

Iwona Stanisławska

AUTOREFERAT

Iwona Stanisławska

Spis treści

I.	Posiadane stopnie naukowe, roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej	3
II.	Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych	3
III.	Poprzednie zatrudnienia	4
IV.	Tytuł osiągnięcia	4
V.	Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
VI.	Omówienie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	6
VII.	Udział w projektach badawczych	26
VIII.	Stáže naukowe	30
IX.	Współpraca międzynarodowa w zakresie działalności naukowej	36
X.	Aktywny udział w kongresach krajowych i międzynarodowych	36
XI.	Działalność dydaktyczna	39
XII.	Działalność organizacyjna związana z nauką	42
XIII.	Działalność wydawnicza	43
XIV.	Prowadzenie studenckich kół naukowych	43
XV.	Nagrody i wyróżnienia	45

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

- 1999 mgr biologii, Wydział Biologii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Kielcach
- 2005 dr n. biologicznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie. Tytuł pracy doktorskiej:
„Wpływ testosteronu na aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie i nerce myszy utrzymywanych na zróżnicowanym poziomie żywienia białkowego”.
- 2018 Studia Podyplomowe: Żywnienie człowieka i ocena żywności, PBSWiA w Warszawie

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- od 2010 Wyższa Szkoła Rehabilitacji w Warszawie, Kierownik Katedry Dietetyki, adiunkt
- od 2018 Warszawska Uczelnia Medyczna im. T. Koźłuka, przygotowanie i prowadzenie zajęć
- 2007-2010 Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Collegium Medicum
Zakład Farmakologii Doświadczalnej – asystent
- 2004-2007 Wyższa Szkoła Edukacji Zdrowotnej w Łodzi

Obecne stanowiska:

- Od 2012 Adiunkt w Wyższej Szkole Rehabilitacji w Warszawie
- Od 2015 Członek Rady Wydziału Wyższej Szkoły Rehabilitacji w Warszawie
- Od 2017 Członek Senatu Wyższej Szkoły Rehabilitacji w Warszawie
- Od 2018 Członek Zespołu ds. Okresowej Oceny Nauczycieli Akademickich w Wyższej Szkole Rehabilitacji w Warszawie
- Od 2014 Kierownik Katedry Dietetyki w Wyższej Szkole Rehabilitacji w Warszawie

Poprzednie zatrudnienia:

- Państwowa Agencja Rozwiązywania Problemów Alkoholowych w Warszawie
- Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Collegium Medicum
Zakład Farmakologii Doświadczalnej – asystent

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.): a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego, b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy), c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Tytuł osiągnięcia: Enzymatyczne i nanohybrydowe modelowanie procesów metabolicznych.

Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

1. **Stanisławska Iwona; Liwinska Wioletta; Łyp Marek; et al.** Recent Advances in Degradable Hybrids of Biomolecules and NGs for Targeted Delivery. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, Volume: 24, Issue:10, 1873. **IF=3.267; MNiSW= 100.**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu manuskryptu, interpretacji danych, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskiwaniu funduszy.

2. **Iwona Stanisławska, Bożena Witek, Małgorzata Czarny-Działak, Ewa Pałka-Łebek, and Marek Łyp.** Activity of Lysosomal Enzymes During Protein Malnutrition and Progesterone Supplementation in the Mouse. *Advances in experimental medicine and biology - Clinical and Experimental Biomedicine*. 2019;1211:89-95. **IF=2.45; MNiSW=20/70 (nowa punktacja)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu projektu badawczego, interpretacji danych, przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskiwaniu funduszy.

3. **Iwona Stanisławska, Bożena Witek, Marek Łyp, Danuta Rochon-Szmejchel, Adam Wróbel, Wojciech Fronczyk, Agnieszka Kamińska, Adam Kołataj, Daniel Załuski.** Effects of Glutathione on Hydrolytic Enzyme Activity in the Mouse Hepatocytes. *Adv Exp Med Biol Clinical and Experimental Biomedicine*. 2018;1116:81-87. **IF=2.126; MNiSW=25/70 (nowa punktacja)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu projektu badawczego, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskiwaniu funduszy.

4. **Bożena Witek, Danuta Rochon-Szmejchel, Iwona Stanisławska (autor korespondujący), Marek Łyp, Krzysztof Wróbel, Arkadiusz Zapała, Agnieszka Kamińska, Adam Kołataj.** Activities of Lysosomal Enzymes in Alloxan-Induced Diabetes in the Mouse. *Exp.*

Medicine Biology - Neuroscience and Respiration. 2018, Vol. 1040, 73-81. **IF=2.126; MNiSW=25/70 (nowa punktacja)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu projektu badawczego, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskiwaniu funduszy.

5. **Stanisławska Iwona, Łyp Marek.** Effect of Immobilization on Changes in Blood Glucose and Cholesterol Concentration in the Examined Mice - Preliminary Studies. Acta Balneol, 2020, TOM LXI, Nr 1(159):27-31. **MNiSW=20/20 (nowa punktacja)**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu projektu badawczego, interpretacji danych, przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa..

6. Liwinska Wioletta, **Stanisławska Iwona**, Łyp Marek, Mackiewicz Marcin, Stojek, Zbigniew, Zabost, Ewelina. Degradable nanogel drug carrier crosslinked with three-oligonucleotide hybrids for two-way drug release in mild- and high hyperthermia treatment. Journal of Materials Chemistry B., 2017, 5(24):4713-4724.

IF= 4.776; MNiSW=35/140 (nowa punktacja)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu projektu badawczego, interpretacji danych, przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskiwaniu funduszy.

Sumaryczna punktacja osiągnięcia naukowego: IF: 14,745; MNiSW: 225/470 (nowa punktacja)

Zestawienie punktacyjne całego dorobku publikacyjnego (włącznie z rozdziałami w monografiach z punktacją MNiSW i publikacjami po 3 stycznia 2023)

	Punktacja		
	IF	Scopus/CiteScore	KBN/MNiSW
I. Publikacje tworzące dzieło habilitacyjne	14,745	20,5	225/470
II. Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	0	0	140
III. Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora	36,31	51,5	1043
Suma punktów I-III:	51,055	72	1408

Web of Science (WoS):

- ilość publikacji indeksowanych – 29
- ilość cytowanych publikacji – 25
- ilość cytowań – 146
- indeks Hirscha = 7

Scopus:

- ilość publikacji indeksowanych – 24
- ilość cytowanych publikacji – 19
- ilość cytowań – 142
- CiteScore = 7

Omówienie prac wchodzących w skład osiągnięcia

Enzymatyczne i nanohybrydowe modelowanie procesów metabolicznych to zaawansowane podejście do badania i analizy procesów biochemicznych zachodzących w komórkach organizmów. Te dwie techniki łączą procesy enzymatyczne, które odgrywają kluczową rolę w przekształcaniu substancji chemicznych w organizmach, co pozwala na precyzyjne kontrolowanie i manipulację procesami metabolicznymi na poziomie molekularnym (nanocząsteczek). Procesy te pozwalają na bardziej zaawansowane badania i rozwijanie innowacyjnych rozwiązań, które mogą poprawić nasze zrozumienie procesów metabolicznych oraz przyczynić się do rozwoju nowych terapii i produktów biotechnologicznych.

