

Autoreferat

*Dr n. farm.* **Marta Michalska**



**Zakład Biochemii Farmaceutycznej**  
**Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii**  
**Wydział Farmaceutyczny**

Łódź 2013

1. *Imię i nazwisko:* **Marta Michalska**

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej*

**Przebieg edukacji zawodowej:**

**1967 – 1972** – Studia na Kierunku Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi (od roku 2002 przemianowano uczelnię na Uniwersytet Medyczny w Łodzi).

**1972** – Obrona pracy magisterskiej w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi pt. „Wpływ fenitrotonu podawanego w dawce  $0,01 \times LD_{50}$  na kształtowanie się poziomu aminotransferaz”. *Kierownik pracy:* prof. dr hab. W. Lasota.

**1983** – Obrona pracy doktorskiej w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi pt. „Wpływ związków rtęci na proces krzepnięcia krwi”. *Promotor:* prof. dr hab. R. Wierzbicki.

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych*

**Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych:**

**1972-1981** - Zatrudnienie na etacie asystenta w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi.

**1981-1994** - Zatrudnienie na etacie adiunkta w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi.

**1994-1998** - Zatrudnienie na etacie pracownika naukowo-technicznego w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi.

**1998-1999** - Zatrudnienie na etacie wykładowcy w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi.

**Od 1999** - Zatrudnienie na etacie starszego wykładowcy w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi (od roku 2002 przemianowano uczelnię na Uniwersytet Medyczny w Łodzi a placówkę zatrudniającą na Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry Chemii Farmaceutycznej i Biochemii)

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

a) *Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:*

**Rola fibryny i wybranych czynników angiogennych w ocenie narażenia środowiskowego, działania leków i aktywności hydrazonowych pochodnych benzopironów oraz praktyczne zastosowanie polimeru fibryny jako nośnika czynników wzrostu (*scaffold*).**

b) *(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)*

W czasie przeprowadzania powyższych badań zostałam współautorem **43 publikacji** naukowych oraz **24 komunikatów** zjazdowych na łączną sumę **IF = 19.716** (w tym 7.464 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne) oraz pkt **MNiSW = 310** (w tym 139 za pierwszoautorskie prace oryginalne) (*Impact Factor* dla publikacji do roku 1990 liczono zgodnie z rozporządzeniem

Centralnej Komisji Do Spraw Stopni i Tytułów **BCK – Org. – 394/12** Ad 1. z dnia 31.XII.2012).

Materiałem źródłowym opracowania moich znaczących osiągnięć naukowych, będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego są następujące publikacje o łącznym **IF = 10.322** oraz pkt **MNiSW = 144**:

I. Kostka B, **Michalska M**, Broncel M, Pająk W. Pomiar generacji trombiny metodą spektrofotometryczną w osoczu pacjentów z hiperlipidemią leczonych atorwastatyną. *Probl Ter Monit* **2003**, 14(1): 13-18 **IF: - MNiSW: 1**

**Wkład pracy kandydata: 50 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

II. Ciejka E, Gorąca A, **Michalska M**, Kostka B. Wpływ pola magnetycznego niskiej częstotliwości na wybrane parametry układu krzepnięcia. *Pol Merk Lek* **2005**, 19(110): 148-151 **IF: - MNiSW: 5**

**Wkład pracy kandydata: 50 %**, opracowanie koncepcji pracy, przeprowadzenie części doświadczalnej, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

III. **Michalska M**, Chojnowska-Jeziarska J, Broncel M, Marczyk I, Sikora J, Kostka B. Ocena stopnia generacji trombiny i wiązania trombiny ze skrzepem w osoczu ludzi z hiperlipidemią typu II leczonych statynami. *Przeł Lek* **2005**, 62(suppl 3): 42-45 **IF: - MNiSW: 5**

**Wkład pracy kandydata: 50 %**, wykonanie części doświadczalnej dotyczącej hemostazy

IV. Broncel M, Marczyk I, Kostka B, **Michalska M**, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. Ocena korelacji między parametrami hemostazy a lipidogramem

surowicy u chorych na hiperlipidemię typu II po leczeniu simwastatyną. *Pol Merk Lek* **2007**, 22(127): 21-24 **IF: - MNiSW: 4**

**Wkład pracy kandydata: 50 %**, wykonanie części doświadczalnej dotyczącej hemostazy

V. **Michalska M**, Kozakiewicz M, Bodek KH. Polimerowe nośniki czynników angiogennych. Cz. I. Membrana chitozanowo- alginianowa jako nośnik PDGF-AB i TGF- $\beta$ . *Polim Med* **2008**, 38(4): 19-28 **IF: - MNiSW: 4**

**Wkład pracy kandydata: 60 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

VI. **Michalska M**, Pająk W, Kołodziejska J, Łazarenkow A, Nawrot-Modranka J. Influence of phosphorohydrazone derivatives of benzopyrones on polymerization and viscosity of fibrin. *Acta Biochim Pol* **2008**, 55(3): 613-617 **IF: 1.448 MNiSW: 15**

**Wkład pracy kandydata: 70 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

VII. **Michalska M**, Mirowski M, Bodek A, Bodek KH. Release kinetics of basic fibroblast growth factor (bFGF) from certain biopolymers in the presence of ketoprofen. *Pharmazie* **2010**, 64: 818-823 **IF: 0.869 MNiSW: 20**

**Wkład pracy kandydata: 60 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

VIII. **Michalska M**, Palatyńska-Ulatowska A, Palatyński A, Mirowski M, Kaplińska K, Nawrot-Modranka J, Lazarenkow A. Influence of antibiotic therapy on the level of selected angiogenic factors in patients with benign gynecologic tumors – preliminary report. *Pharmazie* **2011**, 66: 619-622 **IF: 1.006 MNiSW: 15**

**Wkład pracy kandydata: 60 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

IX. **Michalska M**, Kaplińska K, Mirowski M, Bodek A, Bodek KH. Evaluation of the use of fibrin and microcrystalline chitosan membranes as carriers for transforming growth factor beta-1. *J Appl Polym Sci* **2013**, 127(5): 3506-3513 **IF: 1.395 MNiSW: 25**

**Wkład pracy kandydata: 60 %**, opracowanie koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, częściowe opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

X. Kleniewska P, Piechota-Polanczyk A, Michalski L, **Michalska M**, Balcerczak E, Zebrowska M, Goraca A. Influence of block of NF-kappa B signaling pathway on oxidative stress in the liver homogenates. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, ID: 308358 DOI: 10.1155/2013/308358 **IF: 3.393 MNiSW: 20**

**Wkład pracy kandydata: 25 %**, częściowe wykonanie oznaczeń i częściowe przygotowanie manuskryptu

XI. **Michalska M**, Mirowski M, Kaplińska K, Kuształ D, Łazarenkow A, Nawrot-Modranka J. Effect of phosphorohydrazone derivatives of chromone on fibrin polymerization in the presence of bFGF. *Indian J Biochem Biophys* **2013**, 50(3): 227-232 **IF: 1.026 MNiSW: 15**

**Wkład pracy kandydata: 65 %**, opracowanie koncepcji pracy, częściowe wykonanie oznaczeń, opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

