UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Autoreferat

Załącznik nr 3a

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Ida Franiak-Pietryga

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

1999 – **magister analityki medycznej**, Oddział Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Łodzi;

2003 – **doktor nauk biologicznych** w dyscyplinie biofizyka, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Zmiany właściwości błon erytrocytarnych ludzi chorych na hipercholesterolemię typu II leczonych statynami"

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Doktorant (1999 – 2003)

Stacjonarne Studium Biofizyczno-Biochemiczne, program studiów 4-letni

- Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Adiunkt w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej (2007 –2010)

- Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Asystent w Pracowni Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki (2012 – nadal)

- Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika w Łodzi

Starszy specjalista ds. naukowo-technicznych w Katedrze Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej (2013 – nadal)

- Uniwersytet Medyczny w Łodzi

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wpływ wybranych leków i nanocząsteczek na mechanizm apoptozy w limfocytach białaczkowych przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL)"

Powyższe osiągniecie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji habilitanta zawarte są w Załączniku 5 (oświadczenia współautorów) i 6 (katalog z kopiami publikacji).

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Franiak-Pietryga I**, Sałagacka A, Maciejewski H, Błoński JZ, Borowiec M, Mirowski M, Robak T, Korycka-Wołowiec A. Apoptotic gene expression under influence of fludarabine and cladribine in chronic lymphocytic leukemia – microarray study. Pharmacological Reports 2012; 64: 412-420. (**IF – 1,965**; MNiSW - 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz wstępnym przygotowaniu publikacji. Mój udział szacuję na 50%.

2. **Franiak-Pietryga I**, Sałagacka A, Maciejewski H, Wołowiec D, Błoński JZ, Janus A, Kotkowska A, Wawrzyniak E, Ghia P, Mirowski M, Robak T, Korycka-Wołowiec A. Changes in the apoptotic gene expression profile in CLL patients treated with rituximab combined with cladribine and cyclophosphamide-preliminary results. Leukemia Research 2012; 36: 1134-1140. (**IF - 2,764**; MNiSW - 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz wstępnym przygotowaniu publikacji. Mój udział szacuję na 50%.

3. **Franiak-Pietryga I**, Bryszewska M (2016). „New and repositioning approaches to the

treatment of chronic lymphocytic leukemia" Book Chapter in "Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis, Treatment Options and Prognosis" Nova Science Publishers, INC., New York, U.S.A., **ISBN:** 978-1-63485-510-5.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji rozdziału oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział szacuję na 90%.

4. **Franiak-Pietryga I**, Ziółkowska E, Ziemba B, Appelhans D, Voit B, Szewczyk M, Góra-Tybor J, Robak T, Klajnert B, Bryszewska M. The influence of maltotriose-modified poly(propylene imine) dendrimers on the chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: dense shell G4 PPI. Molecular Pharmaceutics 2013, 10: 2490-2501 (**IF – 4,787**; MNiSW - 45).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział szacuję na 35 %.

5. **Franiak-Pietryga I**, Ziółkowska E, Ziemba B, Appelhans D, Maciejewski H, Voit B, Kaczmarek A, Robak T, Klajnert-Maculewicz B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Borowiec M, Bryszewska M. The Influence of Glycodendrimer on Apoptosis in B-CLL Cells in vitro Defined by Microarrays. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2016**, 16 (E-pub ahead of print) accepted (DOI:10.2174/1871520616666160622092947) (**IF – 2,722**; MNiSW - 30).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział szacuję na 55 %.

Łączny współczynnik oddziaływania dla tych prac **IF =12,238**; MNiSW = 125

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

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszą białaczką w Europie i Ameryce Północnej. Dotyczy ona najczęściej ludzi w wieku podeszłym (81% chorych przekracza 60 rok życia), jednak ostatnio coraz częściej obserwuje się zachorowania ludzi młodszych. Rokowanie co do czasu przeżycia jak i przebieg PBL u poszczególnych chorych, są wybitnie zróżnicowane, co stanowi zasadniczy problem w leczeniu tej

zasadniczo łagodnej choroby. Od wielu lat trwają badania nad lekiem na PBL, który znacznie zwiększy czas przeżycia tych chorych.

U około 1/3 chorych przebieg choroby jest stabilny, a wczesne włączenie chemioterapii nie wpływa istotnie na czas przeżycia [1, 2]. Jednak u większości chorych stwierdza się wczesne nasilenie objawów i szybką progresję, a w konsekwencji stosunkowo krótki czas przeżycia, nawet pomimo szybkiego podania leczenia [3, 4]. Od wielu lat standardowym lekiem dla chorych na PBL, wymagających chemioterapii jest chlorambucyl, stosowany często łącznie z prednisonem [5-7]. Dotychczas nie ma przekonujących dowodów na to, że skojarzona chemioterapia wg programów COP, CHOP lub innych programów stosowanych w tej postaci białaczki, jako leczenie pierwszej linii, powoduje dłuższe przeżycie w porównaniu z chlorambucylem, nawet pomimo większego odsetka uzyskiwanych remisji [1, 8].

W ostatnich latach wykazano znaczną skuteczność w zakresie odsetka remisji analogów puryn – fludarabiny (FA) i 2-chlorodeoxyadenozyny (2-CdA) u chorych na PBL opornych na chlorambucyl. Jednak dotychczas nie udowodniono, aby analogi te stosowane w monoterapii I linii przedłużały czas przeżycia chorych, w porównaniu z chlorambucylem lub CAP [8,9].

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych spowodowało istotny postęp w terapii PBL. Obecnie stosowane są dwa przeciwciała: alemtuzumab i rytuksymab [10,11]. Z badań przedklinicznych na modelach zwierzęcych oraz badań klinicznych wynika, że istnieją trzy możliwe mechanizmy działania tych leków: ADCC (cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał), liza komórek z udziałem dopełniacza i indukcja apoptozy [12-13]. Jednak dokładne mechanizmy działania alemtuzumabu i rytuksymabu nie zostały jeszcze do końca poznane.

Skuteczność rytuksymabu w monoterapii jest niezadowalająca [14], dlatego obecnie stosowany jest z cyklofosfamidem i kladrybiną lub fludarabiną. Wyniki badań potwierdzają wysoką skuteczność u chorych wcześniej nieleczonych skojarzeniem rytuksymabu z fludarabiną w porównaniu z fludarabiną w monoterapii, tak w zakresie odpowiedzi, jak i czasu przeżycia oraz czasu wolnego od progresji [15, 16].

Niestety, brak jest dotychczas odpowiedzi na zasadnicze pytania: czy zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przekłada się na wydłużenie czasu przeżycia chorych na

PBL oraz jakie powinny być wskazania do stosowania tego nadal bardzo kosztownego leczenia?

Główną przyczyną powstawaniu chorób nowotworowych, w tym chorób nowotworowych krwi, jest zaburzona równowaga pomiędzy proliferacją komórek a ich programowaną śmiercią, zwaną apoptozą. Dlatego też większość strategii terapeutycznych oparta jest na modulowaniu apoptozy i cyklu komórkowego komórek nowotworowych. Efekt cytotoksyczny wywierany przez większość leków przeciwnowotworowych wykorzystywanych w onkohematologii, łącznie z cytostatykami czy radioterapią, oparty jest na indukcji apoptozy, pomimo innych efektów, takich jak uszkodzenie DNA. Jako przykład, dla antracyklin czy analogów purynowych, takich jak fludarabina czy kladrybina, nie tylko aktywność proapoptotyczna może być mechanizmem działania. 2-CdA indukuje mitochondrialny szlak aktywacji kaspaz, podobnie jak fludarabina, ale wywiera również dodatkowo bezpośredni efekt cytotoksyczny na mitochondria. Kladrybina hamuje również syntezę DNA w komórkach białaczkowych, wykazując silną synergistyczną cytotoksyczność w połączeniu z promieniowaniem UV [17].

