 2011, 12, 4283–4290.



Rysunek 10. Obrazowanie konfokalne komórek B14, BRL-3A i mHippoE-18 inkubowanych 24 godziny z 100  $\mu$ M dendrymerem PAMAM G4 modyfikowanym pirolidonem. (A) Niespecyficzna niebieska fluorescencja dendrymeru - komórki neutralne. (B) Akumulacja dendrymeru (niebieski kanał), komórki wybarwiono RedDot1 – jądro

komórkowe (kanał czerwony) i NeuroDio carboncyanine – błona komórkowa (kanał zielony). Przed obrazowaniem komórki utrwalono formaldehydem. (W celu lepszej interpretacji kolorów zdjęcia dostępne są on-line [4b5]).

### **(iii) wpływ modyfikacji pirolidonem dendrymerów PAMAM na odpowiedź prozapalną komórek w aspekcie zastosowania tych dendrymerów jako nośników leków**

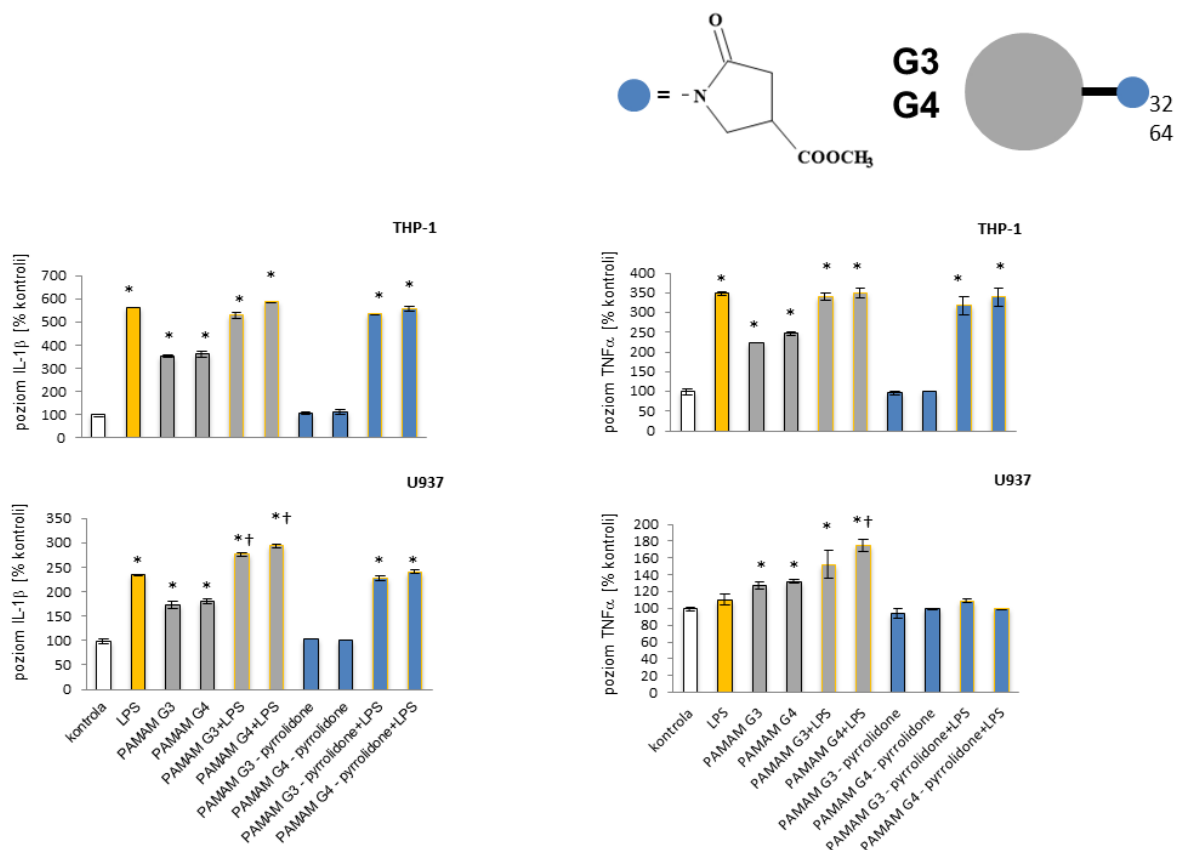
4b7. Janaszewska A, Gorzkiewicz M, Ficker M, Petersen JF, Paolucci V, Christensen JB, Klajnert-Maculewicz B. Pyrrolidone modification prevents PAMAM dendrimers from activation of pro-inflammatory signaling pathways in human monocytes. (2017) *Molecular Pharmaceutics* 15(1), pp. 12-20.

Ważnym aspektem w rozwoju innowacyjnych nanoterapeutyków jest odpowiedź prozapalna komórek na nanocząsteczki. W przypadku zastosowań klinicznych nawet słaba odpowiedź prozapalna jest dla nośników wykluczająca. Niemodyfikowane dendrymery PAMAM wywołują odpowiedź biologiczną poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego [26,27]. Również zastosowanie pirolidonu może mieć wpływ na odpowiedź zapalną [28], dlatego tak istotna jest ocena właściwości immunomodulujących modyfikowanych pirolidonem dendrymerów PAMAM w aspekcie możliwości zastosowania ich jako nośników leków.

Wpływ niemodyfikowanych i modyfikowanych pirolidonem dendrymerów PAMAM na odpowiedź prozapalną oceniono na podstawie ekspresji mRNA dla zestawu genów markerowych. Jako geny markerowe zostały wybrane cele głównych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych biorących udział w odpowiedzi zapalnej: szlak NF- $\kappa$ B (*NFKBIA* i *BTG2*) i związane z nim cytokiny: interleukina 1 $\beta$  (*IL1B*) i czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (*TNF*).

