

AUTOREFERAT

Sylwia Łukasiewicz

Kraków 2019

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

INTERAKCJE NANOKAPSUŁKA - KOMÓRKA DOCELOWA

– BADANIA W KIERUNKU OPRACOWANIA NANONOŚNIKA DLA KŁOZAPINY.

4.2 Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

[H1] Łukasiewicz S, Szczepanowicz K. (*) In vitro interaction of polyelectrolyte nanocapsules with model cells. *Langmuir* (2014) 30:1100-1107. doi: 10.1021/la403610y.

IF 2014=4.457, IF5=4.543, MNiSW=35, Liczba cytowań=18

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji. Opracowaniu protokołów do eksperymentów biologicznych, przeprowadzeniu doświadczeń wstępnych. Wykonaniu wszystkich doświadczeń biologicznych. Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu (za wyjątkiem fragmentów opisujących doświadczenia chemiczne), odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam kierownikiem projektu naukowego obejmujących badania opisane w niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 50% (w części biologicznej – 100%).

[H2] Łukasiewicz, S. (*), Szczepanowicz, K., Błasiak, E., Dziejicka-Wasylewska, M. Biocompatible Polymeric Nanoparticles as Promising Candidates for Drug Delivery. *Langmuir* (2015) 31:6415-6425. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b01226.

IF 2015=3.993, IF5=4.210, MNiSW=35, Liczba cytowań=18

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu ich realizacji. Koordynowaniu wszystkich zadań badawczych. Wykonaniu wszystkich doświadczeń biologicznych (Cell Culture; Cell Viability and Cytotoxicity Assays: MTT Reduction Test, LDH Cytotoxicity Detection; Vybrant Phagocytosis Assay; Flow Cytometry Experiments; Morphological Studies of THP-1 Cell Differentiation) oraz zaplanowaniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Confocal Microscopy Imaging). Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu (za wyjątkiem fragmentów opisujących doświadczenia chemiczne), zredagowaniu całości pracy, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam kierownikiem projektu naukowego obejmujących badania opisane w niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 80% (w części biologicznej – 90%).

[H3] Łukasiewicz S (*), Szczepanowicz K, Podgórna K, Błasiak E, Majeed N, Ogren S.O.Ö, Nowak W, Warszyński P, Dziedzicka-Wasylewska M. Encapsulation of clozapine in polymeric nanocapsules and its biological effects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2016) 140:342-352. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.044.

IF 2016=3.887, IF5=4.295, MNiSW=35, Liczba cytowań=12

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji. Koordynowaniu wszystkich zadań badawczych. Wykonaniu wszystkich doświadczeń biologicznych (Cell Culture; Cell Viability and Cytotoxicity Assays: MTT Reduction Test, LDH Cytotoxicity Detection; Vybrant Phagocytosis Assay; Flow Cytometry Experiments) zaplanowaniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Confocal Microscopy Imaging), zaplanowaniu i współdziałaniu w wykonaniu eksperymentów dotyczących biodystrybucji nanokapsulek (CLO-NCs biodistribution), sformułowaniu potrzeby wykonania eksperymentów dotyczących badań behawioralnych (Behavioral studies) oraz nawiązaniu współpracy z wykonawcami powyższych eksperymentów. Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu (za wyjątkiem fragmentów opisujących doświadczenia chemiczne), zredagowaniu całości pracy, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam kierownikiem projektów naukowych obejmujących badania opisane w tej niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 65% (w części biologicznej – 75%).

[H4] Łukasiewicz S (*), Błasiak E, Szafran-Pilch K, Dziedzicka-Wasylewska M. Dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor interaction in the context of the effects of antipsychotics - in vitro studies. *J Neurochem*. (2016) 137:549-560. doi: 10.1111/jnc.13582

IF 2016=4.083, IF5=3.973, MNiSW=30, Liczba cytowań=14

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji. Koordynowaniu wszystkich zadań badawczych. Wykonaniu wszystkich doświadczeń za wyjątkiem doświadczeń immunohistochemicznych oraz pomiarów FLIM. Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu, zredagowaniu całości pracy, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam kierownikiem projektu naukowego obejmujących badania opisane w niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

[H5] Łukasiewicz S(*), Błasiak E, Szczepanowicz K, Guzik K, Bzowska M, Warszyński P, Dziedzicka-Wasylewska M. The interaction of clozapine loaded nanocapsules with the hCMEC/D3 cells - In vitro model of blood brain barrier. *Colloids Surf B Biointerfaces*. (2017) 1:200-210. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.053

IF 2017=3.997, IF5=4.294, MNiSW=35, Liczba cytowań=0

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji. Koordynowaniu wszystkich zadań badawczych. Współdziałaniu w wykonaniu doświadczeń biologicznych (Cell Culture; Cell Viability and Cytotoxicity Assays: Cell Titer blue Test, Luminescence ATP Detection Assay, LDH Cytotoxicity Detection; Flow Cytometry Experiments; Transcytosis experiments) zaplanowaniu eksperymentów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Confocal Microscopy Imaging), zaplanowaniu i współdziałaniu w wykonaniu eksperymentów dotyczących komórek *hMDMs*. Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu (za wyjątkiem fragmentów opisujących doświadczenia chemiczne), zredagowaniu całości pracy, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam głównym wykonawcą projektu naukowego obejmujących badania opisane w niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 65% (w części biologicznej – 70%).

[H6] Łukasiewicz S. (*), Fic E, Bzowska M, Dziejdzicka-Wasylewska M. Isolation of human monoclonal scfv antibody specifically recognizing the D2-5-HT1A heteromer. Journal of New Developments in Chemistry (2019) 2:18-25. doi: 10.14302/issn.2377-2549.jndc-19-2736

Liczba cytowań=0

(*) – autor korespondujący

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji, sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji. Samodzielnym wykonaniu większości zadań badawczych oraz planowaniu i koordynowaniu pozostałych eksperymentów. Analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu, zredagowaniu całości pracy, odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korekcie manuskryptu wg ich zaleceń. Ponadto byłam kierownikiem projektów naukowych obejmujących badania opisane w tej niniejszej pracy. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

4.3 Przedstawienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1 Tło naukowe

Schizofrenia - uznawana za jedną z najpoważniejszych chorób psychicznych - zaliczana jest do chorób przewlekłych uwarunkowanych wieloczynnikowo (zarówno aspekty biologiczne, biochemiczne jak i czynniki społeczne skorelowane są z występowaniem tej jednostki chorobowej) o nie w pełni poznanej etiologii. Dotyka ona ok. 1% populacji na świecie i wciąż pozostaje bez zadowalająco efektywnej terapii [1]. W krajach rozwiniętych schizofrenia klasyfikowana jest wśród 10 najczęstszych przyczyn niepełnosprawności społecznej obywateli. Powszechnie choroba ta kojarzona jest z halucynacjami, urojeniami i omamami zaliczanymi do tzw. objawów wytwórczych ale w jej przebiegu pojawiają się również tzw. objawy ubytkowe (m.in. zaburzenie prawidłowego funkcjonowania społecznego i emocjonalnego chorych, zmniejszenie zdolności do wyrażania emocji, upośledzenie mowy i czynności wolicjonalnych) oraz zaburzenia poznawcze (m.in. zaburzenia uwagi, koncentracji, pamięci i funkcji wykonawczych) [2]. W przebiegu choroby poza zmianami behawioralnymi obserwuje się również zmiany strukturalno-funkcjonalne wewnątrz mózgu (atrofia i zmniejszenie aktywności neuronów w obrębie kory mózgowej). Badania neuroobrazowe wskazują na znaczny ubytek tkanki nerwowej w przedniej części zakrętu obręczy, tylnym zakręcie skroniowym oraz zakręcie czołowym górnym [3].

Podstawę terapii schizofrenii stanowi leczenie farmakologiczne, choć ogromną rolę przypisuje się również socjo- i psychoterapii oraz psychoedukacji skierowanej nie tylko do pacjentów ale również do ich rodzin i ludzi z najbliższego środowiska. Nie dziwi zatem fakt, że jest to jedna z najbardziej kosztownych chorób psychicznych. Statystyki dotyczące

skuteczności terapii nie są jednoznaczne. Jednakże można stwierdzić, iż jedynie 1/3 pacjentów odpowiada na leczenie pozytywnie, a zastosowane środki pozwalają chorym na w miarę normalne funkcjonowanie. W pozostałych przypadkach poprawa stanu zdrowia nie następuje albo jest niesatysfakcjonująca [4]. Z uwagi na złożony charakter choroby niemożliwym jest opisanie jej przyczyn za pomocą jednej spójnej teorii. Kluczowym zaburzeniem na poziomie biochemicznym obserwowanym w przebiegu schizofrenii jest nieprawidłowe funkcjonowanie neuroprzebieżnictwa w mózgu, co stało się podstawą opracowania kilku hipotez rozwoju choroby, jak koncepcja dopaminowa, serotoninowa czy glutaminianergiczna [1,5]. Jak wspomniano powyżej, obecnie nie są znane metody prowadzące do całkowitego wyleczenia schizofrenii, a podawane substancje terapeutyczne skupiają się na usunięciu objawów choroby i zapobieganiu ich nawrotom. Po raz pierwszy leki o charakterze przeciwpsychotycznym (tzw. klasyczne neuroleptyki) zastosowano w latach 50tych XX wieku. Ich działanie – poprzez blokadę receptorów dopaminowych D₂ (D₂R) w prążkowie – prowadzi do zniesienia objawów wytwórczych, nie wpływając jednak znacząco na pozostałe objawy choroby [6,7]. Ponadto ich długotrwałe stosowanie skutkuje pojawieniem się niekorzystnych działań ubocznych związanych z wystąpieniem głównie tzw. objawów pozapiramidowych, EPS (ang. *extrapyramidal syndrome*), skorelowanych z układem ruchu; są to m.in. drżenia, sztywność, skurcze, ruchy mimowolne, niepokój ruchowy, późne dyskinezy. Inne niepożądane skutki działania leków przeciwpsychotycznych to między innymi: blokowanie aktywności acetylocholino (manifestujące się poprzez pogorszenie ostrości wzroku, zaparcia, zawroty głowy), sedacja, napady padaczkowe, przyrost masy ciała, wzrost stężenia prolaktyny (może powodować mlekotok, hamować owulację, obniżać popęd płciowy) oraz złośliwy zespół neuroleptyczny (potencjalnie śmiertelne powikłanie powodujące problemy z oddychaniem i czynnością serca) [6,7]. Kolejnym rodzajem farmaceutyków wprowadzonych do kliniki w latach 90tych XX wieku są tzw. neuroleptyki atypowe (II generacji). Wykazują one działanie poprzez wpływ głównie na przebieżnictwo zarówno dopaminergiczne jak i serotoninergiczne, ale także na inne klasy neuroreceptorów i cechują się skutecznością w kierunku objawów tak wytwórczych jak i ubytkowych a, co ważne, nie wywołując przy tym EPS [8]. Obecnie receptor serotoninowy 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}R) uważany jest za obiecujący dodatkowy cel działania neuroleptyków atypowych [7,8]. Doniesienia wskazują, że aktywacja tych receptorów zapobiega m.in. objawom EPS wywołanym przez blokadę D₂R, nasila neurotransmisję dopaminergiczną w korze czołowej, ma pozytywny wpływ na nastrój [8]. Dlatego obserwuje się obecnie rosnące zainteresowanie środkami przeciwpsychotycznymi tzw. "III generacji", które mają za

zadanie radzić sobie z pozytywnymi objawami poprzez interakcje z D₂R (efekt blokowania) i jednocześnie z objawami ubytkowymi i deficytami poznawczymi poprzez aktywację 5-HT_{1A}R. Na te działania mają również wpływ dodatkowe interakcje z innymi typami receptorów jak: serotoninowe 5-HT_{2A/2C}, glutaminianergiczne mGluR2/3 czy NMDA [9,10,11].