Cytotoksyczność rytuksymabu, poza mechanizmem ADCC i udziału dopełniacza, wydaje się być zależna od aktywacji szlaku kaspaz i w ten sposób prowadzi do śmierci komórki. Badania *in vitro* wykazują indukcję apoptozy w białaczkowych komórkach typu B za pośrednictwem rytuksymabu [18, 19].

Niektóre doniesienia pokazują odległe wzmocnienie mechanizmu apoptozy indukowanej przez cytostatyki, po wcześniejszym przeleczeniu rytuksymabem. Rytuksymab hamuje aktywność interleukiny 10, która zmniejsza ekspresję białka BCL-2. Ten fakt, wraz ze zmniejszeniem aktywności białek MCL-1 i XIAP, inhibitorów apoptozy obecnych w dużych ilościach na komórkach białaczkowych typu B, może być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za wrażliwość na chemioimmunoterapię rytuksymabem. Z drugiej strony nadekspresja BCL-2 nie ma żadnego wpływu na procesy inicjowane przez rytuksymab [20]. Bezpośredni efekt wiązania z receptorem CD20 nie zmienia ekspresji białek z rodziny BCL-2, takich jak BAX, BCL-XL, BAD jak również białka P53 [20].

Inspiracją do podjęcia badań była ciekawość w zakresie ekspresji genów, związanych ze szlakiem apoptotycznym, indukowanych bądź wygaszanych podczas traktowania

limfocytów białaczkowych lekami stosowanymi w terapii PBL. Uzyskane wyniki były analizowane w kontekście czynników prognostycznych oraz pod kątem mechanizmów związanych ze skutecznym leczeniem. Część badań była przeprowadzona *in vitro* na limfocytach wyizolowanych z krwi pacjentów. Druga część dotyczyła badań *ex vivo* na komórkach od chorych, którzy poddani byli odpowiedniemu leczeniu. Uzyskane wyniki w przyszłości mogą posłużyć do projektowania terapii celowanych i spersonalizowanych dla chorych na PBL.

Jako narzędzie badawcze wykorzystano w dużej mierze analizy oparte o PCR, real-time PCR i mikromacierze Q-PCR z racji na dużą dokładność i szybkość wykonywanych oznaczeń a zarazem mnogość wyników uzyskanych z tych analiz.

W pierwszej pracy cyklu przedstawionego jako habilitacyjny **(Publikacja 1)** przeprowadziłam badania w warunkach *in vitro* na komórkach białaczkowych pozyskanych od pacjentów podczas rutynowych badań. Wyizolowane z krwi pełnej komórki jednojądrowe (MNC) zawierały więcej niż 95% limfocytów białaczkowych (CD5+, CD19+). Zawiesina komórek była inkubowana z dwoma lekami równocześnie w celu zaobserwowania różnic w ich działaniu. Substancje, o których mowa, to kladrybina (2-CdA) i fludarabina (FA) – analogi purynowe stosowane z dużym powodzeniem w terapii PBL. Wśród klinicystów, jak i wśród naukowców, od lat trwają spory nad wyższością jednej substancji nad drugą. Wyniki badań miały na celu zakończenie sporu w świecie naukowo-lekarskim poprzez pokazanie różnic w ekspresji genów apoptotycznych, na które obie substancje działają.

Profil ekspresji genów apoptotycznych określano na macierzy TaqMan®_Low Density Array Human Apoptosis Panel (Applied Biosystems) zawierającej 93 geny apoptotyczne i 3 geny referencyjne (*18S, ACTB, GAPDH*). Do odczytu mikromacierzy użyto skanera 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Względna ekspresja każdego badanego genu była określana metodą ΔΔCt, jako genu referencyjnego użyto 18S. Wartość parametru RQ (fold change) na poziomie 2 lub więcej była przyjęta jako istotna zmiana w ekspresji badanego genu. RQ interpretuje się jako stosunek ekspresji genu po leczeniu/traktowaniu jakimś czynnikiem do ekspresji genu przed leczeniem/traktowaniem jakimś czynnikiem.

W badanych limfocytach białaczkowych pobranych od pacjentów zaobserwowano różnice w ekspresji 27 genów tak pod wpływem działania 2-CdA jak i FA. Kilka z nich

uległo zwiększonej ekspresji: *BAD, TNFRSF21, DAPK1* – w hodowlach komórkowych z 2-CdA, natomiast *CARD6* i *CARD9* w hodowlach z FA. Spośród wszystkich badanych genów cztery (*BAK1, BAX, FAS,* i *BBC3*) zanotowały 20-krotny spadek ekspresji po inkubacjach z lekami, i co ciekawe, w obu badanych grupach te same geny wykazywały nadekspresję lub wygaszenie. W przypadku dwóch z wyżej wymienionych genów (*BAX* i *BBC3*) większe wyciszenie było obserwowane pod wpływem FA. Ponadto zaobserwowano, że gen *FAS* został wyciszony pod wpływem FA prawie dwukrotnie bardziej w porównaniu do wpływu 2-CdA na ten gen. Na podstawie uzyskanych wyników można zakładać, że FA silniej pobudza wewnętrzny szlak apoptozy do aktywacji kaspaz, podczas gdy 2-CdA silniej indukuje apoptozę poprzez aktywację receptorów śmierci (zewnętrzny szlak apoptozy) ale także poprzez indukowanie stresu komórkowego (wewnętrzny szlak apoptozy). Są to jednak pierwsze takie analizy i wymagają ugruntowania w kolejnych badaniach.

Mając wiedzę o zmieniającej się ekspresji genów apoptotycznych pod wpływem pojedynczych substancji (monoterapii) postanowiłam sprawdzić jaki efekt na geny apoptotyczne wywołują stosowane u pacjentów schematy leczenia. Przyjrzeliśmy się bliżej immunochemioterapii z zastosowaniem rytuksymabu, cyklofosfamidu i kladrybiny (RCC) **(Publikacja 2)** oraz standardowej chemioterapii schematem kladrybina z cyklofosfamidem (CC). Badania przeprowadzono na limfocytach białaczkowych uzyskanych od 37 chorych na PBL. Wśród nich 27 chorych leczonych było schematem CC. W drugiej grupie chorych leczonych schematem RCC znalazło się 10 osób. Do badania włączani byli chorzy w stadium 0 - IV wg klasyfikacji Rai. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Profil ekspresji genów apoptotycznych określano na macierzy TaqMan®_Low Density Array Human Apoptosis Panel (Applied Biosystems) zgodnie z protokołem opisanym wcześniej.

Badane próbki od chorych na PBL leczonych schematem RCC zostały pogrupowane pod względem obecności zmutowanego allelu genu *IGVH*. Analiza całej badanej grupy wykazała 5 genów proapoptotycznych, których ekspresja nasiliła się pod wpływem leczenia. Do tych genów należą: *NOXA, RIPK1, CASP10, NFKBIZ* i *ESRRBL1*. W obrębie każdej grupy chorych z obecnością mutacji w genie *IGVH* lub w grupie bez mutacji wyodrębniono panele genów charakterystyczne dla poszczególnej grupy. Geny te były różne pomiędzy grupami. W grupie badanej chorych z obecnym zmutowanym