W komórkach linii THP-1 niemodyfikowane dendrymery PAMAM generacji 3 i 4 aktywowały transdukcję sygnału związanego z NF- $\kappa$ B prowadząc do zwiększonej ekspresji genów markerowych NF- $\kappa$ B (*NFKBIA* i *BTG2*) i cytokin związanych z tym szlakiem sygnałowym: interleukina 1 $\beta$  i TNF $\alpha$ . Natomiast dendrymery PAMAM modyfikowane pirolidonem nie wpływały na odpowiedź prozapalną w linii komórkowej THP-1, nawet w komórkach stymulowanych LPS-em. Po zastosowaniu niemodyfikowanych dendrymerów PAMAM w komórkach linii U937 obserwowano aktywację ekspresji genów *NFKBIA* i *IL1B* na poziomie podobnym do komórek stymulowanych LPS-em. W przypadku genów *BTG2* i *TNF*, dendrymery te zwiększały ekspresję silniej niż LPS. Podobnie jak w przypadku linii komórkowej THP-1, po stymulacji dendrymerami modyfikowanymi pirolidonem nie obserwowano wzrostu ekspresji genów. Ponadto preinkubacja z tymi dendrymerami powodowała znaczące obniżenie ekspresji genów markerowych NF- $\kappa$ B w komórkach stymulowanych LPS-em [4b7].

Wyniki uzyskane na poziomie ekspresji genów, na poziomie białka potwierdziły oznaczenia poziomu interleukiny  $1\beta$  i  $TNF\alpha$  wykonane metodą ELISA. Niemodyfikowane dendrymery PAMAM powodowały sekrecję  $IL-1\beta$  w obu liniach komórkowych (3,5-krotnie w THP-1 i 1,8-krotnie w U937). Jeszcze silniejszy efekt obserwowano dla stymulacji LPS-em (wzrost wydzielania  $IL-1\beta$  o 5,5 razy w THP-1 i 2,4-krotnie w U937). Co istotne, poziom wydzielanych cytokin nie był zależny od generacji badanego dendrymeru PAMAM modyfikowanego pirolidionem, nawet po stymulacji LPS-em (Rysunek 11).

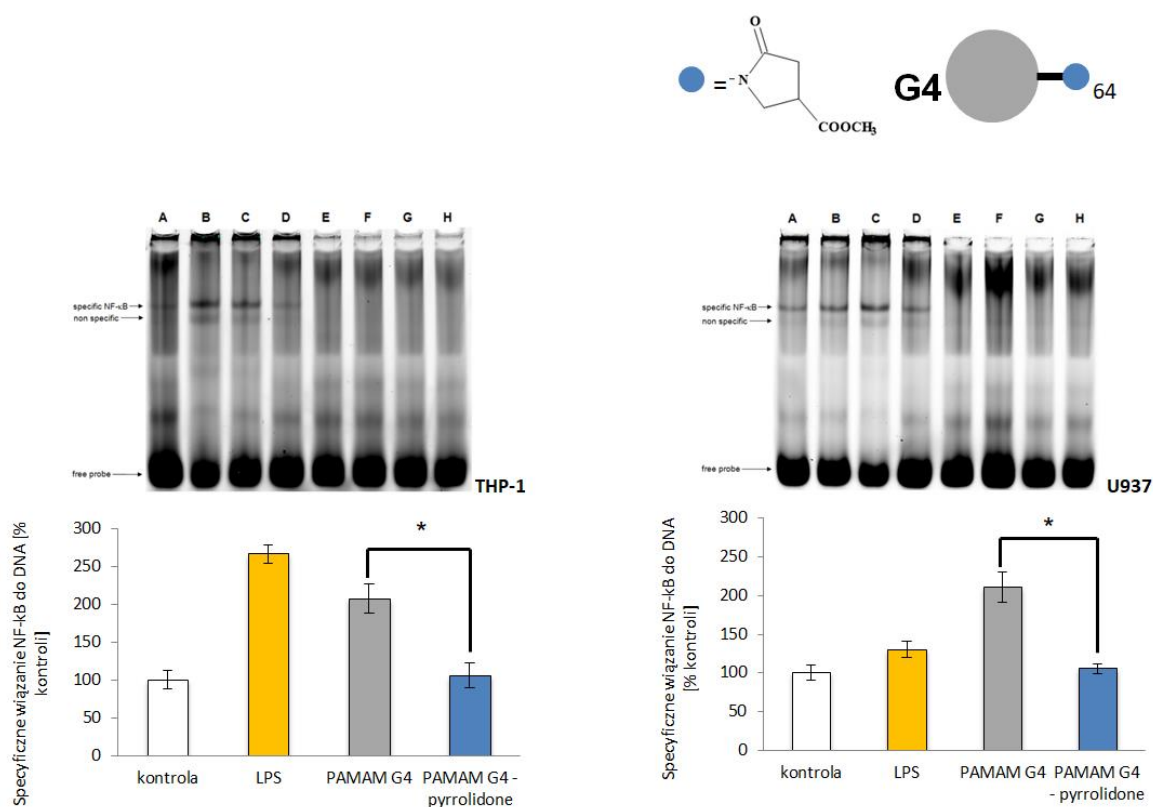


Rysunek 11. Wpływ dendrymerów PAMAM G3 i G4 niemodyfikowanych i modyfikowanych pirolidionem na poziom  $IL-1\beta$  (lewy panel) i  $TNF\alpha$  (prawy panel) w liniach komórkowych THP-1 i U937, oznaczony metodą ELISA. Dane przedstawiono jako procent poziomu cytokin w supernatancie z komórek kontrolnych, średnia  $\pm$  SEM z czterech eksperymentów. \* Różnica statystycznie istotna w porównaniu do nietraktowanej kontroli przy  $p < 0,05$ . † Statystycznie istotna w porównaniu do kontroli stymulowanej LPS przy  $p < 0,05$ .