Przykładami zastosowań tych technik są:

Leczenie chorób metabolicznych: Poprzez modyfikację enzymów lub wprowadzanie nanohybrydowych nośników leków, naukowcy mogą skupić się na celowym leczeniu chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca czy choroby dziedziczne. Bioprodukcja: Enzymatyczne modelowanie może być wykorzystane do zwiększenia wydajności produkcji bioproduktów, takich jak biopaliwa, a nanohybrydowe nośniki mogą pomóc w dostarczaniu substratów i enzymów do komórek mikroorganizmów. Terapie celowane: Nanohybrydowe nośniki mogą być zaprojektowane w taki sposób, aby dostarczać leki lub enzymy do konkretnych komórek lub tkanek, co minimalizuje skutki uboczne i zwiększa skuteczność terapii. Inżynieria metaboliczna: Dzięki modelowaniu enzymatycznemu i wykorzystaniu nanomateriałów naukowcy mogą projektować i optymalizować szlaki metaboliczne w celu produkcji pożądaných związków chemicznych, takich jak białka rekombinowane czy leki.

Zjawisko stresu i funkcjonowania organizmu w warunkach stresogennych jest niezwykle istotnym elementem wpływającym na funkcjonowanie wszystkich organizmów żywych co wpływa na zaburzenie przebiegających procesów metabolicznych. Stres powoduje wiele niekorzystnych zmian psychicznych i somatycznych. Jednym z czynników wywołujących stres jest immobilizacja. Unieruchomienie jako jeden z najważniejszych czynników chorobotwórczych jest analizowany w różnych zakresach funkcjonowania organizmów. Ocena wpływu unieruchomienia na procesy metaboliczne jest jednym z najistotniejszych czynników, które należy poddać analizie. Stres jest wywołany nagłym, silnym, nadprogowym pobudzeniem informatycznym i energetycznym. Reakcja na to

podbudzenie generuje się na poziomie molekularnym i komórkowym. Immobilizacja powoduje zachwianie równowagi metabolicznej organizmu zarówno ludzi jak i zwierząt. Podczas unieruchomienia, w warunkach obniżonej aktywności mięśniowej dochodzi, co wydaje się paradoksalne, do nasilenia tempa przemiany materii i energii. Hipermetabolizm towarzyszący immobilizacji można próbować tłumaczyć zarówno przyspieszonymi reakcjami ośrodkowego układu nerwowego, jak też jego oddziaływaniem na metabolizm, głównie mięśni szkieletowych. Wiadomo, również, że dłuższe pozostawanie włókien mięśniowych w stanie skurczu a więc w stanie zwiększonego napięcia powoduje w nich intensyfikację przemian metabolicznych. Wypływa stąd sugestia, iż analizie stresu należy poświęcić dalsze eksperymenty dotyczące zmian pod wpływem immobilizacji jako przykładowego czynnika stresogennego.

Celem tej części badań była ocena zakresu ewentualnych zmian koncentracji glukozy i cholesterolu w osoczu myszy nieselekcyjowanych i selekcyjowanych poddanych immobilizacji. Badania przeprowadzono na 20 samicach myszy linii Swiss w wieku 12 tygodni, o średniej masie ciała 30 – 35 gramów, selekcyjowanych przez 24 pokolenia z uniknięciem pokrewieństwa na wysokie tempo przyrostu masy ciała i 20 nieselekcyjowanych (kontrolnych), o średniej masie ciała 18-20 gramów, których rodzice byli kojarzeni losowo. Zwierzęta obu grup wybierano losowo z całej populacji, liczącej ponad 800 osobników, pochodzącej z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Wszystkie osobniki utrzymywano w standardowych warunkach fermy w pomieszczeniu o temperaturze 22⁰C i naturalnym fotoperiodyzmie, średnio 12 godzinach światła i 12 godzinach ciemności. W uzyskanych supernatantach wątroby oraz w osoczu krwi oznaczano koncentrację glukozy i cholesterolu całkowitego w oparciu o enzymatyczne metody przy użyciu diagnostycznych testów firmy Bio-Lachema-Test. Koncentrację tych wskaźników w wątrobie wyrażono w molach/gram świeżej tkanki w osoczu krwi w molach/litr osocza. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Waltera R. Harveya. Wyliczono wartości średnie \bar{x} i odchylenia standardowe S_d wskaźników w osoczu oraz wątrobie, w grupach kontrolnych i eksperymentalnych myszy selekcyjowanych i nieselekcyjowanych oraz istotności statystyczne wg testu „t” Studenta. Stres immobilizacji spowodował istotne obniżenie koncentracji glukozy w osoczu i wątrobie myszy selekcyjowanych do 83% i 84% w porównaniu z wartościami w grupie myszy kontrolnych. Myszy nieselekcyjowane nie wykazały żadnych różnic statystycznie potwierdzonych. Stres unieruchomienia spowodował znamieny wzrost koncentracji

cholesterolu do 121% w osoczu myszy selekcyjonowanych. Mechanizm zmian adaptacyjnych, w których zasadniczą rolę odgrywa oś podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowa ma złożony przebieg i chociaż pozwala na „przeżycie” w określonej sytuacji stresowej, może wywoływać zespół reakcji szkodliwych prowadzących do zaburzeń chorobowych. Zmiany sprawności adaptacyjnej organizmu mogą zachodzić pod wpływem różnych czynników tj. zmian warunków otoczenia czy trybu życia. Adaptacja zwierząt jest reakcją na określone i nie zawsze korzystne warunki otoczenia. Analiza wariacji wieloczynnikowej ujawniła statystyczną istotność różnic wywołanych selekcją w odniesieniu do poziomu glukozy w wątrobie oraz cholesterolu w osoczu krwi. U myszy selekcyjonowanych pod wpływem 48 godzinnej immobilizacji podwyższyła się koncentracja cholesterolu w osoczu zaś obniżyła glukozy w osoczu i wątrobie. Selekcja na wysoką masę ciała miała znamienny wpływ na poziom badanych wskaźników. Świadczyć to może, że myszy selekcyjonowane uzyskując większy przyrost białka w postaci większych przyrostów ciała, przy niższym poziomie glukozy, już na poziomie komórkowym były zmuszone pracować bardziej ekonomicznie, ostrożniej gospodarując swoimi metabolitami strukturalnymi i energetycznymi.

Stanisławska Iwona, Lyp Marek. Effect of Immobilization on Changes in Blood Glucose and Cholesterol Concentration in the Examined Mice - Preliminary Studies. Acta Balneol, 2020, TOM LXI, Nr 1(159):27-31.

Bożena Witek, Ewa Ochwanowska, Adam Kołtąj, Alina Ślewa, **Iwona Stanisławska**. Effect of melatonin administration on activities of some lysosomal enzymes in the mouse. Neuroendocrinology Letters, 2001, 22, 181 – 185.

Stanisławska I., Zielińska K., Włostowska E., Jóźwik A., Lyp M., Trylińska E., Lejzerowicz B. The influence of immobilization and physical effort on some lysosomal enzyme activity in hepatocytes of experimental mice. European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine, 2016, Vol. 52, Sup. 1., nr. 2, str. 289.

Iwona Stanisławska, Marta Zych, Anna Cabak, Marek Lyp. Fizjoterapia w redukcji stresu u kobiet. Posiedzenie Naukowe Oddziału Mazowieckiego Polskiego Towarzystwa Rehabilitacji, 9.03.2019, Warszawa.

Stanisławska Iwona, Zych Marta, Lyp Marek. Znaczenie nefarmakologicznych sposobów zmniejszania stresu. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2019. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju. Lublin, 22-24.03.2019.