XII. Łazarenkow A, **Michalska M**, Gorąca A, Mirowski M, Nawrot-Modranka J, Piechota-Polanczyk A. The influence of chromone based hydrazones on lipid peroxidation and bFGF concentration in the HL-60 cell line. *Acta Biochim Pol* **2013**, 60(2): 259-262 IF **1.185** MNiSW: **15**

**Wkład pracy kandydata: 35 %**, opracowanie koncepcji pracy, częściowe wykonanie oznaczeń, opracowanie wyników i częściowe przygotowanie manuskryptu

XIII. Bodek KH, **Michalska M**, Bodek A, Kozakiewicz M. Evaluation of the use of microcrystalline chitosan and collagen membranes as carriers for the platelet derived growth factor (PDGF-BB) in the presence of amoxicillin. *Curr Issues Pharm Med Sci* **2013**, 26(2): 176-182 IF: - MNiSW: -

**Wkład pracy kandydata: 50 %**, opracowanie koncepcji pracy, częściowe wykonanie oznaczeń, częściowe przygotowanie manuskryptu

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

## WPROWADZENIE

W warunkach *in vitro* czynniki wzrostu (**GF's** – *growth factors*) są silnymi mitogenami, a *in vivo* czynnikami chemotaktycznymi dla komórek mięśni gładkich, fibroblastów i osteoblastów (**bFGF** – *basic fibroblast growth factor*, **TGF** – *transforming growth factor*, **PDGF** – *platelet derived growth factor*) i komórek śródbłonna oraz naczyń krwionośnych (**VEGF** – *vascular*

*endothelial growth factor*). Ponadto czynniki wzrostu (bFGF, TGF- $\beta$  i VEGF) zaangażowane są w procesy regeneracyjne i prowadzą do powstawania nowych naczyń krwionośnych, przez co promują angiogenezę [Fernandez PM *et al. Semin Thromb Hemost* **2004** 30: 31-34]. Dodatkowo TGF- $\beta$  stymuluje wytwarzanie błony podstawnej kości [Lind M *et al. Biomaterials* **2001** 22: 189-193], a także podobnie do **ET-1** (*endoteliny-1*) uczestniczy w patogenezie chorób serca, nerek, płuc i skóry [Horstmeyer A *et al. FEBS J* **2005** 272: 6297–6309]. Czynniki bFGF, VEGF oraz PDGF stymulują regenerację tkanki kostnej, nerwowej, skóry, mięśni oraz odbudowywanie ściany naczyń krwionośnych [Murakami M *et al. Curr Opin Hematol* **2008** 15: 215-220].

Wpływ powyższych czynników wzrostu w procesie angiogenezy jest zależny od struktury fibryny [Mosseson MW. *Thromb Haemost* **2005** 3: 1894-1904], [Niehls V, Hermann R. *Microvasc Res* **1996** 51: 347-364] oraz jej wpływu na tworzenie naczyń krwionośnych [Gamble JR *et al. J Cell Biol* **1993** 121: 931-943]. Czynniki wzrostu, wydzielane przez komórki do środowiska zewnętrznego mają zdolność wiązania się z heparyną i siarczanem heparyny (**HS** – *heparin sulphate*), który należy do rodziny liniowych polisacharydów i zlokalizowany jest na powierzchni komórek i w macierzy pozakomórkowej [Rapraeger AC. *Chem Biol* **1995** 2: 645-649]. Siarczan heparyny wchodzi w interakcję z zasadowym czynnikiem wzrostu (bFGF) jak i jego receptorami (między innymi z **FGFR1** – *fibroblast growth factor receptor 1*), tworząc aktywne trójskładnikowe kompleksy sygnałowe, stabilizuje strukturę czynników wzrostu fibroblastów i ogranicza ich dyfuzję do otaczającej przestrzeni. Dlatego heparyna i jej pochodne, szczególnie siarczan heparanu odgrywają znaczącą rolę w tworzeniu nośników czynników wzrostu (*scaffold*) [Liu D *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **2002** 99: 568–573], [Sun B. *et al. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* **2009** 91B: 366-372].

W procesie hemostazy w układzie zewnątrz- i wewnątrzpocho-dnym, biorą udział liczne białka o charakterze enzymów aktywowanych w reakcjach



ograniczonej proteolizy, przy udziale których dochodzi do wytworzenia fibryny. Generowane w procesie krzepnięcia białka koordynują przestrzenną lokalizację fibryny, stabilizację skrzepu, wzrost komórek śródbłonna oraz proces naprawy tkanek. Ściśle związany ze szlakiem krzepnięcia jest proces angiogenezy odpowiedzialny za powstawanie nowych naczyń krwionośnych [Folkman J. *J Nat Med* **1995** 1: 27–31]. Ukryte białka antyangiogenne (*cryptic antiangiogenic proteins*), powstające w procesie koagulacji i fibrynolizy są regulatorami układu angiogenezy [Browder T *et al. J Biol Chem* **2000** 275: 1521-24]. Antyangiogenna antytrombina III (ATIII) wywiera antagonistyczne działanie względem proangiogennych czynników płytkowych, trombiny i fibryny.

Warunkiem zachowania równowagi pomiędzy tworzeniem fibryny a jej degradacją jest odpowiednie funkcjonowanie dwóch wzajemnie powiązanych wieloenzymatycznych układów - krzepnięcia i fibrynolizy. Zaburzenie każdego z tych szlaków prowadzić może do powstawania zakrzepów i ściśle powiązanej z zakrzepicą – hipercholesterolemii. Proces nadkrzepliwości jest nasilony przez możliwość wiązania trombiny z fibrynogenem, fibryną i produktami ich degradacji, co chroni enzym przed inaktywacją przez kompleks heparyna – antytrombina III. Aktywacja krzepnięcia krwi stanowi ponadto integralny mechanizm rozwoju nowotworów i przerzutów. W wielu guzach nowotworowych (rak jelita grubego, piersi) występuje zwiększona gęstość naczyń krwionośnych co prowadzi do nabycia właściwości angiogennych, tzw. fenotypu angiogennego, który koreluje z postępem choroby. Powikłania zakrzepowo-zatorowe występują w każdym stadium zaawansowania choroby nowotworowej, a ich istnienie może o kilka lat wyprzedzać rozpoznanie choroby nowotworowej lub mogą się one pojawiać w trakcie jej trwania [Wojtukiewicz MZ *et al. Neoplasia* **2001** 3: 371-384]. Fibrynogen i fibryna sprzyjają powstawaniu nowych naczyń w obrębie wytworzonego guza, a sama fibryna (jako białko o plejotropowym działaniu) jest miejscem tworzenia nowych naczyń i bezpośrednio wpływa na proces

angiogenezy w organizmie. Powstawanie nowych naczyń jest procesem ciągłym, związanym z proliferacją komórek śródbłonna i nasilonym wydzielaniem czynników proangiogennych do środowiska. Wokół skupisk komórek nowotworowych stwierdza się wzrost gęstości naczyń krwionośnych oraz zwiększenie ilości fibryny [Collen D *et al. Angiogenesis* **1998** 2: 152-166], wytworzonej z fibrynogenu pod wpływem trombiny w procesie hemostazy.

Proangiogenne działanie fibryny wynika z możliwości wiązania angiogennych czynników wzrostu (między innymi bFGF), które promują migrację i adhezję komórek śródbłonna poprzez modulowanie receptorów integrynowych [Browder *et al. J Biol Chem* **2000** 275: 1521-24]. Identyfikacja miejsc wiązania czynników wzrostu w fibrynie oraz badanie kinetyki ich uwalniania z polimeru fibryny stanowi podstawę do poszukiwania nowych potencjalnych leków anty- i proangiogennych [Sahni A *et al. J Biol Chem* **1999** 274: 14936-14941].

