

**Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**

Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych



Dr inż. Marta Kepinska

Załącznik nr 2

Autoreferat

w języku polskim

Wrocław 2019

A U T O R E F E R A T

1. IMIĘ I NAZWISKO: **Marta Kepinska**

15.05.2015 – zmiana nazwiska z Zalewska na Kepinska

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

- ❖ 2003 r. - tytuł zawodowy magistra inżyniera biotechnologii, specjalizacja biotechnologia molekularna i biokataliza.
Temat pracy magisterskiej: „Sekwencjonowanie genu *p53* w linii komórek jajnika typu surowiczego”;
Promotor: dr inż. Iwona Grad
Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska
- ❖ 2011 r. - stopień naukowy doktora nauk chemicznych w dyscyplinie biotechnologia, uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Lokalizacja i kompleksy białka wiążącego hormon juwenilny z innymi białkami – w poszukiwaniu molekularnych mechanizmów jego działania”;
Promotor: prof. dr hab. Marian Kochman
Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska
- ❖ 2013 r. - dyplom i tytuł Menedżera Projektu Badawczo-Rozwojowego studia podyplomowe na kierunku: menedżer projektu badawczo-rozwojowego, październik 2012 r. - czerwiec 2013 r.
Wyższa Szkoła Bankowości we Wrocławiu
- ❖ 2011 r. - uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego Nr 11512 nadany przez Prezesa Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych studia podyplomowe na kierunku: Analityka Medyczna październik 2009 r. - marzec 2011 r.
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- ❖ czerwiec 2009 r. - wrzesień 2010 r. - pracownik inżynierjno-techniczny w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- ❖ październik 2010 r. - wrzesień 2011 r. - asystent w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- ❖ październik 2011 r. - obecnie - adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
również od 2011 r. - obecnie - opiekun Pracowni Elektroforezy Kapilarnej działającej przy Katedrze Biomedycznych Analiz Środowiskowych

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, WYNIKAJĄCE 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem prac obejmującym **1 pracę pogładową oraz 4 prace oryginalne**, opublikowanych w latach 2011 - 2018 w recenzowanych czasopismach naukowych.

We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem do korespondencji (*). Wszystkie wymienione prace zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora.

A) tytuł osiągnięcia naukowego

„Charakterystyka biochemiczna metalotioneiny oraz jej status w komórkach MCF-7 traktowanych kompleksami fulerenów z dokсорubicyną”

B) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

1. Marta Zalewska*, Jagoda Trefon, Halina Milnerowicz. *The role of metallothionein interactions with other proteins.*

Proteomics, 2014; 14(11): 1343-1356.

IF= **3,807**; MNiSW = **35**

[pozycja I.B.1 w załączniku nr 3; kopia pracy w załączniku nr 5].

2. Marta Zalewska*, Anna Bizoń, Halina Milnerowicz. *Comparison of capillary electrophoretic techniques for analysis and characterization of metallothioneins.*

J. Sep. Sci., 2011; 34(21): 3061-3069.

IF= **2,733**; MNiSW = **32**

[pozycja I.B.2 w załączniku nr 3; kopia pracy w załączniku nr 5].

3. Marta Kepinska*, Sona Krizkova, Ewelina Guszpit, Miguel Angel Merlos Rodrigo, Halina Milnerowicz. *Comparison of human and rabbit metallothioneins by the capillary electrophoresis, mass spectrometry and Brdicka reaction analysis.*

Adv. Clin. Exp. Med., 2018; 27(11): 1601-1608.

IF= **1,262**; MNiSW = **15**

[pozycja I.B.3 w załączniku nr 3; kopia pracy w załączniku nr 5].

4. Marta Kepinska*, Rene Kizek, Halina Milnerowicz. *Fullerene as a doxorubicin nanotransporter for targeted breast cancer therapy: capillary electrophoresis analysis.*

Electrophoresis, 2018; 39(18): 2370-2379.

IF= **2,569**; MNiSW = **25**

[pozycja I.B.4 w załączniku nr 3; kopia pracy w załączniku nr 5].

5. Marta Kepinska*, Rene Kizek, Halina Milnerowicz. *Metallothionein and superoxide dismutase - antioxidative protein status in fullerene-doxorubicin delivery to MCF-7 human breast cancer cells.*

Int. J. Mol. Sci., 2018; 19(10); art.3253 [17 s.].

IF= 3,687; MNiSW = 30

[pozycja I.B.5 w załączniku nr 3; kopia pracy w załączniku nr 5].

Łączny współczynnik IF prac składających się na „osiągnięcie naukowe” wynosi:
14,058

Łączna liczba punktów MNiSW prac składających się na „osiągnięcie naukowe”
wynosi: **137**

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej publikacji oraz wykaz innych osiągnięć znajduje się w załączniku nr 3, analiza bibliometryczna publikacji wykonana przez Bibliotekę Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu znajduje się w załączniku nr 4, kopie prac stanowiących „osiągnięcie naukowe” znajdują się w załączniku nr 5, oświadczenia współautorów prac określające indywidualny wkład każdego z Nich w jej powstanie znajdują się w załączniku nr 6.

C) omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie oraz cel przeprowadzonych badań:

Metalotioneiny (MTs) są zachowanymi w ewolucji, stabilnymi termicznie białkami o niskiej masie cząsteczkowej (~ 6 kDa), występującymi u kręgowców, bezkręgowców, grzybów, a nawet u roślin. Jak dotąd, zidentyfikowano 4 główne izoformy MT. MT-1 i MT-2 są obecne we wszystkich typach tkanek i są często opisywane razem jako MT-1/2. MT-3 wykryto głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (neurony, astrocyty w korze mózgowej, hipokampie), ale także w sercu, nerkach i narządach rozrodczych. MT-4 można znaleźć w komórkach nabłonka płaskiego (usta, górny odcinek przewodu pokarmowego, skóra) [Sabolic i inni, 2010; Ruttkay-Nedecky i inni, 2013]. Różnice między izoformami 1-4 wynikają z różnic w sekwencji aminokwasów [Hijova, 2004; Ruttkay-Nedecky i inni, 2013]. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy ssaczej MT składa się z 61-68 aminokwasów i zawiera 20 reszt cysteinyłowych. Wysoka liczba grup sulfhydrylowych daje im zdolność wiązania jonów metali. Tak więc główne funkcje wywodzą się z ich roli w kontroli homeostazy niezbędnych metali (Cu, Zn), detoksykacji

metali toksycznych (np. Cd, Hg) oraz w działaniach ochronnych przed stresem oksydacyjnym [Krizkova i inni, 2017; Torreggiani i inni, 2013]. MT wiążąc jony Zn może przekazywać je do innych białek wiążących Zn i odbierać je od nich [Klassen i inni, 2009], odgrywając ważną rolę jako donator i akceptor jonów metali, dla różnych enzymów i czynników transkrypcyjnych. Przeniesienie Zn z MT do białek wiążących Zn może przyczyniać się do regulacji ekspresji genów, wpływać na apoptozę, proliferację lub różnicowanie komórek [Sabolic i inni, 2010; Krizkova i inni, 2012; Babula i inni, 2012]. **Moim celem było przeprowadzenie studium literaturowego poświęconego usystematyzowaniu aktualnej wiedzy o MT, pełnionych przez nią funkcjach oraz analizie oddziaływań z białkami, przez które te funkcje pełni.**

Indukcja syntezy MT jest regulowana przez specyficzne sekwencje regulatorowe obecne w promotorze genu, takie jak: element odpowiedzi na metale m.in. Cd, Zn i Cu, na glukokortykoidy i element odpowiedzi antyoksydacyjnej aktywowany przez status redoks [Hijova, 2004]. Heterogenność izoform może być odpowiedzią na obecność metali ciężkich, warunków redukcyjno-oksydacyjnych w organellach i stanu redoks MT [Coyle i inni, 2002]. Obok tradycyjnych technik analitycznych, takich jak elektroforeza żelowa czy chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna (CE) okazała się przydatnym narzędziem do rozdzielania białek. CE stała się alternatywą dla powyższych technik, do oznaczania ilościowego poszczególnych izoform MT [Nakamura i inni, 2004; Wilhelmsen i inni, 2004], badania ich stabilności [Pawlak i inni, 2002; Minami i inni, 1998] oraz oligomeryzacji MT [Krizkova i inni, 2010; Wilhelmsen i inni, 2002]. **Dlatego kolejnym celem była identyfikacja oraz charakterystyka MT ludzkiej, króliczej i końskiej przy użyciu trzech technik elektroforezy kapilarnej:** analizy względnej masy cząsteczkowej białek w żelu w obecności SDS, analizy rozdzielania względem masy i ładunku poprzez zastosowanie różnych warunków buforowych oraz izoelektrycznego ogniskowania w kapilarze.

Dodatkowo, charakterystyka ludzkiej MT jest dość uboga, ponieważ to królicza MT jest często stosowana w badaniach jako białko modelowe; **dlatego tak cenne było porównywanie MT wyizolowanej z ludzkiej i króliczej wątroby, oraz dalsza ich charakterystyka co stanowiło kolejny cel moich badań.** Metody elektrochemiczne i zaawansowane metody analityczne, takie jak reakcja Brdicka, chip CE, spektrometria masowa z laserową jonizacją próbki wspomaganą matrycą (MALDI-MS), zostały użyte do scharakteryzowania i porównania ludzkiej i króliczej MT.

MT, ze względu na swoje właściwości, pełni szczególną rolę w utrzymaniu

równowagi pro/antyoksydacyjnej a podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ROS) można znaleźć w większości komórek nowotworowych [Liou i Storz, 2010]. Wolne rodniki, działające na różnych szlakach sygnałowych, powodują wzrost ekspresji białek odpowiedzialnych za wzrost liczby podziałów komórkowych [Gladyshev, 2014], a w konsekwencji wzrost masy guza [Waris i Ahsan, 2006]. System obrony antyoksydacyjnej przed wewnątrzkomórkowym ROS składa się z nieenzymatycznych cząsteczek, w tym metalotioneiny i enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej [Milnerowicz i inni, 2009]. Drugim co do częstości występowania typem raka są nowotwory złośliwe sutka [Mahalingaiah i inni, 2014]. W raku piersi nadekspresja MT okazała się głównie związana ze złym rokowaniem, pomimo roli MT jako przeciwutleniacza. MT sprzyja proliferacji komórek i procesom naprawy komórkowej, zwiększając oporność na chemioterapię i zapobiegając apoptozie [Krizkova i inni, 2018]. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), enzym rozkładający ROS, również jest nadmiernie ekspresjonowana w rakach, a jej aktywność może być niezbędna do utrzymania komórkowego stężenia ROS poniżej krytycznego progu [Papa i inni, 2014]. Działanie SOD polega na enzymatycznej redukcji rodników tlenowych do mniej toksycznego nadtlenku wodoru, który jest następnie rozkładany przez katalazę. SOD1, izoforma miedziowo-cynkowa (Cu/Zn SOD), jest wariantem zlokalizowanym w cytoplazmie komórkowej i mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej. SOD1 ulega nadmiernej ekspresji m.in. w komórkach raka sutka (MCF-7, *Michigan Cancer Foundation-7*), odwrotnie – jej ekspresja jest mniejsza w niezłośliwej linii komórkowej piersi MCF10A [Papa i inni, 2014].