Stanisławska Iwona, Lyp Marek, Bożena Witek. Wpływ immobilizacji na zmiany koncentracji glukozy i cholesterolu we krwi badanych myszy- badania wstępne. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2019. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju. Lublin, 22-24.03.2019.

Modelowanie procesów metabolicznych to również ocena wpływu niedoboru lub nadmiaru substancji aktywnych biologicznie. Jako pytanie badawcze postawiono sobie jak niedożywienie białkowe oraz suplementacja progesteronu wpływa na aktywność enzymów lizosomalnych we fragmentach tkanek wątroby i nerek myszy. Enzymy lizosomalne biorą udział w fizjologicznej degradacji składników komórkowych, a tym samym w utrzymaniu

homeostazy komórkowej, która warunkuje zdolność komórek do adaptacji w odpowiedzi na zmiany w otaczającym środowisku. Oprócz udziału w autofagii, enzymy te odgrywają również rolę w odpowiedziach komórkowych na reakcje apoptotyczne wywołane stresem oksydacyjnym (Stanisławska i wsp. 2018; Brunk i wsp. 2001). Dysfunkcja apoptozy może pogorszyć przebieg szeregu procesów o podłożu miażdżycowym lub neurodegeneracyjnym, często związanych z nasilonym stresem oksydacyjnym. W takich warunkach zwiększenie aktywności hydrolitycznej lizosomów może wydawać się korzystne. Istnieje jednak oczywista dychotomia dotycząca kwestii funkcji lizosomów, ponieważ w innych zmianach patologicznych, na przykład w cukrzycy, gdzie enzymy są uwalniane z pękniętych lizosomów komórkowych, ich proteolityczne działanie degradacyjne może wpływać na mikronaczyniowe powikłania cukrzycowe (Witek i wsp. 2018). Progesteron jest wytwarzany przez komórki lutealne ciała żółtego w jajnikach i umożliwia zagnieżdżenie się zarodka w błonie śluzowej macicy i utrzymanie go w pierwszych tygodniach ciąży. Odpowiednia zawartość progesteronu jest również ważna dla prawidłowego przebiegu cyklu miesięczkowego oraz złuszczenia endometrium (Wu i wsp. 2018; Wessel i wsp. 2014). Zatem fizjologiczne działanie progesteronu znacznie wykracza poza przygotowanie do ciąży i jej utrzymanie (De Ziegler i wsp. 2018). Progesteron jest uważany za hormon adaptacji i odporności na stres, w tym stres oksydacyjny, oraz ma działanie przeciwzapalne (Aksoy i wsp. 2014; Nadal i wsp. 2009). Podczas stresu progesteron łagodzi produkcję kortyzolu nadnerczy, a tym samym pełni rolę ochronną przed szkodliwym działaniem nadmiaru hormonów kory nadnerczy (Miller 2018). W tym badaniu doszliśmy do wniosku, że działanie progesteronu może mieć związek z hamowaniem lizosomów, które są zaangażowane w apoptozę i stres oksydacyjny. Następnie postawiliśmy hipotezę, że każde takie działanie progesteronu mogłoby lepiej wyjść na jaw na tle zwiększonej aktywności enzymów hydrolitycznych. Niedożywienie białkowe jest jednym ze stanów, o których doniesiono, że zwiększa aktywność enzymów lizosomalnych, szybkość katabolizmu komórkowego, apoptozę i stres oksydacyjny (Mahadik i wsp. 2006; Iyengar i Vakil 1985). Dlatego w badaniu starano się określić wpływ suplementacji progesteronem na aktywność enzymów lizosomalnych w tkankach wątroby i nerek na tle przewlekłe niedożywionych białkiem myszy (10% białka), w porównaniu ze standardowym żywieniem białkowym (16% białka). W przeciwieństwie do naszej hipotezy, suplementacja progesteronem działała w połączeniu z niedożywieniem białkowym, wzmacniając aktywność enzymów lizosomalnych. Badanie przeprowadzono na 60 samicach myszy o wadze $25,0 \pm 1,3$ g, w wieku 6 tygodni. Zwierzęta pochodziły z fermi hodowlanej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Przetrzymano je w 12-

godzinnym cyklu światło/ciemność w temperaturze 20–22 °C z wodą ad libitum. Zwierzęta podzielono na dwie grupy po 30 sztuk, różniące się zawartością białka podawanego w karmie: standardowa zawartość białka 16% i niska zawartość białka 10%; pierwsza zapewnia 14,04 MJ/kg, a druga 13,47 MJ/kg dziennego poboru energii ($p > 0,05$). Po 21 dniach dwie grupy podzielono dalej na podgrupę progesteronową i kontrolną po 15 myszy każda. Pierwsza podgrupa otrzymała zastrzyki progesteronu (Jelfa SA, Jelenia Góra, Polska) w dawce 2 $\mu\text{g/g}$ masy ciała rozpuszczonego w objętości 10 $\mu\text{l/g}$ masy ciała oleum *pro injectione*. Zastrzyki dla tej ostatniej grupy składały się z samego oleum *pro injectione*, podawanego w podobny sposób. Schemat iniekcji był taki sam w obu grupach i składał się z pojedynczej iniekcji dziennie, wykonywanej o godzinie 8:00 przez trzy kolejne dni. Okres spoczynku cyklu reprodukcyjnego potwierdzono pomiarem progesteronu w osoczu przed rozpoczęciem jego podawania. Poziom progesteronu wynosił $14,5 \pm 2,7$ ng/ml i $15,8 \pm 3,4$ ng/ml odpowiednio w grupach 16% białka i 10% białka; $p > 0,05$. Dawka egzogenego progesteronu została dobrana na zasadzie wnioskowania, popartej kilkoma próbami pilotażowymi, tak aby powodowała 50-60% wzrost zawartości progesteronu we krwi. Przepuszczalne rozumowanie było takie, że ten rodzaj nadmiaru progesteronu wystarczy do wywołania zmian w aktywności badanych enzymów lizosomalnych; a jednocześnie nie ingeruje w przebieg ogólnoustrojowych procesów fizjologicznych. Sześć godzin po ostatnim wstrzyknięciu progesteronu w 3 dniu prowadzonego doświadczenia, myszom ze wszystkich grup odcięto głowy i natychmiast usunięto nerki i wątrobę. Narządy przepelniono schłodzonym 0,9% NaCl, a fragmenty tkanek homogenizowano w 0,1 mM buforze fosforanowym o pH 6,0 w stężeniu 0,5 g substancji rozpuszczonej w końcowej objętości 5 ml roztworu buforowego (10%) przy 200 obr./min. (Potter Elvehjem; Thomas Scientific; Swedesboro, NJ). Homogenaty poddano następnie frakcjonowanemu wirowaniu, zgodnie z metodą Beaufay (1972), w celu uzyskania lizosomalnej frakcji tkanki. Następnie oznaczono aktywności następujących hydrolaz lizosomalnych: kwaśnej fosfatazy, β -N-acetyloheksozoaminidazy, β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, esterazy lizosomalnej, lipazy lizosomalnej, aminopeptydazy alaninowej i aminopeptydazy leucynowej. Pomiary ekstynkcji wykonano przy 520 nm w spektrofotometrze Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Zawartość białka oznaczono zmodyfikowaną metodą Kirschke i Wiederanders (1984). Aktywność enzymów lizosomalnych wyrażono w nmol/mg białka/h. Wszystkie podłoża zostały wyprodukowane przez SERVA Feinbiochemica (Heidelberg, Niemcy). Dane przedstawiono jako średnie \pm SD. Różnice w średnich wartościach aktywności enzymu oceniano stosując sparowany lub niesparowany dwustronny test t, zgodnie z wymaganiami.