Regulatorową rolę w przekaźnictwie sygnałów i wewnątrzkomórkowych szlaków odpowiadających za syntezę czynników wzrostu, wpływających na proces nowotworzenia, proliferacji i angiogenezy odgrywa jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (**NF-κB** – *nuclear factor kappa B*) [Yamamoto Y, Gaynor RB. *J Clin Invest* **2001** 107: 135-142]. Interakcja z białkiem CD 154, obecnym na limfocytach i niektórych komórkach białaczkowych prowadzi do jego aktywacji. CD154 zwiększa również ekspresję genu będącego pod kontrolą NF-κB, kodującego VEGF [Farahani M *et al. Leukemia* **2005** 19: 524-530]. Aktywacja szlaków zależnych od jądrowego czynnika NF-κB może być zapoczątkowana przez czynnik martwiczy nowotworów (**TNF-α**) bądź jego receptor **TNFR1** [Vila-del Sol V, Fresno M. *J Immunol* **2005** 175: 2825-2833],[Ware CF *et al. J Cell Biochem* **1996** 60: 47-55]. Zasadowy czynnik wzrostu (bFGF) również prowadzi do aktywacji NF-κB [Lee JG, Kay EP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2012** 53: 1530-1538],[Yang LH *et al. Ai Zheng* **2004** 23: 531-534]. Z powyższych względów zainteresowałam się oznaczaniem poziomu

TNF- $\alpha$  oraz NF- $\kappa$ B w badaniach stresu oksydacyjnego, a także wpływu tych czynników na endotelinę-1 (ET-1 – *endothelin-1*) [X].

## ZAŁOŻENIA I CEL NAUKOWY

### I. Wpływ wybranych czynników biochemicznych na fibrynę w procesach hemostazy:

- a/. podczas hipercholesterolemii typu II,
- b/. w zaburzeniach, wywołanych czynnikiem środowiskowym (takim jak *pole magnetyczne*),
- c/. w chorobach nowotworowych (*parametry hematologiczne, czynniki wzrostu, stres oksydacyjny*)

### II. Badanie wpływu obecności zasadowego czynnika wzrostu (bFGF) oraz nowych syntetycznych pochodnych chromonu i kumaryny o działaniu *pro-* lub *antyangiogennym* na tworzenie fibryny oraz jej właściwości fizykochemiczne.

### III. Zastosowanie *angiogennych* czynników wzrostu (bFGF, TGF $\beta$ 1 i PDGF-AB, PDGF-BB) w połączeniu z fibryną jako materiałów regenerujących tkanki (*scaffolds*) oraz ocena wpływu wybranych leków na właściwości powstałego polimeru.

### I. Wpływ wybranych czynników biochemicznych na fibrynę w procesach hemostazy:

- a/. podczas hipercholesterolemii typu II,

- b/. w zaburzeniach, wywołanych czynnikiem środowiskowym (takim jak *pole magnetyczne*),
- c/. w chorobach nowotworowych (*parametry hematologiczne, czynniki wzrostu, stres oksydacyjny*)

a/. Zaburzenia równowagi hemostazy zwiększają możliwość powstawania zakrzepu oraz mają istotną rolę w rozwoju i progresji miażdżycy. Wpływ statyn – leków, stosowanych w hiperlipidemii, wpływających na poszczególne etapy tego procesu, jest przedmiotem wielu badań. W ostatnich latach opublikowano wyniki wielu poważnych badań klinicznych, świadczących o celowości stosowania statyn w prewencji pierwotnej/wtórej chorób układu krążenia, znacząco redukując zarówno chorobowość jak i śmiertelność [Krysiak R *et al. Drugs* 2003 63: 1821-1854]. Zmiany w procesie hemostazy uważane są za ważny etiopatologiczny mechanizm chorób sercowo-naczyniowych, dlatego nieprawidłowości w procesie tworzenia fibryny są przedmiotem zainteresowania różnych dziedzin nauki. Dotychczas wskazywano, że zmiany w strukturze fibryny zależne są od aktywności czynnika XIII, która może być zróżnicowana wystąpieniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNPs) w genach kodujących w/w białka. Skutkuje to zamianą pojedynczego aminokwasu w jego sekwencji pierwszorzędowej – dla czynnika XIII (Val34Leu) oraz fibrynogenu (A $\alpha$  Thr312Ala i B $\beta$ 455G/A). Powyższe zmiany mogą mieć istotny wpływ na funkcje wielu procesów i mogą być przyczyną chorób układu krążenia [Mosseson MW. *Thromb Haemost* 2005 3: 1894-1904],[Staton CA *et al. J Cell Mol Med* 2005 9: 286-302],[Rickles FR *et al. Chest* 2003 124: 58S-68S]. Najczęściej spotykaną przyczyną ostrych zespołów wieńcowych jest zakrzep wewnątrz tętnicy wieńcowej, tworzący się na pękniętej blaszce miażdżycowej. Znajdujący się w bogatolipidowym rdzeniu blaszki miażdżycowej czynnik tkankowy (TF) inicjuje proces krzepnięcia, który poprzez aktywację poszczególnych czynników

proceeds among others to generation of thrombin [Mann KG. *Chest* 2003 124: 4S-10S],[Mann KG. *Circulation* 2011 124: 225-235].

In the framework of a common topic of our Department in cooperation with the Department of Clinical Pharmacology and Therapeutic Monitoring of the Internal Medicine Clinic of the Hospital named after Biegański in Łódź I conducted in patients treated with statins the determination of the degree of generated thrombin (enzyme directly responsible for the formation of fibrin and for hypercoagulability), confirmed in disorders of lipid metabolism [Communications 12-21]. Statins belong to drugs, which lower the level of inflammatory factors (protein C-reactive, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and reduce the expression of tissue factor.

The method of evaluation of the effect of statins: simvastatin, pravastatin and atorvastatin consists in the determination of fibrinogen, the degree of generation of thrombin (GT), the degree of binding of thrombin to fibrin (TZ), the determination of the activity of factor Xa and antithrombin III [I].

In patients with hypercholesterolemia of type II (*hlpII*) treated with atorvastatin, simvastatin and pravastatin at different periods of therapy and at different doses of drugs I performed the determination of fibrinogen, the activity of generated thrombin and thrombin bound to fibrin, the activity of factor X and the activity of antithrombin III. The activity of generated thrombin in the group of patients with a normal lipidogram was lower, in comparison with the values observed in patients with *hlpII* before treatment with atorvastatin ( $p = 0,008$ ), simvastatin ( $p = 0,192$ ) and pravastatin ( $p = 0,504$ ). The activity of thrombin bound to fibrin was at a similar level in all studied groups. After treatment with atorvastatin the activity of generated thrombin ( $p = 0,010$ ) and thrombin bound to fibrin ( $p = 0,033$ ) was significantly lower not only in relation to the value before treatment, but also with the control group ( $p = 0,024$ ).

