

DR KATARZYNA MIŁOWSKA

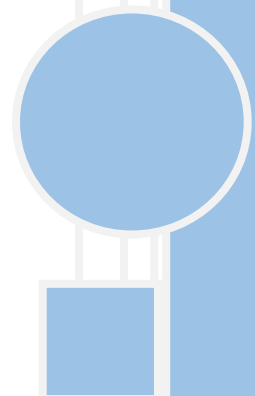
ZAŁĄCZNIK 3

AUTOREFERAT

**Dendrymery jako potencjalne czynniki ochronne
w chorobie Parkinsona**

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

Łódź, 2016



1. Imię i nazwisko

Katarzyna Miłowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

| | | |
|--|-------------|--|
| Doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka | 2007 | Tytuł rozprawy doktorskiej: „Działanie ultradźwięków na erytrocyty jądrzaste” Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki |
| Magister chemii | 1999 | Temat pracy magisterskiej: "Zastosowanie 3-tiokarbamoilopropano- fosfonianu dietylu w syntezie heterocyklicznych pochodnych kwasu propanofosfonowego" Wydział Fizyki i Chemii Uniwersytet Łódzki |

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

| | |
|---|--|
| ADIUNKT 2007 – obecnie | Katedra Biofizyki Ogólnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki |
| ASYSTENT 2000 – 2007 | Katedra Biofizyki Ogólnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki |

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

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Dendrymery jako potencjalne czynniki ochronne w chorobie Parkinsona

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w Załączniku 5. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zawarte są w Załączniku 6.

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Miłowska K.**, Malachowska M., Gabryelak T., 2011, PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of α -synuclein, Inter. J. Biol. Macromol. 48, 742-746. **IF₂₀₁₁ = 2,453, MNiSW = 25**

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

Mój udział procentowy szacuję na 85%.

2. **Miłowska K.**, Gabryelak T., Bryszewska M., Caminade A-M., Majoral J-P., 2012, Phosphorus-containing dendrimers against α -synuclein fibril formation, Inter. J. Biol. Macromol. 50, 1138-1143. **IF₂₀₁₂ = 2,596, MNiSW = 25**

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

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Miłowska K.**, Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J-P., Bryszewska M., Caminade A-M., Gabryelak T., 2013, Interaction between viologen-phosphorus dendrimers and α -synuclein. J. Lumin, 134, 132-137. **IF₂₀₁₃ = 2,367, MNiSW = 35**

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

Mój udział procentowy szacuję na 65%.

4. **Miłowska K.**, Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J-P., Bryszewska M., Gabryelak T., 2013, Viologen-phosphorus dendrimers inhibit α -synuclein fibrillation. Mol. Pharmaceutics 10, 1131-1137. **IF₂₀₁₃ = 4,787, MNiSW = 45**

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

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5. **Miłowska K.**, Szwed A., Zablocka M., Caminade A.M., Majoral J-P., Mignani S., Gabryelak T., Bryszewska M., 2014, *In vitro* PAMAM, phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers prevent rotenone-induced cell damage. Inter. J. Pharm. 474, 42-49. **IF₂₀₁₄ = 3,650, MNiSW = 35**

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

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

6. **Miłowska K.**, Szwed A., Mutrynowska M., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Gabryelak T., Bryszewska M. 2015, Carbosilane dendrimers inhibit α -synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage. Int. J. Pharm. 484, 268-275. **IF₂₀₁₄ = 3,650, MNiSW = 35**

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

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Praca przeglądowa

1. Szwed A., **Miłowska K.**, 2012, Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych, Postępy Hig. Med. Dosw. 66, 187-195. **IF₂₀₁₂ = 0,552, MNiSW = 15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, współudziale w napisaniu pracy, wykonaniu rysunków i przygotowaniu pracy do druku.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Sumaryczne parametry publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

Impact Factor (wg JeR) - 20,055

punkty MNiSW - 215.

liczba cytowań - 61

(Impact Factor oraz punktacja MNiSW podane zgodnie z rokiem publikacji, liczba cytowań wg WoS z dnia 15.03.2016 r.)

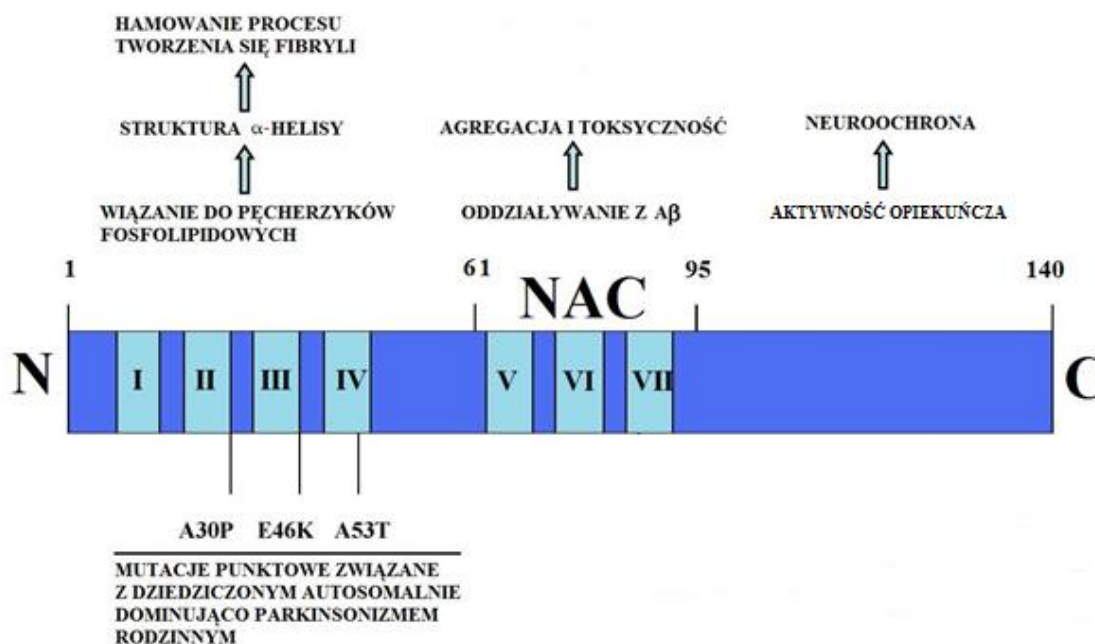
C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WSTĘP

Bezpośrednią przyczyną choroby Parkinsona jest obumieranie neuronów w istocie czarnej mózgu, które wytwarzają dopaminę, będącą neuroprzekaźnikiem kontrolującym ruch mięśni. Aby opóźnić wystąpienie nasilających się objawów tej choroby, pacjentowi podaje się lewodopę (kwas (2S)-2-amino-3-(3,4-dihydroksyfenylo)propanowy), która jest prekursorem dopaminy powodującym zwiększenie stężenia tego neuroprzekaźnika w mózgu. Jednakże leczenie farmakologiczne pozostaje nadal leczeniem objawowym, a nie przyczynowym, gdyż mimo wieloletnich badań nad chorobą Parkinsona trudno jest jednoznacznie wskazać czynnik odpowiedzialny za śmierć neuronów dopaminergicznych (Krygowska-Wajs i Wszolek, 2004).

Jednym z procesów przyczyniających się do utraty neuronów dopaminergicznych jest agregacja α -synukleiny (ASN). Badania naukowe dowodzą, że α -synukleina odgrywa ważną rolę nie tylko w rozwoju choroby Parkinsona, ale także choroby Alzheimer'a z ciałami Lewy'ego, otępieniu z ciałami Lewy'ego i innych zaburzeniach neurodegeneracyjnych, znanych jako synukleinopatie (Beyer, 2006; Giaccone i wsp., 2005; Solecka i wsp., 2005).