wartości $p < 0,05$ określały statystycznie istotne różnice. Zawartość progesteronu w osoczu krwi wzrosła po 3 dniach podawania progesteronu z $14,5 \pm 2,7$ do $23,4 \pm 0,8$ ng/ml i z $15,8 \pm 3,4$ do $26,6 \pm 1,2$ ng/ml odpowiednio w standardowych grupach 16% białka i 10% białka. Wzrosty progesteronu w osoczu były znaczące ($p < 0,001$) w obu grupach, ale różnice między dwiema grupami nie były istotne ($p > 0,05$). Ograniczenie białka spowodowało wyraźny kilkukrotny wzrost zawartości kwaśnej fosfatazy, heksozoaminidazy, aminopeptydazy alaninowej i aminopeptydazy leucynowej oraz zmniejszonej β -galaktozydazy w obu tkankach, przy czym aktywność innych enzymów jest raczej łagodnie naruszona. Podawanie progesteronu na tle standardowej 16% zawartości białka w karmach spowodowało znaczny wzrost wszystkich enzymów w obu tkankach, z wyjątkiem esterazy lizosomalnej w wątrobie oraz β -galaktozydazy, β -glukuronidazy i aminopeptydazy alaninowej w nerkach oscylowała wokół poziomu bazowego. Podobnie, wystąpił silny wzrost aktywności enzymów po podaniu progesteronu na tle ograniczenia białka pokarmowego do 10%. Zawartość wszystkich enzymów istotnie wzrosła w obu tkankach, z wyjątkiem fosfatazy kwaśnej i β -N-acetyloheksozoaminidazy w wątrobie oraz aminopeptydazy alaninowej w nerkach. Żaden z enzymów w wątrobie lub nerkach i na żadnym poziomie białka odżywczego nie był znacząco hamowany przez podawanie progesteronu. Wyniki tego badania wykazały, że zawartość większości badanych enzymów lizosomalnych w osoczu wzrosła we fragmentach tkanki myszy zarówno wątroby, jak i nerek podczas niedożywienia białkowego. Jednak stymulacja aktywności hydrolitycznej była raczej selektywna i bardzo zmienna. Warto zauważyć, że nastąpił wielokrotny wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy, β -N-acetyloheksozoaminidazy i aminopeptydazy leucynowej głównych enzymów proteolitycznych odpowiedzialnych za rozkładanie toksycznych cząsteczek. Z drugiej strony, β -galaktozydaza była hamowana odpowiednio w około 75% i 50% w tkankach wątroby i nerek. Wystąpiła widoczna selektywność tkankowa odpowiedzi enzymatycznych, ponieważ β -glukuronidaza i lipaza lizosomalna miały tendencję do odwrotnych zmian w tkankach wątroby i nerek. Podawanie progesteronu spowodowało dalsze znaczące wzrosty aktywności enzymów na tle stymulacji wywołanej restrykcją białek. Wzrosty pozostały selektywne dla enzymów i tkanek i wysoce zmienne, wynoszące około 22% dla aminopeptydazy alaninowej w obu tkankach, 63% i 182% dla β -galaktozydazy w wątrobie i nerkach lub około 50% i 100% dla esteraz lizosomalnych i lipaz odpowiednio w wątrobie i nerkach. Podawanie progesteronu zwiększyło również aktywność enzymów lizosomalnych podczas standardowego odżywiania białkowego. Odkrycia dają spójne wrażenie, że ograniczenie białka z dodatkiem progesteronu nasilało wzrost aktywności enzymów lizosomalnych, szczególnie dotyczących nerek. Niemniej jednak

wydaje się zasadne założenie, że zauważona zwiększona aktywność enzymów lizosomalnych byłaby wyrazem wzmożonego zaangażowania w oczyszczanie środowiska komórkowego wątroby i nerek z resztek biologicznych w celu powrotu do homeostazy. Przedstawione wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami pokazującymi aktywację enzymów lizosomalnych podczas niedożywienia białkowego. (Iyengar i Vakil, 1985), zaobserwowano stymulację selektywnych enzymów lizosomalnych podczas ograniczania spożycia białka u szczura. Oprócz stymulacji autorzy donoszą o zahamowaniu aktywności β -glukuronidazy o 60% u 4% szczurów karmionych białkiem. W obecnym badaniu zauważyliśmy około 33% zahamowanie aktywności enzymu u 10% myszy karmionych białkiem w nerkach, ale nie w wątrobie. Podobnie (Tutel'ian i in., 1987) wykazali wzrost aktywności enzymów lizosomalnych w wątrobie szczura podczas ograniczania spożycia białka. (Glew i in., 1982) wykazali trzykrotny wzrost heksozoaminidazy w surowicy i 0,5-krotny wzrost aktywności β -glukuronidazy przy diecie zawierającej 3% kazeiny przez 2-4 tygodnie w nerkach szczura, ale spadek kwaśnej fosfatazy. Autorzy przypisują takie zmiany głęboko zmienionej perfuzji krwi w tkankach podczas niedożywienia białkowego, co prowadzi do wtórnego uwalniania enzymów lizosomalnych. (Muñoz-Martinez i in., 1982), stwierdzili silny wzrost β -glukuronidazy w wątrobie szczura podczas ograniczenia spożycia białka do 1%. W przeciwieństwie do tego kwaśna fosfataza pozostała niezmienną. (Muñoz i in., 1981) Stwierdzili również wzrost β -glukuronidazy i kwaśnej fosfatazy w śledzionie i grasicy szczura po 4 tygodniach ograniczenia spożycia białka do 4%, chociaż wystąpiły spadki niektórych innych enzymów hydrolitycznych. Jednak wpływ ograniczenia spożycia białka na aktywność enzymów lizosomalnych pozostaje kontrowersyjną kwestią. Inne badania wykazują hamowanie enzymów lizosomalnego podczas restrykcji białka (Volgarev i wsp. 1984). Wydaje się, że mechanizmy regulujące aktywność kataboliczną lizosomów są niejasne. Rozbieżne dane literaturowe prawdopodobnie wynikają z różnych protokołów niedożywienia białkowego, wahających się od 1% do 4%, 8% i 14% zawartości białka w karmach, różnych okresów ekspozycji, różnych gatunków zwierząt i różnych badanych tkanek, nie mówiąc już o różnicach metodologicznych testów stosowanych w poprzednich badaniach. Brak standaryzacji eksperymentalnej utrudnia wyciągnięcie jednoznacznych wniosków na ten temat. Co ciekawe, w tym badaniu większość hydrolaz lizosomalnych zwiększyła swoją aktywność pod wpływem egzogennej progesteronu. Sugeruje to, że progesteron, jeden z głównych żeńskich hormonów regulujących płodność, działa na rzecz nasilenia tempa katabolicznego komórek wątroby i nerek. Efekty te wydają się być spotęgowane przez ograniczenie spożycia białka. Obserwowane wzrosty aktywności glikozydaz (β -Gal i β -GlcUr) mogą być związane ze