Jednak pomimo coraz lepszego profilu działania leków atypowych i one nie pozostają bez negatywnego wpływu na organizm pacjenta. Zarówno badania kliniczne jak i eksperymentalne wskazują, że osłabienie efektów niepożądanych nie jest całkowite, co prawdopodobnie związane jest z niespecyficznym działaniem leku [12]. Dlatego też wciąż trwają badania skupiające się na poszukiwaniu nowych substancji o większej skuteczności terapeutycznej. Punktem odniesienia dla tych poszukiwań jest klozapina, zaliczana do grupy neuroleptyków atypowych. Lek ten jest stosowany w klinice, nie jest jednak pozbawiony poważnych objawów ubocznych, takich jak: zapalenie mięśnia sercowego, arytmia, zwiększenie masy ciała, zaburzenia metaboliczne, a przede wszystkim agranulocytoza [13,14]. Z powodu ryzyka wystąpienia ww. powikłań stosowanie klozapiny jest często ograniczone, jednak lek ten okazuje się skuteczny w leczeniu lekoopornej schizofrenii, u pacjentów, u których stosowanie innych leków nie przynosi oczekiwanych rezultatów [15]. Dokładny mechanizm działania klozapiny nie jest do końca poznany, jednakże wydaje się, że dodatkowe powinowactwo do receptorów serotoninowych odgrywa tutaj istotną rolę [10,11]. Mimo, że klozapina jest dobrze wchłaniana po podaniu doustnym, lek ten charakteryzuje zasadniczo słaba biodostępność (<27%), co związane jest z efektywnym metabolizmem w wątrobie [16,17]. Z drugiej strony, krótki okres półtrwania leku w osoczu wskazuje na szybki klirens [16,17]. Obecnie, pomimo dużych nakładów finansowych i związanych z tym szerokich badań a także postępów w opracowaniu nowych środków farmakologicznych, skuteczność dostępnych terapii schizofrenii jest wciąż niezadawalająca. Wydaje się, że podstawowym problemem i głównym ograniczeniem farmakoterapii jest nieselektywne dostarczanie leków do dotkniętej chorobą części mózgu. Niestety, dostępne środki przeciwpsychotyczne, które powinny być adresowane tylko do niewielkiej populacji komórek, dostarczane są do wszystkich obszarów mózgu, wykazując niespecyficzne działanie w wielu niepożądanych rejonach, w konsekwencji prowadząc do wygenerowania trudnych i ciężkich do wyeliminowania skutków ubocznych. Nie dziwi zatem fakt, iż opracowanie skutecznej strategii leczenia schizofrenii stanowi jedno z ważniejszych wyzwań współczesnej neuronauki.

Obecnie zastosowanie nanotechnologii w farmakologii molekularnej przyciąga coraz więcej uwagi. Jednym z wiodących nurtów nanomedycyny jest próba wykorzystania leków przyłączonych do nanocząstek w terapii wielu chorób. Nanocząsteczkowe systemy transportu substancji aktywnych stwarzają bowiem nowe możliwości, pozwalają między innymi na osiągnięcie efektu terapeutycznego tylko w wybranym, dobrze zdefiniowanym miejscu docelowym, tym samym prowadząc do zmniejszenia bądź eliminacji niepożądanych skutków ubocznych, związanych głównie z nieselektywnym działaniem leków [18,19]. Głównymi zaletami nanonośników są ich subkomórkowe rozmiary i tkankowo-komórkowa biokompatybilność. Dla różnych nanoformulacji wykazano poprawę kompatybilności lipofilowych, słabo rozpuszczalnych w wodzie lub nawet nierozpuszczalnych w wodzie substancji czynnych czy zwiększoną przenikalność i absorpcję leku [20,21]. Enkapsulacja leku wydłuża okres jego działania chroniąc przed szybkim wychwytem i degradacją, a poprzez kontrolę uwalniania dawki umożliwia utrzymanie koncentracji leku na poziomie wymaganego stężenia terapeutycznego. Strategia taka pozwala zatem na redukcję wielkości i częstości stosowanych dawek [21,22]. Dodatkowo, odpowiednia funkcjonalizacja powierzchni nanonośnika umożliwia tzw. „*intelligent targeting*”, czyli uwalnianie leku w odpowiednim miejscu przeznaczenia [23]. Dzięki temu nanoterapeutyki mają zdolność „*wykonania złożonych operacji*” we właściwym miejscu i czasie w organizmie pacjenta, w przeciwieństwie do dotychczas opracowywanych preparatów, których największą słabością jest właśnie nieselektywność. Wszystkie wspomniane powyżej cechy w konsekwencji prowadzą do obniżenia negatywnych skutków ubocznych terapii. Selekttywne dostarczanie substancji aktywnych wymaga odpowiedniej modyfikacji powłok kapsulek, do których wbudowuje się elementy zewnętrzne, tzw. ligandy kierunkowe w celu uzyskania rozpoznawania molekularnego w pożądanym miejscu docelowym. Jednym z najlepszych ligandów kierunkowych są fragmenty przeciwciał monoklonalnych scFv (ang. *single chain variable fragments*), które – z uwagi na stosunkowo niewielki rozmiar, wyższy w porównaniu do innych typów ligandów stopień specyficzności wiązania, a także brak regionu aktywującego dopełniacz i domeny Fc (co bezpośrednio przekłada się na redukcję immunogenności modyfikowanej nanokapsułki) [23] – są coraz częściej wykorzystywane do funkcjonalizacji nanonośników. Podsumowując, metody terapeutyczne oparte na nanotechnologii zapewniają niespotykaną jak dotąd kontrolę nad zachowaniem leku w organizmie, dając tym samym możliwość ukierunkowanego leczenia.

4.3.2 Cel

Biorąc pod uwagę powyższe, w prowadzonych przeze mnie badaniach, których wyniki zebrano w 6 publikacjach oryginalnych pod wspólnym tytułem **„Interakcje nanocząstka-komórka docelowa - badania w kierunku opracowania nanonośnika dla klozapiny”** podjęto działania prowadzące do wykorzystania nanotechnologii do uzyskania enkapsulowanej formy klozapiny. Wydaje się bowiem, że zwiększenie skuteczności i bezpieczeństwa klinicznego stosowania klozapiny może zostać osiągnięte poprzez zaprojektowanie odpowiedniego nanonośnika, pozwalającego dostarczyć ww. terapeutyk w miejsce docelowego działania. Należy dodać, że wyniki badań własnych wskazują, że potencjał terapeutyczny klozapiny można zwiększyć kierując ją w obszary mózgu bogate w heteromery receptorów dopaminowych D₂ i serotoninowych 5-HT_{1A} (D₂-5-HT_{1A}) [H4]. Powyższa strategia może przyczynić się do zwiększenia dostępności i bezpieczeństwa stosowania leku, a także polepszenia selektywności jego działania, prowadząc w konsekwencji do podniesienia efektywności terapii schizofrenii.

Założenia powyższego celu realizowano poprzez badanie interakcji wszystkich otrzymywanych nanopreparatów (w zależności od ich parametrów fizykochemicznych a także modyfikacji powłoki zewnętrznej) z komórkami docelowymi. Szczegółowo przeprowadzono eksperymenty pozwalające określić:

- cytotoksyczność uzyskanych nanoformulacji [H1, H2, H3, H5]
- oddziaływanie uzyskanych nanokapsulek z komórkami modelowymi HEK 293 [H1]
- oddziaływanie uzyskanych nanokapsulek z komórkami układu immunologicznego [H2, H3, H5]
- oddziaływanie uzyskanych nanokapsulek z komórkami modelującymi ludzką barierę krew-mózg [H5]
- pozwalające oszacować profil biodystrybucji *in vivo* uzyskanych nanokapsulek [H3]
- weryfikujące działanie enkapsulowanej formy klozapiny w teście behawioralnym u zwierząt doświadczalnych (myszy) [H3]
- prowadzące do identyfikacji potencjalnego celu działania klozapiny [H4]
- prowadzące do uzyskania ligandu kierunkowego z przeznaczeniem do funkcjonalizacji powierzchni uzyskanych nanokapsulek [H6]

Wszystkie przeprowadzone przeze mnie badania były wykonane głównie w ramach realizacji trzech projektów badawczych, których byłam pomysłodawcą, autorem i współautorem. W przypadku dwóch z nich – kierownikiem a jednego – koordynatorem i głównym wykonawcą.

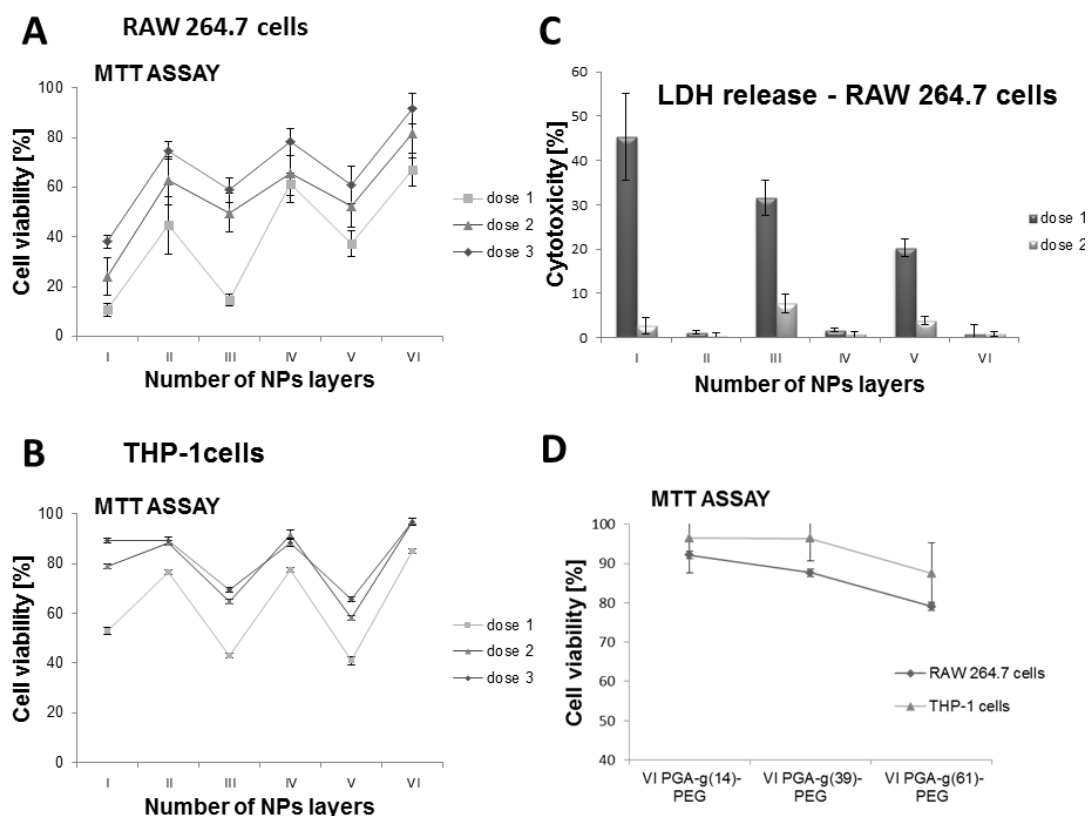
4.3.3 Otrzymywanie polimerowych nanokapsulek (NCs)

W świetle opisanych powyżej zagadnień, podjęto działania mające na celu znalezienie optymalnego nanonośnika dla klozapiny. W celu realizacji postawionego zadania nawiązano współpracę z dr hab. Krzysztofem Szczepanowiczem z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, który odpowiadał za syntezę i chemiczną charakterystykę nanokapsulek oraz enkapsulację klozapiny. Polimerowe nanokapsułki (NCs) z ciekłym rdzeniem pokryte warstwą biodegradowalnych polielektrolitów zostały przygotowane techniką sekwencyjnej adsorpcji przeciwnie naładowanych nanomateriałów „warstwa po warstwie” LbL (ang. layer by layer). Wykorzystano anionowy surfaktant AOT (dokuzynian sodu zatwierdzony przez FDA) jako emulsyfikator oraz biokompatybilne polielektrolity takie jak: poli-L-kwas-glutaminowy (polianion), PGA oraz poli-L-lizyna (polikation), PLL. Pegylowana warstwa zewnętrzna kapsułki została przygotowana przy wykorzystaniu PGA-g-PEG (PGA z wszczepionymi łańcuchami poli(glikolu etylenowego) (PEG)). PEG jest obojętnym, hydrofilowym polimerem, a jego wysoka elastyczność i mobilność łańcucha przyczynia się do podwyższenia stabilności nanokapsulek. Ponadto, pegylowane powłoki charakteryzują się zmniejszonym potencjałem do adsorpcji białek, co skutkuje zahamowaniem procesu opsonizacji a tym samym zmniejszeniem wychwytu NCs przez komórki układu immunologicznego. **Średni rozmiar otrzymanych NCs wynosił 80-100 nm w zależności od grubości powłoki zewnętrznej. Uzyskane NCs były stabilne w warunkach fizjologicznych, przy wysokiej sile jonowej.**