α -Synukleina (ASN) jest 140 aminokwasowym białkiem występującym głównie w presynaptycznych zakończeniach nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. ASN składa się z trzech domen (rys. 1). Region N-końcowy (reszty 1-60) jest bogaty w aminokwasy zasadowe. Domena ta jest odpowiedzialna za wiązanie się do lipidów i tworzenie się α -helikalnej struktury drugorzędowej (Kaźmierczak i wsp., 2007). Silnie hydrofobowy obszar centralny (reszty 61-95) stanowi amyloidogenną sekwencję NAC i wiele badań wskazuje na to, że właśnie ten odcinek odpowiada za tworzenie się formy β i samoistną agregację α -synukleiny. Ten fragment indukuje apoptozę w ludzkich komórkach nerwiaka i aktywuje powstawanie rodników hydroksylowych w zakończeniach neuronu presynaptycznego. Zawiera on sekwencje aminokwasowe występujące w białkach prionowych i amyloidzie A β , które są niezbędne do agregacji (Solecka i wsp., 2005). Region C-końcowy (reszty 96-140) jest szczególnie bogaty w prolinę i aminokwasy kwaśne. Domena ta odgrywa ważną rolę w zapobieganiu agregacji ASN, skutkom stresu oksydacyjnego oraz wykazuje aktywność opiekuńczą (Bifoldi i wsp., 2010; Cheng i wsp., 2011; Fink, 2006; **Szwed i Miłowska, 2012**; Tashiro i wsp., 2008).



Rys. 1. Struktura molekularna oraz charakterystyka funkcjonalna α -synukleiny (Szwed i Miłowska, 2012)

Fizjologiczna funkcja tego białka nie jest do końca poznana. Liczne badania sugerują, że α -synukleina uczestniczy w kształtowaniu plastyczności synaptycznej, regulacji transportu pęcherzykowego oraz przekazywania dopaminergicznego (Cabin i wsp., 2002; Narayanan i wsp., 2005; Sidhu i wsp., 2004a, 2004b; Steidl i Gomez, 2003) a także pełni funkcje białka opiekuńczego i antyapoptotycznego (da Costa i wsp., 2002; Jensen i wsp., 2003). Jednakże właściwości białka i jego neurotoksyczne działanie zależy od przyjętej przez białko konformacji. Pierwszym etapem procesu agregacji jest przyjmowanie przez ASN struktury β -harmonijki a następnie powstawanie rozpuszczalnych oligomerów (protofibrili), które obecnie uważa się za szkodliwe dla komórek nerwowych (Ding i wsp., 2002). Oligomery te oddziałują z błonami pęcherzyków synaptycznych przez co przyczyniają się do powstawania porów i uwalniania nueroprzekazników do cytoplazmy (Kaźmierczak i wsp., 2013; Lashuel i wsp., 2002). Protofibryle mają skłonność do dalszej agregacji i tworzenia nierozpuszczalnych złogów, które są odkładane w komórkach nerwowych w postaci ciał Lewy'ego. Z jednej strony postępująca agregacja może chronić komórki przed toksycznym działaniem oligomerów, ale z drugiej powstałe złogi mogą w sposób mechaniczny uszkadzać neurony, a także zaburzać funkcje białka

spowodowane zmniejszeniem jego biodostępności (Cookson, 2009; Kaźmierczak i wsp. 2004). W wyniku agregacji α -synukleiny dochodzi również do zaburzenia jej funkcji jako białka opiekuńczego i antyapoptotycznego.

Proces agregacji ASN skutkuje również zaburzeniami homeostazy układu dopaminergicznego. α -Synukleina w formie fizjologicznej reguluje syntezę i poziom dopaminy poprzez hamowanie aktywności hydroksylazy tyrozynowej (HT) - kluczowego enzymu biorącego udział w tym procesie. Wraz z postępującym procesem agregacji ASN, spada stężenie jej rozpuszczalnej formy, co ogranicza wiązanie z enzymem HT, w wyniku czego dochodzi do jego nadmiernej aktywności. Prowadzi to do zaburzenia homeostazy dopaminy i wzrostu jej stężenia w cytoplazmie, a w konsekwencji do wytworzenia toksycznych związków, gdyż dopamina, w obecności tlenu cząsteczkowego i w fizjologicznym pH może ulegać autooksydacji. Produktami tego procesu są toksyczne semichinony, chinony, rodniki ponadtlenkowe i nadtlenek wodoru (Lotharius i Brundin, 2002; Sidhu i wsp., 2004a). Zatem niedobór dopaminy w mózgu spowodowany śmiercią neuronów dopaminergicznych wpływa na zaburzenia ruchu. Jednakże nadmiar dopaminy w komórkach również jest niebezpieczny, gdyż może przyczyniać się do powstawania reaktywnych form tlenu a w konsekwencji do śmierci neuronów. Z tego względu proces agregacji α -synukleiny jest niewątpliwie toksyczny dla komórek nerwowych i niezwykle ważne jest utrzymanie stałego poziomu α -synukleiny w organizmie, gdyż zapewnia to prawidłowe funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego.

Agregacja α -synukleiny nie jest jedyną przyczyną choroby Parkinsona. Według danych literaturowych na rozwój choroby Parkinsona może mieć wpływ wiele różnych czynników: uwarunkowania genetyczne, wiek, czynniki środowiskowe, w tym niektóre pestycydy (np. rotenon), zakażenia bakteryjne i wirusowe oraz stres oksydacyjny.

Obecnie w badaniach intensywnie poszukuje się czynników, które mogłyby mieć znaczenie w hamowaniu procesów neurodegeneracyjnych. Potencjalnym czynnikiem zapobiegającym agregacji ASN mogą być dendrymery, które są stosunkowo nowymi, wysoce rozgałęzionymi polimerami. Specyficzna struktura tych związków znacząco wpływa na ich właściwości, co ma istotne znaczenie w wykorzystaniu ich w medycynie. Obecność wolnych przestrzeni wewnątrz cząsteczki pozwala na zamykanie i przenoszenie mniejszych molekuł. Również obecność licznych grup funkcyjnych na powierzchni pozwala na przyłączenie i transportowanie małych cząstek. Dlatego dendrymery dzięki swej budowie doskonale nadają się na nośniki leków

np. przeciwnowotworowych i na wektory genów w terapii genowej (Klajnert i Bryszewska, 2001, Svenson i Tomalia, 2005).

Dzięki odpowiedniej modyfikacji powierzchni dendrymeru, można skierować go do komórek rakowych i zapewnić uwalnianie leku tylko w tym miejscu, gdzie rozwija się nowotwór. Dodatkowym efektem jest również spowolnienie uwalniania się leku, co jest szczególnie istotne, gdyż pozwala obniżyć jego toksyczność w stosunku do zdrowych komórek (Svenson i Tomalia, 2005).

Dendrymery mogą być nie tylko nośnikami leków, ale same również wykazują właściwości lecznicze, co związane jest z ich dużym powinowactwem do struktur białkowych. Mogą one np. blokować receptory na powierzchni komórek, będące miejscem przyłączania się wirusów, i w ten sposób nie dopuszczać do infekcji (Łażniewska i wsp., 2013). Opracowano już nawet pierwszy dendrymerowy lek zapobiegający infekcji wirusem HIV (VivaGel, Starpharma, Australia). Fakt ten sprawił, że obecnie obserwuje się coraz szersze zainteresowanie dendrymerami i coraz więcej laboratoriów pracuje nad syntezą nowych rodzajów dendrymerów. Zabiegi te mają na celu uzyskanie dendrymerów o jak najlepszych właściwościach biologicznych i jak najmniejszej toksyczności

Kolejne, obiecujące działanie terapeutyczne dendrymerów, to zapobieganie tworzeniu się struktur amyloidowych, leżących u podłoża schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroby prionowe czy choroba Alzheimera (Klajnert i sp., 2006a; 2006b, 2007). Po raz pierwszy zaobserwowano, że dendrymery hamują powstawanie złogów amyloidowych po przeprowadzeniu doświadczeń polegających na inkubacji zainfekowanych komórek układu nerwowego z dendrymerami. Komórki uzyskane z homogenatu mózgow organizmów zarażonych chorobą prionową charakteryzują się obecnością form białkowych opornych na trawienie przez enzymy białkowe. Właśnie te formy białkowe, które nie mogą ulec naturalnej degradacji stanowią załóżek złogów amyloidowych. Po inkubacji komórek z dendrymerami nie stwierdzono obecności form białkowych opornych na hydrolizę. Świadczy to o tym, że dendrymery nie tylko hamują powstawanie niepożądanych form białkowych, ale również usuwają z układu już istniejące. Należy zatem przypuszczać, iż mechanizm ich działania nie ogranicza się do blokowania końców monomerów, z których powstają złoże, ale zapewne dochodzi do rozbijania już istniejących agregatów (Supattapone i wsp. 1999).

Dendrymery, posiadając takie właściwości, mogą stanowić ważną grupę farmaceutyków w stanach, gdzie nadmierna agregacja białek leży u źródeł patomechanizmu choroby lub jej powikłań.