allelem genu *IGVH* klaster utworzyły geny ze szlaku mitochondrialnego, rodziny receptora TNF jak również inhibitorów NFKB. Trzy geny wykazały nieznacznie większe zmiany ekspresji (*PUMA, BIRC8, TNFRSF25*) natomiast w obrębie 6 innych genów ekspresja zmieniła się znacząco pod wpływem leczenia (*BIRC5, BNIP3L, CARD15, TNFRSF21, FAS* i *DAPK1*). W grupie pacjentów bez obecności mutacji *IGVH* siedem genów wykazało nieznaczne większe różnice w ekspresji (*BCL2L11, BIRC4, BIRC6, CASP8, TNFRSF10B, FADD, APAF1*), natomiast trzy geny wykazały znaczące zmiany w ekspresji w wyniku leczenia schematem RCC (*BAX, CASP4, TNFRSF1A*). Wykazano, że w grupie chorych z obecną mutacją *IGVH* większość pacjentów uzyskała klinicznie całkowitą remisję. W tej grupie badanej obserwowano również zwiększenie ekspresji dużej liczby genów proapoptotycznych. Największy wzrost ekspresji odnotowano dla genów: *BIRC5, CARD15, TNFRSF21* i *DAPK1*. Wśród genów proapoptotycznych ze zwiększoną ekspresją w wyniku terapii w grupie pacjentów gorzej rokujących (bez obecności mutacji *IGVH*) wyodrębniono: *BAX, CASP4, BCL2L11, CASP8 i APAF1*. Biorąc pod uwagę słabą odpowiedź na leczenie w grupie tych pacjentów, należy przypuszczać, że ekspresja tych genów proapoptotycznych nie odgrywa większej roli w regulacji przeżywalności limfocytów białaczkowych *in vivo*. Może się na to składać wiele różnych czynników, których jeszcze nie przebadaliśmy, np. na ekspresję kodowanych przez te geny białek regulatorowych i efektorowych oraz skuteczności ich działania w organizmie.

Próba wyodrębnienia charakterystycznych paneli genetycznych dla poszczególnych schematów leczenia w kontekście czynników prognostycznych i odpowiedzi na leczenie ma na celu w przyszłości pomoc w personalizacji terapii, która jest kluczem do sukcesu w leczeniu chorych nie tylko na białaczkę, ale na wszystkie nowotwory.

Przez ostatnie 20 lat, znaczący postęp w biologii molekularnej zaowocował lepszą charakterystyką i zrozumieniem biologii i rokowania PBL. Na podstawie ostatnich badań, wiadomo, że kluczową rolę w patogenezie PBL odgrywa aktywacja receptora limfocytów B (BCR) [21] i to odkrycie daje nowe możliwości dla rozwoju innowacyjnych i bardziej skutecznych terapii. W ostatnich latach na rynku farmaceutycznym pojawiło się kilka drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy ukierunkowanych na szlak

sygnałowy BCR, w tym inhibitor kinazy tyrozynowej Brutona (BTK) [22] - ibrutynib [23] oraz inhibitor kinazy 3-fosfatydyloinozytolu p110δ (PI3Kp110δ) [24]- idelalisib [25]. Te dwa nowe leki zostały zatwierdzone przez US Food and Drug Administration w 2014 roku i są bardzo obiecujące w nowej indywidualnej strategii leczenia. Wśród nowych celowanych terapii, wiele uwagi poświęca się lekom o wysokim potencjale do wywołania apoptozy w komórkach nowotworowych. Szlak sygnałowy PI3K/Akt odgrywa kluczową rolę w regulacji przeżywalności limfocytów B w PBL. Inhibitory tego szlaku, OSU-T315, MK2206 mają również silne działanie przeciw-białaczkowe w bardzo unikalnym mechanizmie działania. Nowy mechanizm modulowania szlaku sygnałowego Akt i hamowanie aktywności BCR w komórkach PBL może być bardzo skuteczny w leczeniu białaczki wysokiego ryzyka z del (17p13.1) i/lub niezmutowanym allelem IGVH a także na te postaci choroby, które mogą być oporne na Ibrutinib [26, 27].

Podejście do leczenia PBL zmieniło się znacząco w ciągu ostatnich lat. Analogi purynowe (FA, 2-CdA), pentostatyny lub inne chemioterapeutyki (bendamustyna) wydają się być mniej skuteczne i bardziej toksyczne niż przeciwciała monoklonalne (rytuksymab, alemtuzumab). Najkorzystniejsze efekty wywołują te teki w terapiach skojarzonych, stosowanie ich w monoterapii pozostawia wiele do życzenia. Istnieje wiele prac naukowych dotyczących zaskakującego i nowatorskiego podejścia do leczenia PBL, ponieważ pomimo szerokiej gamy leków przeciwnowotworowych dostępnych obecnie na rynku farmaceutycznym, przewlekła białaczka limfocytowa pozostaje nadal chorobą nieuleczalną. Schematy terapeutyczne dotychczas stosowane skuteczne są dla poszczególnych pacjentów. Ogromna liczba chorych wykazuje oporność na dostępną chemio- i immunochemioterapię. Dlatego też poszukiwanie nowych związków, które będą skutecznie zwalczały białaczkę, jest w pełni uzasadnione. Postanowiono zatem sprawdzić, czy nanocząsteczki okażą się skuteczną bronią w walce z PBL (**Publikacja 3**).

Celem wykonanych badań była wstępna kwalifikacja przydatności klinicznej dendrymerów w monoterapii chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową (PBL), jak i w połączeniu z wybranymi analogami purynowymi (2-CdA, FA) i przeciwciałem monoklonalnym (Rit), na podstawie oceny cytotoksyczności oraz procesu apoptozy indukowanej *in vitro* tymi lekami, określanych w analizie szerokiego spektrum genów apoptotycznych z wykorzystaniem metody mikromacierzy.

Przedmiotem badań (**Publikacja 4 i 5**) jest zastosowanie nanocząsteczki do leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL). Nanocząsteczka, o której mowa, jest polimerem o rozgałęzionej strukturze zwanym dendrymerem. Ten rodzaj nanocząsteczek swoją strukturą przypomina drzewo o bujnie rozgałęzionej koronie (stąd nazwa – dendrymer; z greckiego *dendron*-drzewo, *meros*-część).
Dendrymer został opłaszczony cukrem – maltotriozą w ok. 30% PPI-G4-OS-Mal-III (**Publikacja 5; P.401936/PCT/PL2013/000163**) i w ok. 90% PPI-G4-DS-Mal-III (**Publikacja 4; P.401934/ PCT/PL2013/000154**). Tak przygotowana nanocząsteczka potrafi wywołać śmierć komórki białaczkowej a jednocześnie nie uszkadzać zdrowych komórek krwi (czerwonych krwinek, białych krwinek, płytek krwi). Do tej pory dendrymery wykorzystywano jako nośniki dostępnych na rynku leków. Te wyniki wskazują na możliwość zastosowania nanocząsteczki jako substancji aktywnej, która sama może być lekiem. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem dendrymeru wykazały, że działa on poprzez mechanizm apoptozy, który naturalnie jest uszkodzony w białych krwinkach i dlatego dochodzi do zwiększenia ich liczby we krwi, co powoduje białaczkę.

Działanie dendrymerów PPI-G4-DS/OS-Mal-III polega na indukowaniu w komórkach białaczkowych mechanizmu apoptozy i na tej drodze powodowanie śmierci komórek białaczkowych. Paradygmatem choroby (PBL) jest defekt szlaku apoptozy, tzw. programowanej śmierci komórki, który posiadają limfocyty białaczkowe, dlatego też następuje akumulacja limfocytów B w krwiobiegu (limfocytoza). Ostatnio uważa się również, że limfocyty białaczkowe wykazują nasilony mechanizm proliferacji, stąd też zwiększenie liczby limfocytów następuje w stosunkowo krótkim czasie. Skuteczny składnik leku/lek na PBL powinien indukować apoptozę w limfocytach białaczkowych, hamować ich proliferację i jednocześnie nie wykazywać toksyczności w stosunku do pozostałych zdrowych komórek krwi.

Badania z wykorzystaniem dendrymerów zostały wykonane w warunkach *in vitro*. Materiał do badań stanowiły komórki jednojądrzaste (Mononuclear cells; MNCs) wyizolowane z krwi 20 uprzednio nieleczonych chorych na PBL (10K i 10M) – inkubacje z PPI-G4-DS-Mal-III oraz 31 uprzednio nieleczonych chorych na PBL (12K i 19M)

w grupie z PPI-G4-OS-Mal-III. Dendrymer PPI-G4-DS/OS-Mal-III dodawano do hodowli MNCs z przewagą limfocytów białaczkowych (>95%) w następujących stężeniach: 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml i 10 mg/ml.