W wyniku terapii simwastatyną istotnie statystycznie została obniżona wartość GT ( $p = 0,026$ ) i TZ ( $p = 0,028$ ). Wyliczony procentowy udział trombiny związanej ze skrzepem w stosunku do całkowitej aktywności generowanej trombiny wynosił w grupie kontrolnej 38 %. U pacjentów leczonych atorwastatyną TZ stanowiła przed leczeniem 33 %, zaś po leczeniu 28 %; leczonych simwastatyną 38 % i 35 % a prawastatyną odpowiednio 43 i 35 % [III].

W badaniach dotyczących działania statyn u ludzi z hiperlipidemią typu II wykazałam, że wszystkie trzy statyny istotnie zmniejszają całkowitą ilość generowanej trombiny, zaś atorwa- i simwastatyna znamienne obniżają również aktywność generowanej trombiny wolnej i związanej ze skrzepem. W przypadku braku korelacji pomiędzy lipidogramem (TC, cholesterol LDL, TG) a parametrami hemostazy (AT III, GT, TZ, czynnik X, fibrynogen) po leczeniu statynami prawdopodobnie obserwowane zmiany są efektem pozalipidowego działania statyn poprzez istnienie wpływu na układ krzepnięcia, niezależnego od działania hipolipidemicznego [IV, V].

**b/.** Magnetoterapia jest stosunkowo młodą ale coraz częściej stosowaną dziedziną medycyny. Wykorzystuje zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości. Należy ona do naturalnych metod leczniczych, uzupełniających leczenie farmakologiczne i chirurgiczne. Dane literaturowe piśmiennictwa, dotyczące wpływu pola magnetycznego na układ hemostazy wskazują na zmiany, zachodzące w układzie krzepnięcia i hemolizy w wyniku działania stałego pola magnetycznego oraz pól elektromagnetycznych, generowanych w środowisku człowieka i związanych z wykonywanym zawodem [Kazimierska E. *Pol Merk Lek* 2001 55: 9-11]. Nieliczni autorzy, prowadzący badania nad określeniem wpływu pola magnetycznego niskiej częstotliwości stosowanego w magnetoterapii donoszą o zmniejszeniu aktywności koagulacyjnej krwi [Knazeva TA *et al. Vopr Kurortnoi Fizioter Fiz Kult* 1990 4: 11-15].

Badanie wybranych parametrów hemostatycznych wykonałam u zwierząt narażonych na działanie pola magnetycznego niskiej częstotliwości, gdzie szczury rasy *Wistar* poddawane były działaniu zmiennego pola magnetycznego (40 Hz, indukcja 7 mT, kształt pola prostokątny, czas działania 30 i 60 minut) [II]. Pole magnetyczne było generowane przez aparat stosowany w magnetoterapii, typ Magnetronic MF-70). W badaniach tych oznaczyłam: wskaźnik INR (*international normalized ratio*), liczbę płytek krwi, czas protrombinowy oraz aktywność czynnika X metodą amidolityczną z użyciem substratu chromogenego S-2222.

Wyniki badań pozwoliły mi stwierdzić, że pole magnetyczne niskiej częstotliwości stosowane w magnetoterapii powoduje podwyższenie INR, obniżenie aktywności czynnika X oraz zmniejszenie liczby płytek (dla różnic badanych parametrów  $p < 0,05$ ).

c/. W procesie angiogenezy, utrzymanie stabilności czynników wzrostu biorących w niej udział, a także wzrost nowych naczyń krwionośnych zależne są od fibryny. W obrębie guza obserwuje się zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych w porównaniu z tkanką prawidłową oraz zwiększoną aktywację krzepnięcia krwi, prowadzącą do zaburzeń zakrzepowo-zatorowych, stanowiących przyczynę rozwoju nowotworów i występowania przerzutów. Stan ten określa się jako „koagulopatia nowotworowa” [Sierko *et al.* *Nowotwory* 2001 51: 399-409].

Fibryna stanowi szkielet dla migrujących komórek śródbłonna naczyń oraz formowania nowych kapilar, ochrania także wytworzony czop płytkowy oraz jest źródłem uwalnianych śródbłonkowych czynników wzrostu. Fibryna pobudza również ekspresję czynnika tkankowego (TF), proangiogennej interleukiny 8 (IL-8), ułatwia aktywację wielu czynników angiogennych VEGF, bFGF, IGF-1, TGF. Dlatego bFGF stał się przedmiotem moich dalszych badań.

W procesie tworzenia fibryny z N-końca łańcuchów A $\alpha$  i B $\beta$  cząsteczki fibrynogenu odszczepiane są fibrynopeptydy A i B, uważane za *markery aktywności proangiogennej*. Po odszczepieniu fibrynopeptydu B odsłonięta zostaje sekwencja łańcucha  $\beta$ 15-42 w cząsteczce fibryny odpowiedzialna za wiązanie z czynnikami wzrostu bFGF, VEGF, heparyny, oraz za zwiększenie proliferacji fibroblastów. Fragment  $\beta$ 15-42 oddziałuje z endotelialnym białkiem (kadheryna) i śródbłonkowymi receptorami, promując w ten sposób proces angiogenezy i aktywację ważnych czynników *proangiogennych* (m.in. bFGF i VEGF). Stanowi to z jednej strony czynnik sprzyjający wzrostowi naczyń krwionośnych, z drugiej zaś jest mechanicznym wsparciem dla migrujących komórek [Mosseson MW. *Thromb Haemost* 2005 3: 1894-1904].

W celu wyjaśnienia roli wybranych czynników angiogennych i parametrów krzepnięcia w procesach nowotworzenia, prowadziłam we współpracy z Instytutem Ginekologii UM w Łodzi badania, nad rolą bFGF w rozwoju guzów narządów rodnych[VIII]. Stwierdziłam, że w procesie nowotworzenia stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) ściśle koreluje ze zwiększonym stężeniem fibrynogenu i zmianami fizykochemicznymi fibryny. U kobiet chorych wykazałam znaczący wzrost poziomu bFGF w porównaniu z kontrolą (grupa kobiet zdrowych), odpowiednio ( $51,40 \pm 13,72$  pg/cm<sup>3</sup> i  $9,78 \pm 0,88$  pg/cm<sup>3</sup>), podwyższone stężenie fibrynogenu ( $348,26 \pm 64,74$  mg/cm<sup>3</sup> i  $269,23 \pm 29,01$  mg/cm<sup>3</sup> odpowiednio), oraz zwiększenie lepkości fibryny ( $2,63 \pm 0,36$  mPa; dla kontroli  $1,96 \pm 0,63$  mPa). Jednocześnie wykazałam silne działanie antyangiogenne cefazoliny oraz klindamycyny w połączeniu z metronidazolem stosowanych w trakcie pierwszych 72 godzin leczenia guzów.



Zwiększone generowanie reaktywnych form tlenu jest ściśle związane i dysfunkcją śródbłonna naczyń i procesem hypercholesterolemii [Tardif JC. *Can J Cardiol* **2000** 16(D): 2D-4D], i prowadzi do nasilonej produkcji mitogenów oraz czynników wzrostu [Ruef J *et al. Thromb Haemost* **1999** 82: 32-37].