CELE

Głównym celem pracy było scharakteryzowanie różnych grup i generacji dendrymerów jako potencjalnych czynników zapobiegających rozwojowi choroby Parkinsona.

CELE SZCZEGÓLOWE

1. Ocena skuteczności różnych rodzajów i generacji dendrymerów w hamowaniu procesu agregacji α -synukleiny.
2. Zbadanie czy dendrymery mogą zapobiegać uszkodzeniom komórek hipokampa myszy (mHippoE-18) wywołanych działaniem rotenonu *in vitro*.

DENDRYMERY

W pracy badano dendrymery:

- poliamidoaminowe (PAMAM) generacji 3 i 4 z grupami aminowymi na powierzchni oraz generacji 3,5 z grupami karboksylowymi zakupione w firmie Sigma-Aldrich (USA)
- fosforowe generacji 3 (pd-3) i generacji 4 (pd-4) z grupami dietyloaminowymi na powierzchni zsyntezowane w Laboratoire de Chimie Coordination du CNRS (Francja)
- wiologenowo-fosforowe generacji 0 z grupami dietylofosfonianowymi (vdp-1) i polietylenoglikolowymi (vpd-2) na powierzchni zsyntezowane w Laboratoire de Chimie Coordination du CNRS (Francja)
- karbokrzemowe (BDBR) generacji 2 z grupami aminowymi na powierzchni (BDBR11) i grupami dimetyloaminowymi (BDBR7) zsyntezowane w Departamento de Quimica Inorganica, Universidad de Alcala (Hiszpania).

ODDZIAŁYWANIE POMIĘDZY DENDRYMERAMI A α -SYNUKLEINĄ

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie czy dendrymery mogą oddziaływać z α -synukleina. Badania rozpoczęto od dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) generacji 4 z grupami aminowymi na powierzchni oraz generacji 3,5 z grupami karboksylowymi. Oceniano wpływ dendrymerów PAMAM na fluorescencję własną reszt tyrozynowych w białku. α -Synukleina posiada cztery reszty tyrozynowe i nie posiada reszt tryptofanowych. Po dodaniu dendrymerów z grupami aminowymi obserwowano istotny statystycznie wzrost intensywności fluorescencji, czego nie obserwowano w przypadku dendrymerów PAMAM z grupami karboksylowymi (Milowska i wsp., 2011). Dendrymery fosforowe generacji 3 i 4 przyczyniały się natomiast do gaszenia fluorescencji, przy czym dendrymer pd-4 był silniejszym wygaszaczem. Zmiany fluorescencji własnej tyrozyny świadczą o zmianach konformacyjnych białka (Milowska i wsp., 2012). Również dendrymery wiologenowo-fosforowe efektywnie gasiły fluorescencję tyrozyny i wywoływały zmiany konformacyjne w cząsteczce α -synukleiny. Wykazano dynamiczny mechanizm gaszenia fluorescencji dla dendrymeru vpd-1, natomiast w przypadku dendrymeru vpd-2 zaobserwowano zarówno statyczny jak i dynamiczny mechanizm gaszenia fluorescencji reszt tyrozynowych (Milowska i wsp., 2013a).

Oddziaływanie dendrymerów z natywną cząsteczką ASN badano również oceniając wpływ dendrymerów na strukturę drugorzędową białka oraz mierząc potencjał zeta białka w obecności dendrymerów. Dodanie dendrymerów w niskich stężeniach do białka (stosunek molowy ASN:D - 1:2 dla PAMAM, pd i vpd oraz 1:5 dla BDBR) nie wpływało na zmianę kształtu widma dichroizmu kołowego ASN, co oznacza, że badane dendrymery nie powodowały zmian w drugorzędowej strukturze białka (Milowska i wsp., 2011, 2012, 2013a i 2015).

Potencjał zeta charakteryzuje podwójną warstwę elektryczną, która tworzy się na granicy faz ciecz-cząsteczka. Dodanie dendrymerów vpd do ASN skutkuje zmianą potencjału od -21 mV do -6 mV dla vpd-1 i -3 mV dla vpd-2 (Milowska i wsp. 2013b). W przypadku dendrymerów karbokrzemowych obserwowano zmianę potencjału ASN do wartości -3 mV dla BDBR7 i +15,5 mV dla BDBR11 (Milowska i wsp. 2015). Całkowity ładunek w cząsteczce ASN w neutralnym pH wynosi -9, ale jego rozkład jest różny w poszczególnych domenach. Dendrymery wiologenowo-fosforowe mają ładunek dodatni (+12), ale grupy wiologenowe

obdarzone ładunkiem znajdują się wewnątrz cząsteczki. Dendrymery karbokrzemowe mają ładunki (+16), ale dendrymer BBR7 posiada grupy końcowe $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$, natomiast BDBR11 $-\text{NH}_3^+$. Potencjał zeta kompleksu ASN-dendrymer osiąga wartości dodatnie tylko dla dendrymerów BDBR11, bo ładunek dodatni tych dendrymerów znajduje się na powierzchni i nie jest neutralizowany przez inne grupy.

Pomiar potencjału zeta pozwolił również określić w jakich stosunkach molowych powstają elektrostabilne kompleksy białko-dendrymer. Na jedną cząsteczkę ASN przypada 1,5 cząsteczki vpd-1, 1 cząsteczka vpd-2, 5 cząsteczek BDBR7 i 2 cząsteczki BDBR11 (Milowska i wsp., 2013b; 2015).

HAMOWANIE PROCESU AGREGACJI α -SYNUKLEINY

Hamowanie procesu agregacji α -synukleiny (ASN) jest potencjalną strategią terapeutyczną w leczeniu choroby Parkinsona i innych synukleinopatii. Celem moich badań było sprawdzenie czy wybrane dendrymery mogą hamować proces agregacji ASN w warunkach *in vitro*. Wpływ dendrymerów na proces agregacji badano metodą spektroskopii dichroizmu kołowego i fluorymetryczną z zastosowaniem znacznika tioflawiny T (ThT), który selektywnie wiąże się do powstających w układzie fibryli.

Widma dichroizmu kołowego α -synukleiny są typowe dla białek o strukturze nieuporządkowanej z minimum w zakresie 200-204 nm i drugim o mniejszej intensywności przy ok. 229 nm. Inkubacja ASN przez 48 godz. w temperaturze 37°C prowadzi do jej samoistnej agregacji, co na widmie dichroizmu kołowego obserwowane jest jako zmiana kształtu widma. Pojawia się sygnał dodatni w zakresie 199-206 nm, który wskazuje na przekształcenie nieuporządkowanej formy białka w strukturę β . Wyniki uzyskane metodą fluorymetryczną potwierdzają tworzenie się fibryli białka w wyniku inkubacji ASN. Inkubacja białka z dendrymerami PAMAM G4 obdarzonymi ładunkiem dodatnim na powierzchni przyczynia się spowolnienia i częściowego zahamowania procesu agregacji. W obecności dendrymerów PAMAM G4 obserwowane jest wydłużenie fazy zarodkowania (faza lag), zmniejszenie szybkości wydłużania się fibryli (mierzone jako nachylenie wykładniczej części krzywej sigmoidalnej) i znaczne zmniejszenie ilości powstałych fibryli. Natomiast inkubacja białka z dendrymerami PAMAM G3,5 nie wpływa znacząco na proces jego fibrylacji, a zatem dendrymery obdarzone ładunkiem ujemnym nie hamują tego procesu (Milowska i wsp. 2011).

Druga badana grupa dendrymerów, kationowe dendrymery fosforowe generacji 3 i 4, w niskich stężeniach (stosunek molowy ASN:D = 1:0,1 i 1:0,5) również przyczynia się do zahamowania tworzenia się struktury β oraz fibryli, natomiast inkubacja z dendrymerami fosforowymi w wyższych stężeniach nie hamuje procesu fibrylacji. W stosunku molowym ASN:D równym 1:0,1 dla obu generacji oraz 1:0,5 dla pd-G3 nie obserwowano fibryli. W przypadku, gdy liczba cząsteczek dendrymeru była równa lub większa niż liczba cząsteczek ASN (ASN:D 1:1 oraz 1:2), końcowa ilość fibryli była na tym samym poziomie co dla samej α -synukleiny. Wyniki te wskazują, że dendrymery w niskich stężeniach są termodynamicznymi inhibitorami procesu fibrylacji, ponieważ ostateczna ilość fibryli jest zmniejszona. Inhibitory kinetyczne charakteryzują się zaś różnicami w fazie zarodkowania, ale ostateczna ilość powstających fibryli jest bez zmian. Wydaje się zaskakujące, że dendrymery w wyższych stężeniach nie zapobiegają procesowi fibrylacji. Można to wyjaśnić tym, że dendrymery fosforowe mają tendencję do łączenia się w większe aglomeraty, gdy w roztworze jest odpowiednio duże stężenie cząsteczek i to prawdopodobnie blokuje oddziaływanie z białkiem i zarazem nie hamuje procesu agregacji (**Miłowska i wsp. 2012**).