Najszerzej stosowanym lekiem w chemioterapii u pacjentów z rakiem sutka jest doksorubicyna (DOX) [Zhao i inni, 2017], antybiotyk antracyklinowy, aktywny wobec szerokiego spektrum nowotworów złośliwych [Kizek i inni, 2012]. DOX to interkalator DNA, który blokuje topoisomerazę II, hamując w ten sposób wzrost komórek nowotworowych. DOX może być przekształcona przez reduktazy z chinonu w semichinon, który w warunkach tlenowych jest w stanie zredukować tlen cząsteczkowy do $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Pomimo swojej skuteczności terapeutycznej wykazuje poważne działania niepożądane. DOX uszkadza kurczliwe włókna miocytów serca i oddziałuje na fibroblasty serca poprzez znaczne hamowanie produkcji i proliferacji kolagenu [Arif i inni, 2016]. Jedną ze strategii łagodzenia skutków ubocznych działania DOX jest zastosowanie systemu dostarczania leków [Zhu i inni, 2016]. Nanotransportery leków mogą uwalniać lek w miejscu o pożądanym działaniu na podstawie ich interakcji

z patogennymi komórkami, bądź wrażliwe na pH nanonośniki ulegną destabilizacji w środowisku kwaśnym, np. w pobliżu endosomów, co spowoduje uwolnienie ich zawartości do cytozolu [Kanamala i inni, 2016]. **Kolejnym celem badań było stworzenie celowanego systemu transportu DOX poprzez połączenie jej z fulerenami C₆₀, cząsteczkami węglowymi składającymi się z 60 atomów węgla (C₆₀), jako nanotransporterem.** Modyfikacje powierzchni C₆₀ np. poprzez przyłączenie grup karboksylowych powodują, że stają się rozpuszczalne w wodzie i są zdolne do przenoszenia leków do wnętrza komórek [Foley i inni, 2002]. Fulereny mają zdolność gromadzenia się w masie guza, poprzez wykorzystanie tak zwanego wzmocnionego efektu przenikalności i retencji [Singh i Lillard, 2009]. Zastosowanie nanotransportera może umożliwić regulację uwalniania sprzężonego leku, poprzez przerwanie wiązania lek-transporter w pH charakterystycznym dla komórki rakowej. Działania te pozwolą na selektywną akumulację leku w guzie i znacznie zmniejszą ilość niezbędną do uzyskania efektu terapeutycznego. **Celem badań była ocena uwalniania DOX z kompleksów z C₆₀ w sposób zależny od pH przy użyciu elektroforezy kapilarnej z fluorescencją indukowaną laserem.** C₆₀, ze względu na działanie przeciwutleniające mogą potencjalnie łagodzić skutki uboczne DOX wywołane przez ROS. Uważa się, że zdolność fulerenów do wychwytu wolnych rodników jest powodem, dla którego ich podawanie do komórek rakowych zmniejsza stężenie ROS w komórce, hamując w ten sposób aktywację protoonkogenów, wzrost guza i angiogenezę [Chen i inni, 2012]. Dlatego też, ostatnim **celem badań była analiza kluczowych antyoksydantów uczestniczących w ochronie organizmu przed skutkami terapii DOX, czyli określono stężenie MT-1/2 i SOD1 oraz aktywność SOD w linii komórkowej MCF-7, gdy komórki były narażone na działanie DOX oraz DOX w kompleksie z C₆₀.**

Piśmiennictwo:

- Arif, I. S., Hooper, C. L., Greco, F., Williams, A. C., Boateng, S. Y., *Increasing doxorubicin activity against breast cancer cells using PPAR γ -ligands and by exploiting circadian rhythms*. Br. J. Pharmacol. 2013, 169, 1178–1188.
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova M., Trnkova L., Skutkova H., Provaznik I., Hubalek J., Kizek R., *Mammalian metallothioneins: properties and functions*. Metallomics 2012, 4, 739–750.
- Calvo, J.S., Lopez, V.M., Meloni, G. *Non-coordinative metal selectivity bias in human metallothioneins metal-thiolate clusters*. Metallomics. 2018, 12;10(12): 1777-1791.
- Chen, Z., Ma, L., Liu, Y., Chen, C. *Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics*. Theranostics 2012, 2, 238–250.

- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, A. M., *Metallothionein: the multipurpose protein*. Cell Mol. Life Sci. 2002, 59, 627–647.
- Foley, S., Crowley, C., Smahi, M., Bonfils, C., Erlanger, B. F., Seta, P., Larroque, C., *Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 294, 116–119.
- Gladyshev, V.N. *The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory!* Antioxid. Redox Signal. 2014, 20, 727–731.
- Hijova, E., *Metallothioneins and zinc: their functions and interactions*. Bratisl. Lek. Listy 2004, 105, 230–234.
- Kanamala, M., Wilson, W. R., Yang, M., Palmer, B. D., Wu, Z., *Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review*. Biomaterials 2016, 85, 152–167.
- Kizek, R., Adam, V., Hrabeta, J., Eckschlager, T., Smutny, S., Burda, J. V., Frei, E., Stiborova, M., *Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances*. Pharmacol. Ther. 2012, 133, 26–39.
- Klassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A., *Metallothionein protection of cadmium toxicity*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009, 238, 215–220.
- Krizkova, S., Masarik, M., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R., *Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A 2010, 17, 7966–7971.
- Krizkova, S., Ryvolova, M., Hrabeta, J., Adam, V., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R. *Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy*. Drug Metab. Rev. 2012, 44, 287–301.
- Krizkova, S., Kepinska, M., Emri, G., Eckschlager, T., Stiborova, M., Pokorna, P., Heger, Z., Adam, V. *An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena*. Pharmacol Ther. 2017, 183: 90–117.
- Krizkova, S., Kepinska, M., Emri, G., Eckschlager, T., Stiborova, M., Pokorna, P., Heger, Z., Adam, V. *An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena*. Pharmacol. Ther. 2018, 183, 90–117.
- Liou, G.-Y., Storz, P. *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic. Res. 2010, 44, 479–496.
- Mahalingaiah, P.K.S., Singh, K.P. *Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells*. PLoS ONE 2014, 9, e87371.
- Milnerowicz, H., Jabłonowska, M., Bizoń, A. *Change of zinc, copper, and metallothionein concentrations and the copper-zinc superoxide dismutase activity in patients with pancreatitis*. Pancreas 2009, 38, 681–688.
- Minami, T., Sakita, Y., Kubo, K., Okabe, N., Okazaki, Y., Tohno, S., Tohno, Y., Yamada, M., *Stability of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis*. Cell. Mol. Biol. 1998, 44, 285–292.
- Nakamura, S., Kawata, T., Nakayama, A., Kubo, K., Minami, T., Sakurai, H., *Implication of the differential roles of metallothionein 1 and 2 isoforms in the liver of rats as determined by polyacrylamide-coated capillary zone electrophoresis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 320, 1193–1198.
- Papa, L., Manfredi, G., Germain, D. *SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy*. Genes Cancer 2014, 5, 15–21.
- Pawlak, K. P., Palacios, O., Capdevila, M., Gonzalez-Duarte, P., Lobinski, R., *Monitoring of the metal displacement from the recombinant mouse liver*

- metallothionein Zn-7-complex by capillary zone electrophoresis with electrospray MS detection.* Talanta 2002, 57, 1011–1017.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R. *The role of metallothionein in oxidative stress.* Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 6044–6066.
- Sabolic, I., Breljak, D., Skarica, M., Herak-Kramberger C. M., *Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs.* Biometals 2010, 23, 897–926.
- Singh, R., Lillard, J.W. *Nanoparticle-based targeted drug delivery.* Exp. Mol. Pathol. 2009, 86, 215–223.
- Torreggiani, A., Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Melchiorre, M., Atrian, S., Capdevila, M. *Non-enzymatic modifications in metallothioneins connected to lipid membrane damages: Structural and biomimetic studies under reductive radical stress.* J Proteomics. 2013, 92: 204–215.
- Waris, G., Ahsan, H. *Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions.* J. Carcinog. 2006, 5, 14.
- Wilhelmsen, T.W., Hansen, B. H., Holten, V., Olsvik, P. A., Andersen, R. A., *Improved separation of metallothionein isoforms by the presence of cyclodextrin in capillary zone electrophoresis.* J. Chromatogr. A 2004, 1051, 237–245.
- Zhao, M., Ding, X., Shen, J., Zhang, X., Ding, X., Xu, B., *Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice.* J. Zhejiang Univ.-Sci. B 2017, 18, 15–26.
- Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M.A., Jia, Z., Li, Y.R. *Doxorubicin redox biology: Redox cycling, topoisomerase inhibition, and oxidative stress.* React. Oxy. Species 2016, 1, 189–198.

1. **Marta Zalewska**, Jagoda Trefon, Halina Milnerowicz. *The role of metallothionein interactions with other proteins.*

Proteomics, 2014; 14 (11): 1343-1356.

IF= 3,974; MNiSW = 35

W pierwszej pracy z cyklu podsumowałam oddziaływania MT z innymi białkami i związane z nimi funkcje. Ze względu na znaczną liczbę reszt cysteinyłowych w sekwencji (~ 30% wszystkich aminokwasów) funkcje MT obejmują detoksykację metali toksycznych, ochronę przed stresem oksydacyjnym i regulację homeostazy jonów metali niezbędnych Zn i Cu. Niektóre z funkcji MT opierają się na roli buforowania przez nią wolnego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Zn^{2+} na niskim poziomie i utrzymania homeostazy cynku, podczas gdy inne zależą od dostarczania jonów Zn^{2+} do białek docelowych, np. do zależnych od Zn^{2+} enzymów, czynników transkrypcyjnych zależnych od palca cynkowego i pęcherzyków przedsynaptycznych w neuronach zawierających cynk. Prawie całość wewnątrzkomórkowego Zn^{2+} związana jest z białkami, tym samym ograniczając ilość wolnego Zn^{2+} w cytoplazmie. W kompleksie

Zn-MT, MT odgrywa rolę w biologicznej funkcji cynku, paradygmat zupełnie odmienny od tego występującego w większości innych białek, w których to cynk odgrywa rolę w biologicznej funkcji białka. Ścisłe związanie jonów cynku z MT budzi pytania o to, w jaki sposób są uwalniane i czy uwalnianie jest kontrolowane. Jeśli białko funkcjonuje jako nośnik dostarczający jony metalu, musi istnieć mechanizm biologiczny ułatwiający uwalnianie tych jonów. Jednym ze sposobów osiągnięcia tego celu jest uwolnienie metali przez oddziaływanie MT z innym ligandem komórkowym. Uważa się, że następuje to poprzez bezpośredni kontakt molekularny pomiędzy reagentami. Dlatego kluczowa jest analiza, z którymi białkami MT oddziałuje i dla których jest donorem metali.

Funkcje, które MT spełnia poprzez interakcję z innymi białkami, to:

(1) zmiatanie ROS i reaktywnych form azotu, wytwarzanych fizjologicznie jak również w większej ilości w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez toksyczne metale, procesy zapalne lub fizyczne uszkodzenia (funkcje przeciwutleniające, przeciwapoptotyczne). Cykl redoks MT i jej interakcja z utlenionym i zredukowanym glutationem reguluje uwalnianie Zn z MT i dostępność cynku dla innych białek. MT współpracuje z GSH w utrzymywaniu komórkowego stanu redoks. Po zablokowaniu syntezy GSH stwierdzono zwiększoną rolę MT,

(2) regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych przez przekazywanie jonów cynku, w tym NF- κ B i p53 zaangażowanych w regulację śmierci komórki, istotnych w przebiegu procesów nowotworzenia,

(3) ochrona przed toksycznymi metalami poprzez wiązanie z metalami ciężkimi (detoksykacja), co zapobiega uszkodzeniom struktur komórkowych. Obniżenie toksyczności może być przeprowadzone przez endocytozę Cd-MT zależną od megaliny,

(4) utrzymywanie homeostazy, przechowywanie i transport niezbędnych metali, takich jak Zn i Cu do metaloenzymów, w tym SOD.