Ponieważ indukcja ekspresji genów markerowych nie jest bezpośrednim dowodem aktywacji, dodatkowo dokonano oceny udziału szlaku  $NF-\kappa B$  w odpowiedzi komórkowej na niemodyfikowane i modyfikowane pirolidionem dendrymery PAMAM. Funkcja  $NF-\kappa B$  po

aktywacji zależy od jej translokacji do jądra i zdolności do wiązania specyficznych regulatorowych sekwencji DNA mających wpływ na profil transkrypcji. Aby potwierdzić, iż zmiany obserwowane na poziomie mRNA i białka dla niemodyfikowanych i modyfikowanych dendrymerów PAMAM są bezpośrednio związane ze szlakiem przekazywania sygnału NF- $\kappa$ B, zmierzono ilość aktywnego czynnika w jądrze stosując elektroforetyczny test opóźnionej migracji w żelu (EMSA) [4b7].

W komórkach THP-1 stymulacja niemodyfikowanymi dendrymerami PAMAM G4 powodowała silniejsze wiązanie białka jądrowego do oligonukleotydu konsensusowego swoistego dla NF- $\kappa$ B. Zgodnie z oczekiwaniem stymulacja dendrymerem PAMAM modyfikowanym pirolidonem nie powodowała wzmocnienia obserwowanego efektu (prążka) w porównaniu z kontrolą (Rysunek 12). Analogicznie w przypadku linii komórkowej U937 uzyskane wyniki były bardzo podobne do obserwowanych w przypadku ekspresji genów markerowych [4b7].



Rysunek 12. Wpływ dendrymeru PAMAM G4 niemodyfikowanego i modyfikowanego pirolidonem na aktywność wiązania jądrowego NF- $\kappa$ B w liniach komórkowych THP-1 i U937, oznaczony metodą EMSA po 2h inkubacji (inkubacja z sondą znakowaną IRDye700, obrazowanie na czytniku IR Odyssey). Stymulacja za pomocą LPS została zastosowana jako pozytywna kontrola aktywacji NF- $\kappa$ B. Górny panel: zdjęcie EMSA. (A,E) nietraktowane komórki; (B,F) LPS [10  $\mu$ g/ml];

(C,G) PAMAM G4 [50  $\mu\text{M}$ ]; (D, H) PAMAM-pirolidon-G4 [50  $\mu\text{M}$ ]; (A,B,C,D) Brak konkurencji sond; (E,F,G,H) 100 x nadmiar nieznakowanej sondy. Panel dolny: kwantyfikacja określonego pasma związanego z NF- $\kappa$ B (komputerowa analiza obrazu za pomocą oprogramowania ImageJ). Dane przedstawiono jako procent intensywności pasma w komórkach kontrolnych (nieotraktowanych), średnia  $\pm$  SEM trzech eksperymentów. \* Istotna statystycznie różnica w stosunku do nietraktowanej kontroli przy  $p < 0,05$ .

Test EMSA pokazał, iż niemodyfikowane dendrymery PAMAM są zdolne do indukowania translokacji jądrowej NF- $\kappa$ B *in vitro* co prowadzi do stymulacji ekspresji docelowych genów NF- $\kappa$ B (*NFKBIA* i *BTG2*) i związanych z cytokin prozapalnych (*IL1B* i *TNF*). W obu liniach komórkowych potwierdzono na poziomie białka zwiększoną ekspresję interleukiny  $1\beta$  i TNF $\alpha$ . Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem zaobserwowanego zjawiska jest aktywacja tego szlaku poprzez zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (RFT).

Dendrymery modyfikowane pirolidonom nie wywoływały odpowiedzi przeciwzapalnej w komórkach stymulowanych LPS-em, gdyż jak pokazały wcześniejsze badania nie powodują one uogólnionego stresu komórkowego, prowadzącego do wzmocnienia aktywności NF- $\kappa$ B, charakterystycznego dla niemodyfikowanych dendrymerów. Dlatego związki te są idealnymi kandydatami do dalszych badań i zastosowań biomedycznych, takich jak dostarczanie leków.

Podsumowując, **dendrymery PAMAM modyfikowane pirolidonom charakteryzują się bardzo niską cytotoksycznością, posiadają zdolność wnikania do komórek i intensywną autofluorescencję oraz nie indukują odpowiedzi prozapalnej komórek, dlatego mogą być potencjalnymi nośnikami leków, łącząc funkcję nośnika i jednoczesnego obrazowania biologicznego.**

#### Literatura

- [26] Naha, P. C.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J. Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, 246 (1–2), 91–99.
- [27] Mukherjee, S. P.; Byrne, H. J. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine* 2013, 9 (2), 202–211.
- [28] Chauhan, A. S.; Diwan, P. V.; Jain, N. K.; Tomalia, D. A. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly-(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* 2009, 10, 1195–1202.
- [29] Franklin, I.; Walton, L.; Greenhalgh, R.; Powell, J., The influence of indomethacin on the metabolism and cytokine secretion of human aneurysmal aorta. *European journal of vascular and endovascular surgery* 1999, 18 (1), 35-42.