Po 48 godz. inkubacji ASN z dendrymerami wiologenowo-fosforowymi nie stwierdzono istotnych zmian w kształcie widma CD w porównaniu do widma nieinkubowanej ASN. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dendrymery vpd stosowane we wszystkich badanych stężeniach hamują tworzenie struktury β białka. Wyniki te zostały potwierdzone przez badania fluorymetryczne. W zależności od stężenia dendrymeru i grup na powierzchni, proces ten może być nieznacznie lub nawet całkowicie zablokowany. Bardziej skutecznym inhibitorem jest dendrymer vpd-1, który w dwóch niższych stężeniach prawie całkowicie hamuje fibrylację, natomiast vpd-1 w wyższych stężeniach i vpd-2 nie hamują całkowicie tego procesu, ale w znacznym stopniu przyczyniają się do zmniejszenia ilości utworzonych fibryli. Wyniki te wskazują, że dendrymery wiologenowo-fosforowe, podobnie jak dendrymery fosforowe, są termodynamicznymi inhibitorami procesu fibrylacji (**Miłowska i wsp. 2013b**).

Badania wykazały, że również kationowe dendrymery karbokrzemowe generacji 2 różniące się grupami funkcyjnymi hamują tworzenie się fibryli, a dane dichroizmu kołowego potwierdziły, że inkubacja ASN z dendrymerami zapobiega zmianie struktury drugorzędowej białka (**Miłowska i wsp. 2015**).

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że istnieją trzy mechanizmy hamowania procesu agregacji przez dendrymery. Pierwszy z mechanizmów polega na

efektywnym obniżeniu stężenia białka w wyniku związania się z dendrymerem. Drugim mechanizmem hamowania agregacji jest przyłączenie dendrymerów do końców fibryli i blokada ich rozwoju a trzeci możliwy mechanizm to łamanie istniejących już fibryli (Klajnert i wsp. 2006a).

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że do inhibicji procesu fibrylacji wymagana jest obecność dodatnich ładunków w cząsteczce dendrymeru, ale liczba ładunków dodatnich dla danego typu dendrymeru nie wpływa na jego aktywność. Fibrylację hamują zarówno dendrymery wiologenowe (vpd-1 i vpd-2), które mają 12 ładunków dodatnich), czy karbokrzemowe (+16), jak i dendrymery obdarzone większą liczbą ładunków dodatnich czyli PAMAM (+64) lub dendrymery fosforowe (+48 lub +96). Ładunki ujemne na powierzchni nie pozwalają dendrymerom na hamowanie fibrylacji ASN. Inhibicja również nie zależy od generacji dendrymeru, gdyż hamują fibrylację zarówno dendrymery fosforowe (G3 i G4), jak i wiologenowo-fosforowe generacji 0. Jednakże obecność grup fosfonianowych na powierzchni dendrymeru vpd-1 pozwala bardziej skutecznie hamować ten proces, niż to ma miejsce dla dendrymeru vdp-2 z polietylenoglikolowymi (PEG) grupami końcowymi. Świadczy to o wpływie grup końcowych na właściwości dendrymerów. Wśród dendrymerów karbokrzemowych generacji 2 również rodzaj grupy końcowej miał znaczenie i skuteczniejszy okazał się dendrymer BDBR11 z grupą $^{-}\text{NH}_3$.

W celu porównania skuteczności dendrymerów w hamowaniu procesu fibrylacji obliczono procent inhibicji tego procesu. Procent inhibicji obliczono wykorzystując natężenia fluorescencji znacznika ThT w roztworze samej ASN i w obecności dendrymerów po 72 godz. inkubacji. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Najskuteczniejszymi dendrymerami okazały się dendrymery karbokrzemowe. Wysoką skłonność do inhibicji procesu fibrylacji wykazały również dendrymery wiologenowo-fosforowe (Milowska i wsp., 2013b, 2015).

Tabela 1. Skuteczność różnych typów dendrymerów w hamowaniu fibrylacji α -synukleiny (Miłowska i wsp., 2013b, 2015)

| Dendrymery | Grupy końcowe | Ładunek | Stosunek molow ASN/D | % inhibicji | |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------|------------|
| PAMAM | G3, ⁵ | -COO ⁻ | - 64 | 1:1 | 5,3 ± 4,3 |
| | | | | 1:2 | 3,0 ± 2,8 |
| | G4 | - ⁺ NH ₃ | + 64 | 1:1 | 27,2 ± 2,9 |
| | | | | 1:2 | 30,3 ± 3,2 |
| Fosforowe (pd) | G3 | -N ⁺ HEt ₂ | + 48 | 1:0,1 | 63,9 ± 3,0 |
| | | | | 1:0,5 | 59,7 ± 2,5 |
| | | | | 1:1 | 7,8 ± 3,4 |
| | | | | 1:2 | 6,0 ± 3,0 |
| | G4 | -N ⁺ HEt ₂ | + 96 | 1:0,1 | 48,5 ± 3,3 |
| | | | | 1:0,5 | 36,3 ± 2,7 |
| | | | | 1:1 | 3,2 ± 2,7 |
| | | | | 1:2 | 1,2 ± 0,7 |
| Wiologenowo-fosfor (vpd) | G0 | -P(O)(OEt) ₂ | + 12 | 1:0,5 | 90,7 ± 3,4 |
| | | | | 1:1 | 86,7 ± 1,9 |
| | | | | 1:1,5 | 71,8 ± 1,3 |
| | | | | 1:2 | 73,7 ± 1,2 |
| | G0 | PEG (M=2000 Da) | + 12 | 1:0,5 | 73,9 ± 2,1 |
| | | | | 1:1 | 73,0 ± 1,7 |
| | | | | 1:1,5 | 74,0 ± 2,5 |
| | | | | 1:2 | 71,2 ± 1,9 |
| Karbokrzemowe BDBR7 | G2 | - ⁺ NH(Me) ₂ | + 16 | 1:1 | 91,8 ± 0,5 |
| | | | | 1:2 | 95,2 ± 1,3 |
| | | | | 1:5 | 96,9 ± 1,4 |
| BDBR11 | G2 | - ⁺ NH ₃ | + 16 | 1:1 | 96,9 ± 1,9 |
| | | | | 1:2 | 93,6 ± 2,5 |
| | | | | 1:5 | 95,2 ± 2,1 |

Skuteczność dendrymerów w hamowaniu fibrylacji ASN można przedstawić następująco:

BDBR7 > BDBR11 > vpd-1 > vpd-2 > pd-3 > pd-4 > PAMAM G4 >> PAMAM G3,5

CZY DENDRYMERY CHRONIĄ KOMÓRKI PRZED TOKSYCZNYM DZIAŁANIEM ROTENONU?

Wzrost liczby ludności na Ziemi w ciągu ostatnich kilku dekad wywołał presję, aby produkować więcej żywności i taniej. Efektem tego jest coraz powszechniejsze stosowanie nawozów sztucznych i pestycydów, które nie są obojętne dla zdrowia człowieka.

Narażenie na działanie pestycydów prowadzi do zachwiania równowagi oksydacyjnej w komórkach i stresu oksydacyjnego (Grosicka-Maciąg, 2011). Jednym z takich związków jest rotenon, uznawany za pestycyd ekologiczny, bo jest naturalnie występującym izoflawonem i otrzymuje się go z korzeni roślin należących do rodziny *Fabaceae* (*Derris elliptica* or *Lonchocarpus*). Charakteryzuje się szerokim spektrum działania i jest stosowany od wielu lat na dużą skalę w preparatach owadobójczych i w piscicydach. Pomimo jego zalet jako pestycydu, rotenon może powodować stres oksydacyjny, hamować mitochondrialny kompleks I, przyczyniać się do agregacji α -synukleiny i zaburzeń układu ubikwityna-proteasom, co skutkuje rozwojem choroby Parkinsona (Betarbet i Greenamyre, 2007; Caboni i wsp., 2004; Cannon i wsp., 2009; Elbaz i Tranchant, 2007; Tanner i wsp., 2011; Xiong i wsp., 2013). Z tego względu, indukowane rotenonem komórkowe i zwierzęce modele choroby Parkinsona są często stosowane do badania potencjalnych środków neuroochronnych.