4.3.4 Oddziaływania nanokapsułka/komórka docelowa – badania cytotoksyczności uzyskanych nanopreparatów.

Znalezienie efektywnych nanonośników dedykowanych do kontrolowanego transportu substancji aktywnych wymaga systematycznych badań prowadzących do optymalizacji ich interakcji z komórkami docelowymi. Oddziaływanie to zależy od typu i fizykochemicznych właściwości nośnika oraz przede wszystkim od modyfikacji jego powłoki zewnętrznej. Kwantyfikacja żywotności komórek pozwala opisać toksyczność wykorzystywanych nanomateriałów. Istotne jest tutaj utrzymanie równowagi pomiędzy efektywną internalizacją

nanonośnika a indukcją toksycznego efektu. Oddziaływanie pomiędzy nanokapsułką a błoną komórkową jest głównym czynnikiem wpływającym na ten proces i zależy od ładunku, kształtu, wielkości, elastyczności oraz modyfikacji powierzchniowych i funkcjonalizacji kapsułki [24-27]. W przypadku nanokapsulek posiadających ładunek powierzchniowy, ich interakcja z błoną komórkową będzie determinowana głównie przez oddziaływania elektrostatyczne [24,25]. Pod uwagę brać również musimy fakt, iż rozmiary kapsulek oraz ich właściwości powierzchniowe mogą się znacznie zmieniać w układach biologicznych [28-31]. Z powodu zmieniającej się siły jonowej a także możliwych reakcji z komponentami medium (np. adsorpcji białek) może dochodzić do spontanicznej agregacji nanokapsulek [31-34]. Dlatego w pierwszej kolejności oszacowana została biokompatybilność i cytotoksyczność uzyskanych nanomateriałów w zależności od dawki, ładunku, rozmiaru i modyfikacji powłoki zewnętrznej NCs. Eksperymenty przeprowadzono dla różnych linii komórkowych: HEK 293 (ang. *human embryonic kidney cell line*), RAW 264.7 (ang. *mouse murine macrophages cell line*), THP-1 (ang. *human leukemic monocyte cell line*). Wyniki przedstawiono w pracach [H1, H2]. Doniesienia literaturowe wskazują na rozbieżność uzyskiwanych danych pomiarowych przy zastosowaniu różnych testów dedykowanych do oszacowania żywotności komórek [35,36]. Dlatego, żeby uzyskać najbardziej wiarygodne wyniki i uniknąć ewentualnej nadinterpretacji zdecydowano się na zastosowanie kilku różnych testów. Ogólnie zaobserwowano trzy główne trendy. Cytotoksyczność zależała od: 1) stężenia NCs: zdefiniowano dawki – dla każdego badanego rodzaju NCs, będące najbardziej toksycznymi dla komórek – choć podkreślić należy, że dla najbardziej toksycznych NCs, przeżywalność komórek wzrastała do poziomu 90% przy redukcji dawki do wartości $0,2 \cdot 10^6$ NCs na komórkę, co stanowi znacznie przekraczając zakładaną teoretyczną ilość NCs wystarczającą do osiągnięcia efektu terapeutycznego; 2) liczby powłok polielektrolitowych – im mniejsza liczba powłok tym większy spadek żywotności komórek; 3) ładunku powierzchniowego – negatywny ładunek na powierzchni NCs skorelowany był ze zwiększoną przeżywalnością. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na związek między ładunkiem powierzchniowym NCs a destabilizacją błony komórkowej. Podsumowując, bardziej toksyczne okazały się dodatnio naładowane NCs.



Rysunek 1. Cytotoksyczność uzyskanych nanopreparatów z zależności od ich budowy. Pomiary dla komórek RAW 264.7 oraz THP-1. (Łukasiewicz S. et al. 2015).

Mechanizm obserwowanego zjawiska jest prawdopodobnie zbliżony dla wszystkich badanych linii komórkowych i może być związany z bardziej wydajną adsorpcją dodatnio naładowanych NCs na powierzchni komórki, tendencją do zmniejszania gęstości lipidów i ostatecznie zaburzeniem funkcjonowania błony komórkowej. **Modyfikacje powłoki zewnętrznej polegające na dołączeniu łańcuchów PEG (tzw. PEG grafting) mają pozytywny wpływ na żywotność komórek (nie zaobserwowano toksycznych efektów).** Ponadto, pegylacja stabilizowała NCs przestrzennie i zapobiegała ich agregacji.

4.3.5 Interakcje uzyskanych NCs z komórkami układu immunologicznego.

Wykorzystanie nanotechnologii do opracowania nowych systemów kontrolowanego transportu leków wymaga także szerokich badań pozwalających opisać interakcję nanopreparatów z komórkami układu immunologicznego. Liczne doniesienia wskazują na szybką eliminację nanonośników z krwi [37]. Adsorpcja białek osocza na powierzchni nanonośnika pozwala makrofagom mononuklearnego systemu fagocytującego (ang. *mononuclear phagocytic system*, MPS) na szybkie rozpoznanie i usunięcie nanokapsulek, zanim osiągną one miejsce przeznaczenia [38]. Przekłada się to bezpośrednio

na redukując okresu półtrwania leku i tym samym ogranicza zdolność nanomateriałów do pełnienia funkcji wydajnych nanonośników. Dlatego też niezwykle istotne staje się zaprojektowanie nanonośnika nierozpoznawalnego dla komórek fagocytujących a jednocześnie posiadającego wszystkie cechy umożliwiające pełnienie wymaganej funkcji. Jak pisano wcześniej oddziaływanie nanonośników z komórkami docelowymi w ogromnej mierze zależy od typu i fizykochemicznych właściwości nanonośnika. Zatem, realizując założone cele badano NCs w zależności od ich wielkości, ładunku a także modyfikacji powłoki zewnętrznej. Liczne badania wskazują, że to właśnie odpowiednia modyfikacja powłoki zewnętrznej ma największy wpływ na interakcję z komórkami fagocytującymi. Dekorowanie powierzchni cząstki za pomocą obojętnego hydrofilowego polimeru jakim jest np. PEG, powoduje blokowanie oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych, co prowadzi do redukcji bądź całkowitej eliminacji adsorpcji białek, tym samym minimalizując proces opsonizacji, co w konsekwencji sprowadza się do wydłużenia czasu życia nanonośnika w krwiobiegu. Efekt ten jest skorelowany z właściwościami PEG. Kluczowe znaczenie ma tutaj odpowiednia pegylacja powierzchni cząstki, bowiem jakość PEG, wielkość łańcucha, ilość łańcuchów, gęstość i sposób ich ułożenia ma ogromny wpływ na interakcje z komórką docelową i biodystrybucję nanonośnika w organizmie [39]. Podsumowując, tworzenie otoczki hydrofilowej wokół nanokapsułki chroni ją przed szybkim wychwytem ze strony fagocytów. Z drugiej strony, pegylacja może również nasilać proces internalizacji nanomateriałów przez inne typy komórek (na przykład komórki nowotworowe czy komórki bariery krew-mózg) [37,40]. Doniesienia wskazują, że zarówno fagocytoza, endocytoza jak i mikropinocytoza mogą być zaangażowane w proces internalizacji [18]. Biorąc pod uwagę powyższe kwestie, w prowadzonych eksperymentach skupiono się także na badaniu interakcji pomiędzy uzyskanymi nanośnikami (o różnych parametrach fizykochemicznych) a komórkami układu immunologicznego. Wykorzystano linie komórkowe RAW 264.7 i THP-1 oraz komórki hMDMs (ang. *human monocyte-derived macrophages*), które były różnicowane z komórek PMBC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) pochodzących od zdrowych dawców. Wykazano, że wszystkie typy zsyntetyzowanych NCs są pobierane przez komórki fagocytujące, przy czym wychwyty pegylowanych NCs był zasadniczo dużo mniejszy w porównaniu do NCs niemodyfikowanych. Najsilniejsze zahamowanie procesu zaobserwowano w przypadku blokowania (w doświadczeniach wykorzystano inhibitory specyficzne dla konkretnych ścieżek endocytozy) szklaku endocytozy przebiegającego z udziałem klatryny (RAW 264.7, THP-1). Zwizualizowano również obecność wszystkich typów uzyskanych NCs

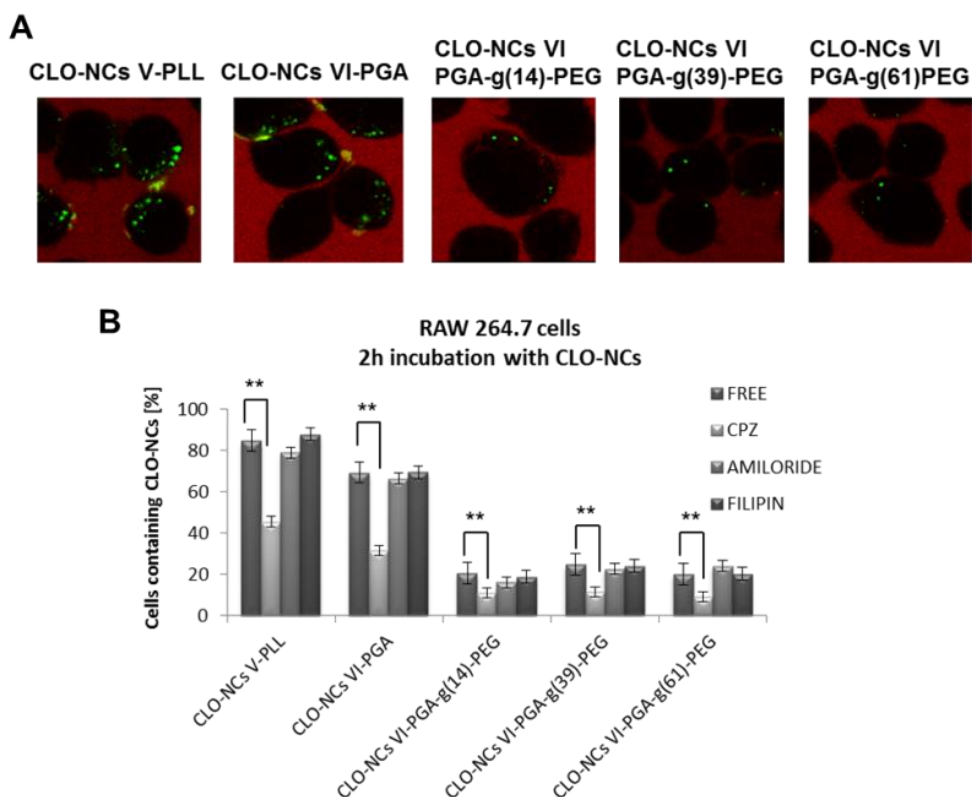
w lizosomach. Dodatkowo przeprowadzono eksperymenty, które pokazały, że niemodyfikowane NCs – w przeciwieństwie do pegylowanych NCs – mają wpływ na potencjał do fagocytozy. Żaden z otrzymanych wariantów NCs nie prowadził także do różnicowania komórek THP-1. **Na podstawie powyższych obserwacji wysunięto wnioski, że uzyskane polimerowe NCs można z powodzeniem modyfikować (przez wszczepienie PEG) w sposób, który umożliwia ich maskowanie dla komórek fagocytyujących.** Potwierdziło to wcześniejszą teorię, że zsyntetyzowane NCs są obiecującym kandydatem, który może zostać wykorzystany do kontrolowanego dostarczania leków.