- [30] Bour, A.; Westendorp, R.; Laterveer, J.; Bollen, E.; Remarque, E., Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for a brain-protective effect. *Exp. Gerontol.* 2000, 35 (8), 1017-1024.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych**

### **5a) Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora**

Indywidualny tok studiów, którego opiekunami byli dr Danuta Ertel z Politechniki Łódzkiej i prof. dr hab. Grzegorz Bartosz z Uniwersytetu Łódzkiego umożliwił mi połączenie dwóch dziedzin: fizyki i biologii. Efektem wspólnych badań było uzyskanie tytułu magistra inżyniera fizyki w zakresie fizyki ciała stałego oraz opublikowanie pierwszego artykułu o tematyce biofizycznej [5a3]. Po obronie pracy magisterskiej rozpoczęłam studia doktoranckie na Uniwersytecie Łódzkim w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej. W mojej pracy naukowej zajmowałam się optymalizacją i porównaniem różnych metod oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza krwi oraz homogenatów tkanek. W roku 2003 obroniłam rozprawę doktorską.

#### **Artykuły naukowe opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:**

- [5a1] Balcerczyk, A., Grzelak, A., Janaszewska, A., Jakubowski, W., Koziol, S., Marszałek, M., Rychlik, B., Soszynski, M., Bilinski, T., Bartosz, G. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity (2003) *BioFactors*, 17 (1-4), pp. 75-82.
- [5a2] Janaszewska, A., Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: Comparison of four methods as applied to human blood plasma (2002) *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62 (3), pp. 231-236.
- [5a3] Bartosz, G., Janaszewska, A., Ertel, D., Bartosz, M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity (1998) *Biochemistry and Molecular Biology International*, 46 (3), pp. 519-528.

### **5b) Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora**

W latach 2006 – 2008 pracowałam jako adiunkt w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a w roku 2008 zostałam zatrudniona w Katedrze Biofizyki Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. W latach 2008 – 2010 byłam zatrudniona w jako post-doc w projekcie Fundacji na rzecz Nauki Polskiej TEAM/2008-1/5 „Właściwości biologiczne i zastosowania biomedyczne dendrymerów” (kierownik projektu prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz), w latach 2010 – 2013 jako post-doc w projekcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Biomedyczne zastosowanie

dendrymerów" (kierownik projektu prof. dr hab. Maria Bryszewska), w latach 2013 – 2016 również jako post-doc w projekcie NCN Harmonia UMO-2013/08/M/NZ1/00761 – „Badanie dendrymerów fosforowych jako układów transportujących fotouczulacze" (kierownik projektu prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz). Od roku 2016 jestem zatrudniona na etacie adiunkta naukowego w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Moja praca naukowa dotyczyła szerokiego aspektu biomedycznych zastosowań różnych grup dendrymerów. W ramach współpracy z Leibniz Institut für Polymerforschung Dresden e.V., w Niemczech brałam udział w badaniach biologicznych właściwości dendrymerów modyfikowanych oligosacharydami *in vitro* i *in vivo* pod kątem zastosowania ich jako nośników leków oraz czynników hamujących agregację białka A $\beta$ 1-40 [5b1,5b7,5b9,5b12,5b21,5b23,5b24,5b26]. Ukoronowaniem tej współpracy jest praca przeglądowa oparta na wspólnych publikacjach Appelhans, D., Klajnert-Maculewicz, B., Janaszewska, A., Lazniewska, J., Voit, B. Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications (2015) Chemical Society Reviews, 44 (12), pp. 3968-3996 (IF 34,09; pkt. MNiSW 50). W ramach współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu w Kopenhadze w Danii powstał mój cykl habilitacyjny dotyczący analizy wpływu modyfikacji powierzchniowych grup aminowych komercyjnych dendrymerów PAMAM na ich cytotoksyczność i możliwość potencjalnego zastosowania jako autofluorescencyjnych nośników leków [5b3,5b4,5b11,5b15,5b19,5b22]. We współpracy z Katedrą Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego brałam również udział w badaniach nad potencjalnym zastosowaniem dendrymerów polipropylenoiminowych jako czynników antybakteryjnych [5b16,5b17,5b25]. We współpracy z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi brałam udział w badaniach nad zastosowaniem silsekwioksanów jako nośników antracyklin [5b6,5b14]. Jako post-doc brałam udział w badaniach dendrymerów fosforowych zsyntezowanych w Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS w Tuluzie we Francji stosowanych jako układy transportujące fotouczulacze tj. róż bengalski i błękit metylenowy [5b8,5b10, oraz zgłoszenia patentowe P.418949, P.418950]. Uczestniczyłam również w badaniach nad zastosowaniem trastuzumabu – przeciwciała monoklonalnego jako cząsteczki zapewniającej selektywny transport koniugatów dendrymeru PAMAM i leków przeciwnowotworowych w terapii raka piersi z nadekspresją HER2 [5b2 oraz zgłoszenia patentowe P.420273, P.420274, P.421439, P.421440]. Ponadto miałam możliwość włączenia się w badania nad oddziaływaniami dendrymerów karbokrzemowych i fosforowych z białkami [5b5], mechanizmami transportu dendrymerów propylenoiminowych do komórek białaczkowych [5b7], zastosowaniem dendrymerów karbokrzemowych i fosforowych jako nośników siRNA [5b13], badaniem własności *in vitro* dendrymerów viologenowych [5b18] oraz

własności dendrymerów peptydowych i ich wpływu na proces agregacji białka A $\beta$ 1-40 i białka A $\beta$ 1-28 [5b20].