zwiększoną produkcją glukozy i rozpadem własnych białek w ramach odpowiedzi komórek nerkowych na zmniejszone spożycie białka (Kilicalp et al., 2005). Nieprawidłowo zbilansowany poziom spożycia białka powoduje negatywne konsekwencje w obszarze degradacji białek komórkowych. (Alleman i in., 2000) donoszą, że zmniejszenie spożycia białka z 16% do 10% u kur zwiększa zawartość trójiodotyroniny, tyroksyny i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 we krwi, co z kolei zwiększa transport kwasów do mięśni i intensywność zachodzących procesów proteolitycznych. W konsekwencji może również wzrosnąć aktywność aminopeptydazy alaninowej. W niniejszym badaniu aminopeptydaza alaninowa wzrosła o około 180% i 55% odpowiednio w wątrobie i nerkach myszy, w odpowiedzi na ograniczenie spożycia białka do 10%. Wzrosty mogą być naturalną adaptacyjną reakcją komórkową, ponieważ zwierzęta niedożywione białkowo wykazują przez pewien czas dodatni bilans azotowy, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu mocznika. W tym badaniu esteraza lizosomalna i lipaza uległy niewielkim zmianom pod wpływem ograniczenia białka. Jednak połączenie progesteronu ze standardową lub obniżoną zawartością białka silnie zwiększało aktywność obu enzymów, które są głównie zaangażowane w rozkład estrów kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Te odkrycia są zgodne z odkryciami Yoshizawy i in., 1997, którzy donieśli, że niedożywienie białkowe powoduje wzrost wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu we krwi oraz procent tłuszczu w wątrobie i nerkach, co może zwiększać potrzebę działania lipaz. Wzmocnienie aktywności obu enzymów pod wpływem progesteronu oznacza, że hormon przyspiesza obrót lipidów w tkankach. W diagnostyce klinicznej i leczeniu coraz częściej stosuje się enzymy lizosomalne do oceny zakresu genetycznych zaburzeń spichrzania lizosomalnego, takich jak choroba Fabry'ego lub Gauchera i innych, w których zachodzi niewystarczająca obróbka degradacyjna cząsteczek sfingolipidów nagromadzonych w komórkach, głównie w mózgu. (Giugliani i in. 2018). Enzymatyczna terapia zastępcza napotyka przeszkody, ponieważ rekombinowane enzymy nie mogą wystarczająco przenikać przez barierę krew-mózg. Wyniki niniejszego badania i innych wcześniejszych badań pokazujących wzmocnienie enzymów lizosomalnych podczas odżywiania uboższego w białko oferują proste podejście do aktywacji enzymów. Podobnie egzogenna suplementacja progesteronu wydaje się podobnie skuteczną drogą do zwiększenia aktywności enzymów lizosomalnych. Nie wiadomo, czy byłby to również skuteczny środek zwiększający aktywność enzymów lizosomalnych w tkance mózgowej. Metoda suplementacji niskobiałkowo-progesteronowej wymagałaby badań próbnych i dostosowania do konkretnych jednostek klinicznych i poszczególnych pacjentów, a także poszukiwań dotyczących poszczególnych enzymów, z których wszystkie wymagają

alternatywnych projektów badań. Podsumowując, wyniki tego badania wskazują na potencjalną interakcję odżywienia niskobiałkowego i umiarkowanej suplementacji progesteronu we wzmacnianiu aktywności enzymów lizosomalnych. W zakresie, w jakim lizosomy służą jako centra detoksykacji i recyklingu odpadów molekularnych komórki, wzmocnienie ich funkcji może mieć wpływ na zaburzenia polegające na nadmiernym wewnątrzkomórkowym nagromadzeniu patologicznych cząsteczek.

Iwona Stanisławska, Bożena Witek, Małgorzata Czarny-Działak, Ewa Pałka-Lebek, and Marek Lyp. Activity of Lysosomal Enzymes During Protein Malnutrition and Progesterone Supplementation in the Mouse. *Advances in experimental medicine and biology - Clinical and Experimental Biomedicine*. 2019;1211:89-95. **IF=2.45 ; MNiSW=20**

Ewa Ochwanowska, **Iwona Stanisławska**, Marek Lyp, Kamila Bicz, Jarosław Chmielewski. Wpływ diety wysokobiałkowej i niskobiałkowej na organizm. *Ochrona, prewencja i profilaktyka zdrowia*. red. Jarosław Chmielewski, Aleksandra Kasperczyk, Monika Szpringer. Instytut Ochrony Środowiska - Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2017, str. 197-210. ISBN 978-83-60312-38-4. **(MNiSW: 5 pkt.)**.

Stanisławska I., Fronczyk W., Strzałkowska N., Lipińska-Palka P., Lyp M., Józwick A. (2016). The age-related changes on the haematological parameters in the mice after supplementation iron, 6th International Young Scientists Conference, Human/Nutrition/ Environment, Rzeszów 2016.

Stanisławska, Marek Lyp, Artur Józwick. The age-related changes on the haematological parameters in the mice after iron ion supplementation , 6th International Young Scientists Conference „Human-Nutrition-Environment”, 21-22.04.2016, Rzeszów.

Ważnym kierunkiem badań dotyczącym wpływu substancji aktywnych na modelowanie procesów metabolicznych jest wpływ zredukowanego glutationu na wybrane enzymy hydrolityczne frakcji lizosomalnej, mikrosomalnej i cytozolowej wątroby myszy. Wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie glutationu (GSH), peptydu zaangażowanego w regulację komórkowego stanu redoks (Kalinina i wsp. 2015; Hultberg i Hultberg 2006). GSH odgrywa również rolę ochronną przed stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami w hepatocytach, wymiatając różne wolne rodniki (Wang i wsp. 2015). GSH jest szczególnie obecny w cytozolu hepatocytów (ok. 90%), gdzie jest syntetyzowany w dwuetapowej reakcji, oraz w macierzy mitochondrialnej (10%), do której przechodzi z cytozolu (Koehler et al. 2006). Lizosomy zawierają enzymy hydrolityczne, których główną rolą jest degradacja i usuwanie niepożądanego materiału komórkowego i jego resztek (Settembre et al. 2013). Stres oksydacyjny przyczynia się do destabilizacji błon lizosomalnych, powodując uwolnienie hydrolaz do cytozolu, z następczą indukcją apoptozy lub martwicy komórek (Bidere i wsp. 2003; Józwick i wsp. 2003). W ostatnim czasie suplementacja GSH jest popularnym trendem w społeczeństwie. Peptyd jest uważany za dodatek do żywności o przypuszczalnej roli wzmacniającej w oczyszczaniu komórkowym i procesach energetycznych, co czyni go