MT jest wewnątrzkomórkowym źródłem cynku m.in. dla metaloenzymów takich jak: dehydrataza δ -aminolewulinowa, metaloproteinaza-9 i SOD. SOD katalizuje przekształcenie dwóch cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru, a MT neutralizuje szeroki zakres ROS, w tym ponadtlenki, nadtlenu wodoru, rodniki hydroksylowe i tlenki azotu wydajniej niż inne przeciwutleniacze. Cu, drugi z metali wiązanych fizjologicznie przez MT, jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym we wszystkich żywych organizmach i tworzy centrum aktywne enzymów w tym Cu/Zn

SOD. MT wiąże Cu za pomocą grup tiolowych. Wykazano, że MT jest w stanie bezpośrednio przekazać Cu do SOD *in vitro*. Ponadto, jony Cu uwolnione z MT i włączone do SOD, spowodowały wzrost aktywności SOD. Aktywność Cu/Zn-SOD można indukować poprzez stres oksydacyjny przy nieobecności aktywacji transkrypcyjnej, co sugeruje, że indukowany przez redoks transfer Cu do apo-SOD może odpowiadać za regulację aktywności enzymatycznej SOD. Przeniesienie Cu z Cu-MT do apo/Zn-SOD było możliwe tylko w obecności donora tlenu azotu i wykazano, że MT zachowuje się jak aktywator SOD, a apo-MT zachowuje się jak inhibitor.

W prezentowanej pracy podsumowałam poznane do tej pory oddziaływania MT z innymi białkami. Tworzenie i rozpad kompleksów MT może mieć kluczowe znaczenie w przenoszeniu i uwalnianiu jonów metali niezbędnych do tworzenia metaloenzymów i czynników transkrypcyjnych. Stwarza to podstawę dla nowego obszaru badań dotyczących dostępności metali regulujących między innymi, aktywność enzymów. Oddziaływania z MT mogą aktywować i dezaktywować białka oraz regulować procesy, w których uczestniczą.

2. **Marta Zalewska**, Anna Bizoń, Halina Milnerowicz. *Comparison of capillary electrophoretic techniques for analysis and characterization of metallothioneins.*

J Sep Sci., 2011; 34(21): 3061-3069.

IF= 2,733; MNiSW = 32

W celu scharakteryzowania i określenia właściwości metalotioneiny wykonałam rozdziały elektroforetyczne preparatów MT z nerki końskiej, wątroby królika i wątroby ludzkiej, trzema różnymi technikami: kapilarną elektroforezą żelową, strefową elektroforezą kapilarną i kapilarnym ogniskowaniem izoelektrycznym.

Metoda kapilarnej elektroforezy żelowej (CGE) z SDS została wykorzystana do zbadania możliwości identyfikacji MT w oparciu o określenie jej względnej masy cząsteczkowej wobec krzywej standardowej z białek o znanych masach. MT z wątroby królika rozdzielono na dwa główne piki o wyliczonych masach 12,1 i 21,0 kDa, odpowiadającym dimerom i trimerom MT. Rozdział preparatu ludzkiej MT, która zawierała obie izoformy: MT-1 i MT-2, wykazał dwa ostre i dobrze rozdzielone piki o masach 9,0 i 9,4 kDa. Rozdział elektroforetyczny MT z nerki końskiej, wykazał jeden

pik o masie 8,6 kDa oraz dodatkowy, niewielki pik o masie około 12 kDa. MT może tworzyć zarówno przejściowe jak i stabilne dimery. Wykazano, że stabilne dimery mogą zawierać międzycząsteczkowe wiązania disiarczkowe, które można zredukować. W rozdziale elektroforetycznym MT w żelu poliakrylamidowym z SDS używaliśmy 2-merkaptoetanolu, który miał eliminować tworzenie się mostków disiarczkowych. Obserwowane dimery były jednak stabilne w tych warunkach eksperymentalnych.

Strefową elektroforezę kapilarną (CZE) przeprowadzono w celu określenia optymalnego pH do rozdziału MT. Izoformy i subizoformy różniące się sekwencją aminokwasową mają różne punkty izoelektryczne i różne hydrofobowości, w związku z czym będą inaczej się zachowywać w zastosowanych buforach. CZE, w przeciwieństwie do CGE z użyciem SDS, umożliwia wykonywanie analiz w warunkach natywnych. Zbadałam wpływ trzech buforów o pH 3,0, 6,0 i 8,0 na rozdział MT. Analiza MT z nerki końskiej wykazała, że rozdział w 50 mM buforze cytrynianowym o pH 3,0 daje dwa ostre piki przy 4,2 i 4,4 minuty. Natomiast MT z wątroby królika rozdziela się na trzy piki w 50 mM buforze trycynowym pH 8,0. Profile rozdziału różnią się dla MT izolowanej z różnych gatunków zwierząt. Wiadomo, że analiza MT w neutralnym lub alkalicznym pH nie wpływa na status wiązania MT z metalami. Podczas gdy zastosowanie niskiego pH (poniżej 3,0) ma ograniczenia, ponieważ MTs są niestabilne, a metale dysocjują z cząsteczki MT.

Metodą kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego (CIEF) określiłam punkt izoelektryczny króliczej i ludzkiej MT. Analizę wykonuje się poprzez bezpośrednie monitorowanie absorbancji przy 280 nm, jednak MT nie zawiera charakterystycznych aminokwasów aromatycznych, pozwalających na pomiar absorbancji przy tej długości fali. Analiza rozdziału została wykonana przy 254 nm co skutkowało mniej stabilną linią bazową ze względu na absorbancję tła przez amfolyty, jednak nadal było możliwe wykrycie pików izoform MT. Oszacowane pI dla pików pochodzących od MT króliczej uzyskano przy użyciu analizy regresji liniowej trzech wewnętrznych markerów standardowych i wynosiło 4,0 i 4,65. Otrzymane wartości pI znajdują się w przedziale wartości opisanych przez innych autorów (pI 3,9-5,0). Ludzką MT analizowano również za pomocą CIEF i otrzymano dwa piki z oszacowanymi wartościami pI 3,9 i 4,6.

Wnioski:

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano przydatność trzech różnych technik elektroforezy kapilarnej do analizy standardów MT. Analiza względnej masy cząsteczkowej białek w żelowej CE w warunkach denaturujących pozwoliła określić

przybliżoną masę MT (dla króliczej: 12,1 i 21 kDa, ludzkiej 9 i 9,4 kDa oraz dla końskiej 8,6 i niewielki pik przy 12 kDa) oraz określić obecność polimerów w analizowanym standardzie. Dzięki zastosowaniu metod, w których zastosowano różne bufony pH, dokonano rozdziału MT w warunkach niedenaturujących. Przy użyciu metody CIEF wyznaczono wartości punktów izoelektrycznych MT (króliczej: 4,0 i 4,65, ludzkiej pI 3,9 i 4,6). Metody zastosowane w tej pracy pozwoliły na scharakteryzowanie standardów MT wyizolowanych z wątroby ludzkiej i króliczej oraz poszerzenie obecnej wiedzy na temat tych białek.

3. **Marta Kepinska**, Sona Krizkova, Ewelina Guszpit, Miguel Angel Merlos Rodrigo, Halina Milnerowicz. *Comparison of human and rabbit metallothioneins by the capillary electrophoresis, mass spectrometry and Brdicka reaction analysis.*

Adv Clin Exp Med, 2018; 27(11): 1601-1608.

IF= 1,262; MNiSW = 15

W kolejnej pracy kontynuowałam analizę ludzkiej i króliczej MT za pomocą innych zaawansowanych metod analitycznych. Ze względu na powszechne stosowanie MT z wątroby królika jako białka modelowego porównałam właściwości ludzkiej i króliczej MT. MTs scharakteryzowałam i porównałam przy użyciu chipowej elektroforezy kapilarnej (chip-CE), spektrometrii masowej z laserową jonizacją próbki wspomaganej matrycą (MALDI-MS) oraz metodą reakcji Brdicka.

W przeprowadzonych badaniach rozdziału MT z wątroby ludzkiej i króliczej, metodą chip-CE, zaobserwowałam zmiany w zakresie mas 5-8 kDa odpowiadające monomerowi MT zarówno w ludzkiej jak i króliczej MT. Pik uzyskany dla króliczej MT miał większą masę (8,2 kDa) w porównaniu z ludzką MT (6,0 i 7,7 kDa dla MT-1 i 5,3 i 6,1 kDa dla MT-2). Dodatkowy pik obserwowano przy około 23-24 minucie (13,4 i 14,0 kDa), co wskazuje na obecność dimerów. Piki odpowiadające dimerom MT obserwowano zarówno dla ludzkiej jak i króliczej MT.

Analiza tych samych preparatów MT spektrometrią mas wykazała, że głównym sygnałem otrzymanym dla króliczej MT był 6211,07 m/z, z masą zbliżoną do tej opublikowanej przez innych autorów dla króliczej MT-2D (6215,40 m/z). Główne obserwowane sygnały dla ludzkiej MT (hMT) to: [hMT-1]⁺ (6145,23 m/z, 6176,46 m/z i 6220,12 m/z) oraz [hMT-2]⁺ (6066,24 m/z). Obserwowane w widmie ludzkiej MT-1

piki można przypisać potencjalnym subizofromom: MT-1A (6145,23 m/z), MT-1G (6176,46 m/z) i MT-1G+Cd (6240,12 m/z). Masa teoretyczna ludzkiej MT-2A to 6042,16 m/z, a nasze wyniki pokazały główne sygnały przy 6066,24 m/z, co odpowiada [hMT-2A+Na]⁺. Ekspozycja MT na kwaśne pH powoduje dysocjację jonów metali i powstawanie apotionein tj. subizofrom bez związanego metalu lub form częściowo pozbawionych metali. Zastosowanie kwaśnych matryc do analizy MS spowodowało prawdopodobnie dysocjację skoordynowanych metali z MT, a uzyskane piki pochodziły od apotionein. Zarówno w próbie ludzkiej jak i króliczej MT obserwowaliśmy niewielki sygnał pochodzący od dimerów MT. Dimery MT mogą tworzyć przejściowe formy pośrednie podczas wymiany metali między białkami oraz bardziej trwałe, które były stabilizowane przez międzycząsteczkowe wiązania disiarczkowe. Stabilny dimeryczny kompleks MT został wykryty w tej pracy zarówno metodą MALDI-MS jak i chip CE.

MT, dzięki wysokiej zawartości grup SH, wykazuje znaczną aktywność elektrochemiczną. Reakcja Brdicka jest jedną z najczęściej stosowanych metod elektrochemicznych do pośredniego oznaczania MT w próbkach biologicznych za pośrednictwem grup -SH. Podczas analizy MT, stwierdzono obecność sygnałów pochodzących od Co²⁺ (-1,25 V) i Cat1 (1,40 V) odpowiadających wydzielaniu wodoru z elektrolitu pomocniczego katalizowanego przez MT oraz zmiany sygnału Cat2 (-1,55V), który reprezentuje odpowiedź kompleksu MT z komponentami elektrolitu Brdicka. Obecność piku Cat2 jest ściśle związana z ilością grup -SH występujących w roztworze Brdicka, co odpowiada stężeniu MT. Charakter wspomnianych sygnałów zmienia się w zależności od zastosowanego stężenia zarówno króliczej jak i ludzkiej MT. Przy niższym stężeniu króliczej MT sygnały Cat1 i Cat2 zmniejszyły się i przesunęły w kierunku bardziej dodatniego potencjału. Wyższe stężenie MT z obu organizmów było wprost proporcjonalne do wzrostu sygnału Cat2. Wyższą wartość piku Cat2 uzyskano w przypadku oceny ludzkiej MT niż króliczej przy tym samym ich stężeniu. Ludzka i królicza MT zachowują się różnie pomimo obecności tej samej liczby grup -SH.