4.3.6 Otrzymanie i charakterystyka enkapsulowanej formy klozapiny

Enkapsulacja substancji aktywnych jest obecnie obiecującą strategią w nowoczesnej farmakologii molekularnej. Wydaje się zatem, iż w świetle opisanych powyżej kwestii, enkapsulacja klozapiny, pozwalająca na jej kontrolowane uwalnianie i dostarczanie, może prowadzić do polepszenia terapeutycznego potencjału tego leku, co może mieć bezpośrednie przełożenie na jakość terapii schizofrenii. Opierając się na danych uzyskanych we wcześniejszych eksperymentach zdefiniowano rodzaj nanonośnika wykorzystanego do enkapsulacji klozapiny. Były to sześciowarstwowe polimerowe, pegylowane nanokapsułki. Polielektrolitowa powłoka (PLL/PGA) zewnętrzna została utworzona metodą sekwencyjnej adsorpcji LbL na rdzeniu emulsyjnym, który zawierał rozpuszczoną klozapinę. Otrzymano kilka wariantów kapsulek zawierających ww. lek, różniących się parametrami fizykochemicznymi (grubością warstwy zewnętrznej, pegylacją, ładunkiem). Odpowiednio były to: dodatnio naładowane pięciowarstwowe NCs - **CLO-NCs V-PLL**, ujemnie naładowane sześciowarstwowe NCs - **CLO-NCs VI-PGA** oraz obojętne, pegylowane sześciowarstwowe NCs - **CLO-NCs VI-PGA-g(x)-PEG** (o różnym stopniu wszczepienia PEG). Zarówno synteza jak i badania fizykochemicznych właściwości uzyskanych NCs została przeprowadzona w IKiFP PAN przez dr hab. K. Szczepanowicza. Eksperymenty pozwalające opisać stabilność NCs oraz profil uwalniania klozapiny wykonane zostały również przez badaczy z powyższego instytutu pod nadzorem dr hab. K. Szczepanowicza [H3].

Opierając się na doświadczeniach zebranych w trakcie badania pustych nośników przeprowadzono podobne eksperymenty, chcąc określić zachowanie tym razem nośników z enkapsulowaną klozapiną. Badania cytotoksyczności i żywotności komórek a także interakcji z komórkami fagocytyującymi pokazały zbliżone rezultaty w porównaniu do tych

uzyskanych dla pustych nośników [H3]. **Formulacją o najlepszych parametrach okazały się CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG.**

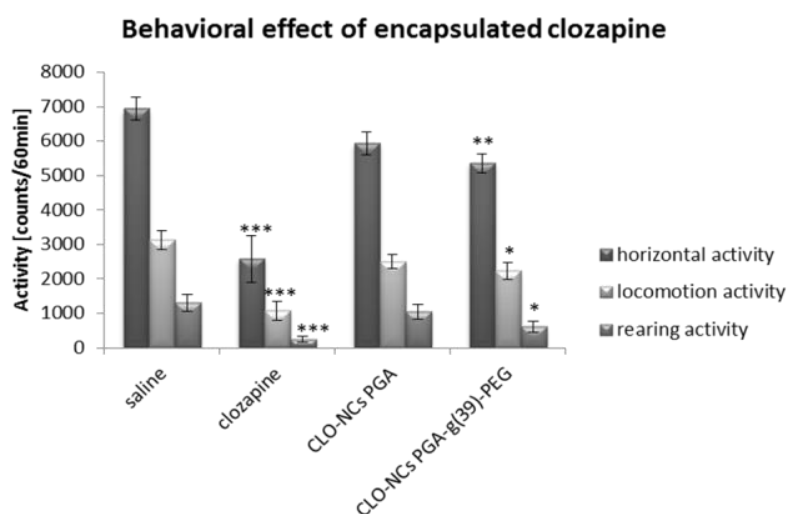


Rysunek 2. Badania internalizacji różnych typów CLO NCs w następstwie 2 godz. inkubacji z komórkami linii RAW 264.7 **A)** mikroskopia konfokalna; **B)** doświadczenia z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. (Łukasiewicz S. et al. 2016).

Niezwykle istotne w przypadku projektowania nowych nośników jest również oszacowanie ich biodystrybucji w układzie *in vivo*. Do realizacji tego zadania nawiązano współpracę z prof. Alicją Józkowicz z WBBiB UJ, zaś eksperymenty wykonałam pod nadzorem dr Witolda Nowaka. Pomimo, iż przeprowadzone doświadczenia miały tylko jakościowy charakter, jednoznacznie wskazują one na zależny od modyfikacji powłoki zewnętrznej kapsułki profil biodystrybucji. Cztery godziny po iniekcji potwierdzono obecność CLO-NCs VI-PGA głównie w wątrobie i śledzionie oraz w mniejszej skali w nerkach i płucach. **Pegylacja powłoki zewnętrznej (CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG) znacząco obniżyła poziom akumulacji kapsulek w badanych organach [H3].**

Ponieważ wszystkie przeprowadzone dotychczas eksperymenty wskazywały na obiecujący charakter CLO-NCs, skupiono się na badaniu funkcjonalnego działania otrzymanego nanopreparatu [H3]. Nawiązano współpracę z prof. Sven'em Ogren'em z *Department of Neuroscience Karolinska Institutet*, gdzie zostały wykonane (przez dr Nather

Majeed'a) behawioralne badania efektywności działania enkapsulowanej formy klozapiny u zwierząt doświadczalnych. **Otrzymane wyniki pokazują, że enkapsulowana klozapina zmniejsza aktywność lokomotoryczną myszy w sposób charakterystyczny dla wolnej klozapiny, jednakże działanie to zostało wywołane jedynie przez pegylowane CLO-NCs (CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG)** Niepegylowane NCs nie były skuteczne, prawdopodobnie z powodu ich szybkiej eliminacji przez makrofagi. Pomimo, iż otrzymane wyniki są jakościowe i wymagają dalszych powtórzeń, to już na tym etapie zaobserwowano efekty działania klozapiny przy znacznie mniejszych dawkach. **Podsumowując, otrzymane rezultaty wskazują na zasadność enkapsulacji klozapiny [H3].**



Rysunek 3. Behawioralne badania efektywności działania enkapsulowanej formy klozapiny. (Łukasiewicz S. et al. 2016).

4.3.7 Interakcje NCs z komórkami hCMEC/D3 (ang. *immortalized human cerebral microvascular endothelial cells, D3 clone*) stanowiącymi model *in vitro* ludzkiej bariery krew-mózg.

Projektując nowe systemy transportu substancji aktywnych, szczególnie tych kierowanych w obszary mózgu, należy przede wszystkim znaleźć odpowiedź na pytanie czy nowy nanośnik będzie zdolny do przekroczenia bariery krew-mózg (ang. *blood brain barrier* - BBB). Obecnie wyprowadzono kilka linii komórkowych [41,42], które posiadają cechy charakterystyczne dla komórek tworzących tę naturalną barierę. Najlepiej poznanym modelem *in vitro* ludzkiej BBB jest linia komórkowa hCMEC/D3. Linia ta została wyprowadzona poprzez unieśmiertelnienie ludzkich pierwotnych mózgowych komórek endotelialnych [42]. Komórki hCMEC/D3 wykazują morfologię zbliżoną do komórek pierwotnych, tworzą ścisłe połączenia, wykazują trans-endotelialną elektryczną oporność

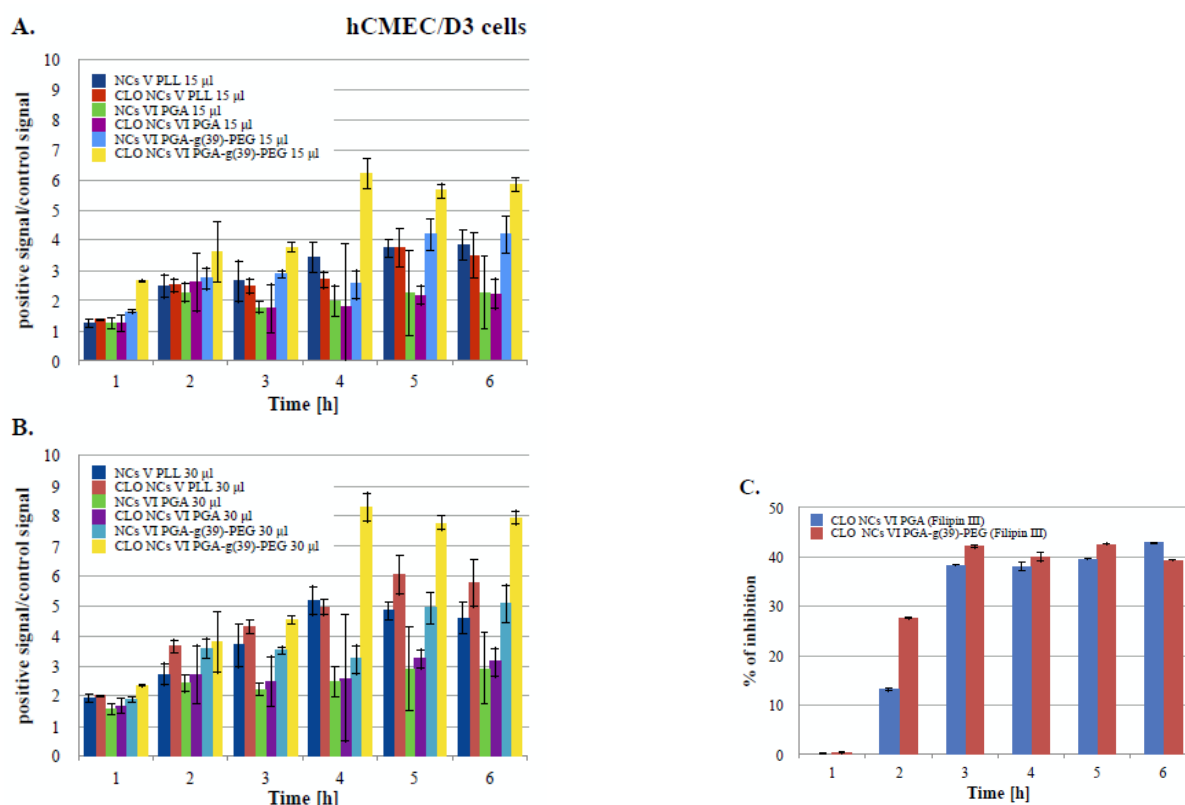
(ang. *transendothelial electrical resistance*, TEER) a także utrzymują ważne i charakterystyczne dla BBB cechy, jak m.in.: ekspresja białek tworzących złącza ścisłe (ang. *tight junction*) oraz białek zaangażowanych w transport substancji z wnętrza na zewnątrz komórki (ang. *efflux transporters*) [41,42]. Z punktu widzenia potrzeb prowadzonych przez mnie eksperymentów linia ta stanowiła dogodny model bo badań procesu transcytozy [43]. Ponieważ wspomniana wyżej linia nie była komercyjnie dostępna, dlatego nawiązano kontakt z jej twórcą - prof. Babette Weksler (Cornell University, NY), od której otrzymano ww. linię nieodpłatnie.