Zwiększenie stężenia reaktywnych form tlenu (**RFT** - anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe) powoduje utlenienie wszelkiego rodzaju białek, znajdujących się w mitochondriach, a także zwiększoną dyfuzję nadtlenu wodoru z mitochondriów, połączenie się z metalami ciężkimi w jądrze i wytworzenie bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego, uszkadzającego jądro DNA, przyczyniając się do powstawania nowotworów, powodując między innymi mutacje w protoonkogenach i supresorach nowotworowych. Działanie wewnątrzkomórkowe RFT jest ściśle powiązane z aktywnością niektórych enzymów: oksydazy NADH/ NADPH, ksantynowej oraz syntazy tlenu azotu. Generowanie wolnych rodników związane jest również z migracją leukocytów we wczesnej fazie zmian miażdżycowych, uszkadzając ściany śródbłonna naczyń, z hiperlipidemią, nadciśnieniem, dysfunkcją śródbłonna, remodelingiem, agregacją płytek krwi oraz lokalnymi stanami zapalnymi [Ross JS *et al. Am J Clin Pathol* **2001** 116(Suppl 1): S97-S101].

Znaczącą, aczkolwiek mało poznaną rolę w procesie nowotworzenia odgrywa jądrowy czynnik transkrypcyjny **NF kappa B** (NF-κB). Jest odpowiedzialny za proces proliferacji, apoptozy i angiogenezy. Wywiera stymulujący wpływ na proces proliferacji, pobudza proces angiogenezy przez zwiększenie ekspresji VEGF oraz TNF-α. Badania nad BAY 11-7082 (selektywnym nieodwracalnym inhibitorem NF-κB) wykazały wpływ na TNFα [Meldrum KK *et al. J Surg Res* **2005** 131: 182-188],[Karin M *et al. Nature Rev* **2002** 2: 301-310],[Seki E *et al. J Hepat* **2007** 47: 307-309], który reguluje różnicowanie i wzrost komórek [Gołąb J *et al. Immunologia*

2004], przez co jest czynnikiem o przeciwnowotworowym działaniu [Cooley WB. *Clin Orthop Relat Res* 1991 262: 3-11]. NF- $\kappa$ B stymuluje również **proces angiogenezy** poprzez nasilenie ekspresji integrzyn  $\alpha v \beta 3$  i bFGF, które w raku jajnika uważane są za markery procesu angiogenezy [Yang LH *et al. Ai Zheng* 2004 23: 531-534].

Endoteliny (*ET*) są to endogenne peptydy zbudowane z 21 aminokwasów, występujące w 3 izoformach: ET-1, ET-2, ET-3 kodowane przez 3 odrębne geny. Właściwości mitogenne ET-1 polegają na pobudzeniu syntezy wtórnych przekaźników, które uwalniają wewnątrzkomórkową pulę jonów wapnia i wpływają na napływ tych jonów z zewnątrz. Dodatkowo na te procesy na drodze para- i autokrynej wpływają czynniki wzrostu bFGF, VEGF, PDGF, EGF [Gancarczyk A *et al. Wiad Lek* 2008 61: 4-6].

Przeprowadzone przez nas badania, miały na celu wyjaśnienie, dlaczego BAY 11-7082 (selektywny, nieodwracalny inhibitor NF- $\kappa$ B) wpływa na poziom reaktywnych form tlenu oraz TNF- $\alpha$  w komórkach wątroby[X]. Czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny była ET-1 w dawkach 1,25 i 12,5 $\mu$ g/kg wagi ciała. Zaobserwowano istotne obniżenie stężenia reaktywnych form tlenu i TNF- $\alpha$  poprzez BAY 11-7082, a także obniżenie ekspresji NF- $\kappa$ B oraz zależnych od NF- $\kappa$ B szlaków sygnałowych, związanych z genem **p21-cip**. Związek ten (BAY 11-7082) okazał się czynnikiem ochraniającym komórki wątroby przed uszkodzeniem spowodowanym stresem oksydacyjnym, wywołanym poprzez działanie ET-1.

## II. Badanie wpływu obecności zasadowego czynnika wzrostu (bFGF) oraz nowych syntetycznych pochodnych chromonu i kumaryny o działaniu pro- lub antyangiogennym na tworzenie fibryny oraz jej właściwości fizykochemiczne.

Wybrane czynniki angiogenne (fibryna, bFGF oraz jego receptor FGFR1) posłużyły jako model do oceny *pro-* lub *antyangiennego* działania nowych związków syntetycznych wcześniej przetestowanych w kierunku ich aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej [Nawrot-Modranka *et al. Acta Pol Pharm - Drug Res* **2007** 63: 429-434],[Nawrot-Modranka *et al. Pharmazie* **2004** 59: 731-732],[Nawrot-Modranka *et al. Eur J Med Chem* **2006** 41: 1301-1309].

Zbadałam:

- a. – wpływ tych związków na fizykochemiczne właściwości fibryny [VI] oraz na wiązanie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) do fibryny [XI].
- b. – wpływ badanych związków na stężenie bFGF w komórkach ludzkiej białaczki HL-60 wraz ze zbadaniem peroksydacji lipidowej [XII].
  - a. Istotnym miejscem (jak wspomniałam wcześniej) w cząsteczce fibryny jest sekwencja  $\beta$ 15-42, która odpowiedzialna jest za interakcję z białkami oraz czynnikami wzrostu: czynnikami wzrostu fibroblastów i śródbłonna. Fibryna pośredniczy w adhezji i rozprzestrzenianiu się komórek śródbłonna poprzez integrynowe białka  $\alpha_v\beta_3$  do miejsca o sekwencji RGD (Arg-Gli-Asp) w pozycji 252-254 oraz 572 - 574 łańcucha  $\alpha$ . Za wiązanie z bFGF odpowiedzialna może być też odsłonięta w procesie plazminowej degradacji fibrynogenu i fibryny sekwencja RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser).

Czynniki wzrostu związane poprzez specyficzne receptory, znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonna indukują proliferację komórek guza, promują angiogenezę i progresję nowotworu, a związane z fibryną chronione są przed proteolityczną degradacją metaloproteinaz (MMPs).

W celu zbadania wpływu omawianych związków na strukturę fibryny usieciowanej przebadałam w warunkach *in vitro* dziesięć nowo zsyntezowanych

pochodnych 4-hydroksykumaryny i chromonu, oznaczając lepkość i polimeryzację fibryny [VI].

Stwierdzono ścisłą zależność między lepkością i strukturą fibryny, za tworzenie której głównie odpowiedzialny jest fibrynostabilizujący czynnik XIII, katalizujący powstawanie wiązań  $\epsilon$ - $\gamma$ -glutamylolizynowych (wiązania krzyżowe).

W przeprowadzonych badaniach wykazałam istotne różnice w działaniu badanych związków w zależności od ich struktury chemicznej oraz stężenia. Badania lepkości całkowicie usieciowanej fibryny (TXL) wykazały, że spośród dziesięciu pochodnych kumaryny i chromonu, cztery powodują obniżenie lepkości fibryny w stężeniach  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  mol/l w stosunku do próby kontrolnej. Słabsze działanie (tylko w stężeniu  $10^{-5}$  mol/l) wykazują dwie pochodne, a trzy nie wpływają na lepkość prób. Kierunek działania badanych związków został potwierdzony badaniami kinetycznymi polimeryzacji fibryny. Związki, które są estrami metylowymi lub fenyłowymi kwasu fosforowego i posiadają grupę metylową na azocie hydrazydowym istotnie wpływają na obniżenie lepkości fibryny.