Wnioski:

Cząsteczka MT ze względu na jej dynamiczny charakter, brak drugorzędowych struktur w przypadku braku związanych metali oraz brak aminokwasów aromatycznych dających możliwość analizy spektroskopowej jest trudna w analizie.

Zarówno w króliczej, jak i ludzkiej MT, metodą chip-CE i MALDI-MS zidentyfikowałam głównie monomery. Dodatkowo zaobserwowałam wyraźnie niższe sygnały pochodzące od dimerów. W króliczej MT główny obserwowany sygnał

odpowiadał masie MT-2D. W ludzkiej MT wykryto MT-1A, MT-1G, MT-1G+Cd i MT-2A. Subizoformy MT, z wyjątkiem ludzkiej MT-1G+Cd, zostały zidentyfikowane bez metali, co może wynikać z zastosowania kwaśnych matryc, które powodują uwalnianie związanych metali. W reakcji Brdicka zastosowanie wyższego stężenia MT z obu organizmów korelowało ze wzrostem sygnału Cat2, odpowiadającego stężeniu MT. Jednakże ludzka MT charakteryzowała się wyższym sygnałem Cat2 niż królicza MT o tym samym stężeniu, co oznacza, że zachowują się różnie w elektrochemii pomimo obecności tej samej liczby reszt cysteinylowych. Może to wynikać z różnej dostępności grup -SH w badanych MTs.

Zastosowane metody pozwoliły na identyfikację i charakterystykę MT oraz dostarczyły uzupełniających się informacji na temat tego białka.

4. **Marta Kepinska**, Rene Kizek, Halina Milnerowicz. *Fullerene as a doxorubicin nanotransporter for targeted breast cancer therapy: capillary electrophoresis analysis*. Electrophoresis, 2018; Vol.39 no.18; s.2370-2379.

IF= 2,74; MNiSW = 25

Celem kolejnych dwóch prac z cyklu była ocena wpływu C60 jako nośnika DOX na status MT w komórkach MCF-7. W pierwszym etapie (4 publikacja z cyklu) określiłam właściwości fizykochemiczne utworzonych kompleksów DOX-C60 oraz analizowałam uwalnianie DOX z C60 wraz ze zmianą pH.

Wielkość otrzymanych kompleksów C60-DOX wyznaczyłam przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) oraz metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Obrazy z SEM wykazały obecność agregatów C60 i agregatów kompleksów C60-DOX. Fulereny oddziałują z DOX poprzez interakcje elektrostatyczne, a ich objętość wzrasta wraz z dodaną ilością DOX. Średnia hydrodynamiczna średnica C60 mierzona techniką DLS wynosiła 226 nm a kompleksów C60-DOX 278 nm. W analizie SEM, średnica kompleksów była nie większa niż 100 nm, mniejsza niż ta zmierzona metodą DLS (278 nm). Średnia średnica hydrodynamiczna wyznaczona przez DLS obejmuje kilka warstw rozpuszczalnika, co daje większy rozmiar cząstek niż ten znaleziony przez SEM. Wielkość nanocząstek może wpływać na wychwyty komórkowy, a ze względu na ich skłonność do tworzenia skupień w roztworze, rozmiar nanocząstek również może wzrosnąć. Istotnym mierzonym parametrem powstałych

kompleksów jest ładunek powierzchniowy, który jest ściśle związany z ich właściwościami biologicznymi, np. rozpuszczalnością, trwałością, wychwytem komórkowym i cytotoksycznością. Odpowiedzią na ładunek cząsteczek jest ich funkcjonalność biologiczna. W niniejszej pracy zaobserwowano zmianę potencjału zeta (ζ) C60 po związaniu z DOX o 6 mV, z -30 mV (dla C60) do -24 mV (dla kompleksów C60-DOX). Zmierzona wartość potencjału zeta wskazuje na obecność ujemnego ładunku na powierzchni cząsteczek C60, prawdopodobnie ze względu na obecność anionorodników C60⁻.

Nanocząstki wstrzykiwane do krwi mogą powodować szereg działań niepożądanych, takich jak hemoliza i tworzenie skrzepów. Aby ocenić bezpieczeństwo nanokonstruktów we krwi, określiliśmy ich aktywność hemolityczną. Wynosiła ona 5% w przypadku zastosowania C60, 11% dla koniugatów C60-DOX i 13% dla samej DOX, co wskazuje, że oparty na fulerenach system nanotransportu DOX miał nieznacznie mniejszą aktywność hemolityczną niż sam lek przeciwnowotworowy. Zatem wiązanie DOX z fulerenem zmniejsza ryzyko wystąpienia hemolizy. Zbadano również działanie cytotoksyczne DOX, kompleksów C60-DOX i C60 na komórki MCF-7. Zaobserwowano znaczący spadek aktywności proliferacyjnej po podaniu kompleksów C60-DOX. Kompleksy C60-DOX (w stężeniu odpowiednio 10 mg/ml - 0,7 μ M) wykazały 25% aktywność cytotoksyczną *in vitro* wobec komórek MCF-7 w porównaniu z kontrolą, reprezentowaną przez czystą hodowlę komórkową. Badano również wpływ C60 bez DOX i stwierdzono, że same C60 wykazują 9% aktywność cytotoksyczną. Wskazuje to, że oprócz funkcji nanoosiźnika leku przeciwnowotworowego, cytotoksyczność komórek rakowych MCF-7 była również konsekwencją obecności C60. Zwiększona aktywność cytotoksyczna kompleksu C60-DOX wynika ze skumulowanego działania DOX i C60.

W analizie uwalniania DOX z kompleksów z C60 przy użyciu elektroforezy kapilarnej, wykorzystałam fakt, że DOX wykazuje wewnętrzną fluorescencję z maksimum wzbudzenia przy 480 nm i maksimum emisji przy 600 nm a intensywność fluorescencji DOX jest wprost proporcjonalna do stężenia DOX. Związanie DOX z C60 nie miało wpływu na wartość maksimum emisji. W opisywanej pracy do analizy uwalniania DOX z kompleksu z C60, zgodnie z dostępną mi wiedzą, po raz pierwszy zastosowano elektroforezę kapilarną. Zastosowanie techniki rozdzielania CE z fluorescencją indukowaną laserem (CE-LIF), było możliwe w analizie stabilności kompleksów ze względu na zdolność rozróżnienia między związaną i wolną DOX, co wykorzystałam do monitorowania selektywnego uwalniania leku. Pewna część wolnego DOX, niezależnie

od zastosowanego pH buforu, pozostawała w roztworze kompleksów C60-DOX, dlatego na elektroforogramie można było zaobserwować dwa piki. Stopniowe obniżanie wartości pH z 7,5 do wartości 4,5 prowadziło do uwolnienia DOX z C60. Obserwowano to poprzez wzrost % intensywności fluorescencji pochodzącej od piku DOX w elektroforogramie w stosunku do sumy sygnałów pochodzących od wolnej DOX, jak i kompleksów C60-DOX. Procent wolnej DOX wzrastał wraz ze spadkiem pH. W buforze o pH 5,25, całość DOX została uwolniona i 100% sygnału pochodziło od wolnej DOX. Przy fizjologicznym pH, DOX jest uprotonowana (pKa grupy aminowej i fenolowej wynosi odpowiednio 8,2 i 9,5), podczas gdy grupy kwasu karboksylowego na C60 są zdysocjowane do ich ujemnej postaci (zakres pKa: 3-5). Tak więc cząsteczki DOX zachowują swoje oddziaływania elektrostatyczne z C60. Przy niskim pH, grupy kwasu karboksylowego na C60 są tylko częściowo zdysocjowane, co zmniejsza ładunek ujemny C60, zmniejszając oddziaływania elektrostatyczne z uprotonowaną DOX.

Podczas endocytozy C60 przez komórki nowotworowe, uwalnianie leku następowałoby w endosomach (przy pH 5,0-6,0) i lizosomach (4,5-5,5). Połączenie mechanizmu uwalniania leku, stymulowanego przez spadek pH z układem dostarczania leku na nośniku jest jedną z koncepcji poprawy wyników terapeutycznych, ponieważ jest skierowane na kwaśne zewnątrzkomórkowe mikrośrodowisko i wewnątrzkomórkowe organelle litych guzów. Systemy dostarczania leków o kontrolowanym uwalnianiu oparte na nanotransporterach dostarczających środek bioaktywny do miejsca docelowego mogłyby zwiększyć skuteczność terapeutyczną leków.

Wnioski:

Otrzymałam kompleksy C60 z DOX, których wielkość wynosiła około 280 nm z wąskim rozkładem i ładunkiem ujemnym. Po raz pierwszy zastosowano CE w analizie uwalniania DOX z C60. Wykazałam wrażliwe na pH uwalnianie DOX z C60, co może ułatwić uwalnianie leku w endosomach/lizosomach. Kompleksy C60 z DOX wykazywały wyższą cytotoksyczność w stosunku do linii komórek MCF-7 niż sama DOX. Odkrycia te wskazują, że ukierunkowane dostarczanie leków przeciwnowotworowych przy użyciu nanonośników opartych na C60 może stanowić obiecującą nową strategię dla ograniczeń konwencjonalnej chemioterapii. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że nowe nanonośniki mogą nie tylko znacząco zmniejszyć negatywne skutki uboczne czynników chemioterapeutycznych poprzez transport celowany, ale także zwiększyć ich aktywność przeciwnowotworową.

5. **Marta Kepinska**, Rene Kizek, Halina Milnerowicz. *Metallothionein and superoxide dismutase - antioxidative protein status in fullerene-doxorubicin delivery to MCF-7 human breast cancer cells.*

Int. J. Mol. Sci., 2018; Vol.19 no.10; art.3253 [17 s.].

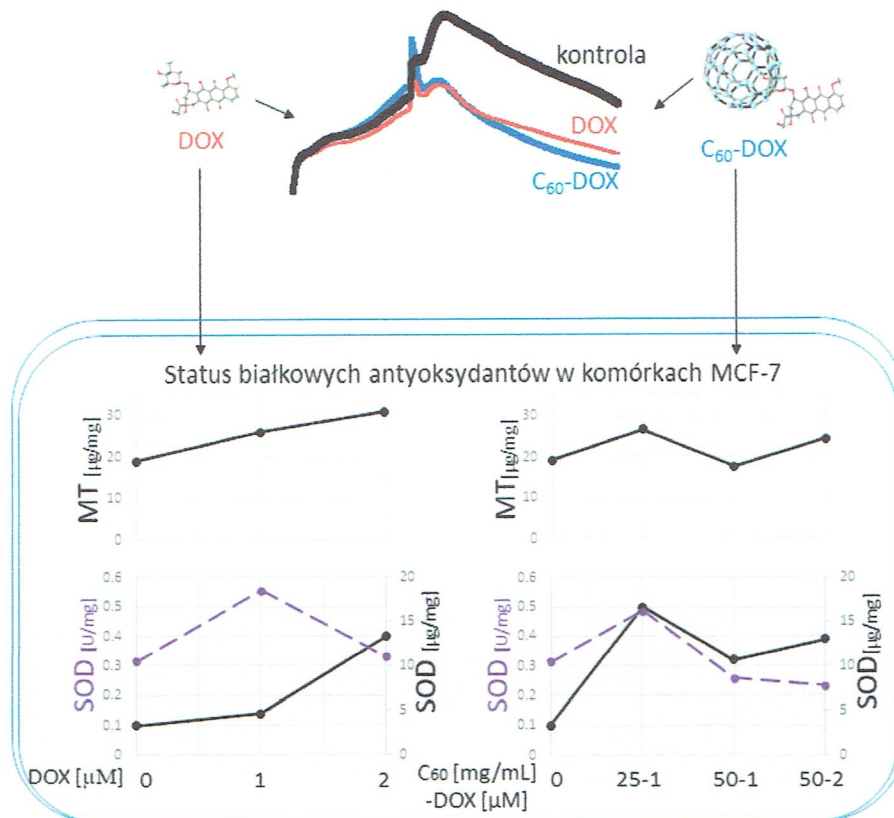
F= 3,687; MNiSW = 30

Kontynuując badania dotyczące roli MT, w ostatniej pracy z cyklu dokonałam **analizy wpływu C60 w traktowaniu komórek MCF-7 doksorubicyną na ich proliferację, stężenie MT i SOD1 oraz aktywność całkowitą SOD w tych komórkach.**