**Artykuły naukowe opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:**

- [5b1] Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B., Marcinkowska, M., Duchnowicz, P., Appelhans, D., Grasso, G., Deriu, M.A., Danani, A., Cangiotti, M., Ottaviani, M.F. Multivalent interacting glycodendrimer to prevent amyloid-peptide fibril formation induced by Cu(II): A multidisciplinary approach (2018) *Nano Research*, 11 (3), 1204-1226.
- [5b2] Marcinkowska, M., Sobierajska, E., Stanczyk, M., Janaszewska, A., Chworos, A., Klajnert-Maculewicz, B. Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody-trastuzumab: The new approach of a well-known strategy (2018) *Polymers*, 10 (2), art. no. 187.
- [5b3] Janaszewska, A., Gorzkiewicz, M., Ficker, M., Petersen, J.F., Paolucci, V., Christensen, J.B., Klajnert-Maculewicz, B. Pyrrolidone Modification Prevents PAMAM Dendrimers from Activation of Pro-Inflammatory Signaling Pathways in Human Monocytes (2018) *Molecular Pharmaceutics*, 15 (1), 12-30.
- [5b4] Janaszewska, A., Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Paolucci, V., Christensen, J.B., Tomalia, D.A., Klajnert-Maculewicz, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups-its uptake, efflux, and location in a cell (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 211-216.
- [5b5] Shcharbin, D., Pedziwiatr-Werbicka, E., Vcherashniaya, A., Janaszewska, A., Marcinkowska, M., Goska, P., Klajnert-Maculewicz, B., Ionov, M., Abashkin, V., Ihnatsyeu-Kachan, A., de la Mata, F.J., Ortega, P., Gomez-Ramirez, R., Majoral, J.-P., Bryszewska, M. Binding of poly(amidoamine), carbosilane, phosphorus and hybrid dendrimers to thrombin - Constants and mechanisms (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 11-16.
- [5b6] Sobierajska, E., Konopka, M., Janaszewska, A., Piorecka, K., Blauz, A., Klajnert-Maculewicz, B., Stanczyk, M., Stanczyk, W.A. Unusual enhancement of doxorubicin activity on co-delivery with Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) (2017) *Materials*, 10 (5), art. no. 559.
- [5b7] Studzian, M., Szulc, A., Janaszewska, A., Appelhans, D., Pułaski, Ł., Klajnert-Maculewicz, B. Mechanisms of Internalization of Maltose-Modified

- Poly(propyleneimine) Glycodendrimers into Leukemic Cell Lines (2017) *Biomacromolecules*, 18 (5), 1509-1520.
- [5b8] Dabrzalska, M., Janaszewska, A., Zablocka, M., Mignani, S., Majoral, J.P., Klajnert-Maculewicz, B. Cationic Phosphorus Dendrimer Enhances Photodynamic Activity of Rose Bengal against Basal Cell Carcinoma Cell Lines (2017) *Molecular Pharmaceutics*, 14 (5), 1821-1830.
- [5b9] Wrobel, D., Marcinkowska, M., Janaszewska, A., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert-Maculewicz, B., Bryszewska, M., Štofík, M., Herma, R., Duchnowicz, P., Maly, J. Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins-Human serum albumin and lysozyme (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 18-28.
- [5b10] Dabrzalska, M., Janaszewska, A., Zablocka, M., Mignani, S., Majoral, J.P., Klajnert-Maculewicz, B. Complexing methylene blue with phosphorus dendrimers to increase photodynamic activity (2017) *Molecules*, 22 (3), art. no. 345.
- [5b11] Svenningsen, S.W., Janaszewska, A., Ficker, M., Petersen, J.F., Klajnert-Maculewicz, B., Christensen, J.B. Two for the Price of One: PAMAM-Dendrimers with Mixed Phosphoryl Choline and Oligomeric Poly(Caprolactone) Surfaces (2016) *Bioconjugate Chemistry*, 27 (6), 1547-1557.
- [5b12] Wrobel, D., Janaszewska, A., Appelhans, D., Voit, B., Bryszewska, M., Maly, J. Interactions of dendritic glycopolymer with erythrocytes, red blood cell ghosts and membrane enzymes (2015) *International Journal of Pharmaceutics*, 496 (2), 475-488.
- [5b13] Dzmitruk, V., Szulc, A., Shcharbin, D., Janaszewska, A., Shcharbina, N., Lazniewska, J., Novopashina, D., Buyanova, M., Ionov, M., Klajnert-Maculewicz, B., Gómez-Ramirez, R., Mignani, S., Majoral, J.-P., Muñoz-Fernández, M.A., Bryszewska, M. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action (2015) *International Journal of Pharmaceutics*, 485 (1-2), 288-294.
- [5b14] Janaszewska, A., Gradzinska, K., Marcinkowska, M., Klajnert-Maculewicz, B., Stanczyk, W.A. In vitro studies of polyhedral oligo silsesquioxanes: Evidence for their low cytotoxicity (2015) *Materials*, 8 (9), 6062-6070.
- [5b15] Janaszewska, A., Studzian, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Klajnert-Maculewicz, B. PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone-In vitro assessment of neurotoxicity (2015) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (2), 409-411.