Jak wspomniano wcześniej, kwantyfikacja żywotności komórek stanowi kluczowy element w zrozumieniu interakcji zachodzących pomiędzy NCs a komórką docelową. Dlatego rozpoczynając eksperymenty wykorzystujące ludzki model BBB, w pierwszej kolejności skupiono się na określeniu przeżywalności modelowych komórek hCMEC/D3 w następstwie inkubacji z uzyskanymi NCs [H5]. Również i w tym przypadku przeprowadzono kilka różnych testów. Dodatkowo, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy śmierć komórki następuje w drodze nekrozy czy apoptozy. Podobnie jak w przypadku innych badanych linii komórkowych, pokazano zależny od stężenia NCs spadek żywotności, jakkolwiek w przypadku komórek linii hCMEC/D3 skala tego zjawiska była dużo mniejsza, co prawdopodobnie mogło mieć związek z dobrze rozwiniętym systemem transportu na zewnątrz, a co za tym idzie, szybkim usuwaniem nadmiaru kapsulek z komórki. Liczne doniesienia [25,27,32], w tym również nasze wcześniejsze badania [H1, H2, H3], wskazują na korelację pomiędzy dodatnim ładunkiem na powierzchni NCs a spadkiem żywotności komórek. Efekt ten, związany z przerwaniem ciągłości błony komórkowej, jest prawdopodobnie wspólną cechą wszystkich dodatnio naładowanych nanomateriałów. Wysoki poziom uwalniania LDH w wyniku stymulacji pięciowarstwowymi NCs popiera tę hipotezę. Niestety, na podstawie wykonanych analiz nie można jednoznacznie stwierdzić czy to apoptoza, czy nekroza ma swój udział w śmierci komórki. **Podsumowując, najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla sześciowarstwowch kapsulek z pegylowaną powłoką zewnętrzną (CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG), w przypadku których przeżywalność komórek wynosiła niemal 100%, tak po 24 jak i 48 godzinach inkubacji z NCs.**

BBB stanowi anatomiczno-funkcjonalny układ regulujący wymianę substancji pomiędzy krwią a komórkami ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Jej zadaniem jest m.in. utrzymanie optymalnej homeostazy i ochrona OUN przed szkodliwymi substancjami a także selektywny transport związków krążących we krwi do płynu mózgowo-rdzeniowego [44-46]. Z uwagi na precyzyjną wybiórczość bariery, transport substancji o potencjale

terapeutycznym do mózgu jest sporym wyzwaniem, bowiem tylko substancje nienaładowane, lipofilne i stosunkowo małych rozmiarów mogą przechodzić przez BBB bez większych przeszkód. Są to jednak poważne ograniczenia, z jakimi nie są w stanie poradzić sobie dostępne obecnie terapie [47]. Dodatkowymi ograniczeniami dla nich są precyzyjne mechanizmy transportujące w komórkach endotelium, tj. niski poziom pęcherzyków pinocytarnych i selektywne transportery w błonie komórkowej [47]. Dodatkowo, komórki endotelialne, które posiadają spolaryzowaną błonę, do transportu wykorzystują proces transcytozy (endocytozę po stronie apikalnej i egzocytozę po stronie bazolateralnej) [44]. Opracowanie nanonośników wykorzystywanych do dostarczania leków w obszary mózgu wymaga zatem szczegółowych badań procesu transportu przez komórki modelujące BBB. W literaturze opisano różne ścieżki endocytozy wykorzystywane do internalizacji egzogennych substancji przez komórki śródbłonna [44, 48]. Przeprowadzono zatem eksperymenty mające na celu znalezienie odpowiedzi na trzy podstawowe pytania: 1) czy mechanizm internalizacji jest zależny od energii, 2) czy zachodzi poprzez endocytozę i 3) która ścieżka endocytozy jest zaangażowana w proces. Uzyskane wyniki [H5] wskazują na zależność procesu od dawki i czasu. Najwyższy stopień internalizacji opisano dla dodatnio naładowanych, niepegyłowanych NCs, co prawdopodobnie ma związek z ułatwionym oddziaływaniem między kapsułką a błoną komórkową [32]. Ponadto, otrzymane wyniki sugerują zależny od energii oraz związany z tworzeniem pęcherzyków klatrynowych mechanizm wychwytu dla wszystkich typów badanych NCs oraz dodatkowy pasywny transport w przypadku pegyłowanych NCs. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej pozwoliły zwizualizować NCs w obrębie pęcherzyków otoczonych klatryną a także w przedziale wczesnych endosomów oraz lizosomów. Rozważając wykorzystanie nowego nośnika dla klozapiny niezbędne było przeprowadzenie eksperymentów pokazujących nie tylko zdolność modelowych komórek do internalizacji NCs ale także zdolność uzyskanych NCs do przekraczania BBB.

Doświadczenia *in vitro* z udziałem linii komórek hCMEC/D3 ujawniły, iż obserwowany proces transcytozy zależał od dawki i czasu a najsilniejszy efekt zarejestrowano dla pegyłowanych CLO-NCs (CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG). Badania z zastosowaniem specyficznego inhibitora transcytozy wskazują na mechanizm powyższego procesu zależny od kaweoli. **Podsumowując CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG są zdolne do przekraczania bariery krew-mózg i stanowią obiecujący model nanonośnika dla klozapiny.**

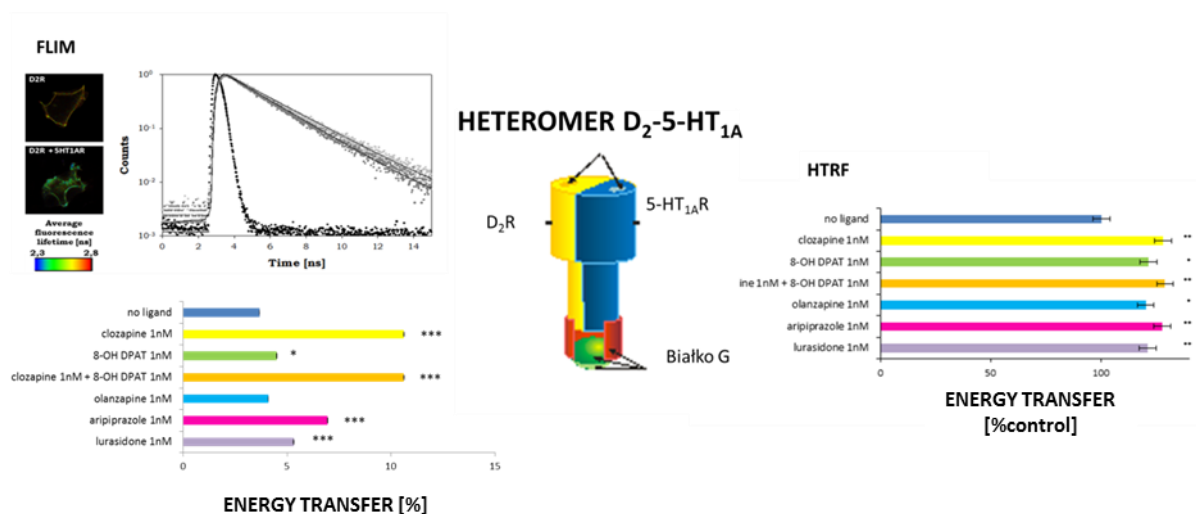


Rysunek 4. **A,B**) Eksperyment transcytozy wykonany dla różnych typów NCs w komórkach hCMEC/D3 – (transwell pore – 3µm). **C**) Inhibicja procesu transcytozy dla wybranych rodzajów NCs. (Łukasiewicz S. *et al.* 2017).

4.3.8 Heteromer receptorów D₂-5-HT_{1A} jako istotny cel działania klozapiny

Koncepcja oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs) odgrywa istotną rolę we współczesnej farmakologii molekularnej. Fizyczna asocjacja białek receptorowych wskazuje bowiem na nowy poziom złożoności przekazu sygnału oraz na możliwość zmiany farmakologicznych właściwości receptorów wchodzących w skład kompleksu [49-51]. Coraz częściej podejmowane są badania nakierowane na poszukiwanie substancji terapeutycznych działających poprzez selektywne rozpoznawanie heteromerów GPCRs. Taka strategia pozwala uzyskać tkankowo specyficzne działanie, jako że interakcja między receptorami wchodzącymi w skład kompleksu może mieć miejsce tylko wtedy gdy jednocześnie występują one na tej samej komórce. Wiele ostatnich doniesień wskazuje na istnienie klinicznie istotnych heteromerów GPCRs mających znaczenie w leczeniu między innymi bólu, astmy czy choroby Parkinsona [51-55]. Dowody te wskazują na heteromery GPCRs jako niezwykle istotne cele w projektowaniu nowoczesnych dróg leczenia.

Zarówno D₂R jak i 5-HT_{1A}R są ważne jako punkty działania atypowych leków przeciwpsychotycznych [8], stąd podjęto badania interakcji pomiędzy tymi receptorami w kontekście działania przeciwpsychotycznego.



Rysunek 5. Konstytutywna dimeryzacja receptorów dopaminowych D₂ i serotoninowych 5-HT_{1A}. (na podstawie Łukasiewicz S. et al. 2016).

Uzyskane wyniki omówiono szerzej w pracy [H4]. Po raz pierwszy pokazano konstytutywną dimeryzację obydwu badanych receptorów w komórkach linii HEK 293. W celu uniknięcia ewentualnej nadinterpretacji danych istnienie heteromerów D₂-5-HT_{1A} potwierdzono dwoma niezależnymi technikami (FLIM i HTRF). Ponadto, wykazano wpływ różnych substancji przeciwpsychotycznych (m.in. klozapina, aripiprazol, 8-OH-DPAT) na proces heteromeryzacji. Największy efekt zarejestrowano po inkubacji komórek z klozapiną, aripiprazolem oraz po równoczesnym podaniu klozapiny i 8-OH-DPAT. We wcześniejszych badaniach, w tym również prowadzonych przez mnie przed doktoratem [56-57], wykazano przeciwne w stosunku do opisanego powyżej, działanie klozapiny na heteromery receptorów dopaminowych D₁ (D₁R) i D₂R (D₁-D₂) oraz heteromery receptorów serotoninowych 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}R) i D₂R (D₂-5-HT_{2A}). Dane te wskazują na specyficzne działanie klozapiny, zależne od typu receptorów wchodzących w skład kompleksu. Ponadto, we wspomnianej pracy [H4] pokazano *in vivo* kolokalizację D₂R i 5HT_{1A}R w korze prefrontalnej u myszy (doświadczenia wykonane w Instytucie Farmakologii PAN przez dr K. Szafran-Pilch), co sugeruje potencjalne miejsce występowania heteromerów ww. receptorów. Dodatkowo, przeprowadzono liczne testy funkcjonalne pozwalające oszacować aktywację ścieżek przekazu sygnału w komórce w rezultacie działania substancji przeciwpsychotycznych. Doświadczenia prowadzono w liniach komórkowych HEK 293 wykazujących ekspresję pożądaných receptorów w różnych kombinacjach. Takie podejście umożliwiło zróżnicowanie

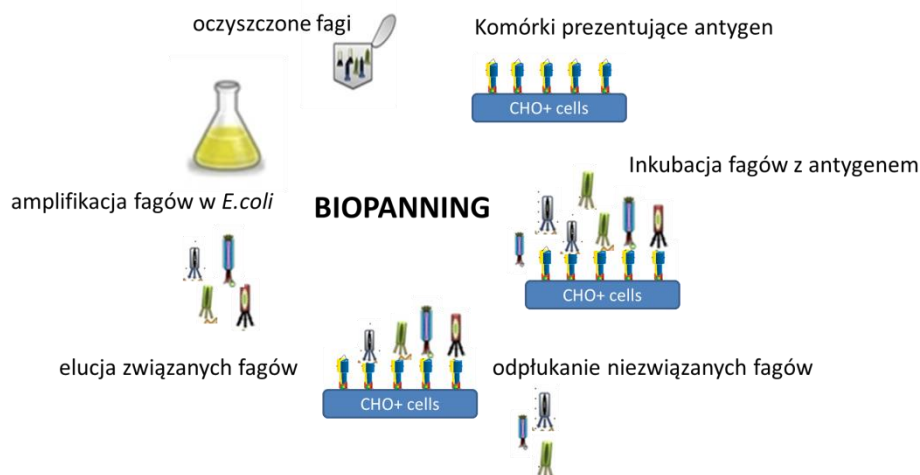
działania badanych substancji w zależności od obecności homo- bądź heteromerycznych kompleksów receptorów. Chociaż funkcjonalne konsekwencje przekazu sygnału poprzez heteromery D₂-5-HT_{1A} są wciąż nie w pełni wyjaśnione, to badania te wskazują na uruchomienie odmiennych ścieżek sygnałowych w zależności od tego czy badane receptory ulegają koekspresji czy też powstają samodzielnie w komórce. Z uwagi na fakt, iż do wspólnej ekspresji D₂R i 5-HT_{1A}R może dochodzić w neuronach kory mózgowej wydaje się, że zjawiska opisane w pracy [H4] - choć dotyczą modelu *in vitro* - mają duże znaczenie i powinny być brane pod uwagę podczas projektowania nowych leków. **Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na możliwość działania przeciwpsychotycznego poprzez specyficzne ukierunkowanie substancji aktywnych na heteromery D₂-5-HT_{1A} i mogą być inspiracją dla ulepszonej farmakoterapii schizofrenii.**

4.3.9 Uzyskanie ligandu kierunkowego specyficznie rozpoznającego heteromer D₂-5-HT_{1A} z przeznaczeniem do funkcjonalizacji uzyskanych CLO-NCs VI-PGA-g(39)-PEG.