W celu sprawdzenia czy dendrymery mogą zapobiegać uszkodzeniom komórek hipokampa myszy (mHippoE-18) wywołanych działaniem rotenonu *in vitro* badano: cytotoksyczność rotenonu w obecności dendrymerów stosując test MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu), poziom reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej H₂DCFDA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny) i transbłonowy potencjał mitochondrialny z użyciem znacznika JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny).

Pierwszym etapem badań była ocena wpływu rotenonu o różnych stężeniach na żywotność komórek hipokampa myszy (mHippoE-18), poziom reaktywnych form tlenu oraz transbłonowy potencjał mitochondrialny a następnie wybór jednego ze stężeń, które zastosowano w następnych eksperymentach. Uzyskane wyniki wskazują, że cytotoksyczność rotenonu jest zależna od jego stężenia. Do dalszych badań wybrano stężenie 1 μ mol/l czyli takie, które obniżało żywotność komórek do ok. 60 %, ale ilość rozpuszczalnika (DMSO) użyta do rozpuszczenia rotenonu nie miała wpływu na żywotność komórek. Również na podstawie

wstępnych badań wybrano jedno stężenie dendrymerów (0,1 $\mu\text{mol/l}$), które stosowano w dalszej pracy. Wszystkie badane dendrymery o stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/l}$ nie powodowały większego niż 14 % spadku żywotności komórek.

W celu sprawdzenia czy dendrymery mogą chronić komórki przed toksycznym działaniem rotenonu przeprowadzono godziną preinkubację z dendrymerami, a następnie komórki traktowano rotenonem. Istotność statystyczną określono w stosunku do komórek traktowanych rotenonem o stężeniu 1 $\mu\text{mol/l}$. Wszystkie badane dendrymery mają korzystny wpływ na żywotność komórek inkubowanych z rotenonem. Żywotność komórek preinkubowanych z dendrymerami była znacznie wyższa w porównaniu do komórek, które traktowano tylko rotenonem. Dendrymer PAMAM G3, dendrymery fosforowe oraz dendrymery karbokrzemowe powodowały wzrost żywotności z 60% do ok. 75%. Efekt ochronny był wyższy dla dendrymerów PAMAM G4 i dendrymerów wiologenowo-fosforowych, dla których żywotność osiągnęła ponad 80%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy dendrymerami (**Milowska i wsp. 2014, 2015**).

W komórkach poddanych działaniu rotenonu zaobserwowano drastyczny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu. Żaden z badanych dendrymerów w zastosowanym stężeniu (0,1 $\mu\text{mol/l}$) nie powodował istotnego statystycznie zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu. Natomiast w komórkach preinkubowanych z dendrymerami a następnie poddanych działaniu rotenonu zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu reaktywnych form tlenu w porównaniu z komórkami traktowanymi tylko rotenonem. Obecność dendrymerów PAMAM G3 wpłynęła na zmniejszenie produkcji reaktywnych form tlenu 2-krotnie, a PAMAM G4 3-krotnie. Dendrymery fosforowe, wiologenowo-fosforowe i karbokrzemowe jeszcze silniej hamowały produkcję reaktywnych form tlenu. Efekt był porównywalny dla tych trzech grup dendrymerów (**Milowska i wsp. 2014, 2015**).

Rotenon (z wyjątkiem najniższego stężenia) obniżał transbłonowy potencjał mitochondrialny. W najwyższym zastosowanym stężeniu potencjał został obniżony do 27%. Dendrymery PAMAM oraz karbokrzemowe nie zmieniały potencjału błony mitochondrialnej, natomiast dendrymery fosforowe i wiologenowo-fosforowe powodowały nieznaczną depolaryzację błony mitochondrialnej, istotną statystycznie dla dendrymeru fosforowego pd-4.

Dendrymery PAMAM, karbokrzemowe i dendrymer wiologenowo-fosforowy częściowo zapobiegają depolaryzacji błony mitochondrialnej wywołanej przez rotenon. Najskuteczniejszy

jest dendrymer wiologenowo-fosforowy. Dendrymer fosforowy generacji 3, nie ma wpływu na zmiany wywołane rotenonem, natomiast generacji 4 pogłębia efekt działania rotenonu (**Milowska i wsp. 2014, 2015**).

W celu wyjaśnienia mechanizmu ochronnego działania dendrymerów przeprowadzono analizę oddziaływania pomiędzy dendrymerami i rotenonem. Dendrymery mają zdolność wiązania w swoim wnętrzu małych cząsteczek lub ich przyłączania do grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni. Rotenon jest małą cząsteczką, która potencjalnie może być zamknięta wewnątrz dendrymerów. Sprawdzone taką możliwość przez pomiar potencjału zeta dendrymerów w obecności rotenonu.

Wszystkie zastosowane dendrymery posiadają ładunek dodatni na powierzchni, więc spodziewano się, że potencjał zeta dendrymerów będzie dodatni, jednak dla dendrymeru PAMAM wartości te były ujemne. Prawdopodobnie ma tu miejsce zaginanie grup końcowych dendrymerów do jego wnętrza tzw. back-folding.

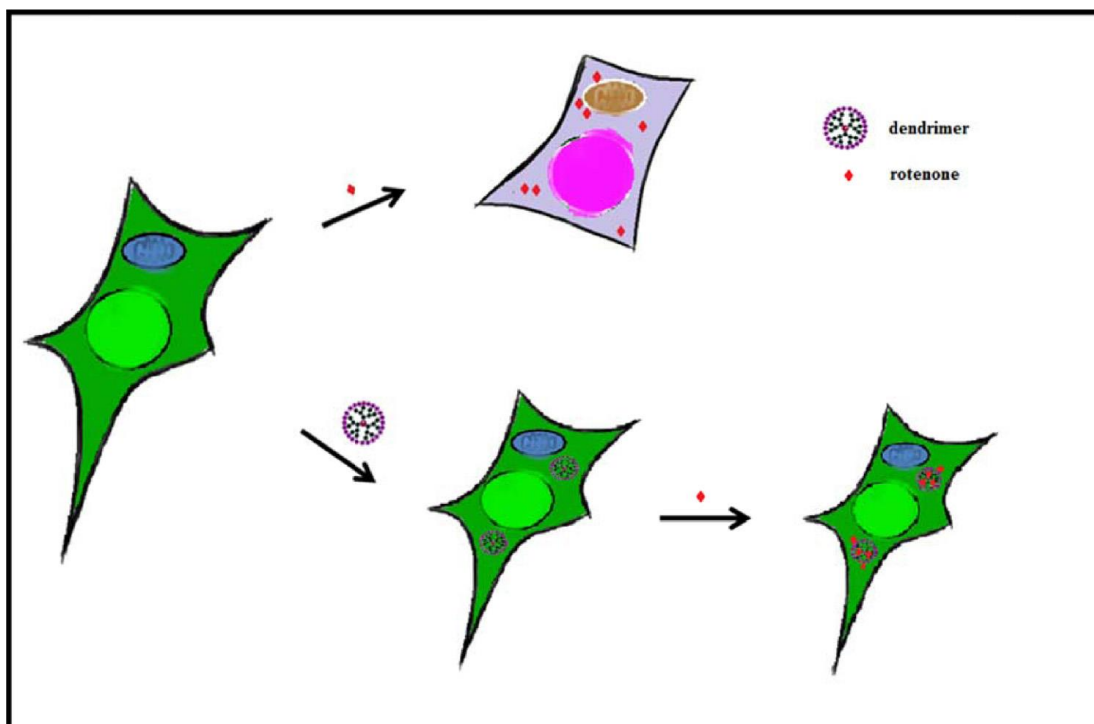
Analiza zmian potencjału zeta dendrymerów po dodaniu rotenonu sugeruje, że w pierwszym etapie cząsteczki rotenonu wnikały w wolne przestrzenie dendrymerów - potencjał zeta układu nie zmieniał się. Następnie następował spadek potencjału zeta co świadczy o przyłączeniu się rotenonu do powierzchni dendrymeru i po osiągnięciu wysycenia rotenonem wartość potencjału zeta pozostawała na stałym poziomie. Liczba cząsteczek rotenonu przyłączonych do jednej cząsteczki dendrymeru (tabela 2.) zależy od rodzaju i generacji dendrymeru. Dendrymer wiologenowo-fosforowy jest generacji zerowej i ma otwartą strukturę, więc z tego względu nie obserwowano wnikania rotenonu do wnętrza dendrymeru (**Milowska i wsp., 2014, 2015**).