- [5b16] Wrońska, N., Felczak, A., Zawadzka, K., Janaszewska, A., Klajnert, B., Bryszewska, M., Lisowska, K. The antibacterial effect of the co-administration of poly(propylene imine) dendrimers and ciprofloxacin (2014) *New Journal of Chemistry*, 38 (7), 2987-2992.
- [5b17] Felczak, A., Zawadzka, K., Wrońska, N., Janaszewska, A., Klajnert, B., Bryszewska, M., Appelhans, D., Voit, B., Lisowska, K. Enhancement of antimicrobial activity by co-administration of poly(propylene imine) dendrimers and nadifloxacin (2013) *New Journal of Chemistry*, 37 (12), 4156-4162.
- [5b18] Lazniewska, J., Janaszewska, A., Miłowska, K., Caminade, A.-M., Mignani, S., Katir, N., Kadib, A.E., Bryszewska, M., Majoral, J.-P., Gabryelak, T., Klajnert-Maculewicz, B. Promising low-toxicity of viologen-phosphorus dendrimers against embryonic mouse hippocampal cells (2013) *Molecules*, 18 (10), 12222-12240.
- [5b19] Janaszewska, A., Ciolkowski, M., Wróbel, D., Petersen, J.F., Ficker, M., Christensen, J.B., Bryszewska, M., Klajnert, B. Modified PAMAM dendrimer with 4-carbomethoxypyrrolidone surface groups reveals negligible toxicity against three rodent cell-lines (2013) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9 (4), 461-464.
- [5b20] Neelov, I.M., Janaszewska, A., Klajnert, B., Bryszewska, M., Makova, N.Z., Hicks, D., Pearson, H.A., Vlasov, G.P., Ilyash, M.Yu., Vasilev, D.S., Dubrovskaya, N.M., Tumanova, N.L., Zhuravin, I.A., Turner, A.J., Nalivaeva, N.N. Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with  $\alpha\beta$ -peptides and neuronal cells (2013) *Current Medicinal Chemistry*, 20 (1), 134-143.
- [5b21] Ciepluch, K., Ziemia, B., Janaszewska, A., Appelhans, D., Klajnert, B., Bryszewska, M., Fogel, W.A. Modulation of biogenic amines content by poly(propylene imine) dendrimers in rats (2012) *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68 (3), 447-454.
- [5b22] Ciolkowski, M., Petersen, J.F., Ficker, M., Janaszewska, A., Christensen, J.B., Klajnert, B., Bryszewska, M. Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility (2012) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8 (6), 815-817.
- [5b23] Janaszewska, A., Ziemia, B., Ciepluch, K., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert, B., Bryszewska, M. The biodistribution of maltotriose modified poly(propylene imine) (PPI) dendrimers conjugated with fluorescein - Proofs of crossing blood-brain-barrier (2012) *New Journal of Chemistry*, 36 (2), 350-353.
- [5b24] Janaszewska, A., Mączyńska, K., Matuszko, G., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert, B., Bryszewska, M. Cytotoxicity of PAMAM, PPI and maltose modified PPI dendrimers in

Chinese hamster ovary (CHO) and human ovarian carcinoma (SKOV3) cells (2012) *New Journal of Chemistry*, 36 (2), 428-437.

[5b25] Felczak, A., Wrońska, N., Janaszewska, A., Klajnert, B., Bryszewska, M., Appelhans, D., Voit, B., Różalska, S., Lisowska, K. Antimicrobial activity of poly(propylene imine) dendrimers (2012) *New Journal of Chemistry*, 36 (11), 2215-2222.

[5b26] Ziemba, B., Janaszewska, A., Ciepluch, K., Krotewicz, M., Fogel, W.A., Appelhans, D., Voit, B., Bryszewska, M., Klajnert, B. In vivo toxicity of poly(propyleneimine) dendrimers (2011) *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 99 A (2), 261-268.

### **Pozostałe publikacje naukowe**

[5b27] Appelhans, D., Klajnert-Maculewicz, B., Janaszewska, A., Lazniewska, J., Voit, B. Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications (2015) *Chemical Society Reviews*, 44 (12), 3968-3996.

[5b28] Shcharbin, D., Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B., Ziemba, B., Dzmitruk, V., Halets, I., Loznikova, S., Shcharbina, N., Milowska, K., Ionov, M., Shakhbazau, A., Bryszewska, M. How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo (2014) *Journal of Controlled Release*, 181 (1), 40-52.

[5b29] Janaszewska A., Golański J., Watała C. "Natural compounds as modulators of platelet function. *Nauka a zdravie – občianske združenie Bratislava*, 2007, 207–232. – rozdział w monografii.

### **Doniesienia konferencyjne**

- B. Ziemba, A. Janaszewska, W. A. Fogel, M. Krotewicz, K. Ciepluch, B. Klajnert, M. Bryszewska: In vivo toxicity of polypropylenimine dendrimers, XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 16-19 września 2009, Łódź, Polska, *Acta Biochim. Pol.* (2009) 56, 192
- B. Ziemba, A. Janaszewska, K. Ciepluch, M. Krotewicz, W. A. Fogel, D. Appelhans, B. Klajnert, M. Bryszewska Toxicity of polypropylenimine dendrimers with various degree of sugar modification, XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, 28-30 września 2010, Łódź, Poland, *Curr. Topics Biophys.* (2010) 33 B, 66
- Janaszewska, A. Felczak, N. Wrońska, K. Lisowska, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert, M. Bryszewska, Poly(propylene imine) dendrimers – Potential antimicrobial agents? 3rd

International Symposium on Biological Applications of Dendrimers BIO-Dendrimer 2012, 5-7 września 2012, Toledo, Hiszpania, książka abstraktów str. 53