Optymalne zaprojektowanie nanoosiłników dla substancji terapeutycznych poprzez odpowiednią funkcjonalizację ich powierzchni może doprowadzić do rozwoju tzw. spersonalizowanej medycyny. Dekorowanie powierzchni NCs poprzez przyłączanie ligandów kierunkowych pozwala bowiem na selektywne dostarczanie leków do wybranych, zdefiniowanych miejsc docelowych. Między innymi ludzkie monoklonalne fragmenty przeciwciał - scFv (ang. *single-chain variable fragment*) mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako ligandy kierunkowe. Przeciwciała te składają się ze zmiennych regionów ciężkich (VH) i lekkich (VL) łańcuchów immunoglobulin połączonych elastycznym peptydowym łącznikiem zaprojektowanym w sposób umożliwiający kontakt obydwu łańcuchów i zachowanie miejsca wiązania antygeny w obrębie pojedynczej liniowej cząsteczki [58]. Fragmenty scFv, w porównaniu do większych form przeciwciał monoklonalnych jak m.in. Fab, F(ab)₂, IgG, charakteryzują się niższym czasem retencji w tkankach innych niż docelowe, lepszą penetracją tkanki i obniżoną immunogennością, co czyni je atrakcyjnymi kandydatami do zastosowań terapeutycznych [59].

Bazując na danych opisanych w pracy [H4] podjęto próbę opracowania drogi selektywnej regulacji heteromerów D₂-5-HT_{1A} przy udziale enkapsulowanej klozapiny. Osiągnięcie postawionego celu wymaga otrzymania ligandu kierunkowego w postaci fragmentu ludzkiego monoklonalnego przeciwciała scFv specyficznie rozpoznającego heteromer D₂-5-HT_{1A}. Aby ww. przeciwciała mogło spełniać swoją rolę musi rozpoznawać

epitop strukturalny utworzony w obrębie struktury heteromeru oraz jednocześnie nie wykazywać specyficzności wobec monomerycznych lub homomerycznych form receptorów. Do realizacji powyższego zadania [H6] wykorzystano technikę ekspresji fagowej opisaną po raz pierwszy przez Smitha [60] – tegorocznego laureata Nagrody Nobla (2018). Wykorzystano fagemidową bibliotekę ludzkich przeciwciał scFv Tomlinson I+J (Geneservice). Biblioteka ta pozwala na przygotowanie około 3×10^8 różnych fagów, w otoczkę których wbudowane jest białko fuzyjne PIII-scFv kodowane przez fagemid pIT2. Ponieważ obydwa receptory wchodzące w skład heteromeru należą do rodziny białek błonowych, dlatego niezmiernie ważne było przeprowadzenie etapów selekcji, tzw. *bio-panningu*, w warunkach najbardziej zbliżonych do tych, w których pożądane receptory występują naturalnie w komórkach, co pozwoliło najlepiej zachować natywną przestrzenną konformację heteromeru. W celu wyodrębnienia fagów specyficznie wiążących heteromer D₂-5-HT_{1A} przeprowadzono następujące kolejno rundy immunoselekcji na komórkach linii CHO⁺ (stabilna linia CHO-K1, ang. *chinese hamster ovary*) wykazujących nadekspresję obydwu receptorów. Fagi wiążące monomery receptorów oraz inne białka obecne na powierzchni komórek CHO-K1 były eliminowane w wyniku negatywnej selekcji, z zastosowaniem mieszaniny komórek CHO⁻ (stabilne linie CHO-K1) wykazujących nadekspresję jedynie pojedynczych typów receptorów budujących heteromer.



Rysunek 6. Technika ekspresji fagowej – ilustracja procesu selekcji

Wyodrębnione w procesie selekcji monoklonalne fagi najsilniej wiążące się do zadanego heteromeru posłużyły do uzyskania rozpuszczalnej formy przeciwciał typu scFv w systemie ekspresyjnym *E.coli* HB2151. Procedurę oczyszczania powstałych białek oparto na chromatografii powinowactwa, wykorzystując złożę z immobilizowanym białkiem L. Procedurę dokładnie opisano w pracy [H6]. **W efekcie prowadzonych eksperymentów**

wyzolowano przeciwciało monoklonalne scFv specyficznie rozpoznające heteromery D₂-5-HT_{1A}. Zostało ono wykorzystane jako ligand kierunkowy do funkcjonalizacji modelowych nanokapsulek (dane niepublikowane). Podjęto również eksperymenty bazujące na przeprowadzeniu mutagenyzy przypadkowej, mające na celu polepszenie parametrów fizykochemicznych uzyskanego przeciwciała (eksperymenty w toku).

4.3.10 Wnioski końcowe

Otrzymane NCs zawierające klozapinę (**CLO-NCs VI-PGA-g-PEG**) stanowią obiecującą nową formułację powyższego leku. Oczywistym jest fakt, iż eksperymenty przeprowadzone zostały głównie w modelach *in vitro* a chcąc w pełni opisać zachowanie nanoosiłników konieczne są również szczegółowe i szerokie badania *in vivo*. Kolejne eksperymenty są aktualnie w toku bądź na etapie planowania.

Podsumowując, wyniki uzyskane w prezentowanym przez mnie cyklu 6 publikacji oryginalnych dostarczają wartościowych danych, które poszerzają obecną wiedzę dotyczącą nanoformulacji i ich aplikacji w obszarze nowoczesnej farmakologii molekularnej. W konsekwencji mogą przyczynić się do postępu w projektowaniu nowoczesnych nanoosiłników dla różnych leków (nie tylko przeciwpsychotycznych) a także mogą stanowić cenne narzędzie do ulepszenia celowanego transportu leków w obszary mózgu. Podkreślić należy, że przedstawione badania są nowatorskie i dobrze odzwierciedlają światowe trendy w molekularnej farmakologii i nanomedycynie.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Jednym z moich pierwszych osiągnięć badawczych było stworzenie pracowni hodowli komórkowej w Zakładzie Biochemii Fizycznej (ZBF) oraz aplikacja szeregu technik badawczych wykorzystywanych do monitorowania procesów zachodzących w żywych komórkach. Wcześniej eksperymenty prowadzone w ZBF skupiały się wokół badania rozpuszczalnych form białek rekombinowanych.

Rodzina receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G protein-coupled receptors - GPCRs*) stanowi największą rodzinę ludzkich białek błonowych (odpowiadającą około 3% wszystkich genów) [54] zdolnych do wiązania szeregu różnorodnych cząsteczek sygnałowych, między innymi fotonów, jonów, nukleotydów, aminokwasów, amin czy peptydów. Na granicy między środowiskiem zewnątrzkomórkowym a wewnątrzkomórkowym receptory te uczestniczą w regulacji niemal każdego procesu

fizjologicznego, przekształcając bodźce pozakomórkowe w reakcje wewnątrzkomórkowe. W ostatnim czasie koncepcja oligomeryzacji GPCRs została szeroko udokumentowana a lawinowo pojawiające się nowe doniesienia wskazują na formowanie potencjalnie ważnych farmakologicznie heteromerów tychże receptorów [51-53,61]. Heteromeryzacja GPCRs odgrywa kluczową rolę w wielu różnych aspektach biogenezy i funkcji receptora, jak dojrzewanie i fałdowanie, błonowa ekspresja, szybkość i specyfika przekazu sygnału a także desensytyzacja [49-55]. Dane literaturowe podają, iż obecnie około 50% dostępnych leków działa poprzez GPCRs [61,62]. Jakkolwiek tylko 10% znanych GPCRs jest celem dla tych terapeutyków [62]. Od lat konwencjonalne projektowanie leków ukierunkowanych na GPCRs skupiało się na inhibicji lub aktywacji pojedynczej cząsteczki receptora w dobrze zdefiniowanym miejscu wiązania liganda. Obecnie, poprzez stymulację heteromerów można uzyskać istotne farmakologicznie działanie, często bardziej selektywne i specyficzne niż w przypadku podejścia tradycyjnego. Związane jest to między innymi z faktem, iż heteromery mogą występować jedynie na komórkach, w których jednoczesnej ekspresji ulegają receptory wchodzące ze sobą w interakcje. Podsumowując, heteromery GPCRs rozpatrywane są obecnie jako niezwykle istotne cele w projektowaniu nowoczesnych strategii leczenia. Nie dziwi zatem fakt, iż zjawisko heteromeryzacji odgrywa istotną rolę we współczesnej farmakologii molekularnej i wskazuje na innowacyjny kierunek medycyny XXI wieku.

Badania koncentrujące się wokół zjawiska homo- i heteromeryzacji GPCRs rozpoczęłam już w trakcie studiów doktoranckich i nadal je kontynuuję. Do ważniejszych osiągnięć naukowych związanych z powyższą tematyką należy:

- identyfikacja konstytutywnych homo- i heteromerów receptorów dopaminowych D_1 , D_2 i serotoninowych $5-HT_{2A}$
- oszacowanie wpływu leków powszechnie stosowanych w terapii (klozapina, haloperidol) na proces dimeryzacji w/w receptorów;
- identyfikacja zmian właściwości farmakologicznych receptorów dopaminowych D_2 i serotoninowych $5-HT_{2A}$ w układzie heteromeru D_2-5-HT_{2A} ;
- identyfikacja motywów białkowych zaangażowanych w procesie dimeryzacji receptorów dopaminowych D_1 i D_2 oraz dopaminowych D_2 i serotoninowych $5-HT_{2A}$;
- określenie możliwego molekularnego mechanizmu, poprzez który polimorfizm w obrębie receptora serotoninowego $5-HT_{2A}$ H452Y wpływa na odmienną odpowiedź na terapię haloperidolem i klozapiną w niektórych przypadkach schizofrenii.

Wyniki dotyczące powyższej tematyki zostały zebrane w kilku pracach [A1-A6] a także stały się przedmiotem mojej pracy doktorskiej (2009) [A1-A4], która została wysoko oceniona przez Recenzentów i Członków Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, a mój przewód doktorski zakończył się obroną z wyróżnieniem. Wyniki zebrane w pracy doktorskiej poza dużym wkładem poznawczym pozwoliły również na opracowanie modelu badawczego wykorzystywanego do badań mechanizmów działania substancji o potencjale terapeutycznym w aspekcie ich wpływu na heteromery GPCRs. Praca ta zajęła II miejsce w IV edycji konkursu Fundacji Hasco-Lek (2010 rok) na najlepsze prace doktorskie dotyczące nowych odkryć i innowacji mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

[A1] **Lukasiewicz S**, Błasiak E, Faron-Górecka A, Polit A, Tworzydło M, Górecki A, Wasylewski Z, Dziedzicka-Wasylewska M. Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A2A and serotonin 5-HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol Rep.* (2007) 59:379-392.

[A2] **Lukasiewicz S**, Faron-Górecka A, Dobrucki J, Polit A, Dziedzicka-Wasylewska M. Studies on the role of the receptor protein motifs possibly involved in electrostatic interactions on the dopamine D1 and D2 receptor oligomerization. *FEBS J.* (2009) 276:760-775. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06822.x.

[A3] **Lukasiewicz S**, Faron-Górecka A, Kędracka-Krok S, Dziedzicka-Wasylewska M. Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT(2A) receptor and its genetic variant 5-HT(2A)H425Y with dopamine D(2) receptor. *Eur J Pharmacol.* (2011) 659:114-123. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.03.038.