Odsetek komórek ulegających apoptozie indukowanej dendrymerem PPI-G4-DS-Mal-III jak również PPI-G4-OS-Mal-III zastosowanych we wszystkich stężeniach, zarówno po 24 jak i 48 godzinach, był znamiennie wyższy, niż komórek ulegających apoptozie spontanicznej. Wyższy odsetek komórek ulegających apoptozie zaobserwowano dla czasów inkubacji 48h, w porównaniu do 24h w obu grupach badawczych. Największy odsetek komórek późnoapoptotycznych (Ann-V^+JP^+) wykazano po 48h inkubacji dla dendrymeru PPI-G4-DS-Mal-III o stężenia 8 mg/ml, podczas gdy dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III indukował późną apoptozę równie mocno w stężeniu 8 mg/ml jak i 10 mg/ml. Dendrymer PPI-G4-DS-Mal-III znacząco indukował również wczesną apoptozę (Ann-V^+JP^-) w komórkach PBL w trzech stężeniach: 4 mg/ml, 6 mg/ml i 8 mg/ml w hodowlach komórkowych 24-godzinnych, podczas gdy dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III nie indukował znacząco wczesnej apoptozy (Ann-V^+JP^-) w komórkach PBL. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla odsetka komórek nekrotycznych PBL w porównaniu z kontrolą ani w hodowlach 24h ani w 48h w przypadku obu badanych dendrymerów. Świadczy to o tym, że badany dendrymer powoduje śmierć komórek białaczkowych pobudzając mechanizm apoptozy a nie działa bezpośrednio na błonę komórkową przerywając jej ciągłość.

Kolejną metodą potwierdzającą działanie dendrymeru PPI-G4-DS-Mal-III poprzez mechanizm apoptozy na komórki białaczkowe są wyniki oceny potencjału mitochondrialnego. Odsetek komórek apoptotycznych zwiększał się proporcjonalnie do wzrostu stężenia dendrymeru. Odsetek komórek apoptotycznych po inkubacji dendrymeru z analogiem purynowym (FA, fludarabina) w stężeniu 1,6 μM był porównywalny do odsetka komórek apoptotycznych dla stężenia 8 mg/ml obu badanych dendrymerów. Przeciwciało monoklonalne anty-CD20 (Rit, rytuksymab) w stężeniu 10 μg/ml wykazywało działanie indukujące apoptozę rzędu apoptozy spontanicznej (w próbkach kontrolnych). Po 48h w hodowlach z dodatkiem dendrymeru PPI-G4-DS-Mal-III odsetek komórek z obniżonym potencjałem mitochondrialnym ($\Delta\Psi m^{low}$/Gly-A^-) był istotnie wyższy (od 67,1% do 91,9 % w zależności od stężenia dendrymeru) od odsetka tych komórek w hodowli kontrolnej (28,3%). Dla porównania – dendrymer PPI-G4-OS-Mal-III obniżał potencjał

mitochondrialny w 67,8% do 79,3 % populacji komórek badanych (w zależności od stężenia dendrymeru) w porównaniu do hodowli kontrolnej (28,3%). Odsetek komórek apoptotycznych zwiększał się proporcjonalnie do wzrostu stężenia dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III, jak również PPI-G4-DS-Mal-III.

Wpływ obu badanych dendrymerów na normalne komórki jednojądrzaste jest znikomy. Odsetek komórek martwych wybarwionych jodkiem propidyny (JP) po 24 h inkubacji z PPI-G4-DS-Mal-III był równy 12,9% dla stężenia 8 mg/ml, podczas gdy dla komórek nietraktowanych wynosił 12,38%. Podobny wynik uzyskano dla PPI-G4-OS-Mal-III. Jak widać z przedstawionych wyników badań, dendrymery PPI-G4-DS/OS-Mal-III nie wykazują toksycznego działania na normalne limfocyty. Ponadto sprawdzono, jaki wpływ ma badany dendrymer na hamowanie proliferacji komórek. Dendrymer PPI-G4-DS-Mal-III jak również PPI-G4-OS-Mal-III hamują w niewielkim stopniu proliferację normalnych limfocytów. Efekt ten nie ma istotnego znaczenia z biologicznego punktu widzenia. Wraz ze wzrostem stężenia dendrymeru zdolność do hamowania proliferacji wzrasta.

Sprawdzono również dwa inne bardzo ważne parametry krwi, na które mógłby wpływać dendrymer: hemolizę erytrocytów i agregację płytek krwi. Żaden z badanych dendrymerów nie powodował hemolizy erytrocytów ani agregacji płytek krwi. Z powyższych obserwacji widać w sposób oczywisty, że zarówno PPI-G4-DS-Mal-III jak i PPI-G4-OS-Mal-III są bezpieczne dla erytrocytów, nie niszczą ich błony komórkowej i nie powodują agregacji trombocytów. IC_{50} dla dendrymeru PPI-G4-DS-Mal-III zastosowanego pojedynczo wynosiło 10 mg/ml, natomiast dla dendrymeru PPI-G4-OS-Mal-III zastosowanego pojedynczo wynosiło 8,53 mg/ml.

Jak opisałam powyżej, dodanie dendrymeru PPI-G4-DS-Mal-III lub PPI-G4-OS-Mal-III do limfocytów białaczkowych w istotnym stopniu indukuje w tych komórkach mechanizm apoptozy, w ten sposób znacznie redukując ich przeżywalność. Wykazałam, że w przypadku tej nanocząsteczki można oczekiwać dobrego terapeutycznego działania w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL). Równocześnie wykazałam, że cząsteczka ta jest nietoksyczna dla pozostałych elementów morfotycznych krwi (erytrocytów, płytek krwi), co zachęca do przeprowadzenia badań na zwierzętach w kierunku opracowania nowej substancji do leczenia PBL.

Zostały również przeprowadzone badania profilu ekspresji genów pod wpływem badanych dendrymerów. Wykazałam pożądany wpływ dendrymerów PPI-G4-OS/DS-Mal-III na zmianę ekspresji genów ze szlaków sygnałowych: BCR, AKT, WNT, NFkB, TNF, co zwiększa możliwość zastosowania tych nanocząsteczek w terapii celowanej i spersonalizowanej. Wiadomo również, że szlaki te są skutecznie modulowane w komórkach PBL z aberracjami chromosomowymi takimi jak del(17p), del(11q), del(13q) i trisomia 12, co czyni te nanocząsteczki jeszcze bardziej atrakcyjnymi, gdyż pokazuje możliwość zastosowania w przypadkach odnotowanej oporności na leczenie dotychczas dostępnymi lekami. Część z tych wyników badań została już opublikowana w dobrych czasopismach naukowych oraz przedstawiona na polskich i zagranicznych konferencjach.

Wykorzystanie wyników

Wyniki badań zostały zgłoszone do ochrony patentowej w Polsce (P.401934, P.401936, P.416636) oraz międzynarodowej (PCT/PL2013/000154, PCT/PL2013/000163). Wynalazki są w trakcie procesu komercjalizacji. Jesteśmy na etapie wdrażania badań przedklinicznych pierwszej fazy.