- M. Maly, J. Maly, A. Semeradtova, E. Pedziwiatr-Werbicka, D. Wrobel, A. Janaszewska, J. Frolik, A. Danani, D. Appelhans, F.-J. De La Mata, R. Gomez, J. Cladera, J.-P. Majoral, A.M. Caminade, D. Shcharbin, J. Cermak, B. Klajnert-Maculewicz, M. Bryszewska, M.-F. Ottaviani, M.A. Munoz-Fernandez, Molecular modeling of dendrimers and their interactions with molecules of biomedical interest. 8th International Dendrimer Symposium, 23-27 czerwca 2013, Madryt, Hiszpania, książka abstraktów str. 45
- M. Dabrzalska, A. Janaszewska, J. P. Majoral, B. Klajnert-Maculewicz, M. Bryszewska In vitro evaluation of photodynamic activity of dendrimer-photosensitizer complexes, 4th International Symposium on Biological Application of Dendrimers BIO-Dendrimer, 18-20 lipca 2014, Lugano, Szwajcaria, książka abstraktów str. 58
- Janaszewska, D. Wrobel, J. F. Petersen, M. Ficker, J. B. Christensen, M. Marcinkowska, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz Modified PAMAM-pyrrolidone dendrimer as a nanocarrier – pros and cons. 4th International Symposium on Biological Application of Dendrimers BIO-Dendrimer, 18-20 lipca 2014, Lugano, Szwajcaria, książka abstraktów str. 59
- M. Dabrzalska, A. Janaszewska, N. Benseny Cases, R. Barnadas, J. Cladera, S. Mignani, M. Zablocka, J.-P. Majoral, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz Dendrimer-photosensitizer complexes: spectroscopic characterization and photodynamic activity in vitro on basal cell carcinoma cell lines. The American Society for Nanomedicine (ASNM) 5th Annual International Conference 15-17 października 2015 Waszyngton, USA
- Klajnert-Maculewicz, A. Janaszewska, M. Studzian, J. F. Petersen, M. Ficker, J. B. Christensen, D. A. Tomalia Localization of fluorescent pyrrolidone-modified PAMAM dendrimers in cells by confocal microscopy. 5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers. 2-5 sierpnia 2016, Kopenhaga, Dania, książka abstraktów str. 82
- M. Gorzkiewicz, I. Jaczak-Pawlik, M. Studzian, L. Pulaski, D. Appelhans, B. Voit, A. Janaszewska, B. Klajnert-Maculewicz Maltose-modified poly(propylene imine) dense shell dendrimers activate the NF- $\kappa$ B signaling pathway in THP-1 monocytic cell line 5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers. 2-5 sierpnia 2016, Kopenhaga, Dania, książka abstraktów str. 72
- Klajnert-Maculewicz, M. Dabrzalska, A. Janaszewska, M. Zablocka, S. Mignani, J. P. Majoral Phosphorus dendrimers as carriers of photosensitizers 5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers. 2-5 sierpnia 2016, Kopenhaga, Dania, książka abstraktów str. 83

- S. W. Svenningsen, A. Janaszewska, M. Ficker, J. F. Petersen, B. Klajnert-Maculewicz, J. B. Christensen Two for the price of one: PAMAM-dendrimers with mixed phosphoryl choline and oligomeric poly(caprolactone) surfaces 5th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers. 2-5 sierpnia 2016, Kopenhaga, Dania, książka abstraktów str. 63

### **Zgłoszenia patentowe**

- P.418949 – „Zastosowanie błękitu metylenowego i dendrymeru fosforowego generacji 2 posiadającego na powierzchni 24 grupy karboksylowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia podstawnocomórkowego raka skóry w terapii fotodynamicznej” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Dąbrzalska, Jean-Pierre Majoral – wniosek przyjęto do UP RP dn. 30.09.2016
- P.418950 – „Zastosowanie różu bengalskiego i dendrymeru fosforowego 3 generacji posiadającego na powierzchni 48 grup amonowych do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia podstawnocomórkowego raka skóry w terapii fotodynamicznej” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Dąbrzalska, Jean-Pierre Majoral – wniosek przyjęto do UP RP dn. 30.09.2016
- P.420273 – „Sposób otrzymywania koniugatu docetakselu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie docetakselu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Marcinkowska, Ewelina Sobierajska, Maciej Stańczyk, Włodzimierz Stańczyk – wniosek przyjęto do UP RP dn. 23.01.2017
- P.420274 – „Sposób otrzymywania koniugatu docetakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie docetakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Marcinkowska, Ewelina Sobierajska, Maciej Stańczyk, Włodzimierz Stańczyk – wniosek przyjęto do UP RP dn. 23.01.2017
- P.421439 – „Sposób otrzymywania koniugatu doksorubicyny, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie doksorubicyny, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Marcinkowska, Ewelina Sobierajska, Maciej Stańczyk, Włodzimierz Stańczyk – wniosek przyjęto do UP RP dn. 27.04.2017



P.421440 – „Sposób otrzymywania koniugatu paklitakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe oraz zastosowanie paklitakselu, trastuzumabu i dendrymeru PAMAM generacji 4 posiadającego na powierzchni 64 grupy aminowe do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi” – Twórcy: Barbara Klajnert-Maculewicz, Anna Janaszewska, Monika Marcinkowska, Ewelina Sobierajska, Maciej Stańczyk, Włodzimierz Stańczyk – wniosek przyjęto do UP RP dn. 27.04.2017

### 5c) Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych

Współautorka 31 badawczych i przeglądowych prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, o łącznym indeksie cytowań 574 (Web of Science) i indeksie Hirscha = 13. Współautorka sześciu zgłoszeń patentowych.