Zwiększona aktywność cytotoksyczna kompleksu C60-DOX wynika ze skumulowanego działania DOX i C60. Wykazałam, że DOX, w stężeniu istotnym klinicznie (1-2 μM), wpływa na proliferację komórek w większym stopniu niż w stężeniu 0,7 μM jak wskazano w poprzedniej pracy, powodując zmniejszenie proliferacji komórek o ok 55%. C60 w kompleksie z DOX powodowały spadek proliferacji komórek MCF-7 o kolejne 5-10%. Wykazałam, że w komórkach MCF-7 traktowanych DOX stężenie MT-1/2 było wyższe niż w komórkach kontrolnych (Rysunek 1). MT jest białkiem wiążącym cynk, a w warunkach stresu oksydacyjnego cynk jest uwalniany z MT. Może to stanowić szlak, w którym cynk jest dystrybuowany w komórce lub uwalniany tylko w warunkach stresowych, w których cynk jest potrzebny w systemach obrony antyoksydacyjnej. Komórki MCF-7 traktowane C60 wykazywały niższe stężenie MT-1/2 (18 i 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka odpowiednio dla 25 i 50 mg/ml C60). Zastosowanie 50 mg/ml C60 w kompleksie z DOX 1 lub 2 μM spowodowało zmniejszenie stężenia MT, które wzrastało w komórkach MCF-7 pod wpływem samej DOX. Przeciwuutleniające właściwości C60 prawdopodobnie spowodowały spadek ekspresji MT, której wydzielanie stymulowane jest m.in. przez stres oksydacyjny. Inhibitory MT mogą znaleźć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w indukowaniu apoptozy w komórkach nowotworowych.

Wykazałam również wzrost stężenia SOD1 w lizacie komórek MCF-7 traktowanych DOX i wyższą aktywność SOD od tej uzyskanej w kontroli. Można to przypisać zmianom adaptacyjnym zachodzącym w komórkach nowotworowych, których celem jest zwiększenie przeżywalności komórek narażonych na wysokie stężenia ROS generowane przez lek. W przypadku komórek MCF-7, zwiększone stężenie SOD1 zostało przypisane jednemu z bezpośrednich mechanizmów warunkujących oporność komórek nowotworowych na działanie DOX.

Wpływ DOX i kompleksów C₆₀-DOX na proliferację komórek MCF-7



Rysunek 1. Wpływ DOX oraz kompleksów C₆₀-DOX na proliferację komórek MCF-7 oraz stężenie MT oraz SOD1 i aktywność SOD.

Fulereny, jak stwierdzono wcześniej, mają zdolność redukcji stresu oksydacyjnego. Zarówno w komórkach MCF-7 traktowanych 25 mg/ml C₆₀ jak i 50 mg/ml C₆₀, stężenie SOD1 było wyższe niż w grupie kontrolnej. Zaobserwowano natomiast znacznie niższą aktywność SOD w przypadku komórek traktowanych 50 mg/ml C₆₀. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że komórki traktowane C₆₀ wykazują niższą aktywność SOD niż kontrolne, pomimo zaobserwowanego wyższego stężenia SOD1. Pomimo tego, że zastosowanie każdego z badanych kompleksów C₆₀-DOX powodowało wzrost stężenia SOD1 w porównaniu do kontroli, z wyjątkiem komórek traktowanych kompleksem C₆₀-DOX w stężeniu 25 mg/ml -1 μM , aktywność SOD była niższa niż obserwowana w kontroli. Stosunek aktywności SOD do stężenia SOD1, we wszystkich analizowanych próbach, z wyjątkiem komórek traktowanych 1 μM DOX, był mniejszy w porównaniu do kontroli. Proponowany mechanizm dotyczy blokowania cząsteczką C₆₀ aktywnego miejsca SOD i dezaktywacji enzymu. Innym możliwym wytłumaczeniem niższej aktywności SOD w komórkach traktowanych kompleksem

C60-DOX o stężeniu 50 mg/ml - 2 μ M jest działanie antyoksydacyjne C60. Redukcja ROS przez C60 w badanych komórkach może powodować zmniejszenie poziomu stresu oksydacyjnego w komórce i w konsekwencji zmniejszyć aktywność SOD. Z tego względu niższa aktywność SOD z wyższym stężeniem w komórkach traktowanych kompleksami C60-DOX obserwowana w przedstawionych badaniach jest szczególnie ważna w kontekście stosowania C60 jako systemów transportowych DOX. Potencjalne blokowanie aktywności SOD w komórkach nowotworowych wskazuje, że zastosowanie C60 jako nośników miałyby znaczący wpływ na zwiększenie działania cytotoksycznego DOX.

Hamowanie aktywności SOD przez C60 może blokować chemoodporność komórek spowodowaną zwiększoną aktywnością SOD, która jest również spowodowana działaniem DOX. Odkrycia te wskazują, że SOD może odgrywać kluczową rolę w mechanizmach przeżycia komórek nowotworowych związanych ze stresem oksydacyjnym. To sprawia, że SOD jest potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych, a jego inhibitory mogą znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Wnioski:

Ekspozycja komórek MCF-7 na kompleksy C60-DOX powodowała wzrost hamowania proliferacji komórek w porównaniu z wolną DOX. Zastosowanie C60 jako nanotransportera DOX powodowało spadek wzrostu stężenia MT indukowanego przez DOX. C60 powodowały wzrost stężenia SOD1 a z drugiej strony prowadziły do zmniejszenia aktywności SOD. C60 w kompleksie z DOX powodowały spadek indukowanej przez DOX aktywności SOD.

Uzyskane wyniki wskazują na szansę zastosowania kompleksów C60-DOX w chemioterapii nowotworów złośliwych. Wykorzystanie spadku proliferacji komórek MCF-7 pod wpływem C60 oraz zdolność do blokowania stężenia MT i aktywności SOD może być wielką zaletą kompleksowania DOX z C60 i miałyby znaczący wpływ na zwiększenie działania cytotoksycznego DOX. Równocześnie ważne jest przeprowadzenie dalszych badań wskazujących wpływ zastosowanych kompleksów na stężenie MT i aktywność SOD w kardiomiocytach i komórkach wątroby, które są najbardziej narażone na toksyczne działanie DOX.

Na podstawie przeprowadzonych badań, do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

❖ Podsumowanie funkcji MT i oddziaływań z innymi białkami, przez które je pełni, ze szczególnym uwzględnieniem roli MT jako donora jonów cynku dla białek, m.in. dla metaloenzymów (w tym dla SOD) oraz jej udziału w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

❖ Scharakteryzowanie oraz porównanie MT króliczej z ludzką poprzez wyznaczenie ich mas zarówno metodą elektroforezy kapilarnej jak i spektrometrii masowej, punktów izoelektrycznych oraz aktywności elektrochemicznej metodą reakcji Brdicka. Wykazałam obecność formy MT-2D w króliczej MT. W ludzkiej MT zidentyfikowano MT-1A, MT-1G, MT-1G+Cd i MT-2A. MT ludzka i królicza wykazują różnice w sygnale w reakcji Brdicka pomimo obecności tej samej liczby grup -SH.

❖ Wykazanie uwalniania DOX z kompleksów z C60 pod wpływem spadku pH, co daje możliwość wykorzystania C60 w transporcie celowanym leku.

❖ Wykazanie wzrostu cytotoksyczności kompleksów C60-DOX, w porównaniu do samej DOX, wobec komórek MCF-7.

❖ Wskazanie wpływu C60 na równowagę pro/antyoksydacyjną w komórkach MCF-7 traktowanych DOX poprzez wykazanie zamian w statusie antyoksydantów - obniżonej aktywności enzymatycznej (aktywność SOD) i spadku stężenia nieenzymatycznego antyoksydanta (MT) w komórkach MCF-7. Ze względu na działanie przeciwutleniające C60, mogą one potencjalnie łagodzić skutki uboczne DOX wywołane przez ROS.

❖ Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał w zastosowaniu kompleksów C60-DOX w chemioterapii nowotworów poprzez wykorzystanie możliwości uwalniania DOX z kompleksów z C60 w zależności od pH oraz przez rolę antyoksydacyjną C60, co może obniżyć toksyczność DOX dla komórek nienowotworowych.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Poza cyklem publikacji, wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dotychczasowy dorobek naukowy (załącznik 3, część II.A, II.D, III.B) obejmuje:

- ❖ **32 publikacje** o łącznej wartości **IF 82,996**, na które składa się 20 publikacji eksperymentalnych (w tym 3 opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 12 publikacji poglądowych,
- ❖ **1 rozdział w monografii w języku angielskim** oraz **4 pełnotekstowe referaty** w materiałach zjazdowych,
- ❖ **2 publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism,**
- ❖ **47 komunikatów**, na które składa się **30** komunikatów prezentowanych na zagranicznych konferencjach i zjazdach naukowych (w tym przed uzyskaniem stopnia doktora – 3 komunikaty) oraz **17** komunikatów prezentowanych na konferencjach i zjazdach krajowych, w tym 4 o zasięgu międzynarodowym.

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych z opisem indywidualnego wkładu znajduje się w załączniku nr 3, natomiast wykaz dorobku naukowego wraz z analizą bibliometryczną, sporządzoną przez Bibliotekę Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, zawarto w załączniku nr 4.

- ❖ Sumaryczny *impact factor* za całokształt dorobku naukowego wynosi – według listy *Journal Citation Reports* – **97,054** oraz **922** punktów według punktacji MNiSW, w tym IF = **14,058** oraz pkt MNiSW = **137** stanowi „osiągnięcie naukowe”.
- ❖ Analiza publikacji w bazie *Web of Science – Science Citation Index-Expanded* wykazała:

- **271 cytowań (226 bez autocytowań)**

- **Indeks Hirscha 11**

Tematyka pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowo-badawcza, prowadzona w ramach studiów doktoranckich w Zakładzie Biochemii, Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej dotyczyła mechanizmu transportu hormonu juwenilnego (JH), przy udziale białka wiążącego hormon juwenilny (JHBP), do tkanek docelowych mola woskowego (*Galleria mellonella*). Wyniki przeprowadzonych badań zostały wyróżnione stypendium FEBS i zaprezentowane podczas Forum Młodych Naukowców w Goteborgu w 2010 roku. Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem trzech prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, *Acta Biochim. Pol.* oraz *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom* [załącznik 3, publikacje II.A.1, II.A.2, II.A.3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF: 9,124, MNiSW: 72.**

Hormon juwenilny (JH) kontroluje rozwój owadów, ich metamorfozę i rozmnażanie. W hemolimfie owadów ponad 99% JH jest związana z białkiem wiążącym hormon juwenilny (JHBP), które chroni JH przed degradacją przez niespecyficzne hydrolazy i służy jako nośnik dostarczający hormon do tkanek docelowych. Wykazaliśmy obecność JHBP w nabłonku tchawicy i komórkach tłuszczowych zarówno w błonie komórkowej jak i w cytoplazmie. Wiązanie JHBP do białek potwierdzono przy pomocy plazmonowego rezonansu powierzchniowego jak również wykazano, że w tym oddziaływaniu bierze udział zlokalizowana w błonie komórkowej syntaza ATP. Stwierdzono, że w ciele tłuszczowym *G. mellonella* enzym ten występuje zarówno we frakcji mitochondrialnej jak i błonach plazmatycznych. W układzie modelowym zawierającym wołową syntazę F_1ATP i JHBP z *G. mellonella* oddziaływanie między tymi dwoma białkami występuje ze stałą dysocjacji równą $K_d = 0,86 \pm 0,08$ nM. Wykazaliśmy również, że w hemolimfie *G. mellonella*, JHBP znajduje się w kompleksie z białkami wiążącymi lipidy o dużej masie cząsteczkowej (apolipoforyny, aryloforyny i heksameryny) i to oddziaływanie jest silniejsze w obecności JH. JHBP oddziałuje również z białkiem o niższej masie cząsteczkowej (44 kDa), zidentyfikowanym jako dehydrogenaza izocytrynianu. Wyniki te stanowią pierwsze na świecie doniesienie wykazujące oddziaływanie JHBP oraz kompleksu JH-JHBP z białkiem błonowym i białkami hemolimfy oraz identyfikujące oddziałujących z JHBP partnerów.