P.401934 -- Zastosowanie dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-DS-Mal-III; wniosek przyjęto w UP RP dn. 06.12.2012 [WIPO ST 10/C PL401934 – nr publikacji]
PCT/PL2013/000154

Autorzy: Franiak-Pietryga Ida, Bryszewska Maria, Appelhans Dietmar, Klajnert-Maculewicz Barbara

P.401936 -- Zastosowanie dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji opłaszczonego maltotriozą PPI-G4-OS-Mal-III; wniosek przyjęto w UP RP dn. 06.12.2012 [WIPO ST 10/C PL401936 – nr publikacji]
PCT/PL2013/000163

Autorzy: Franiak-Pietryga Ida, Bryszewska Maria, Appelhans Dietmar, Klajnert-Maculewicz Barbara

P.416636 -- Medyczne zastosowanie dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji, opłaszczonego maltotriozą – wniosek przyjęto do UP RP dn. 24.03.2016

Autorzy: Franiak-Pietryga Ida, Bryszewska Maria, Appelhans Dietmar

Wyniki badań dotyczące zgłoszonego wynalazku (**P.401936**) zostały przedstawione na 112 Międzynarodowych Targach Wynalazczości „Concours Lepine" 2013, które odbyły się w Paryżu we Francji.

Wynalazek pt.: ***Dendrymer czwartej generacji – zastosowanie***
został zgłoszony przez Uniwersytet Łódzki (UŁ) oraz Centrum Transferu Technologii przy UŁ.

Autorzy: Dr Ida Franiak-Pietryga, Prof. dr hab. Maria Bryszewska, Dr Dietmar Appelhans, Prof. dr hab. Barbara Klajnert - zespół pod kierownictwem prof. Marii Bryszewskiej.
Wynalazek został na targach uhonorowany **złotym medalem – nagroda dla całego zespołu badawczego.**

Prace w części zostały zrealizowane ze środków grantowych w ramach projektu NCN **(Opus 2011/01/B/NZ5/01371)** po tytułem: *„Dendrymery – potencjalne leki w przewlekłej białaczce limfocytowej".* Kierownikiem projektu była prof. Maria Bryszewska z Uniwersytetu Łódzkiego, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska.

Piśmiennictwo

1. Robak T, Kasznicki M. Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1015-27.
2. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Navarro M, Leblaw R, Leporrier M, Jaubert J, Leppeu G, Drevius B, Binett IL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 1306-1514.
3. Dighiero G, Binet JL. When and how to treat chronic lymphocytic leukemias. *N Engl J Med* 2000; 343: 1799-1801.
4. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2015; 90, 447-460.
5. Robak T., Kasznicki M. Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1015-27.
6. Catovsky D, Murphy RL. Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2146-54.
7. O,Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 308-18.
8. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz I, Elias L, Shepherd L, Hines I, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1750-57.
9. Robak T, Błoński JZ, Kasznicki M, Błasińska-Morawiec M, Krykowski E, Dmoszyńska A, Mrugała-Śpiewak H, Skotnicki AB, Nowak W, Konopka L, Ceglarek B, Maj S, Dwilewicz-Trojaczek I, Hellmann A, Urasiński I, Zdziarska B, Kotlarek-Haus S. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first line

therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized multicenter trial. *Blood* 2000; 96: 2723-29.
10. Hallek M. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): First –Line Treatment. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005; 285-91.
11. Montserrat E, Moreno C, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Gine E, Bosch F. How I treat refractory CLL. *Blood* 2006; 107: 1276-83.
12. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, Densmore JJ, Williams ME, Taylor RP. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 2004; 172: 3280-88.
13. Villamor N, Montserrat E, Colomer D. Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2003; 30: 424-33.
14. Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R, Knauf W, Riedel U, Hinke A, Srock S, Serke S, Peschel C, Emmerich B. German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2001; 98: 1323-31.
15. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4079-88.
16. Wilson PK, Szabados E, Mulligan SP, Christopherson RI. Comparative effects of cladribine, fludarabine and pentostatin on nucleotide metabolism in T- and B-cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 833-42.
17. Genini D, Adachi S, Chao Q et al. Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukaemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. Blood *2000*; 96: 3537-43.
18. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through mitogen activated protein - kinase - dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 1314-19.
19. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B-cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 673-83.
20. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 709-23.
21. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103, 4389-95.
22. Satterthwaite AB, Witte ON. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective. *Immunol Rev* 2000; 175, 120-7.
23. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007; 2, 58-61.
24. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, et al. Phosphatydilinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010; 116, 2078-2088.

25. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123, 3390–3397.
26. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanism for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014; 370, 2286-94.
27. Cheng S, Guo A, Lu P, Ma J, Coleman M, Wang YL. Functional characterization of BTK (C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia* 2015; 29, 895-900.

d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Przebieg kariery naukowej

W roku 1994 rozpoczęłam studia wyższe na Oddziale Analityki Wydziału Farmacji Akademii Medycznej w Łodzi. W latach 1995-1999 brałam czynny udział w pracy naukowo-badawczej w ramach Studenckiego Koła Naukowego Immunologii Kardiologicznej i Transplantacyjnej przy Oddziale Chorób Wewnętrznych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi pod kierownictwem prof. dr hab. med. Andrzeja Żebrowskiego. Wyniki uzyskane w trakcie tych badań zostały zaprezentowane na Konferencji Studenckiego Towarzystwa Naukowego. Uczestnicząc w kole naukowym zainteresowałam się immunologią, biologią molekularną, transplantologią i miałam możliwość zdobycia szerszej wiedzy na ten temat. Tematyka podejmowana w kole naukowym znalazła swoją kontynuację w pracy magisterskiej pt.: „Dobór dawcy i biorcy a niektóre zjawiska immunologiczne występujące u ludzi po przeszczepie nerek" przygotowanej pod kierownictwem prof. Andrzeja Żebrowskiego.

W 1999 roku ukończyłam studia na Oddziale Analityki Medycznej i w tym samym roku zostałam doktorantką Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Biofizyczno-Biochemicznego na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką prof. Marii Koter-Michalak. Pracę doktorską pt: „Zmiany właściwości błon erytrocytarnych ludzi chorych na hipercholesterolemię typu II leczonych statynami" obroniłam w 2003 roku. W pracy, która stanowiła podstawę rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki dotyczące właściwości błon biologicznych, a w szczególności zmian ich płynności w stanach patologicznych. Zaobserwowano, że usztywnienie błon erytrocytarnych w przebiegu miażdżycy związane jest m. in. ze wzrostem stężenia cholesterolu w osoczu krwi [1, 5]. Płynność błony erytrocytarnej określano za pomocą

spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) z zastosowaniem dwóch znaczników spinowych tj. kwasu 5-doksylostearynowego (5-DSA) i 16-doksylostearynowego (16-DSA). Zmiany konformacyjne białek błonowych śledzono przy użyciu znacznika maleimidowego (MSL). Badania zostały przeprowadzone w kilku etapach. Główny etap pracy obejmujący terapię farmakologiczną wykazał, że leczenie statynami powoduje nie tylko obniżenie stężenia cholesterolu we krwi ale powoduje również poprawę właściwości reologicznych poprzez poprawę właściwości błon erytrocytarnych [2-4, 6]. W kolejnym etapie przeprowadziłam badania *in vitro*, dotyczące bezpośredniego wpływu statyn, jak również flawonoidu – kwercetyny, na wybrane parametry, określające uszkodzenie błon erytrocytarnych [7]. W modelu *in vitro* zaobserwowałam, że statyny obniżają zawartość cholesterolu w błonie erytrocytarnej a tym samym zwiększają jej płynność. Wykazałam również, że kwercetyna powoduje w erytrocytach ludzi chorych obniżenie stopnia peroksydacji lipidów błon oraz zawartości cholesterolu. Zarówno statyny jak i kwercetyna nie wywołują istotnych zmian właściwości błon erytrocytów u ludzi zdrowych.

W okresie wykonywania doktoratu prowadziłam także działalność dydaktyczną - zajęcia z biofizyki ze studentami Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska.