również przydatnym w aktywności fizycznej w celu zwiększenia wydolności organizmu. Jednak wpływ GSH na aktywność określonych procesów lizosomalnych jest w dużej mierze nieznany. Niniejsze badanie miało na celu zbadanie wpływu egzogenego GSH, zastosowanego *in vivo*, na aktywność *in vitro* enzymów hydrolitycznych we frakcjach lizosomalnych, mikrosomalnych i cytozolowych wątroby myszy. Doświadczenie przeprowadzono na 30 szwajcarskich samcach myszy w wieku 8 tygodni, o wadze $25,0 \pm 1,2$ g. Zwierzęta trzymano w standardowych klatkach w temperaturze pokojowej 20–22 °C, wilgotności względnej 50–60%, z wodą *ad libitum*, z 12-godzinnym cyklem światło/ciemność (światło włączane o 8:00 i wyłączane o godz. 20:00). Wszystkie zwierzęta były utrzymywane w dobrej kondycji fizycznej i znajdowały się pod profesjonalną opieką weterynaryjną. Po odsadzeniu w 4-5 tygodniu zwierzęta otrzymywały przez kolejne 7 dni pokarm składający się z 16% białka. Następnie zwierzęta podzielono na grupy (kontrolne) traktowane glutationem i 0,9% NaCl, po 15 zwierząt każda. W ciągu następnych 7 dni myszy otrzymywały zredukowany glutation (Sigma-Aldrich; St. Louis, MS) w dawce 100 µg/g rozpuszczony w 12 µl/g masy ciała 0,9% NaCl lub samą sól fizjologiczną. Wszystkie iniekcje wykonywano dootrzewnowo, dwa razy dziennie, w godzinach 8.15-8.45 i 16.15-16.45. 6 godzin po ostatnim wstrzyknięciu, w krótkotrwałym znieczuleniu eterem dietylowym, myszy uśmiercono przez zwichnięcie szyjki macicy i odcięto im głowy. Fragmenty tkanki wątroby natychmiast izolowano, perfundowano 0,9% roztworem NaCl w 5°C i umieszczano w 0,25 M roztworze sacharozy zawierającym 2 mM EDTA, w stężeniu 1 g tkanki na 6 ml roztworu. Fragmenty homogenizowano przy 200 obr./min w rozdrabniaczu do tkanek Potter-Elvehjem z teflonowym tłuczkiem (Omni International; Kennesaw, GA), zgodnie z metodą Beaufay'a (1972). Homogenaty poddano kolejno rosnącemu wirowaniu: 8 min przy 5500 obr./min w wirówce K26D, 20 min przy 14 000 obr./min (Sorvall RC-5C) i 60 min przy 10 000 obr./min (Beckman L7-66; GMI, Ramsey, MN), zgodnie do metody Marzelli i Glaumanna (1980). Osady lizosomalne i mikrosomalne zawieszono w 100 mM soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS), pH 6,0, z dodatkiem 0,1% Triton X100. Następnie dwukrotnie zamrażano i rozmrażano, a następnie wirowano przez 10 min przy 700 obr./min w wirówce K-26D. Po kolejnym dwukrotnym zamrożeniu i rozmrożeniu frakcje cytozolowe poddano analizie. Aktywność β -GlcUr, β -Gal, β -Glu, Hex, AcP, EL i LL oznaczono przy użyciu substratów 4-nitrofenylowych przy długości fali 420 nm zgodnie z mikrometodą Barretta i Heatha (1977). Cath D i Cath L oznaczono przy użyciu 6% azokazeiny jako substratu przy długości fali 366 nm zgodnie z metodą Langnera i wsp. (1973). LeuAP i AlaAP oznaczano z użyciem substratów soli Fast Blue BB (chlorek 4-benzoiloamino-2,5-dietoksybenzenodiazonium) przy

długości fali 540 nm według metody McDonalda i Barretta (1986). Aktywność enzymatyczną wyrażono w nmolach/mg białka/h. Białko oznaczano zmodyfikowaną metodą Kirschke et al. (1972). Wszystkie podłoża zakupiono od SERVA Feinbiochemica GmbH & Co (Heidelberg, Niemcy). Dane przedstawiono jako średnie \pm SD. Różnice między średnimi grupowymi glutationu i grup kontrolnych porównano stosując analizę wariancji ANOVA. Wartość $p < 0,05$ określa statystycznie istotne różnice. Użyto komercyjnego pakietu statystycznego oprogramowania SAS/STAT (SAS Institute Inc., Cary, NC). W grupie glutationu aktywność β -GlcUr istotnie spadła średnio we frakcji lizosomalnej hepatocytów (do 64,4% tej w grupie kontrolnej) i wzrosła we frakcji mikrosomalnej (do 174,9% kontroli) i cytozolowej (do 119,9% kontroli) frakcje. Aktywność β -Gal i β -Glu wzrosła we wszystkich badanych frakcjach, podczas gdy aktywność Hex znacznie wzrosła tylko we frakcji lizosomalnej i cytozolowej (odpowiednio do 130,5% i 136,2% kontroli). Pokarm dla zwierząt wzbogacony GSH wyraźnie zwiększał aktywność wszystkich pozostałych enzymów hydrolitycznych we frakcjach subkomórkowych wątroby myszy, z wyjątkiem esterazy, aminopeptydaz leucynowych i alaninowych oraz katepsyn w cytozolu i lipazy we frakcji mikrosomalnej. Mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy komórkowej glutationu nie są do końca poznane. GSH jest syntetyzowany w cytozolu wątrobowym, skąd jest transportowany do mitochondriów (Fernandez-Checa i Kaplowitz 2005), co skutkuje wysoką zawartością GSH w komórkach wątroby. Szybkość syntezy GSH w hepatocytach jest równoważona przez jego wydzielanie do krwi i żółci (Zhu i wsp. 2014). Hepatocyty są bogate w mitochondria, dzięki czemu są narażone na duże ilości reaktywnych form tlenu (ROS) i stały stres oksydacyjny. Wiadomo, że stres oksydacyjny przyczynia się do uszkodzenia komórek poprzez zmniejszenie zawartości komórkowego GSH, przesuwając równowagę w kierunku oksydacyjnej strony dwusiarczku glutationu (GSSG). Utlenianie grup sulfhydrylowych w resztach cysteinowych białek tworzy disiarczki (Mosharov et al. 2000). Cysteina jest elementem ograniczającym tempo biosyntezy komórkowej glutationu (Radtko et al. 2012). Uznano, że egzogenne suplementowany glutation może chronić hepatocyty przed stresem oksydacyjnym poprzez hamowanie peroksydacji lipidów i białek w mitochondriach lub chelatowanie żelaza niehemowego, które łatwo gromadzi się w mitochondriach wątroby, co prowadzi do dysfunkcji i uszkodzeń mitochondriów i lizosomów (Seo i wsp. 2008). Uszkodzenie wywołane stresem oksydacyjnym jest również pośredniczone przez uszkodzenie lizosomalne (Ollinger i Brunk 1995), zmniejszając w ten sposób zdolność komórki do usuwania niepożądanych materiałów. Uznaliśmy zatem za uzasadnione zbadanie, czy i w jaki sposób podawanie egzogenne glutationu wpłynie na proces hydrolitycznej degradacji za