Zbadano także wpływ uprzednio przetestowanych pod względem aktywności przeciwnowotworowej pochodnych chromonu i kumaryny na proces wiązania bFGF do fibryny [VI, XI]. Wykazanie działania zapobiegającego wiązaniu bFGF z fibryną przez badane związki pozwala stwierdzić, że mogą one wykazywać działanie *antyangiogenne* poprzez hamowanie tworzenia polimerów, jak również i obniżonego stopnia wbudowywania bFGF do fibryny.

Analiza Western-blot wykazała znaczne obniżenie stopnia wiązania bFGF do fibryny pod wpływem trzech związków. W grupie pochodnych kumaryny jeden związek w stężeniu  $10^{-5}$  mol/l i istotnie obniżał szybkość polimerazycji fibryny (w porównaniu do prób kontrolnych) oraz lepkość fibryny (1.82 mPas) w porównaniu z kontrolą (3.93 mPas). Wśród pochodnych chromonu istotne obniżenie lepkości wykazały dwa związki. Okazało się, że istnieje ścisła

zależność pomiędzy strukturą pochodnych fosforohydrazonowych chromonu i kumaryny a ich aktywnością oraz badanymi wartościami pH.

Z przeprowadzonych badań wynika, że pochodne fosforohydrazonowe kumaryny i chromonu powodują obniżanie lepkości i stopnia polimeryzacji fibryny. Spośród pochodnych kumaryny, związki, zawierające podstawnik metylowy przy atomie azotu w układzie fosforohydrazynowym i będących estremii metylowym tiofosforowego kwasu, obniżają zarówno polimeryzację jak i lepkość fibryny. Wśród chromonów takie działanie wykazuje pochodna, zawierająca *N*-metylofosforohydrazonowy podstawnik. Powyższe związki zmniejszają również stopień wiązania bFGF do fibryny wykazując tym samym potencjalne antyangiogenne właściwości.

Wykazanie działania zapobiegającego wiązaniu bFGF z fibryną przez badany związek pozwala stwierdzić, że wykazuje on działanie antyangiogenne poprzez obniżenie stopnia tworzenia polimerów jak również obniżonego stopnia wbudowywania bFGF do fibryny.

**b.** Peroksydacja lipidów to wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych i innych lipidów, w którym powstają ich nadtlarki. Aktywne chemicznie związki powstałe w wyniku tego procesu mogą przemieszczać się do jądra komórkowego i indukować zmiany w strukturze DNA. Dlatego stanowią one grupę związków potencjalnie mutagennych i kancerogennych, prowadzące do mutacji i efektów cytotoksycznych [Kulbacka J *et al.* *Pol Merk Lek* 2009 27: 44-47]. Mutowanie zdrowych komórek w formę nowotworową jest spowodowane aktywacją protoonkogenów i/lub inaktywacją genów supresorowych.

Badane przez nas dwie hydrazonowe pochodne benzo- $\gamma$ -pironu (A-12 i CH3) na komórkach białaczki linii HL-60 wykazały znaczący wpływ na poziom bFGF i TBARS w zakresie odpowiednio -137.20~380.26 % oraz -81.66~ -28.68%, w porównaniu z kontrolą (określoną jako 0 %) [XII].

Obniżenie poziomu bFGF przez te związki świadczy o ich hamującym, a tym samym antyangiogennym działaniu. Niższe stężenia badanych pochodnych wykazują działanie proangiogenne, co może być cenne ze względu na możliwość ich zastosowania w inżynierii tkankowej (*scaffold*).

### III. Zastosowanie angiogennych czynników wzrostu (bFGF, TGF $\beta$ 1 i PDGF-AB, PDGF-BB) w połączeniu z fibryną jako materiałów regenerujących tkanki (*scaffolds*) oraz ocena wpływu wybranych leków na właściwości powstałego polimeru.

Inżynieria tkankowa jest nowoczesną metodą o bardzo szerokim potencjalnym zastosowaniu w leczeniu uszkodzeń tkanki kostnej, skóry, mięśni, naczyń krwionośnych, nerwów czy narządów wewnętrznych. Jednym z podstawowych celów inżynierii tkankowej jest wytworzenie bioaktywnej i biodegradowalnej membrany (*scaffold*), która poprzez miejscowe uwalnianie czynników wzrostu wspomaga regenerację tkanki [Leor J *et al. Pharm Ther* **2005** 105: 151-163]. Substancje lecznicze, w tym także białka związane kowalencyjnie z polimerem mogą być „uwięzione” pomiędzy łańcuchami polimeru a następnie uwalniane podczas jego degradacji zapewniając stopniowe działanie czynników wzrostu po implantacji membrany [Langer R *et al. Science* **1993** 260: 920-926],[Mistry AS *et al. Adv Biochem Eng Biotechnol* **2005** 94: 1-22].

Używane do regeneracji tkanek membrany muszą spełniać ściśle określone wymagania. Powinny zapewniać tymczasowe wsparcie mechaniczne uszkodzonego fragmentu tkanek, służyć jako magazyn dla odkładania osteoidów (regeneracja kości), posiadać porowatą strukturę dla zapewnienia wspomaganie migracji komórek i oraz ich różnicowania we wnętrzu membrany.

Podstawowym założeniem inżynierii tkankowej jest wykorzystanie naturalnej odpowiedzi biologicznej uszkodzonej tkanki, poprzez implantację membran stymulujących wzmożoną reakcję biologiczną sąsiadujących z nią komórek. Membrany powinny w sposób kontrolowany uwalniać bioaktywne czynniki wzrostu, które stymulują regenerację tkanek i stosowane w trakcie choroby leki. Idealna membrana powinna imitować naturalne środowisko organizmu w miejscu implantacji oraz ulegać biodegradacji w ustroju bez wywoływania niepożądanych odpowiedzi fizjologicznych.

Skuteczność i wysoką wydajność terapii w inżynierii tkankowej uzyskuje się poprzez implantowanie naturalnych lub syntetycznych membran, o odpowiednich właściwościach fizycznych, mechanicznych i biologicznych oraz kontrolowane, stopniowe uwalnianie czynników wspomagających regenerację tkanki. Pod względem wymienionych wymagań, najbardziej przydatne okazały się być polimery naturalne, takie jak fibryna, kolagen, żelatyna, które ulegają całkowitej biodegradacji, uwalniają bioaktywne czynniki w sposób kontrolowany oraz posiadają odpowiednią biokompatybilność i biodegradowalność. Spośród używanych do tego celu wielu materiałów (polimery naturalne, polimery syntetyczne, materiały nieorganiczne), okazało się, że naturalny kolagen oraz fibryna wykazują małe ryzyko wystąpienia stanów zapalnych, brak odpowiedzi immunologicznej, małą toksyczność oraz zwiększoną zdolność adhezji komórek. Fibryna z uwagi na swoją budowę i zdolność wiązania z innymi białkami i peptydami jest zasadniczym biopolimerem stosowanym obecnie w inżynierii tkankowej w postaci membran. Przykładem stosowanych preparatów leczniczych uznanych przez Międzynarodową Komisję Agencji ds. Żywności i Leków, FDA (*Food and Drug Administration*), opartych na żelu fibrynowym są: *Tissel*, *Beriplast*, *Biocol*, *Tussicol*, *Tachocomb*, *Fibrin Sealant FS* [Curie LJ *et al. Plast Reconstr Surg* **2001** 108: 1713-26],[Achmed TAE *et al. Tissue Eng* **2008** 14: 199-215],[Janmey PA *et al. J R Soc Interface* **2009** 6: 1-10].