Po ukończeniu studiów doktoranckich i uzyskaniu stopnia naukowego doktora zajmowałam się nadal tematyką związaną z dyslipidemią. Kontynuowałam współpracę z Katedrą Biofizyki Skażeń Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz nawiązałam współpracę z Kliniką Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Współpraca ta zaowocowała czterema oryginalnymi publikacjami, w których dokonałam m. in. analizy jak działają różne leki hipolipemiczne u otyłych kobiet w okresie menopauzy jak również u kobiet ze stwierdzonym zespołem metabolicznym [8, 10-12]. Badania wykazały, że trzymiesięczna terapia atorwastatyną jest wystarczająca do skompensowania zaburzeń w strukturze błon erytrocytów u kobiet w okresie menopauzy ze stwierdzonym zespołem metabolicznym. Takich efektów nie udało się uzyskać trzymiesięczną terapią fenofibratem w podobnej grupie kobiet z aterogenną dyslipidemią.

Celem kolejnej pracy z tego zakresu było porównanie działania statyn (prawastatyny, simwastatyny) jak również flawonoidów (epikatechiny, kwercetyny) w hodowlach *in vitro* na wybrane parametry strukturalne błon erytrocytów osób

z hipercholesterolemią typu 2. Zaobserwowałam, że epikatechina w warunkach *in vitro* nieznacznie lepiej obniża poziom cholesterolu błonowego w porównaniu do prawastatyny. Obie substancje bardzo korzystnie wpływają na poprawę płynności krwinek czerwonych. Prawastatyna i simwastatyna, w przeciwieństwie do epikatechiny i kwercetyny, w warunkach *in vitro,* nie wykazują wpływu na peroksydację lipidów w błonie erytrocytów u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną. W kolejnej pracy zbadałam wpływ innej statyny (atorwastatyny) na skuteczność terapii jak i na błonę komórkową erytrocytów. Najsilniejsze działanie spośród trzech badanych statyn w organizmie chorego wykazała atorwastatyna natomiast w warunkach pozaustrojowych wysoką skutecznością hipolipemiczną i antyoksydacyjną wykazały się flawonoidy.

W 2007 roku uzyskałam prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego opatrzone nr 08355 (nr wpisu na listę diagnostów laboratoryjnych 11936). Od 2 maja 2012 roku specjalizuję się z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

W latach 2007-2010 byłam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, w celu realizacji projektu badawczego zamawianego pt. „POL-POSTDOC III – Projekty badawcze przygotowane i realizowane przez osoby po doktoracie" pt. „Ocena mechanizmów apoptozy komórek białaczkowych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową leczonych kladrybiną w skojarzeniu z rytuksymabem i innymi lekami przeciwbiałaczkowymi". Zarejestrowany pod numerem PBZ/MNiSW/07/2006/28 projekt realizowany był w oparciu o materiał kliniczny pozyskiwany, klasyfikowany i analizowany immunologicznie w Klinice Hematologii UM w Łodzi kierowanej przez prof. Tadeusza Robaka. Część badań, dotycząca porównawczej analizy ekspresji genów po traktowaniu komórek lekami (w hodowlach komórkowych), wykonywana była w Pracowni Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UM w Łodzi. Projekt był w pełni finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Byłam głównym wykonawcą ww. grantu i jego kierownikiem. Projekt zaowocował pięcioma publikacjami oryginalnymi [13, 14, 16, 17, 18], jedną pracą poglądową w polskim czasopiśmie [9] i rozdziałem do książki w języku angielskim [15] na temat wykorzystania techniki mikromacierzy do określenia profilu ekspresji genów przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL).

Od pięciu lat (od 2011r.) pracuję w szpitalnym laboratorium –Pracowni Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Mikołaja Kopernika w Łodzi - i zajmuję się diagnostyką białaczek metodami biologii molekularnej. Nadal współpracuję naukowo z Kliniką Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Katedrą Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego [19-22].

Od dwóch lat pracuję w Katedrze Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku Starszego Specjalisty ds. Naukowo-Badawczych, gdzie pogłębiam swoją wiedzę i doskonalę umiejętności w zakresie genetyki medycznej.

Jestem autorem 22 prac oryginalnych, jednej poglądowej, których suma punktów MNiSW wynosi 349,5 (w tym 279 punktów MNiSW i 25,252 IF przypada na prace, których jestem pierwszym autorem), a IF w sumie wynosi 32,694. Mój dorobek naukowy obejmuje również 15 komunikatów zjazdowych, w tym 8 prezentowanych na zagranicznych konferencjach, dwa rozdziały do książki w anglojęzycznych wydawnictwach oraz dwa zgłoszenia patentowe międzynarodowe (**PCT/PL2013/000154** i **PCT/PL2013/000163**) i trzy krajowe. Chciałabym podkreślić, że mój wkład do większości opublikowanych prac był znaczny i praktycznie wszystkie prace z ostatnich 5 lat o charakterze eksperymentalnym opublikowane zostały w czasopismach o zasięgu światowym.

Prace nad wykorzystaniem glikodendrymerów jako potencjalnych leków trwają. Planuję również kontynuację badań nad biologią molekularną białaczek w ramach nowych projektów naukowych. Obecnie aplikuję o granty międzynarodowe bazując na mojej współpracy z zagranicznymi partnerami (Northern University, Boston; University of California, San Diego, U.S.A.; Liebniz Polymer Research Institute, Dresden, Germany)

Piśmiennictwo

a) Publikacje przed doktoratem

1. Koter M, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J, **Franiak I.** Zmiany płynności błon krwinek czerwonych u chorych z hiperlipidemią typu II podczas terapii simwastatyna. Problemy Terapii Monitorowanej 2001, 12: 117-124.

2. Koter M, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J, Klikczynska K, **Franiak I.** The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. Eur J Clin Pharmacol. 2002; 58(8):501-6.

b) Publikacje po uzyskaniu tytułu doktora, nie włączone do cyklu habilitacyjnego

3. Koter M, **Franiak I**, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Effects of simvastatin and pravastatin on peroxidation of erythrocyte plasma membrane lipids in patients with type 2 hypercholesterolemia. Can J Physiol Pharmacol. 2003; 81(5):485-92.

4. Bała A, Chojnowska-Jezierska J, Koter M, **Franiak I.** Wpływ 8-tygodniowego leczenia atorwastatyną na skład lipidowy błony erytrocytów u pacjentów z dyslipidemią typu II. Probl. Terap. Monit. 2003; 14 supl. 1: 29-30.

5. Koter M, **Franiak I**, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(2):205-15.

6. Broncel M, Chojnowska Jezierska J, Koter-Michalak M, **Franiak I.** Erythrocyte fluidity in patients with hyperlipidemia during statins therapy. Pol Arch Med Wewn 2005; 113(6): 531-537.

7. Broncel M, **Franiak I,** Koter-Michalak M, Duchnowicz P, Chojnowska-Jezierska J. The comparison in vitro the effects of pravastatin and quercetin on the selected structural parameters of membrane erythrocytes from patients with hypercholesterolemia. Polski Merkuriusz Lekarski 2007; 22: 112-116.

8. **Franiak-Pietryga I,** Koter-Michalak M, Broncel M, Duchnowicz P, Chojnowska-Jezierska J. Anti-inflammatory and hypolipemic effects in vitro of simvastatin comparing to epicatechin in patients with type-2 hypercholesterolemia. Food Chem Toxicol 2009; 47: 393-7.

9. **Franiak-Pietryga I,** Mirowski M, Lech-Marańda E, Robak T. Microarray gene expression profiling in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Acta Haematologica Polonica 2009, 40: 55-66.

10. **Franiak-Pietryga I**, Koter-Michalak M, Duchnowicz P, Sikora J, Tylińska M, Broncel M. The reduction of cholesterol concentration in plasma membranes of erythrocytes and erythrocyte plasma membrane fluidity normalization under the influence of pravastatin and epicatechin *in vitro* in patients with type-2 hypercholesterolemia. Problemy Terapii Monitorowanej 2009; 20 (2): 109-115.