pośrednictwem hydrolaz w preparatach in vitro frakcji lizosomalnych, mikrosomalnych i cytozolowych mysich hepatocytów. Ten rodzaj badania znajduje potwierdzenie w wiedzy, że dieta wzbogacona GSH może znacząco wpływać na zawartość komórek GSH (Valencia i wsp. 2001). Wyniki tego badania są zasadniczo zgodne z przedstawionym powyżej uzasadnieniem. Stwierdziliśmy, że aktywność in vitro wszystkich badanych hydrolaz, z jednym wyjątkiem β -GlcUr, wzrosła we frakcji lizosomalnej. Aktywność enzymów, z kilkoma wyjątkami, wzrosła również w innych frakcjach komórkowych, najmniej w cytozolu. Dominujący wpływ na aktywność hydrolaz lizosomalnych, egzogenego GSH w nerkach opisali również inni autorzy (Śliwa-Jóźwik i in., 2004), co sugeruje wysokie zapotrzebowanie komórek wątroby i nerek na przeciwutleniacz. Istnieje biologiczne prawdopodobieństwo, że poprawa strukturalnej funkcjonalności lizosomów, dzięki antyoksydacyjnemu działaniu GSH, prowadzi do zwiększonej aktywności hydrolaz, w efekcie nasilając hydrolityczną degradację niechcianych materiałów przez komórkę. Zawartość GSH w wątrobie wzrasta wraz ze spożyciem białka (Hum i wsp. 1992; Morini i wsp. 1991), zapewniając wsparcie ochronnym procesom błonowym antyoksydacyjnym. McCarty i DiNicolantonio (2015) wykazali, że spożycie białka zwiększa pulę aminokwasów dostępnych do syntezy glutationu. W naszych badaniach zastosowaliśmy dietę wysokobiałkową wraz z suplementacją GSH, co może przyczynić się do zwiększenia aktywności zauważonych peptydaz endogennych. Wyjątkiem były katepsyny, których zawartość zmniejszyła się we frakcji cytozolowej hepatocytów. Katepsyny są uwalniane z lizosomów do cytozolu w odpowiedzi na czynniki apoptogenne, w tym stres oksydacyjny. Ich uwalnianie indukuje zmiany w zewnętrznych błonach mitochondrialnych (Bidere i wsp. 2003). Zatem spadek zawartości katepsyn przemawia za możliwością mniejszego stresu oksydacyjnego i mniejszej skłonności do apoptozy, jako efekt suplementacji GSH zauważony w tym badaniu. Rodzina enzymów lipaz i esteraz wykazuje duży stopień złożonej różnorodności funkcjonalnej (Anthonsen i wsp. 1995). Zatem wzrost ich aktywności zauważony w tym badaniu jest również zgodny z nasileniem procesów degradacji komórek, indukowanych przez GSH podany in vivo. Podsumowując, wyniki tego badania stwierdzono, że dieta uzupełniona GSH aktywuje degradację niepożądanego materiału komórkowego w hepatocytach, szczególnie w najbardziej hydrolitycznie aktywnej frakcji lizosomalnej. Wskazuje to na potencjalną rolę egzogenego GSH jako środka modulującego reaktywność degradacyjnych enzymów lizosomalnych w wątrobie. Dieta wzbogacona w GSH może zatem odgrywać ochronną rolę w stanach dysfunkcyjnych wątroby poprzez rozwijanie odpowiedzi adaptacyjnych mających na celu przywrócenie równowagi zniekształconego „stanu redoks” poprzez zwiększenie zdolności antyoksydacyjnych komórek.

Wyniki tego badania sugerują potencjalną korzyść z suplementacji GSH dla zmniejszenia uszkodzeń oksydacyjnych, szczególnie w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu metabolicznym, na poziomie komórkowym.

Iwona Stanisławska, Bożena Witek, Marek Łyp, Danuta Rochon-Szmejchel, Adam Wróbel, Wojciech Fronczyk, Agnieszka Kamińska, Adam Kołataj, Daniel Załuski. Effects of Glutathione on Hydrolytic Enzyme Activity in the Mouse Hepatocytes. *Adv Exp Med Biol Clinical and Experimental Biomedicine*.2018;1116:81-87.

Kolejnym kierunkiem badań nad zmianami dotyczącymi procesów metabolicznych w organizmach jest ocena i analiza aktywności enzymów lizosomalnych w tkankach wątroby i nerek w cukrzycy wywołanej alloksanem u myszy. Cukrzyca jest chorobą, która od dziesięcioleci jest szeroko omawiana w literaturze naukowej (Gilinsky i in. 2015; Perkisas i Vandewoude 2016). WHO sklasyfikowała cukrzycę jako chorobę XXI wieku (WHO 2012). Patogeneza cukrzycy nie jest jednak do końca jasna, zwłaszcza jeśli chodzi o biochemiczne aspekty jej rozwoju (Kido 2013; Krischer et al. 2003). Coraz większą uwagę w tym zakresie poświęcono enzymom lizosomalnym, które odgrywają kluczową rolę w komórkowych szlakach degradacji białek, lipidów, węglowodanów i ksenobiotyków (Hamer et al. 2012; Heltianu et al. 2011; Kołataj et al. 2001). Aktywność enzymatyczna jest uważana za istotny czynnik w utrzymywaniu komórki w stanie dynamicznej homeostazy, zwłaszcza w zakresie syntezy i katabolizmu substancji dostarczających energię (Witek i wsp. 2001, 2014; Platt i wsp. 2012). Celem badań było określenie kierunku i zasięgu zmian aktywności enzymów we frakcji lizosomalnej komórek wątroby i nerek u myszy z cukrzycą doświadczalną indukowaną alloksanem (mezoksalilomocznikiem). Doświadczenia przeprowadzono na 108 samcach myszy szwajcarskich w wieku 8-9 tygodni i wadze $25,0 \pm 1,4$ grama. Zwierzęta zostały losowo wybrane z pokrytej populacji 1000 osobników wyhodowanych w standardowej hodowli w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Zwierzęta utrzymywano w klatkach, ze swobodnym dostępem do karmy handlowej (16% białka i wartości energetycznej 14,04 MJ/kg) i wody, w temperaturze 21–22 °C, wilgotności względnej 50–60% oraz w 12-godzinny cykl światło/ciemność. Było dziewięć grup, trzy kontrolne i sześć eksperymentalnych, po 12 zwierząt każda. Myszy z grup doświadczalnych (grupa 2, 5 i 8) otrzymywały alloksan (10% roztwór w 0,9% NaCl v/v) w dawce 50 mg/kg dziennie (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) przez 4 dni 8 i 12 dni w odpowiednich grupach, podczas gdy myszy z grup 3, 6 i 9 otrzymały alloksan w dawce 75 mg/kg w podobny sposób. Myszy z grup kontrolnych (grupa 1, 4 i 7) otrzymywały 0,9% roztwór NaCl w odpowiednich okresach czasu. Wszystkie wstrzyknięcia