Według oceny FDA materiał do wytwarzania membran powinien zachować swoje mechaniczne właściwości przez okres co najmniej 1 – 3 miesięcy po implantacji i powinien ulegać całkowitej biodegradacji na drodze metabolicznej w czasie nie dłuższym niż 12 – 18 miesięcy [Lee SH, Shin H. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 59: 339-359]. Czynniki wzrostu, które wiążą się ze specyficznymi receptorami błony komórkowej odgrywają znaczącą rolę w inżynierii tkankowej. Szczególne znaczenie posiada płytkowy czynnik wzrostu, który jest dimeryczną glikoproteiną zaangażowaną w regulację podziałów komórkowych, migrację oraz wzrost komórek w procesie angiogenezy [Sun B *et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 91B: 366-372].

W moich badaniach opracowałam technologię wytwarzania nowych fibrynowych nośników (*scaffold*), przeprowadziłam ocenę ich właściwości fizykochemicznych i stosując metodę immunoenzymatycznego testu ELISA określiłam kinetykę uwalniania w czasie, wybranych czynników wzrostu z wytworzonych membran bez i w obecności leków stosowanych podczas zabiegów.

W przedstawionych doświadczeniach, we współpracy z Zakładem Farmacji Stosowanej UM w Łodzi, Instytutem Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi oraz Kliniką Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej i Onkologicznej UM przeprowadziłam badania membran z zastosowaniem zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów, transformującego czynnika wzrostu beta-1 i płytkowych czynników wzrostu: PDGF-AB, PDGF-BB.

1. Opracowałam charakterystykę parametrów fizykochemicznych dla membran chitozanowo-alginianowych oraz określiłam kinetykę uwalniania dla PDGF-AB i TGF- $\beta$  z membrany chitozanowo-alginianowej [V] oraz TGF- $\beta$ 1 z membrany chitozanowej (Ch) i fibrynowo-chitozanowej (Fb-Ch) [IX]. Stopień uwalniania płytkowego czynnika wzrostu jest znacznie wyższy w porównaniu z



uwalnianiem transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ ). Najbardziej korzystne cechy wykazała warstwowa membrana chitozanowo-fibrynowa. Stopień uwalniania płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) okazał się znacznie wyższy w porównaniu z uwalnianiem czynnika transformującego (TGF- $\beta$ ). Stężenie uwolnionego czynnika płytkowego z badanej membrany po 3 godzinach inkubacji wynosiła  $255,41 \pm 8,82$  ng/ml, przy współczynniku wiązania 3,53, następnie ulegał obniżeniu i po 5 godzinach inkubacji wynosił  $217,24 \pm 13,9$  ng/ml, przy współczynniku wiązania 4,14. Stężenie transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ ) uwalnianego w doświadczeniu było najwyższe w pierwszej godzinie ( $114,2 \pm 9,61$  ng/ml, współczynnik wiązania 1,12), natomiast w trzeciej i piątej godzinie wynosił odpowiednio  $11,53 \pm 2,70$  ng/ml (współczynnik wiązania 11,06) oraz  $19,04 \pm 2,00$  ng/ml (współczynnik wiązania 6,58). Z badań moich wynika, że membrana chitozanowo-alginianowa jest lepszym nośnikiem dla płytkowego czynnika (PDGF-AB) w porównaniu z TGF- $\beta$ . Wyniki te sugerują, że zastosowanie płytkowego czynnika wzrostu i nośnika w postaci membran chitozanowo-alginianowych może mieć duże praktyczne zastosowanie w regeneracji tkanek. Różnice w szybkości uwalniania płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) i transformującego czynnika beta (TGF- $\beta$ ), wynika prawdopodobnie z ich różnego powinowactwa do użytego złoża polimerowego.

Zastosowanie leków (antybiotyków lub chemioterapeutyków) w membranie i ich stopniowe uwalnianie w ustroju może zapobiegać możliwości wystąpienia infekcji lub może być użyte w leczeniu miejscowych zmian nowotworowych. Wystąpienie infekcji wiąże się ze spowolnieniem procesu gojenia i regeneracji uszkodzonej tkanki, a tym samym znacznym obniżeniem skuteczności długoterminowych implantacji, szczególnie ważnych w ortopedii. Profilaktyczne stosowanie antybiotyków w membranach syntetycznych zmniejsza ryzyko infekcji aż o 81%.

2. Przeprowadziłam dlatego ocenę kinetyki uwalniania czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) w obecności ketoprofenu z membran fibrynowych, chitozanowych i fibrynowo-chitozanowych oraz wyselekcjonowanie najbardziej przydatnej w praktyce membrany charakteryzującej się szybkim uwalnianiem czynnika wzrostu a jednocześnie powolnym uwalnianiem leku [VII].

Największy wpływ ketoprofenu na uwalnianie zasadowego czynnika wzrostu wykazałam dla membrany chitozanowej. Czas, po którym zostało uwolnione z membrany 20% bFGF był on znacznie skrócony (2,1 godzin w obecności ketoprofenu i 10,1 godzin w kontroli). Podobnie niższy był stopień uwalniania czynnika wzrostu w obecności ketoprofenu dla membran fibrynowych, natomiast nie wykazałam takiej zależności w przypadku membrany fibrynowo-chitozanowej.

3. W moich dalszych badaniach przeprowadziłam ocenę bardzo przydatnych w praktyce membran chitozanowych (MCCh), kolagenowych (Coll) i chitozanowo-kolagenowych (MCCh-Coll) w obecności amoxicyliny – antybiotyku często stosowanego w implantologii kości [XIII]. Proces uwalniania PDGF-BB i amoxicyliny z badanych membran był dwufazowy. Pierwsza faza (8 godzin) charakteryzowała się nagłym uwalnianiem czynnika, podczas gdy w drugiej fazie (do 10 dni) uwalnianie było znacznie powolniejsze. Membrana złożona z chitozanu i kolagenu (MCCh-Coll), okazała się być najbardziej użyteczną z uwagi na szybkie uwalnianie PDGF-BB, znaczącego w procesie regeneracji tkanek angiogenego czynnika wzrostu oraz na powolne uwalnianie antybiotyku (amoxicyliny), która pełni ochronną rolę przed zakażeniem w procesie regeneracji.

## WNIOSKI

1. W celu efektywnego monitorowania procesu nadkrzepliwości u ludzi z zaburzeniami sercowo-naczyniowymi i w ocenie działania statyn (simwa-, prawa-, oraz atorwastatyny), stosowanych w leczeniu hypercholesterolemii typu II, opracowałam i wdrożyłam do badań:

- metodę pomiaru generacji trombiny,
- metodę pomiaru trombiny związanej ze skrzepem,
- amidolityczną metodę oznaczania czynnika Xa

Pomiary tych parametrów stały się również przydatne w profilaktyce geriatrycznej oraz w ocenie wpływu pola magnetycznego o małych częstotliwościach na przebieg hemostazy.

2. W badaniach dotyczących kobiet, obciążonych nowotworami narządów rodnych stwierdziłam, że w procesie nowotworzenia aktywacja zasadowego czynnika wzrostu (bFGF) związana jest ze znacznym wzrostem poziomu fibrynogenu oraz zmianami fizykochemicznymi fibryny. Wykazałam silne antyangiogenne działanie cefazoliny w połączeniu z metronidazolem i celowość ich stosowania w leczeniu guzów narządów rodnych.