11. **Franiak-Pietryga I,** Balcerak M, Sikora J, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Stetkiewicz T, Broncel M. The effect of atorvastatin on the erythrocyte plasma membrane and C-reactive protein in menopausal women with metabolic syndrome. Przegląd Menopauzalny 2009; 4: 233-38.

12. **Franiak-Pietryga I**, Balcerak M, Sikora J, Duchnowicz P, Stetkiewicz T, Koter-Michalak M, Broncel M. The pleiotropic effects of micronized fenofibrate in obese menopausal women with atherogenic dyslipidemia. Przegląd Menopauzalny 2009; 5: 273-277.

13. Zaborowska A, Cebula-Obrzut B, **Franiak-Pietryga I**, Błoński JZ, Smolewski P, Robak T, Korycka-Wołowiec A. The influence of bendamustine used either alone or in combination with purine nucleoside analogues on the viability and apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells in culture in vitro. Acta Haematologica Polonica 2009; 40 (4): 781-791.

14. **Franiak-Pietryga I**, Sałagacka A, Maciejewski H, Błoński JZ, Borowiec M, Mirowski M, Robak T, Korycka-Wołowiec A. Apoptotic gene expression under influence of fludarabine and cladribine in chronic lymphocytic leukemia – microarray study. Pharmacological Reports 2012; 64: 412-420.

15. **Franiak-Pietryga I** and Mirowski M. Current knowledge of microarray analysis for gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia. Rozdział w książce „Chronic Lymphocytic Leukemia" ,pp. 95-118; ISBN 978-953-307-881-6.
Redaktor: Pablo Oppezzo
Adres wydawniczy: Rijeka Croatia : InTech, 2012

16. Czemerska M, Smolewski P, **Franiak-Pietryga I**, Maciejewski H, Janus A, Ghia P, Robak T. Zespół Richtera w przebiegu leczenia R-CC – opis przypadku. LyFE Journal 2012; 2: 12-17.

17. **Franiak-Pietryga I**, Salagacka A, Maciejewski H, Wolowiec D, Blonski JZ, Janus A, Kotkowska A, Wawrzyniak E, Ghia P, Mirowski M, Robak T, Korycka-Wolowiec A.
Changes in the apoptotic gene expression profile in CLL patients treated with rituximab combined with cladribine and cyclophosphamide-preliminary results. Leukemia Research 2012; 36: 1134-1140.

18. Rogalińska M[Δ], **Franiak-Pietryga I**[Δ], Błoński JZ, Góralski P, Maciejewski H, Janus A, Wawrzyniak E, Robak P, Mirowski M, Piekarski H, Robak T, Kiliańska ZM. Towards personalized therapy for chronic lymphocytic leukemia; DSC and cDNA microarray assessment of two cases. Cancer Biol Ther. 2013; 1;14(1):6-12. doi: 10.4161/cbt.22623.

(Δ equal contribution)

19. Ziółkowska E, **Franiak-Pietryga I**, Błoński JZ, Robak T, Smolewski P, Korycka-Wołowiec A. Type of serum influences the rituximab dependent cytotoxicity and apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2012; 22;66:730-8. doi: 10.5604/17322693.1015036.

20. **Franiak-Pietryga I**, Ziółkowska E, Ziemba B, Appelhans D, Voit B, Szewczyk M, Góra-Tybor J, Robak T, Klajnert B, Bryszewska M. The influence of maltotriose-modified poly(propylene imine) dendrimers on the chronić lymphocytic leukemia cells in vitro: dense shell G4 PPI. Molecular Pharmaceutics 2013; 10: 2490-2501.

21. Ziemba B[Δ], **Franiak-Pietryga I**[Δ], Pion M, Appelhans D, Muñoz-Fernández M, Voit B, Bryszewska M, Klajnert-Maculewicz B. Toxicity and proapoptotic activity of poly(propylene imine) glycodendrimers in vitro: considering their contrary potential as biocompatible entity and drug molecule in cancer. Int J Pharmaceutics 2014; 461/1-2: 391-402. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.011.

22. **Franiak-Pietryga I**, Bryszewska M. (2016) „New and repositioning approaches to the treatment of chronic lymphocytic leukemia" Book Chapter in "Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis, Treatment Options and Prognosis"

Nova Science Publishers, INC., 400 Oser Avenue, Suite 1600, Hauppauge, NY, 11788-3619 USA, **ISBN:** 978-1-63485-510-5

23. **Franiak-Pietryga I**, Tymoniuk B, Borowiec M, Ziolkowska E, Blonski ZJ, Janus A, Misiewicz M, Wawrzyniak E, Trelinski J, Maciejewski H, Tomasiuk R, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Kaminska J, Stepien A, Mirowski M, Gora-Tybor J. Potential genetic agent BFL1 for targeted therapy in chronic lymphocytic leukemia. European Scientific Journal 2015, vol.11, no. 27, p. 223-243; ISSN: 1857-7881 (Print) e-ISSN 1857-7431.

24. **Franiak-Pietryga I**, Maciejewski H, Ostrowska K, Appelhans D, Voit B, Misiewicz M, Kowalczyk P, Bryszewska M, Borowiec M. Dendrimer-based nanoparticles for potential personalized therapy in chronić lymphocytic leukemia: Targeting the BCR-signaling pathway. Int J Biol Macromol 2016; 88, 156-161. (http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.021)

25. **Franiak-Pietryga I**, Ziółkowska E, Ziemba B, Appelhans D, Maciejewski H, Voit B, Kaczmarek A, Robak T, Klajnert-Maculewicz B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Borowiec M, Bryszewska M. The Influence of Glycodendrimer on Apoptosis in B-CLL Cells in vitro Defined by Microarrays, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, Volume 16, 12 Issues, 2016

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Największe sukcesy naukowe osiągam od 2012 roku, odkąd wraz z prof. Marią Bryszewską z Katedry Biofizyki Ogólnej UŁ dostałyśmy finansowanie grantu z NCN (2011/01/B/NZ5/01371) pt. *„Dendrymery – potencjalne leki w przewlekłej białaczce limfocytowej".* Jestem pomysłodawcą i głównym wykonawcą tego grantu. Projekt był realizowany przy współpracy z dr Dietmarem Appelhans'em z Leibniz Institute of Polymer Research w Dreźnie (Niemcy). Pierwszymi owocami projektu były dwa **zgłoszenia patentowe (P.401934/ PCT/PL2013/000154** i **P.401936/ PCT/PL2013/000163)** na dwie modyfikacje dendrymeru poli(propyleno iminowego) (PPI-G4-Mal-III) opłaszczonego maltotriozą jako potencjalnych leków na białaczkę limfocytową przewlekłą. Jeden z wynalazków został wystawiony w 2013 roku na **112 Międzynarodowych Targach Wynalazczości w Paryżu** (Concour Lepine) i został nagrodzony **złotym medalem**. Te dwa zgłoszenia są w trakcie procedury międzynarodowej ochrony patentowej. W roku 2016r. dołaczyło trzecie polskie zgłoszenie na szersze zastosowanie glikodendrymerów **(P.416636).**

Doświadczenie naukowe zdobyte w Polsce i za granicą

Należy wspomnieć, że wychowuję niepełnosprawne dziecko. Mój syn urodził się z wadą mózgu – dysplazją kory lewej półkuli, co skutkuje lekooporną padaczką. Był dwukrotnie operowany w Klinice Neurochirurgicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Bonn (Niemcy), w której pozostaje pod stałą opieką lekarską. Operacja uratowała mu życie, ale stan zdrowia mojego syna był na tyle zły, że nie pozwalał mi do tej pory na odbycie dłuższego stażu zagranicznego. Dopiero w zeszłym roku (2015r.) jako laureatka „TOP500 Innovators" spędziłam dwa miesiące na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley, natomiast w tym roku zostałam laureatką Stypendium Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta w kategorii Senior Award 2016-17 i począwszy od września 2016 r. będę realizowała stypendium na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Diego, U.S.A., realizując swój własny projekt badawczy.