Tabela 2. Liczba cząsteczek rotenonu przyłączona do jednej cząsteczki dendrymeru (**Miłowska i wsp., 2014, 2015**).

| | Wnętrze cząsteczki | Razem |
|-----------------|---------------------------|--------------|
| PAMAM G3 | 4 | 15 |
| PAMAM G4 | 10 | 16 |
| pd G3 | - | 9 |
| pd G4 | 3 | 15-16 |
| vpd G0 | - | 8 |
| BDBR7 | - | 5 |
| BDBR11 | 5 | 11 |

Rotenon przyłącza się do dendrymeru za pomocą wiązań wodorowych a w przypadku dendrymerów zawierających wewnątrz pierścienie aromatyczne następuje oddziaływanie niekowalencyjne tzw. π -stacking, polegające na bocznym nakładaniu układów aromatycznych bogatych w zdelokalizowane wiązania π . Zatem dendrymery fosforowe oraz wiologenowo-fosforowe posiadające w swej cząsteczce układy aromatyczne mogą wchodzić w interakcje z innym układem aromatycznym (rotenon).

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że badane dendrymery zapobiegają uszkodzeniom komórek wywołanych przez rotenon. Najbardziej skuteczny jest dendrymer wiologenowo-fosforowy a następnie dendrymery karbokrzemowe. Mechanizm ochronnego działania dendrymerów polega na wychwytywaniu cząsteczek rotenonu przez dendrymery i w ten sposób zmniejszeniu szkodliwego działania pestycydu (rys. 2).



Rys. 2. Prawdopodobny mechanizm ochronnej roli dendrymerów przed działaniem rotenonu (Miłowska i wsp., 2014).

PODSUMOWANIE

Podsumowując przeprowadzone badania można stwierdzić, że:

- Badane dendrymery w niskich stężeniach oddziałują z natywną cząsteczką α -synukleiny, ale nie powodują zmian jej struktury drugorzędowej
- Dendrymery posiadające ładunek dodatni mogą być potencjalnymi inhibitorami procesu fibrylacji, a ich skuteczność zależy od stężenia dendrymeru i rodzaju grup funkcyjnych
- Najskuteczniejszymi inhibitorami procesu agregacji są dendrymery karbokrzemowe i wiologenowo-fosforowe
- Dendrymery chronią komórki przed szkodliwym działaniem rotenonu
- Wychwytywanie rotenonu przez dendrymery jest głównym mechanizmem ich ochronnego działania
- Największe właściwości ochronne wykazują dendrymery karbokrzemowe i wiologenowo-fosforowe

WNIOSEK

Dendrymery karbokrzemowe i wiologenowo-fosforowe mogą być wykorzystane do dalszych badań mających na celu określenie ich przydatności jako potencjalnych leków w chorobie Parkinsona.

Literatura

- Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2007, Parkinson's disease: animal models. *Handb. Clin. Neurol.* 83, 265-287.
- Beyer K., 2006, α -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol.* 112, 237-251.
- Binolfi A., Rodriguez E.E., Valensin D., D'Amelio N., Ippoliti E., Obal G., Duran R., Magistrato A., Pritsch O., Zweckstetter M., Valensin G., Carloni P., Quintanar L., Griesinger C., Fernández C.O., 2010, Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein., *Inorg. Chem.*, 49, 10668–10679.
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., Mcilwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L., 2002, Synaptic vesicle depletion correlates with-attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 22, 8797-807.
- Caboni P., Sherer T.B., Zhang N., Taylor G., Na H.M., Greenamyre J.T., Casida J.E., 2004, Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1540-1548.
- Cannon, J.R., Tapias V.M., Na H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., Greenamyre, J.T., 2009, A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 34, 279–290.
- Cheng F., Vivacqua G., Yu S., 2011, The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 242-248.
- Cookson M.R., 2009, α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol. Neurodegeneration*, 4, 1-14.
- da Costa A.C., Paitel E., Vincent B., Checler F. 2002, Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 277, 50980-50984.
- Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C., Lansbury P.T. Jr., 2002, Annular α -synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry*, 41, 10209-10217.
- Elbaz, A., Tranchant, C., 2007, Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 262, 37-44.
- Fink A.L., 2006, The aggregation and fibrillation of α -synuclein. *Accounts Chem. Res.*, 39, 628-634.

- Giaccone G., Salmona M., Tagliavini F., Forloni G., Brain dysfunction associated with amyloid fibrils and other aggregated proteins, in: J.D. Sipe (Eds), *Amyloid proteins. The beta sheet conformation and disease*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, 355-382.
- Grosicka-Maciąg, E., 2011, Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 65, 357-366.
- Jensen P.J., Alter B.J., O'malley K.L., 2003, Alpha-synuclein protects naive but not dbcAMP-treated dopaminergic cell types from 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity. *J Neurochem.* 86, 196-209.
- Kaźmierczak A., Adamczyk A., Benigna-Strosznajder J., 2013, Znaczenie zewnątrzkomórkowej α -synukleiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek, *Postępy Hig. Med. Dosw.* 67, 1047-1057.
- Kaźmierczak A., Adamczyk A., Strosznajder J.B., 2007, The influence of α -synuclein on dopaminergic system function, *Postępy Biol. Kom.*, 34, 377-390.
- Klajnert B., Bryszewska M., 2001, Dendrimers: properties and applications, *Acta Biochim. Polonica* 48, 199-208.
- Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M., Cladera, J., 2006b, Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 577-582.
- Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., Bryszewska M. 2006a Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 21-28.
- Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., Majoral, J.P., Caminade, A.M., Bryszewska, M. 2007, Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364, 20-25.
- Krygowska-Wajs A., Wszolek Z., 2004, Postęp w badaniach genetycznych w chorobie Parkinsona, *Neurol. Neurochir. Pol.* 2, 127-136
- Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J., Simon M., Nowak R.J., Walz T., Lansbury P.T.Jr., 2002, α -Synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J. Mol. Biol.*, 322, 1089-1102.
- Lazniewska J., Miłowska K., Gabryelak T., 2012, Dendrimers – revolutionary drugs for infectious diseases. *WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 4, 469-491.
- Lotharius J., Brundin P., 2002, Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 11, 2395-407.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., Bryszewska M., Caminade A-M., Majoral J-P., **2012**, Phosphorus-containing dendrimers against α -synuclein fibril formation, *Inter. J. Biol. Macromol.* 50, 1138-1143.

- Milowska K.**, Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J-P., Bryszewska M., Caminade A-M., Gabryelak T., **2013a**, Interaction between viologen-phosphorus dendrimers and α -synuclein. *J. Lumin*, 134, 132-137.
- Milowska K.**, Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J-P., Bryszewska M., Gabryelak T., **2013b**, Viologen-phosphorus dendrimers inhibit α -synuclein fibrillation. *Mol. Pharmaceutics* 10, 1131-1137.
- Milowska K.**, Malachowska M., Gabryelak T., **2011**, PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of α -synuclein, *Inter. J. Biol. Macromol.* 48, 742-746.
- Milowska K.**, Szwed A., Mutrynowska M., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Gabryelak T., Bryszewska M. **2015**, Carbosilane dendrimers inhibit α -synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage. *Int. J. Pharm.* 484, 268-275.
- Milowska K.**, Szwed A., Zablocka M., Caminade A.M., Majoral J-P., Mignani S., Gabryelak T., Bryszewska M., **2014**, *In vitro* PAMAM, phosphorus and viologen-phosphorus dendrimers prevent rotenone-induced cell damage. *Inter. J. Pharm.* 474, 42-49.
- Narayanan V., Guo Y., Scarlata S., 2005, Fluorescence Studies Suggest a Role for alpha-synuclein in the phosphatidylinositol lipid signaling pathway. *Biochemistry*. 44, 462-470.
- Sidhu A., Wersinger C., Vernier P, 2004b, Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J.* 18, 637-47.
- Sidhu A., Wersinger C., Vernier P., 2004a, alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 565, 1-5.
- Solecka J., Adamczyk A., Strosznajder J.B., 2005, Alpha-synuclein in physiology and pathology of the brain, *Postępy Biol. Kom.* 2, 343-357.
- Steidl J.V., Gomez T., 2003, Altered short – term hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha– synuclein transgenic mice. *Neuroreport.* 14, 219 – 223.
- Supattapone S., Nguyen H.O., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R., 1999, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14529–14534.
- Svenson S., Tomalia D.A., 2005, Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2106-2129.
- Szwed A., **Milowska K.**, **2012**, Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych, *Postępy Hig. Med. Dosw.* 66, 187-195.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, Ch., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., Langston, J.W., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872 .
- Tashiro M., Kojima M., Kihara H., Kasai K., Kamiyoshihara T., Ueda K., Shimotakahara S., 2008, Characterization of fibrillation process of a-synuclein at the initial stage. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 369, 910–914.