3. Wykazałam wpływ nowych zsyntetyzowanych związków pochodnych chromonu i kumaryny na proces polimeryzacji i lepkość fibryny. Spośród ośmiu badanych pochodnych w stężeniach  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  mol/l, dwie pochodne chromonu oraz jedna pochodna kumaryny istotnie hamowały przebieg procesu polimeryzacji fibryny. Obniżenie lepkości fibryny potwierdzono dla trzech pochodnych. Stwierdzono także istotny wpływ badanych związków na poziom bFGF i peroksydację lipidów.

4. Zbadałam wpływ fosforohydrazonowych pochodnych chromonu (10 związków) na przebieg procesu polimeryzacji fibryny w obecności

proangiogenego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) w zależności od pH środowiska. Analiza Western-blot wskazuje na wiązanie zasadowego czynnika wzrostu z dimerami  $\gamma$ - $\gamma$  i polimerami fibryny. Trzy związki istotnie obniżały przebieg procesu polimeryzacji, obniżały wiązanie zasadowego czynnika wzrostu (bFGF) do fibryny przy badanych wartościach pH, co wskazuje na ich antyangiogenne działanie.

5. W moich badaniach opracowałam metody wytwarzania nowych nośników (*scaffold*). Przeprowadziłam ocenę fizykochemicznych parametrów wybranych membran oraz kinetykę uwalniania z nich angiogenych czynników wzrostu, co pozwala mi stwierdzić że:

a/. przeprowadzone badania kinetyki uwalniania z dwuwarstwowej membrany chitozano-alginianowej wykazały znacznie szybszy stopień uwalniania PDGF-AB w porównaniu z TGF- $\beta$ .

b/. membrana fibrynowo-chitozanowa i fibrynowa są dobrymi nośnikami dla transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ 1).

c/. membrana fibrynowo-kolagenowa jest skutecznym nośnikiem dla PDGF-BB w obecności amoxycyliny.

6. Przebadany inhibitor stresu oksydacyjnego BAY 11-7082 (selektywny i nieodwracalny inhibitor NF- $\kappa$ B) może być stosowany jako związek który chroni wątrobę przed uszkodzeniem przez stres oksydacyjny. Potwierdziłam jednocześnie, że BAY 11-7082 hamuje zwiększone uwalnianie angiogenego czynnika (TNF- $\alpha$ ), które może być wynikiem zmniejszonej ekspresji NF- $\kappa$ B oraz zależnych od NF- $\kappa$ B szlaków sygnałowych, związanych z genem p21-cip.

## KONTYNUACJA BADAŃ

Obecnie prowadzę badania, zmierzające do oceny pro- i antyangiogenego działania nowosyntetyzowanych w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej pochodnych benzo- $\gamma$ -pironu na komórki czerniaka linii WM-115 i komórki raka sutka MCF-7. Wyselekcjonowane związki o działaniu *proangiogennym* użyję do badań na fizjologicznych liniach komórek fibroblastów w celu badania procesu migracji oraz procesu gojenia (*wound healing*), mającego decydujące znaczenie w inżynierii tkankowej. Związki o *antyangiogennym* profilu zostaną użyte do dalszych badań jako inhibitory wybranych czynników wzrostu charakterystycznych dla danego typu nowotworu.

Podobny kierunek badań dotyczyć będzie selektywnego doboru membran, mających również zastosowanie w inżynierii tkankowej. Struktura, właściwości fizykochemiczne, kinetyka uwalniania czynników wzrostu w zależności od stężenia w obecności stosowanych leków, a także badania nowo syntetyzowanych pochodnych kumaryny i chromonu o charakterze *proangiogennym*, jak i próba ich klinicznego zastosowania pozostaną przedmiotem moich badań.

### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Poruszając się w polu podobnych zagadnień:

Przeprowadziłam także badania dotyczące wyjaśnienia wpływu **apocyniny** (inhibitora oksydazy NADPH) na stres oksydacyjny, indukowany edoteliną 1 (*ET-1*). W trakcie naszych badań stwierdzono, że ET-1 wywołuje stres oksydacyjny, redukuje stosunek GSH do GSSG, stymuluje peroksydację lipidów i zwiększa poziom TNF-alfa w zależności od dawki.

Zastosowanie apocyniny zaś zmniejsza stres oksydacyjny, jak również i poziom TNF-alfa, co tłumaczy tworzenie ROS na drodze zależnej od aktywności oksydazy NADPH [Kleniewska P., Michalska M., Gorąca A. The influence of NADPH oxidase inhibition on oxidative stress parameters in rat hearts. *Pharmacol Reports* 2013, 65(4), *przyjęto do druku*].

Zbadałam również wpływ badanych związków na stężenie wybranych czynników angiogennych (zasadowy czynnik wzrostu (*bFGF*) i jego receptor FGFR1) w komórkach czerniaka linii WM-115 pod wpływem pochodnych chromonu i kumaryny w przedziale stężeń  $5 \cdot 10^{-4}$  -  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/l.

Odnotowano ścisłą zależność pomiędzy zastosowanym stężeniem badanych pochodnych a ich wpływem zarówno na poziom zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów, jak i na jego receptor. [*Praca w przygotowaniu*].

## NAGRODY I WYRÓŻNIENIA NAUKOWE

**1979** - Indywidualna dydaktyczna nagroda rektorska III stopnia

**1985** - Indywidualna dydaktyczna nagroda rektorska III stopnia

**1989** - Indywidualna naukowa nagroda rektorska III stopnia

**1992** - Zespołowa naukowa nagroda Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej III stopnia

**1994** - Indywidualna naukowa nagroda rektorska III stopnia

**2002** - Medal Akademii Medycznej w Łodzi

**2010** - Zespołowa naukowa nagroda rektorska III stopnia

## ZNACZĄCE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

Od roku 1972 prowadzę wielokierunkowe badania, podczas których nawiązałam współpracę naukową z niżej wymienionymi jednostkami naukowo-badawczymi w Łodzi:

- *Pracownia Hematologiczna Kliniki Chirurgii Ogólnej Szpitala N.*

*Barlickiego UM*

- *Zakład Amin Biogennych Polskiej Akademii Nauk*

- *Zakład Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UM*

- *Zakład Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego UM*

- *Zakład Chemii Bionieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego UM*

- *Zakład Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego UM*

- *Zakład Chemii Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UM*

- *Instytut Medycyny Pracy*

- *Oddział Farmakologii i Terapii Monitorowanej Kliniki Chorób*

*Wewnętrznych UM*

- *Instytut Ginekologii Szpitala im. Madurowicza*

- *Klinika Chirurgii Czaszkowo-Twarzowej i Onkologicznej UM*

- *Zakład Endodoncji Katedry Stomatologii Zachowawczej, Endodoncji  
i Periodontologii UM*

- *Zakład Fizjologii Krążenia Katedry Fizjologii Doświadczalnej UM*

W trakcie moich badań naukowych przyznawano mi następujące finansowanie:

Badania własne nr: 502-13-752, 502-16-109 oraz 502-13-229

Badanie statutowe nr 503-315-2

Szczegóły innych moich osiągnięć naukowo-badawczych są opisane w załącznikach 4-9.

*M. Michalska*