W *G. mellonella* JHBP jest glikozylowane w jednym (Asn 94) z dwóch potencjalnych miejsc N-glikozylacji (Asn 4 i Asn 94). W celu zbadania funkcji

glikozylacji, każde z tych dwóch miejsc w cząsteczce rekombinowanego JHBP (rJHBP) zbadano przez ukierunkowaną mutagenezę. Analizą spektrometrii mas wykazaliśmy, że rJHBP ulegające nadmiernej ekspresji w układzie *Pichia pastoris* może występować zarówno w postaci nieglikozylowanej, jak i glikozylowanej w obu miejscach. Wykazaliśmy, że mutacja w pozycji Asn (94) zmniejsza poziom sekrecji białka, podczas gdy mutacja w miejscu Asn (4) nie ma wpływu na wydzielanie białka. Oczyszczone rJHBP i jego zmutowane formy (N4W i N94A) mają takie same aktywności wiązania JH, podobne do aktywności JHBP z hemolimfy. Jednak oba mutanty pozbawione łańcucha węglowodanowego są bardziej podatne na inaktywację termiczną. Wykazaliśmy, że glikozylacja cząsteczki JHBP jest ważna ze względu na jej termiczną stabilność i sekrecję, chociaż nie jest wymagana dla aktywności wiążącej JH.

Główne kierunki pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Moja działalność naukowo-badawcza, prowadzona po ukończeniu studiów doktorskich i podjęciu pracy zawodowej w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, dotyczyła tematyki ekspozycji zawodowej na metale ciężkie, narażenia kobiet ciężarnych na ksenobiotyki dymu tytoniowego jak również zastosowania nanotechnologii m.in. w znakowaniu białek i celowanym transporcie wybranych leków przeciwnowotworowych.

❖ **Ocena wpływu ekspozycji zawodowej na metale ciężkie oraz palenia papierosów na markery stresu oksydacyjnego i stężenie białek we krwi hutników**

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem czterech prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Biol. Trace Elem. Res.*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, *Int. J. Environ. Health Res.* oraz *Przeg. Lek.* [załącznik 3, publikacje II.A.4, II.A.6, II.A.14, II.D.2].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=4,528; Pkt. MNiSW=66.**

Istotnym źródłem narażenia na metale ciężkie i czynnikiem powodującym powstawanie stresu oksydacyjnego jest praca w hutnictwie oraz palenie papierosów.

U osób narażonych zawodowo występuje większe ryzyko oksydacyjnego uszkodzenia DNA, białek i lipidów. W ocenie ekspozycji zawodowej hutników na metale ciężkie, zaobserwowaliśmy kilkukrotny wzrost stężenia Cd, Pb i As u palących i niepalących hutników w porównaniu do grupy kontrolnej palącej i niepalącej. Najwyższe stężenia Cd, Pb i As stwierdzono u palących hutników. Wykazano, że stężenie Cd we krwi było prawie pięciokrotnie wyższe w grupie kontrolnej palącej w porównaniu z grupą kontrolną niepalącą i ponad trzykrotnie wyższe w grupie hutników palących w porównaniu do niepalących.

Zbadaliśmy wpływ narażenia na metale ciężkie na procesy peroksydacji lipidów, białek oraz DNA poprzez oznaczenie odpowiednio malonyldialdehydu (MDA) i zaawansowanych produktów utleniania białek (AOPP) w osoczu oraz 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) w surowicy. Narażenie zawodowe na metale ciężkie skutkowało wzrostem stężenia MDA we krwi palących i niepalących hutników w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano natomiast statystycznie istotnej różnicy w stężeniu 8-OHdG w surowicy palących i niepalących pracowników huty miedzi w porównaniu do niepalących osób grupy kontrolnej. W grupach hutników (palących i niepalących) wykazano dwukrotnie wyższe stężenie AOPP oraz wskaźnik AOPP/albumina w porównaniu do grup kontrolnych (palących i niepalących). Wykazano również, że narażenie zawodowe na metale ciężkie powoduje większy wzrost stężenia AOPP niż dym tytoniowy. Narażenie zawodowe w hutnictwie skutkuje również wzrostem stężenia markerów stresu oksydacyjnego ale może także powodować zaburzenia w stężeniu głównych frakcji białek w surowicy. Wykazano większe stężenie α 2-globulin w surowicy hutników palących i niepalących w stosunku do grupy kontrolnej oraz niższe stężenie α 1-globulin u hutników palących. Ponadto stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem Cd we krwi a stężeniem frakcji zawierających globuliny α 1 i α 2. Stwierdzono, że stężenie Cd w moczu koreluje negatywnie z frakcją α 1 i α 2-globulin. Zbadaliśmy również wpływ narażenia zawodowego na metale ciężkie, i dym tytoniowy na aktywność paraoksonazy i γ -glutamylotranspeptydazy, a także na stężenie glutationu. Zaobserwowaliśmy zmniejszoną aktywność paraoksonazy i wyższą aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w surowicy hutników w porównaniu z grupami kontrolnymi. We krwi hutników palących wykazano ujemną korelację pomiędzy aktywnością paraoksonazy i wartością BMI, a także między aktywnością paraoksonazy i paleniem papierosów.

Podsumowując, wykazaliśmy, że ekspozycja na wysokie stężenia arsenu, kadmu

i ołowiu może prowadzić do zmian w stężeniu markerów stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów. Wykazano, że dym tytoniowy jest głównym źródłem Cd we krwi hutników, natomiast kumulacja Pb i As zależy przede wszystkim od narażenia zawodowego. Przeprowadzone badania wykazały, że zawodowa ekspozycja na metale ciężkie oraz palenie papierosów generują wolne rodniki, które wywierają działanie toksyczne na lipidy i białka. Obserwowane anomalie w profilach białkowych hutników oraz aktywności γ -glutamylotranspeptydazy i aktywności paraoksonazy w surowicy, mogą być ważnymi markerami przy ocenie narażenia na metale ciężkie i we wczesnej diagnozie wywołanych przez nie chorób.

❖ **Ocena wpływu narażenia na ksenobiotyki dymu tytoniowego na profil białkowy i transport żelaza we krwi kobiet ciężarnych oraz rozwój płodu**

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem pięciu prac doświadczalnych oraz jednej pracy pogładowej, zamieszczonych na łamach *Reprod. Toxicol.*, *Fetal Pediatr. Pathol.*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, *PLoS One* [załącznik 3, publikacje II.A.4, II.A.7, II.A.12, II.A.13, II.A.15, II.A.21].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=13,359; Pkt. MNiSW=152.**

Palenie tytoniu jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych używek na świecie. Szacuje się, że w Polsce około 25% kobiet pali, z czego w czasie ciąży kontynuuje palenie aż 12%. Narażenie na dym tytoniowy w czasie ciąży wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wad płodu, porodu przedwczesnego, niskiej masy urodzeniowej czy wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR). Wykazaliśmy, że palenie papierosów przez kobiety ciężarne powoduje wzrost stężenia Cd we krwi oraz zaburzenie homeostazy Zn, pierwiastka niezwykle istotnego dla rozwoju ciąży, którego stężenie spada w przebiegu ciąży.

Analizując wpływ palenia papierosów na równowagę pro/antyoksydacyjną u kobiet ciężarnych, zaobserwowaliśmy wzrost stężenia markerów stresu oksydacyjnego: MDA i 8-OHdG oraz aktywności enzymu antyoksydacyjnego Cu/Zn SOD w osoczu kobiet w ciąży z IUGR, których to wartości wzrastały dodatkowo u kobiet palących papierosy. Zaobserwowaliśmy natomiast spadek stężenia glutationu i aktywności peroksydazy glutationowej we krwi kobiet z IUGR palących papierosy. Czterokrotny wzrost stężenia

MT zaobserwowano w osoczu kobiet w ciąży z IUGR, który dodatkowo był nasilony przez palenie papierosów, co potwierdza indukujący wpływ ksenobiotyków dymu tytoniowego na status tego antyoksydanta. Zaobserwowane zmiany w stężeniu markerów stresu jak również w stężeniu i aktywności antyoksydantów wskazują, że ekspozycja na dym tytoniowy zaburza równowagę pro/antyoksydacyjną u kobiet w ciąży z IUGR.

Narażenie na dym tytoniowy powodując wzrost stężenia Cd we krwi kobiet w ciąży może prowadzić do podwyższonego ryzyka zaburzeń przebiegu ciąży. Cd odkładając się w łożysku wpływa na metabolizm mikroelementów, takich jak Zn i Fe, mających kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju płodu. Uważa się, że akumulacja Cd w łożysku zaburza transport Zn do układu krążenia dziecka. Wykazaliśmy, że wymiary płodu korelują negatywnie ze stężeniem Cd u matek narażonych na ten metal ciężki. Cd wpływa na stężenie oraz budowę białek surowicy krwi. Wykazaliśmy wpływ dymu tytoniowego na kluczowe frakcje białkowe u zdrowych kobiet w ciąży. Zaobserwowano różnice w profilu białkowym (α 1-globulin, β -globulin, γ -globulin) u kobiet ciężarnych palących w porównaniu do kobiet ciężarnych niepalących. Stężenie α 1-antytrypsyny i α 2-makroglobuliny było niższe w grupie niepalących, niż w grupie palących i korelowało negatywnie ze stężeniem Cd. Stosunek Zn/Cd korelował ujemnie ze stężeniem α 1-, α 2- i β -globulin.

Wykazaliśmy, że ekspozycja na dym tytoniowy kobiet w ciąży wpływa również na sialację transferyny (Tf), glikoproteiny odpowiedzialnej za transport żelaza w organizmie m.in. do łożyska. U kobiet z anemią z niedoboru żelaza częściej występują porody przedwczesne i niższa waga urodzeniowa dziecka. Cząsteczka Tf składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego oraz dwóch bocznych, rozgałęzionych łańcuchów oligosacharydowych, w skład których wchodzi: N-acetyloglukozamina, mannoza, galaktoza oraz kwas sialowy. W zależności od ilości przyłączonych reszt kwasu sialowego można wyróżnić dziewięć izoform transferyny (od 0 do 8 reszt kwasu sialowego). Wskazuje się na występowanie we krwi zmiennie usialowanej Tf (sialoTf) zarówno podczas procesów fizjologicznych (ciąża) jak i patologicznych (np. wzrost poziomu niskosialowanej transferyny u osób spożywających alkohol). W przeprowadzonych przez nas badaniach, również zaobserwowaliśmy zmiany w sialacji Tf u kobiet ciężarnych. W przebiegu ciąży obserwowaliśmy wzrost procentowego udziału stężenia 2-, 5- i 6-sialo Tf i spadku 3- i 4-sialo Tf. Palenie tytoniu ma wpływ na liczbę reszt kwasów sialowych w Tf i wydaje się zmieniać konwersję jej izoform w przebiegu ciąży, co może zakłócać transport żelaza, a w konsekwencji

wpływać na rozwój i żywienie płodu. W trzecim trymestrze ciąży zaobserwowano niższe stężenie izoformy 4-sialoTf i wyższe stężenie 5-sialoTf w surowicy kobiet niepalących z IUGR w porównaniu do grupy kontrolnej. W dniu porodu stężenie 2-sialoTf było znacząco niższe, a stężenie 3-sialo Tf było wyższe w surowicy kobiet niepalących. Stężenie 4-sialo było niższe w surowicy kobiet palących z IUGR niż w grupie kontrolnej.