Xiong, N., Xiong, J., Jia, M., Liu, L., Zhang, X., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z., Hou, L., Luo, Z., Ghoorah, D., Lin, Z., Wang, T., 2013, The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modelling. *Behavioral Brain Funct.* 9, 13
<http://www.behavioralandbrainfunctions.com/content/9/1/13>.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia ukończyłam w 1999 roku na kierunku chemia Wydziału Fizyki i Chemii (obecnie Wydział Chemii) Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę magisterską pt.: "Zastosowanie 3-tiokarbamoilopropanofosfonianu dietylu w syntezie heterocyklicznych pochodnych kwasu propanofosfonowego" wykonałam w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Romualda Bartnika.

W 2000 roku rozpoczęłam pracę w Katedrze Biofizyki Ogólnej UŁ na stanowisku asystenta. Początkowo moje zainteresowania naukowe dotyczyły badania wpływu czynników fizykochemicznych na komórki w badaniach *in vitro*. Efektem prowadzonych badań było 5 prac (**Pałecz i wsp., 2002; Gabryelak i wsp. 2002; Miłowska i wsp., 2003a; Miłowska i wsp., 2003b, Miłowska i Gabryelak, 2005a**).

W 2002 roku zostałam słuchaczką *Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii* Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską pt. „Działanie ultradźwięków na erythrocyty jądrzaste” wykonałam w Katedrze Biofizyki Ogólnej pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Gabryelak. Celem mojej pracy było zbadanie wpływu ultradźwięków na wybrane składniki erythrocytów jądrzastych (błonę komórkową, hemoglobinę i DNA), określenie mechanizmu działania ultradźwięków na erythrocyty oraz ocena działania ultradźwięków w obecności ftalocyjanin. W efekcie tych badań powstały następujące prace **Miłowska i wsp. 2005, Miłowska i Gabryelak 2005b., Miłowska i wsp. 2007*; Miłowska 2007*, Miłowska i Gabryelak, 2008***. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskałam w 2007 roku.

W latach 2004-2006 odbyłam trzy dwutygodniowe staże naukowo-badawcze w Stacji Morskiej Instytutu Fizjologii i Biologii Morza w Tamaris/La Seyne sur Mer, Uniwersytet Claude Bernard Lyon I we Francji. Podczas staży uczestniczyłam w badaniach oceniających wpływ

tanin na wybrane parametry komórkowe zwierząt morskich (ryby i małże), których rezultaty przedstawiono w pracy **Labieniec i wsp. 2009***.

* prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

Literatura

- Pałecz D., **Miłowska K.**, Gabryelak T., **2002**, Charakterystyka enzymatycznego systemu P-450 trzustko-wątroby *Unio tumidus* w przekroju rocznym. [w]: Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona, ed; K. Gwoździński, Wyd. UŁ, Łódź. 272-284.
- Gabryelak T., Nowak J., **Miłowska K.**, **2002**, Małże z rodziny *Unionidae* jako wskaźnik stopnia zanieczyszczenia środowiska wodnego metalami ciężkimi (Cu, Cd). [w]: Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona, ed: K. Gwoździński, Wyd. UŁ, Łódź. 241-250.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., Dudala J., Labieniec M., Slobozhanina E., **2003a**, Biological activity of pentachlorophenol on the digestive gland cells of the freshwater mussels *Unio Tumidus*, Z. Naturforsch C 11/12, 867-872.
- Miłowska K.**, Majda M., Gabryelak T., **2003b**, Wpływ pentachlorofenolu (PCP) na erytrocyty karpia w badaniach *in vitro*. [w]: Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona, ed: K. Gwoździński, Wyd. UŁ, Łódź, pp. 305-317.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., **2005a**, Oddziaływanie kwasu taninowego i produktów jego rozpadu na erytrocyty człowieka i karpia”, [w]: Bory Tucholskie - zasoby i ich ochrona, ed: K. Gwoździński, Wyd. UŁ, Łódź, 73-81
- Miłowska K.**, Gabryelak T., Lypacewicz G., Tymkiewicz R., Nowicki A., **2005**, Effect of ultrasound on nucleus erythrocytes. *Ultrasound Med. Biol.* 31, 129-134.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., **2005b**, Synergistic effect of ultrasound and phthalocyanines on nucleated erythrocytes *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* 31, 1707-1712.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., **2007***, Reactive oxygen species and DNA damage after ultrasound exposure. *Biomol. Eng.* 24, 263-267.
- Miłowska K.**, **2007***, Ultradźwięki – mechanizmy działania i zastosowanie w terapii sonodynamicznej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 61, 338-349.
- Miłowska K.**, Gabryelak T., **2008***, Enhancement of ultrasonically induced cell damage by phthalocyanines *in vitro*. *Ultrasonics*, 48, 724-730.
- Labieniec M., **Miłowska K.**, Balcerczyk A., Rucińska A., Sadowska M., Jokiel M., Brichon G., Gabryelak T., **2009***, Interactions of free copper (II) ions alone or in complex with iron (III) ions with erythrocytes of marine fish *Dicentrarchus labrax*, *Cell Biol. Inter.* 33, 941-948.

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Biofizyki Ogólnej i swoją aktywność naukową skierowałam na badania z obszaru nanobiologii. Głównym tematem moich badań była charakterystyka dendrymerów jako potencjalnych czynników zapobiegających agregacji α -synukleiny i chroniących komórki przed toksycznym działaniem rotenonu. Publikacje dotyczące tego zagadnienia stanowią moje OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE.

Dodatkowo uczestniczyłam w wielu badaniach i projektach krajowych oraz międzynarodowych dotyczących oceny biologicznych właściwości nanocząstek (lista projektów znajduje się w załączniku 4) oraz brałam udział w opisie właściwości i potencjalnych medycznych zastosowań dendrymerów (**Sękowski i wsp. 2008; Shcharbin i wsp. 2014a, Shcharbin i wsp. 2014b**). W ramach współpracy z Katedrą Chemii Fizycznej Uniwersytetu Łódzkiego wzięłam udział w badaniach dotyczących oddziaływania dendrymerów z lekami przeciwnowotworowymi (**Buczowski i wsp., 2011**). Byłam promotorem pomocniczym doktoratu dr Joanny Łazniewskiej „Ocena toksyczności dendrymerów wiologenowo-fosforowych oraz fosforowych wobec mysich komórek nerwowych linii N2a i mHippoE-18”. W związku z powyższym konsultowałam wybór metod oraz opracowanie i interpretacje uzyskanych wyników badań, które przedstawiono w pracach: **Lazniewska i wsp. 2012; Lazniewska i wsp. 2013a; Lazniewska i wsp. 2013b; Lazniewska i wsp. 2013c**. Uczestniczyłam również w ocenie biologicznych właściwości krzemionek mezoporowatych (**Pędziwiatr-Werbicka i wsp. 2014; Ferenc i wsp. 2015**), dendrymerów hybrydowych (**Moreno i wsp. 2015**) oraz dendrymerów skompleksowanych z dwutlenkiem tytanu (**Milowska i wsp. 2015a**). Jako wykonawca projektu NCN HARMONIA uczestniczyłam w badaniach mechanizmu oddziaływania dendrymerów z białkami (**Nowacka i wsp., 2015a; Shcharbin i wsp. 2015; Nowacka i wsp. 2016; Milowska i wsp. 2015b, Nowacka i wsp. 2015b**). W projekcie badawczym w ramach polsko-słowackiej współpracy dwustronnej MNiSW brałam udział w pracach mających na celu ocenę oddziaływania dendrypleksów (kompleksów dendrymerów z peptydami HIV-1) z liposomami (**Ionov i wsp. 2015a**). Odbylam również dwutygodniowy staż w Katedrze Fizyki Jądrowej i Biofizyki Uniwersytetu im. Komeńskiego w Bratysławie (Słowacja). W ramach projektu FP7-PEOPLE-2012-IRSES NANOGENE uczestniczyłam w badaniach oddziaływania dendrymerów z siRNA (**Ionov i wsp. 2015b**) oraz

odbyłam dwa staże naukowe (miesięczny w Instytucie Biologii Chemicznej i Medycyny Fundamentalnej Rosyjskiej Akademii Nauk w Nowosybirsku (Rosja) oraz dwutygodniowy w Instytucie Biofizyki i Inżynierii Komórki, Białoruskiej Akademii Nauk w Mińsku (Białoruś).