Liczba opublikowanych prac	32
Sumaryczny impact factor *	150,003
Punkty MNiSW	1055
Liczba cytowań bez autocytowań	590
Indeks Hirscha	13
Impact factor osiągnięcia naukowego*	35,088
Punkty MNiSW osiągnięcia naukowego	270
Liczba cytowań bez autocytowań osiągnięcia naukowego	76

\* Zgodnie z rokiem opublikowania

### 5d) Udział w projektach badawczych

- 2008–2010 projekt finansowany przez FNP TEAM/2008-1/5 „Biologiczne właściwości i biomedyczne zastosowania dendrymerów” – zatrudnienie jako post-doc
- 2010–2013 projekt MNiSW współfinansowany przy Akcji COST TD 0802 „Dendrimers in biomedical applications” – zatrudnienie jako post-doc
- 2011–2013 grant NCN N N302 636640 „Dendrymery polipropylenoiminowe: nanocząsteczki o działaniu przeciwbakteryjnym” – wykonawca

- 2013–2016 grant HARMONIA finansowany przez NCN UMO-2013/08/M/NZ1/00761 „Badanie dendrymerów fosforowych jako systemów transportujących fotouczulacze” – zatrudnienie jako post-doc
- 2013–2016 grant OPUS finansowany przez NCN UMO–2012/07/B/ST5/02603 „Oligosilseskwiksany jako nanotransportery leków” – wykonawca
- 2015–2018 grant OPUS finansowany przez NCN UMO-2014/13/B/NZ3/04643 „Komórkowe i molekularne mechanizmy działania kompleksów dendrymerów PPI z lekami przeciwnowotworowymi - analogami nukleozydowymi” – wykonawca

#### **Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych**

COST Action TD 0802 „Dendrimers in biomedical applications” (Training School, Workshop, Short Scientific Mission)

#### **5e) Staże zagraniczne i szkolenia**

1. Wielka Brytania, University of Nottingham - pobyt naukowy - 07.2010
  2. Włochy, University of Milano–Bicocca, pobyt naukowy w ramach Akcji COST TD 0802 „Dendrimers in biomedical applications” - 03.2013
  3. Czechy, Purkyně University in Ústí nad Labem, pobyt naukowy w ramach Akcji COST TD 0802 „Dendrimers in biomedical applications”- 04.2013
  4. Czechy, Purkyně University in Ústí nad Labem, pobyt naukowy w ramach „Programu wymiany osobowej z Czechami na lata 2013-2014”- 12.2014
  5. Stany Zjednoczone, University of Kentucky - pobyt naukowy - 10.2015
- Polska, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Szkolenie z udziałem zwierząt laboratoryjnych - indywidualna licencja na pracę ze zwierzętami (aktualna licencja nr 46/2015 – Rattus norvegicus i Mus musculus – ważna do 12/2020) – 2006
  - Polska, Uniwersytet Warszawski, Katedra Cytologii (prof. dr hab. A. Ciemerych-Litwinienko), Kurs hodowli komórkowych – 2009
  - SKILLS project – FNP, Scientific Writing Training with Jean–Luc Lebrun – Kraków 2013
  - Prof. Naoto Kawakami, Max Planck Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany, szkolenie – “Visualization of T cells within living animals using two–photon imaging” – Uniwersytet Łódzki, 2015

#### **5f) Nagrody i wyróżnienia**

2003 – zespołowa nagroda naukowa pierwszego stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji

- 2013 – zespołowa nagroda naukowa drugiego stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji na temat „Biologiczne właściwości dendrymerów”
- 2014 – zespołowa nagroda naukowa pierwszego stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji na temat „Badania biologicznych właściwości i biomedycznych zastosowań dendrymerów”
- 2014 – indywidualna nagroda naukowa Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za osiągnięcia w zakresie dorobku publikacyjnego
- 2016 – zespołowa nagroda naukowa drugiego stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji na temat „Biologiczne właściwości i biomedyczne zastosowania nanoukładów”
- 2017 – indywidualna nagroda naukowa Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za osiągnięcia w zakresie dorobku publikacyjnego
- 2018 – zespołowa nagroda J.M. Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za szczególne osiągnięcia naukowe finansowana z Funduszu Spójności

### **5g) Recenzje artykułów**

Recenzje artykułów w czasopismach tj. New Journal of Chemistry, Journal of Photochemistry & Photobiology, Journal of Nanoparticle Research.

## **6. Działalność dydaktyczna i organizatorska**

### **6a) Opieka naukowa nad magistrantami**

Paula Działak – tytuł pracy magisterskiej: „Ocena efektywności działania koniugatów PAMAM-doksorubicyna i PAMAM-doksorubicyna-glukoza w porównaniu do wolnej doksorubicyny” – opiekun naukowy (data obrony 12 czerwca 2017)

Małgorzata Książak – tytuł pracy magisterskiej: „Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej koniugatów dendrymerów PAMAM, leków przeciwnowotworowych i przeciwciała monoklonalnego” – opiekun naukowy (planowana data obrony: wrzesień 2018)

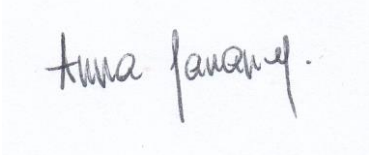
### **6b) Opieka naukowa nad doktorantami**

mgr Monika Dąbrzalska – tytuł rozprawy doktorskiej: „Dendrymery fosforowe jako nośniki fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej” – promotor pomocniczy (data otwarcia przewodu 24.11.2015, planowana obrona: 19 czerwca 2018)

mgr Monika Marcinkowska – tytuł rozprawy doktorskiej: „Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem monoklonalnym w badaniach in vitro” – promotor pomocniczy (data otwarcia przewodu 30.05.2017, planowana obrona w 2018)

**6c) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki**

- Wygłoszenie referatu popularnonaukowego w ramach wykładów Nauka dla Biznesu w 2010 r w Fundacji Rozwoju Przedsiębiorczości w Łodzi „TEAM znaczy zespół”.
- Reprezentowanie i promocja dorobku naukowego Wydziału BiOŚ na Targach BioForum – Budapeszt, Węgry, 2013.
- Wygłoszenie referatu popularnonaukowego dla studentów Purkyně University in Ústí nad Labem, Czechy podczas pobytu naukowego w 2014 r w ramach „Programu wymiany osobowej z Czechami na lata 2013–2014”.



Anna Janaszewska