Wzrost stężenia Cd we krwi spowodowany paleniem papierosów, ma wpływ na gospodarkę żelaza wynikającą m.in. ze zmiany sialacji transferyny. Kobiety z niedoborem żelaza, które paliły, rodziły wcześniej niż kobiety niepalące, bez niedoboru żelaza. Stężenie Cd, ale nie stężenie kotyniny, dodatnio korelowało ze sialacją Tf we krwi kobiet z niedoborem żelaza, które paliły; stężenie 3-, 4-, 5- i 6-sialoTf korelowało ujemnie z płodowymi parametrami biometrycznymi. U kobiet palących wraz ze wzrostem narażenia na Cd zmniejszała się również waga urodzeniowa dziecka. Wykazany związek między stężeniem Cd a biometrycznymi parametrami płodu obserwowano tylko w grupie ciężarnych z niedoborem żelaza, co sugeruje addytywny efekt tych dwóch czynników i wskazuje, że matki z niedokrwistością mogą być bardziej podatne na toksyczność Cd i zaburzony rozwój płodu.

Intrygujący jest również związek pomiędzy statusem żelaza a długością telomerów, niekodujących fragmentów na końcach chromosomów. Zagadnienie to podsumowaliśmy w pracy dotyczącej wpływu stresu oksydacyjnego indukowanego żelazem na długość telomerów. Indukcja stresu oksydacyjnego może zachodzić przez zwiększone stężenie żelaza w organizmie, prowadząc w konsekwencji do skracania telomerów. Opisałiśmy skracanie chromosomów w częściach telomerowych u pacjentów z pierwotną hemochromatozą oraz u pacjentów przyjmujących suplementy zawierające żelazo. Zwiększony poziom wysycenia Tf jest również związany z obecnością krótszych telomerów w chromosomach leukocytów.

Podsumowując, palenie tytoniu przez kobiety w ciąży ma negatywny wpływ na rozwój płodu i zwiększa ryzyko zaburzeń ciąży poprzez zmianę równowagi pro/antyoksydacyjnej i poziomu mikroelementów. Palenie wpływa na stężenie, strukturę i funkcję białek, potencjalnie prowadząc do negatywnych skutków w przebiegu ciąży. We krwi kobiet ciężarnych palących papierosy wykazano zaburzony profil białkowy (α 1-globulin, β -globulin, γ -globulin) w porównaniu do kobiet ciężarnych niepalących. Zwiększone stężenie Cd we krwi palących wpływa na gospodarkę żelaza i zmianę sialacji Tf. We krwi kobiet palących z niedoborem żelaza zaobserwowano pozytywną korelację stężenia kadmu z 3-sialoTf, 4-sialoTf, 5-sialoTf i 6-sialoTf oraz negatywną korelację

z wymiarem dwuciemiowym, obwodem główki, obwodem brzuszka oraz długością kości udowej płodu. Zaobserwowane zmiany sugerują związek między statusem żelaza, transportem żelaza do płodu i zaburzeniami rozwoju płodu.

❖ **Metody detekcji metalotioneiny oraz wpływ czynników biologicznych, środowiskowych i procesu nowotworzenia na jej stężenie**

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem publikacji obejmujących cztery prace doświadczalne oraz pięć prac poglądowych, zamieszczonych na łamach *J. Chromatogr. Sci.*, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, *J. Nanopart. Res.*, *Colloid Surf. B - Biointerfaces.*, *Int. J. Electrochem. Sci.*, *J. Metallomics Nanotechnol.*, *Curr. Drug Targets.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *Pharmacol. Ther.* [załącznik 3, publikacje II.A.8, II.A.9, II.A.10, II.A.16, II.A.23, II.A.24, II.A.25, II.A.29, II.D.3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF = 28,304; MNiSW = 240**

Ze względu na niską masę cząsteczkową i unikalną strukturę pierwszorzędową, opracowanie metod izolacji, separacji i detekcji MT stwarza wiele problemów, zwłaszcza w osiągnięciu zadowalającej czułości i swoistości. W pracy poglądowej podsumowaliśmy liczne badania poświęcone optymalizacji warunków detekcji MT metodą elektroforezy kapilarnej takich jak powierzchnia kapilary, rodzaje elektrolitu, modyfikatorów lub rodzaj detektora. Technika, którą badaliśmy rozdział MT jest zminiaturyzowana forma elektroforezy kapilarnej - chip-CE. Wykazaliśmy jej zastosowanie również w analizie kompleksów MT z kropkami kwantowymi (QDs). QDs są to fluorescencyjne nanocząstki (NPs) o unikalnych właściwościach optycznych, które pozwalają na ich wykorzystanie jako sond w obrazowaniu chemicznym, biologicznym, immunologicznym i molekularnym. QDs związane z docelowymi ligandami, takimi jak peptydy lub małe cząsteczki, mogą być stosowane jako selektywne i czułe biomarkery w obrazowaniu molekularnym. Analizując oddziaływanie ludzkiej MT z czterema rodzajami CdTe QDs (niebieskie, zielone, żółte i czerwone QDs) wykazaliśmy, że technika chip-CE umożliwia obserwację powstałych kompleksów. Zaobserwowaliśmy również, że zmiany w zakresie około 6-7 kDa, wartości odpowiadające monomerowi MT, zależą od hydrodynamicznych średnic QDs, MT silniej oddziałuje z mniejszymi QDs (niebieską CdTe QD), a słabiej z większymi QDs (czerwoną CdTe QD). Wykazaliśmy również, że niekadmowana MT

oddziałuje silniej z QDs niż MT wysycona Cd. Zgodnie z naszą wiedzą, technika chip-CE została po raz pierwszy zastosowana w badaniu oddziaływań CdTe QDs z MT. Stabilność utworzonych kompleksów ludzkiej MT i CdTe QDs ocenialiśmy przy użyciu intensywności fluorescencji oraz woltamperometrii różnicowej. Wykazaliśmy, że wielkość QDs ma wpływ na ich interakcję z ludzką MT, a także na stabilność tych kompleksów.

MT wiąże jony cynku, których główne znaczenie w organizmie oparte jest na ich strukturalnej roli w wielu białkach, w tym czynnikach transkrypcji, enzymach antyoksydacyjnych i MTs. Ze względu na rolę Zn w wielu kluczowych procesach fizjologicznych jego homeostaza jest ściśle kontrolowana. Mechanizmy kontrolujące opierają się głównie na transporterach jonów cynku i białkach o niskiej masie cząsteczkowej - MTs. Omówiliśmy funkcję Zn w białkach ze szczególnym uwzględnieniem stresu oksydacyjnego. Podsumowaliśmy również testy stosowane do wykrywania Zn w złożonych matrycach biologicznych.

Stężenie MT jest regulowane przez wiele czynników, przede wszystkim przez jony metali m.in. cynku i kadmu, cytokiny, glukokortykoidy i wolne rodniki. Czynniki te zależą od czynników biologicznych takich jak płeć, ciąża i wiek, a także od czynników środowiskowych, w tym stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych i palenia papierosów. Wykazaliśmy wpływ tych czynników na stężenie MT w lizacie erytrocytarnym i w osoczu. Wyższe stężenie MT zarówno w lizacie erytrocytarnym, jak i w osoczu występowało u kobiet w porównaniu z mężczyznami. Ponadto wskazaliśmy, że ciąża powoduje wzrost stężenia MT w osoczu, podczas gdy doustne środki antykoncepcyjne powodują wzrost stężenia MT w lizacie erytrocytarnym. Również palenie papierosów powodowało wzrost stężenia tego białka w osoczu. U kobiet w ciąży, kobiet przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne i kobiet palących obserwowaliśmy niższe stężenia GSH w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazuje na występowanie stresu oksydacyjnego. Stężenie GSSG u kobiet palących było wyższe niż w grupie kontrolnej, wskazując na utlenianie glutationu. U kobiet w ciąży oraz przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne zaobserwowano obniżone stężenie GSSG, co wskazuje, że inne procesy obok utleniania wpływają na stan glutationu.

Podsumowaliśmy również metody analizy MT również na poziomie jej ekspresji w chorobach nowotworowych oraz strategii, w jaki sposób można wykorzystać tę wiedzę w terapii przeciwnowotworowej. Zmiany w ekspresji MT są związane z procesem kancerogenezy różnych typów nowotworów złośliwych u ludzi lub z bardziej

agresywnym fenotypem i opornością terapeutyczną. Informacja o wzorze ekspresji MT może być pomocna w analizie odporności na leki i zastosowaniu prawidłowej chemioterapii. Mikromacierze dają możliwość analizy ekspresji izoform MT, nie tylko w nowotworach, ale także w innych chorobach, zwłaszcza cukrzycy, otyłości, chorobach układu krążenia, starzeniu się, osteoporozie, zaburzeniach psychiatrycznych oraz efektach działania toksycznego leków.

Zastosowanie MT jako nowego środka terapeutycznego przeciwko stresowi oksydacyjnemu i w kardioprotekcji analizowane jest pod kątem jej zdolności do zwiększania chemooporności wobec niektórych rodzajów powszechnie stosowanych cytostatyków. Podsumowaliśmy więc podstawowe typy wolnych rodników tworzonych przez antracykliny i główne procesy ich usuwania. Główną uwagę skupiliśmy na roli MT w detoksyfikacji metali i leków. Głównym mechanizmem działania antybiotyków antracyklinowych, poza interkalacją w strukturę DNA/RNA, hamowaniem topoizomerazy DNA i usuwaniem histonu z chromatyny, jest powstawanie różnych form wolnych rodników, co prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia komórek rakowych. Najpoważniejszym niekorzystnym działaniem antracyklin jest kardiomiopatia prowadząca do zastoinowej niewydolności serca, wywołanej przez te same mechanizmy, podczas gdy MT może chronić przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez antracykliny.

✧ **Wpływ ksenobiotyków, w tym leków, na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i funkcje receptorów sprzężonych z białkiem G oraz analiza czystości i właściwości pro/antyoksydacyjne leków**

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem publikacji obejmujących jedną pracę doświadczalną oraz trzy prace poglądowe, zamieszczonych na łamach *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, *Toxicol. in Vitro* oraz *Acta Pol. Pharm* [załącznik 3, publikacje II.A.11, II.A.19, II.A.20, II.A.27].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF = 7,544; Pkt. MNiSW = 85**

Wiele środowiskowych ksenobiotyków hamuje aktywność Cu/Zn SOD. Podsumowaliśmy działanie inhibitorów Cu/Zn SOD, które można znaleźć nie tylko w przemysłowych ściekach, papierosach i środkach chemicznych, ale również, które używane są jako leki, substraty do produkcji leków lub są produktem biotransformacji

leków. Wpływ tych związków na Cu/Zn SOD prowadzi do jej inhibicji z powodu: chelatowania jonów miedzi, rozwijania struktury enzymu, wpływając na reszty aminokwasowe niezbędne do utrzymania jej aktywności.