[A4] **Lukasiewicz S**, Polit A, Kędracka-Krok S, Wędzony K, Maćkowiak M, Dziedzicka-Wasylewska M. Hetero-dimerization of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors. *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1803:1347-1358. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.010.

[A5] Błasiak E, **Lukasiewicz S**, Szafran-Pilch K, Dziedzicka-Wasylewska M. Genetic variants of dopamine D2 receptor impact heterodimerization with dopamine D1 receptor. *Pharmacol Rep.* (2017) 69:235-241. doi: 10.1016/j.pharep.2016.10.016.

[A6] **Lukasiewicz S**, Błasiak E, Dziedzicka-Wasylewska M. 5-HT_{2A} Receptor Heterodimerization, 5-HT_{2A} RECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM Book Series: Receptors Series (2018) Volume: 32 Pages: 57-66.

W ramach współpracy z naukowcami z Pracowni Farmakologii Biochemicznej, Instytutu Farmakologii, Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) prowadziłam badania dotyczące procesu dimeryzacji zachodzącego pomiędzy receptorami somatostatynowymi Sst₅, dopaminowymi D₂, serotoninowymi 5-HT_{1A} oraz wariantami receptorów dopaminowych D₁. Mój wkład polegał głównie na:

- otrzymaniu przy pomocy technik inżynierii genetycznej i biologii molekularnej odpowiednich konstruktów genetycznych pozwalających na otrzymanie białek fuzyjnych badanych receptorów niezbędnych do prawidłowego przeprowadzenia eksperymentów umożliwiających śledzenie procesu dimeryzacji

- uzyskaniu stabilnej ekspresji pożądaných receptorów w wybranych liniach komórkowych
- badaniu procesu dimeryzacji w modelowym układzie komórkowym *in-vitro* przy wykorzystaniu technik fluorescencyjnych bazujących na pomiarze zjawiska transferu energii
- określeniu wpływu związków o potencjale terapeutycznym na zjawisko dimeryzacji badanych receptorów

Wyniki prowadzonych badań zostały zebrane w pracach:

[A7] Grymek K, **Lukasiewicz S**, Faron-Górecka A, Tworzydło M, Polit A, Dziedzicka-Wasylewska M. Role of silent polymorphisms within the dopamine D1 receptor associated with schizophrenia on D1-D2 receptor heterodimerization. *Pharmacol Rep.* (2009) 61:1024-1033.

[A8] Szafran K, **Lukasiewicz S**, Faron-Górecka A, Kolasa M, Kuśmider M, Solich J, Dziedzicka-Wasylewska M. Antidepressant drugs promote the heterodimerization of the dopamine D2 and somatostatin Sst5 receptors--fluorescence in vitro studies. *Pharmacol Rep.* (2012) 64:1253-1258.

[A9] Kolasa M, Solich J, Faron-Górecka A, Żurawek D, Pabian P, **Lukasiewicz S**, Kuśmider M, Szafran-Pilch K, Szlachta M, Dziedzicka-Wasylewska M. Paroxetine and Low-dose Risperidone Induce Serotonin 5-HT1A and Dopamine D2 Receptor Heteromerization in the Mouse Prefrontal Cortex. *Neuroscience.* (2018) 377:184-196. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.004.

W badaniach homo-, heteromeryzacji GPCRs niezwykle istotne jest właściwe zaprojektowanie i przeprowadzenie eksperymentów. Szeroka gama metod badawczych znalazła swoje zastosowanie w tego typu badaniach, jednakże należy mieć na uwadze, że każda ze stosowanych obecnie technik niesie ze sobą pewne ograniczenia. Stąd też, niezwykle ważne jest rygorystyczne kontrolowanie warunków eksperymentu a także precyzyjna interpretacja otrzymanych wyników. W swojej pracy do śledzenia procesów dimeryzacji receptorów wykorzystuję techniki fluorescencyjne związane z monitorowaniem zjawiska rezonansowego transferu energii (RET ang. *Resonance Energy Transfer*) takie jak: FLIM (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) oraz HTRF (ang. *Homogeneous Time Resolved Fluorescence*). Pozwalają one na detekcję i monitorowanie powyższych procesów w żywych komórkach, w czasie rzeczywistym, zapewniając równocześnie wysoką rozdzielczość czasową i przestrzenną. Zastosowanie tych metod do badania dimeryzacji receptorów błonowych stało się wykonalne przede wszystkim ze względu na możliwość uzyskania – technikami biologii molekularnej – białek fuzyjnych (tzn. badanego receptora sprzęgniętego z odpowiednim białkiem fluorescencyjnym) bądź receptorów znakowanych odpowiednimi etykietkami. Sam etap projektowania białka fuzyjnego jest również niezwykle ważny, gdyż nieumiejętne przyłączenie partnera fuzyjnego może doprowadzić do zmian w zachowaniu i strukturze badanego białka, co z kolei doprowadzi do wygenerowania fałszywych wyników.

Dlatego też prawidłowe przeprowadzenie tego typu eksperymentów ma tutaj ogromne znaczenie. Zdobyte przeze mnie wieloletnie doświadczenie w tej dziedzinie zaowocowało powstaniem kilku publikacji o charakterze metodycznym, w których przedstawiono szczegółowo zasady właściwego przygotowania i przeprowadzenia eksperymentów monitorujących zjawisko dimeryzacji GPCRs.

[A10] **Łukasiewicz S**, Faron-Górecka A, Dziedzicka-Wasylewska M. A biophysical approach for the study of dopamine receptor oligomerization. *Methods Mol Biol.* (2013) 964:79-94. doi: 10.1007/978-1-62703-251-3_6.

[A11] **Łukasiewicz S**, Błasiak E, Szafran-Pilch K, Dziedzicka-Wasylewska M. Novel Approaches to Serotonin Receptor Interaction Studies; *Serotonin Receptor Technologies*. Humana Press, New York 2015, 3-20; ISBN: 978-1-4939-2186-7, <http://www.springer.com/us/book/9781493921867>

[A12] **Łukasiewicz S**, Polit A. - Metody badania dimeryzacji receptorów - XXVIII Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN - skrypt, Kraków, Polska

[A13] Grymek K, Gaska M, **Łukasiewicz S**, Górecki A, Dziedzicka-Wasylewska M. Fluorescence studies of G-protein coupled receptors oligomerization]. *Postepy Biochem.* (2008) 54:431-437.

W ostatnich latach prowadzone przeze mnie badania w tematyce związanej z nanomedycyną skupiają się na wykorzystaniu nanotechnologii do projektowania nanoonośników dedykowanych do kontrolowanego dostarczania substancji terapeutycznych w wybrane, zdefiniowane rejony docelowego działania. Podstawowym założeniem wykonywanych doświadczeń jest szerokie opisanie interakcji zachodzących pomiędzy różnymi typami nanokapsulek/nanocząstek a komórkami docelowymi. Realizacja powyższych tematów badawczych zaowocowała szeroką współpracą z naukowcami z takich ośrodków badawczych jak: IKiFP PAN (grupa prof. Piotra Warszyńskiego), IF PAN (grupa prof. Władysława Lasonia), Uniwersytet Śląski (grupa prof. Jarosława Polańskiego), WBBiB UJ: Zakład Biochemii Komórki, (dr Monika Bzowska), Zakład Immunologii (dr Małgorzata Bzowska, dr Krzysztof Guzik), Zakład Biofizyki Komórki (prof. Jerzy Dobrucki), Zakład Biotechnologii Medycznej (prof. Alicja Józkowicz, dr Witold Nowak), Department of Neuroscience Karolinska Institutet (prof. Sven Ove Ogren), STIFTELSEN SINTEF (dr. Christian Simon), Uniwersytet Oslo (prof. Mahmood Amiry-Moghaddam). Współuczestniczyłam i nadal kontynuuję doświadczenia, w których projektowane, nanocząsteczkowe systemy transportu leków dedykowane są dla terapii chorób neuropsychiatrycznych oraz przeciwnowotworowych. Przeprowadziłam eksperymenty dla różnych rodzajów nanocząstek, między innymi: nanocząstek Ag, nanocząstek Au oraz liposomów z inkorporowanymi związkami zaliczanymi do tiosemikarbazonów – związków o potencjale antynowotworowym (publikacja w przygotowaniu), nanocząstek krzemu,

nanocząstek polimerowych z enkapsuowanymi związkami o charakterze neuroprotekcijnym (kurkumina, polidatyna, kwas udecylenowy), polimerowych nanokapsulek zawierających paclitaxel. W ramach realizacji powyższych zadań powstały prace:

[A14] Piotrowski M, Jantas D, Szczepanowicz K, **Lukasiewicz S**, Lason W, Warszynski P. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing undecylenic acid: Synthesis, biocompatibility and neuroprotective properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. (2015) 135:8-17. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.029.

[A15] Karabas A, Bzowska M, **Lukasiewicz S**, Bereta J, Szczepanowicz K. Cytotoxic activity of paclitaxel incorporated into polyelectrolyte nanocapsules. *J Nanopart Res*. (2014) 16 (4).

[A16] Szczepanowicz K (*), **Lukasiewicz S**, Dziedzicka-Wasylewska M, Warszynski P. Functional nanocapsules for targeted drug delivery. XIX International Conference on Bioencapsulation, BRG Amboise, France (2011) 246-247.

Prowadziłam również szerokie badania nad możliwością zastosowania nanocząstek polikaprolaktanowych jako nowego nośnika dla klozapiny. Wykonane zostały eksperymenty w układzie *in vitro* pozwalające opisać toksyczność otrzymanego materiału, oddziaływania z układem immunologicznym a także zdolność do przekraczania bariery krew-mózg. Wyniki zebrano w poniższych pracach:

[A17] **Lukasiewicz S** (*), Mikołajczyk A, Szczęch M, Szczepanowicz K, Warszynski P, Dziedzicka-Wasylewska M. Encapsulation of clozapine into polycaprolactone nanoparticles as a promising strategy of the novel nanoformulation of the active compound. *J Nanopart Res*. (2019) – przyjęte do druku

[A18] **Lukasiewicz S** (*), Mikołajczyk A, Błasiak E, Dziedzicka-Wasylewska M, The interaction between PCL nanoparticles and murine macrophage (RAW 264.7) cell line. *Colloids Surf B Biointerfaces* – w trakcie recenzji

Moim osiągnięciem naukowym była również aplikacja techniki ekspresji fagowej (ang. *phage display*) do produkcji monoklonalnych fragmentów przeciwciał scFv. Wcześniej ww. technika nie była stosowana w Zakładzie Biochemii Fizycznej. Moje badania skupiają się głównie na uzyskaniu przeciwciał specyficznie rozpoznających dimery (heteromery) formowane przez receptory zaliczane do rodziny GPCRs. W ramach szerokich badań prowadzonych w powyższym obszarze powstały publikacje, w których między innymi: przedstawiono różne strategie dla procesu „*bio-panning-u*” podczas selekcji scFv specyficznych dla dimerów GPCRs, porównano różne systemy ekspresyjne (bakteryjne, owadzie) oraz techniki oczyszczania białek mogące znaleźć zastosowanie do uzyskania rozpuszczalnych form przeciwciał scFv skierowanych przeciwko białkom błonowym /heteromerom GPCRs.

[A19] **Lukasiewicz S** (*), Stachowicz A, Bzowska M, Dziedzicka-Wasylewska M. Comparison of Various Selection Strategies Used for Isolation of Human Monoclonal scFv Antibody Specific to GPCRs Heteromers. *J Pharmacol Pharm Res*. (2019) 2:1–8.

[A20] **Lukasiewicz S** (*), Stachowicz A, Fic E, Błasiak E, Kowalik A, Dziedzicka-Wasylewska M. Different strategies used in the purification of human monoclonal scfv antibodies. *J Biol Med* (2019) 3:014-020. doi: <http://dx.doi.org/10.17352/jbm.000007>

[A21] **Lukasiewicz S** (*), Szczepanowicz K, Bzowska M, Warszynski P, Dziedzicka-Wasylewska M. Targeted delivery system for therapy of schizophrenia. XIX International Conference on Bioencapsulation, BRG Amboise, France (2011) 222-223.