Brałam udział w następujących szkoleniach i warsztatach:

1. "Statistical Methods in Bioinformatics", "Good practice in DNA Microarray Analysis" - warsztaty grupy roboczej podczas konferencji IBS/GMDS w Monachium, Niemcy 22-23.11.2007

2. Niemcy, Universitaetsklinikum Koeln, Klinik I fuer Innere Medizin – projektowanie badań do projektu POL-POSTDOC, zapoznanie się z nowymi technikami molekularnymi wykorzystywanymi w diagnostyce hematoonkologicznej, lipiec 2009

3. Szkolenie "Real-Time PCR training" w Applied Biosystems Training Lab, Warszawa 19.08.2009

4. Szkolenie "Mikromacierze ekspresyjne – projektowanie eksperymentów i analiza danych", Centrum Edukacji Medycznej, Warszawa 17-18.02.2010

5. Szkolenie "Real-Time PCR – wdrażanie metody, projektowanie reakcji i analiza wyników", Centrum Edukacji Medycznej, Warszawa 25.03.2010

6. Szkolenie dotyczące innowacyjnej technologii automatycznego genotypowania antygenów układu HLA opartej na analizie mikromacierzy systemu Histo Spot®, Pracownia Dawców Szpiku Kliniki Chorób Wewnętrznych Hematologii i Onkologii Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie, 22.09. 2011.

7. Staż w zakresie technik molekularnych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, 26-30.03.2012.

8. Kurs do specjalizacji „Genetyka molekularna", Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 21-24.05.2012

9. Szkolenie „Zastosowanie mikromacierzy CGH w cytogenetyce molekularnej", Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy; 17-19.09.2012

10. Kurs do specjalizacji „Diagnostyka przedurodzeniowa", Zakład Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź, 26-28.11.2012

11. Kurs do specjalizacji „Cytogenetyka kliniczna", Zakład Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź, 15-19.04.2013

12. Szkolenie „Sekwencjonowanie następnej generacji za pomocą Sure Select i Haloplex" Agilent, Warszawa, 21.05.2013

13. Kurs do specjalizacji „Genetyka Hematoonkologiczna", Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, 16-20.09.2013

14. Kurs do specjalizacji „Badania genetyczne w guzach litych", Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Gdański Uniwersytet Medyczny, 23-25.10.2013

15. Kurs do specjalizacji "Neurogenetyka", Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, 22-24.04.2014

16. Kurs do specjalizacji "Podstawy immunogenetyki i farmakogenetyki" Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki, Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 06.08.2014

17. Kurs do specjalizacji "Choroby genetyczne innych układów" Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, 25.04.2014

18. Kurs do specjalizacji "Diagnostyka zaburzeń cielesno-płciowych" Zakład Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź, 09.03.2015

19. Kurs do specjalizacji "Poradnictwo genetyczne" Zakład Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź, 11.03.2015

20. Kurs do specjalizacji "Wybrane przykłady genetycznych chorób metabolicznych" instytut Matki i Dziecka, Warszawa, 18-22.05.2015

21. University of Texas, Austin (USA), 17-21.11.2014; wizyta konsultacyjna w centrum Transferu Technologii odnośnie komercjalizacji moich dwóch wynalazków

22. University of California, Berkeley (USA), Haas School of Business, Poland TOP 500 Innovators, 28.09.2016 – 27.11.2015

23. TP53 MASTR warsztaty prowadzone przez firmę Multiplicom NV w kooperacji z firmą OpenExome; 11-13.05.2016 Wojskowa Akademia Techniczna w Warszawie

24. TruSight HLA User Workshop prowadzone przez firmę Illumina (U.S.A.) we współpracy z firmą OpenExome, 17-19.05.2016, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet Adama Mickewicza, Poznań

Udział w projektach badawczych

1. PBZ/MNiSW/07/2006/28 „POL-POSTDOC III" (2007-2010) – Uniwersytet Medyczny w Łodzi – byłam **kierownikiem projektu**
   Tytuł projektu: *„Ocena mechanizmów apoptozy komórek białaczkowych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową leczonych kladrybiną w skojarzeniu z rituksimabem i innymi lekami przeciwbiałaczkowymi".*

2. Projekt finansowany przez firmę farmaceutyczną MUNDIPHARMA dotyczący badań nad wykorzystaniem nowego leku w białaczce limfocytowej przewlekłej (2008-2010). Kierownik projektu: Prof. Anna Korycka-Wołowiec, projekt realizowany był

w Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – byłam współwykonawcą projektu

3. 2011/01/B/NZ5/01371 – przyznany przez NCN – Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska – pomysłodawca i główny wykonawca projektu
Tytuł projektu: *„Dendrymery – potencjalne leki w przewlekłej białaczce limfocytowej"*
Kierownik projektu: prof. Maria Bryszewska

Członkostwo w Radach Naukowych i Towarzystwach Naukowych i Stowarzyszeniach Popularyzujących Wiedzę

1. Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów - członek
2. Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka – członek
3. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych – członek
4. European Research Initiative on CLL (ERIC) – członek
5. Stowarzyszenie TOP500 Innowators – członek
6. Polsko-Amerykańska Rada Innowacji (PLUS-IP) - członek

Opracowanie ocen wydawniczych

Recenzuje artykuły dla czasopism:

1. International Journal of Pharmaceutics
2. Journal of Cellular and Molecular Medicine
3. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej
4. International Journal of Cell Biology
5. Annals of Hematology & Oncology

Przyznane Nagrody

1) **Złoty medal – nagroda dla zespołu badawczego** pod kierownictwem prof. Marii Bryszewskiej.
Skład zespołu: Dr Ida Franiak-Pietryga, Prof. dr hab. Maria Bryszewska, Dr Dietmar Appelhans, dr hab. Prof. UŁ Barbara Klajnert

112 Międzynarodowe Targi Wynalazczości „Concours Lepine" 2013. Paryż, Francja

Uniwersytet Łódzki, Centrum Transferu Technologii
Dendrymer czwartej generacji – zastosowanie

2) Dyplom Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Uniwersytetu Łódzkiego i Centrum Transferu Technologii UŁ za projekt pod nazwą „Dendrymer czwartej generacji – zastosowanie" Twórcy: Dr Ida Franiak-Pietryga, Prof. dr hab. Maria Bryszewska, Dr Dietmar Appelhans, dr hab. Prof. UŁ Barbara Klajnert
Giełda Wynalazków, Centrum Nauki Kopernik, Warszawa, 2014

3) Wyróżnienie **„Łódzkie EUREKA" 2014** przyznane przez Radę ds. Szkolnictwa Wyższego i Nauki przy Prezydencie miasta Łodzi za osiągnięcia związane z zastosowaniem dendrymeru polipropylenoiminowego (PPI) czwartej generacji w lecznictwie dla zespołu badawczego pod kierownictwem prof. Marii Bryszewskiej.
Skład zespołu: Prof. dr hab. Maria Bryszewska, Prof. dr hab. Barbara Klajnert, Dr Ida Franiak-Pietryga, Dr Dietmar Appelhans.

4) **Pierwsze Miejsce** w III edycji **"Konkursu InnoTechAkademia – od pomysłu do komercjalizacji"** za project pod tytułem "Zastosowanie dendrymeru polipropylenoiminowego czwartej generacji modyfikowanego maltotriozą (PPI-G4-OS/DS-Mal III) do wytworzenia leku na przewlekłą białaczkę limfocytową" (2014r.).

5) Laureatka konkursu **TOP500 Innovators** pod patronatem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz 2-miesieczny staż na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley (2015r.)

6) **Fulbright Senior Award 2016-17**, 9-miesięczne stypendium na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Diego, Moores Cancer Center

Ida Franiak-Pietryga