Leki mogą wpływać nie tylko na aktywność enzymów (np. SOD) ale również mieć wpływ na transmisję sygnałów przez receptory. Blisko jedna trzecia leków obecnych na rynku farmaceutycznym wpływa na funkcję receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCRs). Podsumowaliśmy wpływ zmian w transmisji sygnału przez GPCRs, które są punktem łączącym szlaki wielu leków, na powstawanie chorób i terapię lekami. Występujące w nich mutacje wiążą się z szerokim spektrum chorób o różnej etiologii. Wiele mutacyjnych zmian w genach kodujących GPCRs może zmienić terapię lekową już istniejących chorób: niewydolność serca (receptory adrenergiczne), astmę (receptory cysteinylu-leukotrienowe). Badania dotyczące struktury i funkcji genetycznie zmodyfikowanych GPCRs pozwalają poznać różnorodne mechanizmy jego działania, co z kolei może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat etiologii i farmakoterapii wielu obecnie nieuleczalnych chorób. Aktywność stosowanych leków może się zmieniać w zależności od obecności zanieczyszczeń obecnych w preparacie. Podsumowaliśmy również zastosowanie technik elektroforezy kapilarnej w badaniu czystości leków przeciwnowotworowych. Potencjalne zanieczyszczenia mogą mieć wysoką toksyczność i nie wywoływać pożądanego efektu terapeutycznego. Wykazaliśmy, że doniesienia dotyczące separacji leków, takich jak cisplatyna, karboplatyna, lobaplatyna, metotreksat, tamoksyfen, paklitaksel od ich pochodnych, które są ich potencjalnymi zanieczyszczeniami, pokazują, że elektroforeza kapilarna zapewnia odpowiednie narzędzia do analizy zanieczyszczeń tych leków przeciwnowotworowych.

Zbadaliśmy również wpływ leków heterocyklicznych z pojedynczą grupą tiolową (tiamazol, merkaptopurynę) i ditiolowych leków alifatycznych (kwas dimerkaptobursztynowy, ditiotreitól) w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego wodoronadtlenkiem tert-butyłu na hemoglobinę. Wyniki badań scalają informacje w zakresie zróżnicowania mechanizmów reakcji leków tiolowych w zależności od struktury chemicznej: alifatycznej lub cyklicznej jak również liczby i pozycji podstawnika -SH w cząsteczce. Wykazaliśmy, że mesna, tiopronin i kaptopryl, podczas stresu oksydacyjnego, mogą zapobiegać toksycznym modyfikacjom hemoglobiny w przeciwieństwie do wykazanych zdolności prooksydacyjnych N-acetylocysteiny, N-acetylopenicylaminy i penicylaminy. Podczas utleniania hemoglobiny leki z podstawnikiem tiolowym na drodze wielokierunkowych interakcji w procesach

wolnorodnikowych mogą wpływać modyfikująco na formę i ilość powstających oksydacyjnych produktów. Takie działanie w zastosowanym układzie modelowym należy uznać za efekt toksyczny. Uzyskane przez nas dane eksperymentalne mogą posłużyć do oceny efektów prooksydacyjnych różnych leków tiolowych stosowanych w leczeniu wielu chorób przebiegających w warunkach stresu oksydacyjnego.

✧ **Zastosowanie nanotechnologii w analizie białek oraz nanocząsteczek w transporcie leków przeciwnowotworowych**

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem publikacji obejmujących dwie prace doświadczalne, trzy prace pogładowe, dwie prace doświadczalne w suplementach czasopism oraz cztery prace doświadczalne w pełnotekstowych materiałach zjazdowych zamieszczonych na łamach: *Int. J. Mol. Sci*, *Nanomaterials*, *Nanomedicine (Lond.)*, *Int. J. Nanomed.*, *Klin. Onkol. suppl.*, *NANOCON* [załącznik 3, publikacje II.A.17, II.A.18, II.A.22, II.A.26, II.A.28, II.D.4, II.D.5, II.D.6, II.D.7, II.D.8, II.D.9].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF = 20,137; Pkt. MNiSW = 170 oraz Pkt. MNiSW = 25 w suplementach i materiałach zjazdowych**

We współcześnie opracowywanych systemach mikromacierzy łączy się wiele technik opartych na nanotechnologii. Podsumowaliśmy wykorzystanie mikromacierzy białkowych, jako ważnego narzędzia badawczego do wykrywania i analizy białek, oddziaływań białko-białko i wielu innych zastosowań. Wykorzystanie nanomateriałów i opartych na nanotechnologii technik unieruchomienia pozwala rozszerzyć powierzchnię dla immobilizacji biocząsteczek, co skutkuje lepszymi właściwościami wiązania substratu, zmniejszonym sygnałem tła i ulepszonymi układami reporterowymi zwiększającymi czułość testów. Podsumowaliśmy zastosowanie nanocząstek w konstruowaniu mikromacierzy białkowych, immobilizacji i detekcji białek. Rozwój nanotechnologii daje nowe możliwości w dziedzinie zastosowań nanomedycznych, od metod diagnostycznych po ukierunkowane nanotransportery. Opisaliśmy również możliwości zastosowania nanotechnologii w procesie skuteczniejszego sposobu podawania selenu. Podsumowaliśmy wiedzę na temat nanocząstek selenu, ich biologicznych skutków w organizmie, mechanizmów absorpcji i nanotechnologicznych zastosowań do podawania doustnego. Tradycyjne suplementy selenu na ogół mają niski

stopień wchłaniania i zwiększoną toksyczność. Opracowanie innowacyjnego systemu transportu związków selenu, pomogłoby zwiększyć biodostępność tego pierwiastka i umożliwiłoby jego kontrolowane uwalnianie w organizmie. Selen w nanoskali wzbudził duże zainteresowanie jako dodatek do żywności, szczególnie dla osób z niedoborem selenu, ale także jako środek terapeutyczny bez znaczących efektów ubocznych.

Terapia celowana w chorobach onkologicznych stanowi duże wyzwanie dla zaawansowanej nanomedycyny. Zaprojektowaliśmy i zbadaliśmy kilka nanotransporterów, w tym oparte na chitozanie umożliwiającym tworzenie nanocząsteczek (NPs). Te NPs mogą wiązać jony metali, głównie cynku stabilizującego strukturę chitozanu. Komórki nowotworów złośliwych często silnie ekspresjonują MT, dlatego poprzez zwiększone powinowactwo MT do jonów cynku, nanotransporter został ukierunkowany na tkankę nowotworową z wysokim stężeniem MT. Zmiany w metabolizmie aminokwasów raka prostaty objawiają się między innymi wzrostem ilości sarkozyny. Dlatego też zmodyfikowaliśmy dodatkowo chitozan przez przyłączenie przeciwciał przeciw sarkozynie (AntiSar). Otrzymane NPs testowano pod względem toksyczności i nie zaobserwowano znaczącego hamowania wzrostu w żadnym z analizowanych systemów modelowych (*Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*). Aktywność hemolityczna przygotowanych NPs była podobna do aktywności kontrolnej.

Nanocząsteczki chitozanu zastosowaliśmy również jako nośniki leku w celu ukierunkowanego dostarczania DOX. Przygotowane nanonośniki były, jak powyżej, stabilizowane i funkcjonalizowane przez jony cynku wbudowane w szkielet nanocząsteczki chitozanu. Wykorzystaliśmy również wysoką ekspresję sarkozyny w komórkach raka prostaty i kierowanie nanocząstek odbywało się poprzez AntiSar obecne na powierzchni nanostruktur. Potwierdziliśmy zdolność tych nanocząstek z AntiSar, związanych z DOX, do wiązania się z cząsteczką sarkozyny. Otrzymane kompleksy są perspektywicznym narzędziem w ukierunkowanej terapii lekowej z użyciem specyficznego oddziaływania z sarkozyną w nowotworach prostaty.

W celu zastosowania CdTe QDs, związanych z AntiSar w ukierunkowanej terapii raka prostaty z wykorzystaniem efektu fotodynamicznego, przeprowadziliśmy badanie interakcji CdTe QDs z albuminą surowicy bydlęcej i z AntiSar. Zaobserwowaliśmy spadek intensywności znormalizowanego sygnału fluorescencyjnego w obecności BSA lub AntiSar o 70-90%. Wielkość poszczególnych QDs wpływała na intensywność

oddziaływać z biocząsteczką. Nanokonstrukty powinny zatem być ukierunkowane zgodnie z tymi danymi eksperymentalnymi do ich zamierzonego zastosowania.

DOX - często stosowana w leczeniu, nie tylko nowotworów prostaty, ale przede wszystkim nowotworów piersi - pomimo swojej skuteczności terapeutycznej, wykazuje wysoką kardiotoxycywność. Szacuje się, że około 5-10% raków sutka jest uwarunkowanych genetycznie mutacją w genie *BRCA2*, dlatego też opracowaliśmy nanotransporter o oczekiwanym działaniu cytostatycznym bez znaczących efektów toksycznych. Kompleksy C60-DOX zmodyfikowano oligodeoksynukleotydem (ODN1) reprezentującym specyficzną sekwencję do związania kompleksu do mutacji punktowej w genie *BRCA2*. W celu udowodnienia interakcji zaprojektowano magnetyczną nanocząsteczkę złota modyfikowaną sekwencją komplementarną do testowego nanotransportera. Oddziaływanie kompleksu C60-DOX-ODN1 z komplementarną cząsteczką (ODN2-Fe₂O₃-AuNP) zostało następnie potwierdzone kilkoma niezależnymi technikami. Wykazaliśmy, że zaproponowane kompleksy są funkcjonalne w wiązaniu z sekwencją docelową.

Wykazaliśmy również nowe interesujące możliwości syntezy nanocząstek złota (AuNPs) i srebra (AgNPs) w zależności od zastosowanej temperatury czy ekstraktów roślinnych. Stosując różne temperatury syntezy (20, 40, 60, 80 i 100°C) otrzymaliśmy AuNPs o różnej wielkości i potencjale (wielkość od 17 do 37 nm, potencjał zeta od -32 do -44 mV). AuNPs wykazywały znaczącą aktywność podobną do aktywności peroksydazy, którą monitorowano w obecności tetrametylobenzydyny i nadtlenu wodoru. Proponowany system zastosowano w immunodetekcji ludzkiej IgG, w której przeciwciała anti-IgG zmodyfikowano za pomocą AuNPs. Otrzymaliśmy również pięć typów NPs srebra (AgNPs) z wykorzystaniem syntezy nieorganicznej i pięć typów AgNPs z wykorzystaniem zielonej syntezy (ekstraktów roślinnych). AgNPs wytworzone w drodze fitosyntezy rozróżniano zgodnie z ekstraktem roślinnym wchodzącym w reakcje syntezy. Do fitosyntezy wykorzystano ekstrakty *Camellia sinensis* (zielona herbata), *Tagetes erecta* (nagietek), *Hypericum perforatum* (ziele dziurawca zwyczajnego) i *Allium cepa* (cebula). AgNPs otrzymane w drodze fitosyntezy miały wyższą zdolność do zmiatania wolnych rodników. AgNPs zsyntetyzowane przy użyciu zielonej herbaty wykazywały najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus* i *E. coli*.

Nanocząstki mogą być stosowane w terapii i leczeniu w takich dziedzinach jak obrazowanie medyczne czy szybkie testy diagnostyczne. Nanotechnologia jest również

przyszłością w transporcie celowanym leków. Wykazaliśmy możliwości zastosowania nanotransporterów w celowanym dostarczaniu leków poprzez rozpoznanie przez przeciwciała czy przez komplementarną do zmutowanej formy genu *BRCA2* sekwencję. Zaprojektowaliśmy i sprawdziliśmy funkcjonalność kilku nanotransporterów w tym oparte na chitozanie. Pokazaliśmy zastosowanie QDs w znakowaniu białek oraz nowe możliwości syntezy AuNPs i AgNPs z aktywnościami m.in przeciwbakteryjnymi.

Marta Kepińska