W ramach współpracy z dr hab. Sylwią Kędracką-Krok brałam udział w badaniach proteomicznych, których przedmiotem były wewnętrznie nieuporządkowane białka jądrowych. Efektem tej pracy jest publikacja:

[A22] Skupien-Rabian B, Jankowska U, Swiderska B, **Lukasiewicz S**, Ryszawy D, Dziedzicka-Wasylewska M, Kedracka-Krok S. Proteomic and bioinformatic analysis of a nuclear intrinsically disordered proteome. *J Proteomics*. (2016) 130:76-84. doi: 10.1016/j.jprot.2015.09.004.

Moje zainteresowania badawcze koncentrują się również wokół tematyki związanej z medycyną integracyjną będącą połączeniem medycyny akademickiej z medycyną naturalną reprezentowaną między innymi przez ziołolecznictwo czy medycynę chińską. Okazuje się bowiem, że ten sposób leczenia może osiągać znacznie lepsze wyniki niż stosowanie każdego z odłamów medycyny oddzielnie. W 2016 roku uczestniczyłam w VII Międzynarodowym Kongresie Medycyny Chińskiej w Izraelu organizowanym przez *International Community of Chinese Medicine (ICCM)*, gdzie nawiązałam współpracę z jednym z pionierów medycyny integracyjnej w Izraelu a także wybitnym autorytetem w zakresie medycyny chińskiej dr Yair-em Maimon. Obecnie dr Yair Maimon jest m.in. dyrektorem Instytutu Onkologii – Szpitala Sheba a także Integracyjnego Centrum Badań Nowotworów. Poza tym prowadzi Izraelskiemu Centrum Badań w Zakresie Medycyny Komplementarnej. Moja praca badawcza w tym obszarze skupia się na ewaluacji działania mieszanki ziołowej LCS 101 w kontekście antynowotworowym. W ramach realizacji powyższej tematyki powstała praca (aktualnie w trakcie recenzji), w której przedstawiony został immunomodulacyjny efekt działania mieszanki ziołowej LCS101.

[A23] **Lukasiewicz S** (*), Maimon Y, Coen Z, Kedracka-Krok S, Jankowski U, Zwinczewska H, Zwinczewska D, Dziedzicka-Wasylewska M and Guzik K (*). The influence of the botanical compound LCS101 on RAW 264.7 cells – immunomodulatory effect. – w trakcie recenzji

Moje przyszłe plany badawcze koncentrują się wokół szeroko pojętego tematu nanomedycyny i związane są z dalszą pracą nad opracowaniem nowych, bezpiecznych nanonośników do transportu substancji terapeutycznych w wybrane miejsca docelowe.

Kolejny nurt badawczy stanowić będzie otrzymywanie i charakterystyka ligandów kierunkowych (w oparciu o technikę ekspresji fagowej) z przeznaczeniem do funkcjonalizacji nanonośników. Prowadzone będą również eksperymenty pozwalające opisać proces heteromeryzacji różnych GPCRs ze wskazaniem na poszukiwanie klinicznie istotnych heteromerów powyższych receptorów mogących stanowić potencjalne cele dla terapeutyków.

Literatura

- [1] Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA, Current Concepts and Treatments of Schizophrenia, *Molecules*. (2018) 23 pii: E2087.
- [2] Hanson EI, Healey K, Wolf D, Kohler C. Assessment of pharmacotherapy for negative symptoms of schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. (2010) 12:563-57.
- [3] Yamasue H, Iwanami A, Hirayasu Y, et al. Localized volume reduction in prefrontal, temporolimbic, and paralimbic regions in schizophrenia: an MRI parcellation study. *Psychiatric Res Neuroimaging* (2004) 131:195–207.
- [4] Howes OD, McCutcheon R, Agid O, et al. Treatment-resistant schizophrenia: treatment response and resistance in psychosis (TRRIP) working group consensus guidelines on diagnosis and terminology, *Am J Psychiatry*. (2017) 174:216–229.
- [5] Ali FT, Abd El-Azeem EM, Hamed MA, Ali MAM, Abd Al-Kader NM, Hassan EA, Redox dysregulation, immuno-inflammatory alterations and genetic variants of BDNF and MMP-9 in schizophrenia: Pathophysiological and phenotypic implications, *Schizophr Res*. (2017) 188:98-109.
- [6] Boloc D, Gortat A, Cheng-Zhang JQ, et al. Improving pharmacogenetic prediction of extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics. *Transl Psychiatry*. (2018) 13:276.
- [7] Xu Y, Zhu X, Wang H, Sun S, Yue X, Tian J. In Vitro and In Vivo Characterization of PCC0104005, a Novel Modulator of Serotonin-Dopamine Activity, as an Atypical Antipsychotic Drug. *Sci Rep*. (2018) 8:6892.
- [8] Newman-Tancredi A1, Kleven MS. Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor properties. *Psychopharmacology* (2011) 216:451-473.
- [9] Gaur N1, Gautam S, Gaur M, Sharma P, Dadheech G, Mishra S. The biochemical womb of schizophrenia. *Indian J Clin Biochem*. (2008) 23:307-327.
- [10] Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Prog Brain Res*. (2008) 172:177-197.
- [11] Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol*. (2011) 11:59-67.
- [12] Masri B1, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2008) 105:13656-13661.
- [13] Berardis D, Rapini G, Olivieri L, et al. Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. *Ther Adv Drug Saf*. (2018) 9:237-256.
- [14] Berardis D, Serroni N, Campanella D, et al. Update on the adverse effects of clozapine: focus on myocarditis, *Curr Drug Saf*. 7 (2012) 55-62.
- [15] Remington G, Lee J, Agid O, et al. Clozapine's critical role in treatment resistant schizophrenia: ensuring both safety and use, *Exp Opin Drug Saf*. (2016) 15:1193–1203.

- [16] Kadam RS, Bourne DW, Kompella UB. Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance, *Drug Metab. Dispos.* (2012) 40:1380-1388.
- [17] Manjunath K, Venkateswarlu V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration, *J Control Rel.* (2005) 107:215-228.
- [18] Fond G, Macgregor A, Miot S, Nanopsychiatry--the potential role of nanotechnologies in the future of psychiatry: a systematic review. *Eur. Neuropsychopharmacol.* (2013) 23:1067-1071.
- [19] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. Part *Fibre Toxicol.* (2010) 7:3-8977-7-3.
- [20] Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2005) 172:1487-1490.
- [21] Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments, *Clin. Pharmacol. Ther.* (2008) 83:761-769.
- [22] Kadam RS, Bourne DW, Kompella UB. Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance, *Drug Metab. Dispos.* (2012) 40:1380-1388.
- [23] Bennewitz, Saltzman. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics.* (2009) 6:323-336.
- [24] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* (2006) 311:622-627.
- [25] Hong S, Leroueil PR, Janus EK, et al. Interaction of Polycationic Polymers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Nanoscale Hole Formation and Enhanced Membrane Permeability. *Bioconjugate Chem.* (2006) 17:728-734.
- [26] Lee H, Larson RG. Lipid Bilayer Curvature and Pore Formation Induced by Charged Linear Polymers and Dendrimers: The Effect of Molecular Shape. *J. Phys. Chem. B* (2008) 112:12279-12285.
- [27] Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, et al. Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers, *Nano Lett.* (2008) 8:420-424.
- [28] Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle? Cell Interactions. *Small* (2010) 6:12-21.
- [29] Balogh L, Nigavekar SS, Nair BM, et al. Significant Effect of Size on the in Vivo Biodistribution of Gold Composite Nanodevices in Mouse Tumor Models. *Nanomedicine* (2007) 3:281-296.
- [30] Mailänder V, Landfester K. Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* (2009) 10:2379-2400.
- [31] Stark WJ. Nanoparticles in Biological Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2011) 50:1242-1258.
- [32] Xiao K, Li Y, Luo J, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles, *Biomaterials.* (2011) 32:3435-3446.
- [33] Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri J, Gazeau F. Intracellular Uptake of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles as a Function of their Surface Coating. *Biomaterials* (2003) 24: 1001-1011.
- [34] Gaucher G, Asahina K, Wang J, Leroux J. Effect of Poly(NVinyl-Pyrrolidone)-Block-Poly(d,l-Lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis, and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles. *Biomacromolecules* (2009) 10:408-416.

- [35] Tadros TF, Warszyński P, Zembala M. The Influence of Polymer Adsorption on Deposition Kinetics of Colloid Particles II. Experimental Studies. *Colloids Surf.* (1989) 39:93–105.
- [36] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer AA. Practical Note on the use of Cytotoxicity Assays. *Int. J. Pharm.* (2005) 288:369–376.
- [37] Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface Modification of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles and their Intracellular Uptake. *Biomaterials* (2002) 23:1553-1561.
- [38] Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (2006) 307:93-102.
- [39] Poon Z, Lee JB, Morton SW, Hammond PT, Controlling in vivo stability and biodistribution in electrostatically assembled nanoparticles for systemic delivery, *Nano Lett.* (2011) 11:2096-2103.
- [40] Neves AR, Queiroz JF, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Reis S. Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E, *Nanotechnology.* (2015) 26:495103-4484/26/49/495103.
- [41] Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies, *Fluids Barriers CNS.* (2013) 10:33-8118-10-33.
- [42] Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier, *Fluids Barriers CNS.* (2013) 10:16-8118-10-16.
- [43] Markoutsas E, Papadia K, Clemente C, Flores O, Antimisiaris SG. Anti-Abeta-MAb and dually decorated nanoliposomes: effect of Abeta1-42 peptides on interaction with hCMEC/D3 cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2012) 81:49-56.
- [44] Georgieva JH, Kalicharan D, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Hoekstra D, Zuhorn IS. Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro, *Mol. Ther.* (2011) 19:318-325.
- [45] Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2002) 28:1-13.
- [46] Xiao G, Gan LS. Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics, *Int. J. Cell. Biol.* 2013 (2013) 703545.
- [47] Brzezińska K, Ziaja M. Struktura i funkcje bariery krew-mózg. *Postępy biologii komórki* (2012) 1:84-99.
- [48] Smith MW, Gumbleton M, Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies, *J. Drug Target.* (2006) 14:191-214.
- [49] Gomes I, Ayoub MA, Fujita W, Jaeger WC, Pflieger KD, Devi LA. G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2016) 56:403-425.
- [50] Rozenfeld R, Devi LA. Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. *Biochem J.* (2011) 433:11-18.
- [51] Albizu L, Moreno JL, González-Maeso J, Sealfon SC. Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* (2010) 9:636-650.
- [52] Fujita W, Gomes I, Devi LA. Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR review 10. *Br J Pharmacol.* (2014) 171:4155-4176.
- [53] Derouiche L, Massotte D. G protein-coupled receptor heteromers are key players in substance use disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* (2018) 29. pii: S0149-7634(18)30158-1.

- [54] Kamal M. and Jockers R. Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* (2011) 1;2:2.
- [55] Carriba P, Ortiz O, Patkar K, et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*. (2007) 32:2249-2259.
- [56] Faron-Górecka A, Górecki A, Kuśmider M, Wasylewski Z, Dziedzicka-Wasylewska M. The role of D1-D2 receptor hetero-dimerization in the mechanism of action of clozapine. *Eur Neuropsychopharmacol*. (2008) 18:682-691.
- [57] Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Kędracka-Krok S, Dziedzicka-Wasylewska M. Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT(2A) receptor and its genetic variant 5-HT(2A)H425Y with dopamine D(2) receptor. *Eur J Pharmacol*. (2011) 659:114-123.
- [58] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, et al. Single- chain antigen-binding proteins, *Science* 242 (1988) 242:423-426.
- [59] Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*. (2013) 4:1-20.
- [60] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science* (1985) 228:1315-1317.
- [61] Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. (2010) 31:124-130.
- [62] Schlyer S1, Horuk R. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov Today*. (2006) 11:481-493.

Sylwia Łukasiewicz