Literatura

- Buczowski A., Sekowski Sz., Grala A., Palecz D., **Milowska K.**, Urbaniak P., Gabryelak T., Piekarski H., Palecz B., **2011**, Interaction between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Inter. J. Pharm.* 408, 266-270
- Lazniewska J., **Milowska K.**, Gabryelak T., **2012**, Dendrimers – revolutionary drugs for infectious diseases. *WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 4, 469-491.
- Lazniewska J., **Milowska K.**, Katir N., El Kadib A., Bryszewska M., Majoral J-P., Gabryelak T., **2013a**, Viologen-phosphorus dendrimers exhibit minor toxicity against murine neuroblastoma cell line. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18, 459-478.
- Lazniewska J., **Milowska K.**, Zablocka M., Mignani S., Caminade A.M., Majoral J-P., Bryszewska M., Gabryelak T., **2013b** Mechanism of cationic phosphorus dendrimers toxicity against murine neural cell lines. *Mol. Pharmaceutics* 10, 3484–3496.
- Lazniewska J., Janaszewska A., **Milowska K.**, Caminade A-M., Mignani S., Katir N., El Kadib A., Bryszewska M., Majoral J-P., Gabryelak T., Klajnert-Maculewicz B., **2013c** Promising low-toxicity of viologen-phosphorus dendrimers against embryonic mouse hippocampal cells. *Molecules* 18, 12222-12240.
- Shcharbin D., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Ziemia B., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Shcharbina N., **Milowska K.**, Ionov M., Shakhbazau A., Bryszewska M., **2014a**, How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity *in vivo*. *J. Control. Release* 181, 40-52.
- Pędziwiatr-Werbicka E., **Milowska K.**, Podlas M., Marcinkowska M., Ferenc M., Brahmī Y., Katir N., Majoral J.P., Felczak A., Boruszewska A., Lisowska K., Bryszewska M., El Kadib A. 2014, Oleochemical-tethered-SBA-15-type mesoporous silicates with tunable nanoscopic order, carboxylic reactive-surface and hydrophobic framework: Impact on cellular toxicity, hemolysis and antibacterial activity. *Chem-A Eur J* 20, 9596-9606
- Shcharbin D., Shcharbina N., **Milowska K.**, de la Mata F.J., Muñoz-Fernandez M.A., Mignani S., Gomez-Ramirez R., Majoral J-P., Bryszewska M. **2014b**, Interference of cationic polymeric nanoparticles with clinical chemistry tests—Clinical relevance. *Inter. J. Pharm.* 473, 599-606
- Ionov M., Ciepluch K., Garaiova Z., Melikishvili S., Michlewska S., Balcerzak L., Glinska S., **Milowska K.**, Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Shcharbin D., Waczulikova I., Bryszewska M., Hianik T., **2015a**, Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. *BBA-Biomembranes*. 1848, 907-915.

- Ferenc M., Katir N., **Milowska K.**, Bousmina M., Majoral J.-P., Bryszewska M. El Kadib A., 2015, Haemolytic activity and cellular toxicity of SBA-15-type silicas: elucidating the role of the mesostructure, the surface functionality and the linker length *J. Materials Chem. B* 3, 2714-2724
- Nowacka O., **Milowska K.**, Bryszewska M. **2015a**, Interaction of PAMAM dendrimers with bovine insulin depends on nanoparticle end-groups. *J. Lumin.* 162, 87-91.
- Moreno S., Szwed A., El Brahmī N., **Milowska K.**, Kurowska J., Fuentes-Paniagua E., Pedziwiatr-Werbicka E., Gabryelak T., Katir N., de la Mata F.J., Muñoz-Fernández M.A., Gomez-Ramirez R., Caminade A.M., Majoral J.-P., Bryszewska M. 2015 Synthesis, characterization and biological properties of new hybrid carbosilane-viologen-phosphorus dendrimers. *RSC Advances* 5, 25942-25958
- Ionov M., Lazniewska J., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Novopashina D., Apartsin E., Krasheninina O., Venyaminova A., **Milowska K.**, Nowacka O., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Majoral J.-P., Shcharbin D., Bryszewska M. **2015b**, Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. *Int. J. Pharm.* 485, 261-269.
- Shcharbin D., Ionov M., Abashkin V., Loznikova S., Dzmitruk V., Shcharbina N, Matusевич N., **Milowska K.**, Gałęcki K., Wysocki S., Bryszewska M., **2015**, Nanoparticle corona for proteins: Mechanisms of interaction between dendrimers and proteins. *Coll. Surfaces B: Biointerfaces* 134, 377–383
- Milowska K.**, Rybczyńska A., Mosiolek J., Durdyn J., Szewczyk E.M., Katir N., Brahmī Y., Majoral J.P., Bousmina M., Bryszewska M., El Kadib A. **2015a**, Biological activity of mesoporous dendrimer-coated titanium dioxide: Insight on the role of the surface–interface composition and the framework crystallinity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 19994-20003.
- Milowska K.**, Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Gabryelak T., Bryszewska M.. Carbosilane dendrimers affect the fibrillation of α -synuclein., *AIP Conf. Proc.* **2015b**, 1695, 020024-1–020024-7;
- Nowacka O., **Milowska K.**, Ionov M., Bryszewska M. Influence of PAMAM dendrimers on the human insulin. *AIP Conf. Proc.* **2015b**, 1695, 020028-1–020028-6;
- Nowacka O., **Milowska K.**, Belica-Pacha S., Palecz B., Siposova K., Gazova Z., Bryszewska M. **2016**, Generation-dependent effect of PAMAM dendrimers on human insulin fibrillation and thermal stability. *Int. J. Biol. Macromol.*, 82, 54-60.

Działalność dydaktyczna

Od momentu zatrudnienia w Katedrze Biofizyki Ogólnej UŁ prowadziłam zajęcia dydaktyczne ze studentami studiów stacjonarnych i niestacjonarnych na kierunkach: biologia, ochrona środowiska, biotechnologia i chemia kosmetyczna. Brałam udział w opracowaniu instrukcji i przygotowaniu ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotów: Biofizyka medyczna, Oddziaływanie promieniowania niejonizującego i fal dźwiękowych z układami biologicznymi, Biofizyka, Chemia fizyczna.

Byłam promotorem 5 oraz opiekunem naukowym 12 prac magisterskich. Kierowałam 4 pracami licencjackimi, w wyniku których powstała publikacja **Miłowska i wsp. 2014**.

Literatura

Miłowska K., Grabowska K., Gabryelak T. 2014, Zastosowanie promieniowania elektromagnetycznego w medycynie. Postępy Hig. Med. Dosw. 68, 473-482.

Działalność organizacyjna

Od początku pracy biorę aktywny udział w działalności organizacyjnej Katedry oraz Wydziału (m.in. Sekretarz Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej, członek Uczelnianych Komisji Przetargowych). Uczestniczyłam w imprezach o charakterze popularno-naukowym promującym Wydział BiOŚ. Do najważniejszych z nich należą: Noc Biologów, Festiwal Nauki Techniki i Sztuki. Organizowałam również i przeprowadzałam warsztaty dla uczniów Szkół Podstawowych.

ZESTAWIENIE WYBRANYCH OSIĄGNIĘĆ

| | |
|--|------------------|
| Liczba opublikowanych prac | 38 |
| Sumaryczny impact factor^a | 100,862 |
| Impact factor OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO^a | 20,055 |
| Punkty MNiSW ^a | 887 |
| Punkty MNiSW OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO ^a | 215 |
| Liczba cytowań (bez autocytowań) | 214 (170) |
| Indeks Hirscha | 9 |

^a zgodnie rokiem opublikowania

K. Miłowska