dootrzewnowe miały objętość 250 μ l i były wykonywane raz dziennie w godzinach 8.00-9.00. Trzydzieści minut po ostatnim wstrzyknięciu myszy uśmiercono przez dootrzewnowe wstrzyknięcie tiopentalu (40 mg/kg). Krew pobrano w celu oznaczenia stężenia glukozy oraz pobrano fragmenty nerek i wątroby. Fragmenty przepłukano 0,9% roztworem NaCl w 4°C, a następnie zawieszono w 100 mM roztworze buforu fosforanowego, pH 7,0 w 4°C, w stężeniu 500 mg tkanki na 5 ml buforu. Zawiesiny tkanek wątroby i nerek homogenizowano przy 200 obr./min przy użyciu młynka do tkanek Potter-Elvehjem wyposażonego w tłuczek teflonowy (Omni Inc; NW Kennesaw, GA) zgodnie z metodą Beaufay (1972). W celu uzyskania frakcji lizosomalnych z komórek wątroby i nerek, homogenaty wirowano przez 8 min przy 5000 obr./min (wirówka MPW-351R; MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska). Supernatanty zebrano i odwirowano przez 20 min przy 14 000 obr./min (wirówka Sorvall RC-5C; GMI Inc, Ramsey, MN). Osady rozpuszczono w 4 ml 0,1% Triton X-100 ochłodzonego do 4°C, kilkakrotnie zamrożono i rozmrożono, a następnie utrzymywano zamrożone w temperaturze -20 °C do dalszej analizy. W supernatantach aktywności lizosomalne kwaśnej fosfatazy (ACP, EC 3.1.3.2), β -glukuronidazy (β -GlcUr, EC 3.2.1.31), β -galaktozydazy (β -Gal, EC 3.2.1.23), β -glukozydazy (β -Glu, EC 3.2.1.21) i β -N-acetylohekszoaminidazę (Hex, EC 3.2.1.52) oznaczano metodą Barretta i Heatha (1977). W supernatantach homogenatów wątroby i nerek całkowity poziom białka oznaczano również metodą Lowry'ego (Lowry i wsp. 1951) w modyfikacji Kirschke i Wiederanders (1984). Poziom glukozy i insuliny oznaczano w osoczu krwi za pomocą zestawu diagnostycznego Bio-La-Test (Erba Lachema s.r.o., Brno, Czechy). Aktywność enzymatyczną wyrażono w nmol/mg białka/h, poziom glukozy w mmol/l, a insuliny w μ U/ml. Wszystkie podłoża zakupiono od Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg, Niemcy). Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu wielowymiarowej analizy wariancji (MANOVA). Wartość $p < 0,05$ określała zmiany istotne statystycznie. Ocenę przeprowadzono za pomocą komercyjnych pakietów statystycznych SAS/STAT (SAS Institute Inc; Cary, NC) i Origin v5.0 (Microcal Inc; Northampton, MA). Podawanie alloksanu spowodowało, że wszystkie myszy bez wyjątku zachorowały na cukrzycę. Rezultatem była hiperglikemia z prawie pięciokrotnym wzrostem poziomu glukozy oraz hiperinsulinemia z siedmiokrotnym wzrostem poziomu insuliny w stosunku do wartości wyjściowej. Stwierdzono istotny wzrost aktywności ACP w wątrobie po 4, 8 i 12 dniach oraz w nerkach po 12 dniach od wstrzyknięcia obu dawek alloksanu. Wzrosty mogły być spowodowane zwiększoną zawartością glukozy w osoczu. Wzrost ACP stwierdzono również w szczurzym modelu cukrzycy wywołanej alloksanem w badaniu El-Demerdash et al. (2005). Autorzy ci zaobserwowali równoczesny wzrost ACP i

transferazy glutationowej (GST); co było najprawdopodobniej odzwierciedleniem komórkowej ochrony antyoksydacyjnej przed reaktywnymi formami tlenu (ROS), powstającymi w cukrzycy. Podwyższony poziom ACP w wątrobie, wynikający ze stresu oksydacyjnego wywołanego hiperglikemią, odnotowano również w cukrzycy wywołanej streptozotocyną (McAnuff i wsp. 2003). Zwiększony stres oksydacyjny w cukrzycy jest znanym induktorem peroksydacji lipidów. Obserwowana w niniejszym badaniu zwiększona aktywność ACP mogła być również związana ze zwiększoną wrażliwością hydrolazy na zmiany w komórkowym potencjale redoks. Innym mechanizmem może być większe zapotrzebowanie na organofosforany, które aktywnie uczestniczą w wykorzystaniu węglowodanów (Al-Attas i wsp. 2011). Aktywność kwaśnej fosfatazy (ACP) (nmol/mg białka/h) w wątrobie i nerkach w cukrzycy wywołanej alloksanem u myszy; każda grupa składająca się z 12 myszy. Aktywność β -glukuronidazy (β -GlcUr) nie wykazała istotnych zmian 4 dni po podaniu alloksanu w dawce 50 mg/kg, natomiast wzrosła z $0,43 \pm 0,11$ do $0,53 \pm 0,13$ nmol/mg białka/h ($p < 0,05$) w wątrobie i od $0,32 \pm 0,03$ do $0,43 \pm 0,05$ nmol/mg białka/h ($p < 0,01$) w nerkach po dawce alloksanu 75 mg/kg. Procentowo, wzrost β -GlcUr wyraźnie osiągnął szczyt 8 dni po którejkolwiek dawce alloksanu zarówno w wątrobie, jak i nerkach, po czym słabnie. Obserwacje Mohanama i Bose (1984) oraz Zhao i in. (2013) wskazują na tempo metabolizmu glikozaminoglikanów w kształtowaniu poziomu aktywności β -GlcUr w tkankach. Zatem wyraźny wzrost β -GlcUr rozpoczynający się 8 dni po podaniu alloksanu w niniejszym eksperymencie mógł być spowodowany znacznym wzrostem ilości glikozaminoglikanów w osoczu w tym czasie, równoległe do wzrostu zawartości glukozy (Oshima i wsp. 1994). Innym czynnikiem prowadzącym do wzrostu β -GlcUr może być jednoczesne obniżenie poziomu heparyny i siarczanu heparanu, wynikające z przyspieszonej hydrolizy glukuronidów, stymulowanej obecnością alloksanu w wątrobie (Faure et al. 2013; Hinohara et al. 1974). Aktywność β -galaktozydazy (β -Gal) nie zwiększyła się znacząco ani w wątrobie, ani w nerkach przed upływem 12 dni od podania alloksanu. W wątrobie wzrosty wynosiły od $0,15 \pm 0,03$ do $0,23 \pm 0,04$ i do $0,22 \pm 0,03$ nmol/mg białka/h ($p < 0,001$) odpowiednio przy dawkach 50 mg i 75 mg/kg alloksanu. W nerkach wzrosty wynosiły od $0,12 \pm 0,03$ do $0,16 \pm 0,05$ i $0,17 \pm 0,08$ nmol/mg białka/h ($p < 0,01$) przy odpowiednich dawkach alloksanu. Obserwowany wzrost β -Gal może być spowodowany zwiększonym tempem metabolizmu glukozy w cukrzycy. Stroev i in. (1993) zinterpretowali zwiększoną aktywność β -Gal w wątrobie szczurów z cukrzycą jako „odpowiedź kataboliczną” narządu na alloksan. Kutryk i in. (1987) donieśli również o zwiększonym β -Gal w sercu szczurów 16 tygodni po wystąpieniu cukrzycy wywołanej

streptozotocyną. Zgodnie z tym raportem Fushimi i in. (1980) stwierdzili znaczny wzrost β -Gal u myszy z cukrzycą indukowaną streptozotocyną leczonych insuliną. Natomiast Chang i in. (1977), którzy badali wpływ cukrzycy wywołanej streptozotocyną na aktywność β -Gal, β -Glu i Hex w wątrobie, nerkach i trzustce chomików chińskich, nie znaleźli żadnych znaczących zmian w β -Gal i Hex, podczas gdy β -Glu spadło. Badanie Mirallesa i in. (1993) wykazali, że zarówno w cukrzycy typu I, jak i typu II, produkcja glukozy w nerkach jest zwiększona i wynosi aż 30% całkowitej glukoneogenezy. Aktywność β -glukozydazy (β -Glu) znacząco wzrosła zarówno w wątrobie, jak i nerkach już 4 dni po alloksanie w wyższej dawce 75 mg/kg. Wzrosty wynosiły odpowiednio od $0,13 \pm 0,02$ do $0,16 \pm 0,03$ nmol/mg białka/h oraz od $0,11 \pm 0,01$ do $0,13 \pm 0,02$ nmol/mg białka/h odpowiednio w wątrobie i nerkach ($p < 0,05$). β -Glu jest glikozydazą, która katalizuje rozpad wiązań 1,4-glikozydowych, tak więc jej wzrost już 4 dni po podaniu alloksanu może wskazywać na większą syntezę enzymu. Wysoka zawartość glukozy w cukrzycy hamuje aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej; kluczowy enzym szlaku pentozofosforanowego, który przyczynia się do glikozylacji białek, a w konsekwencji zwiększa aktywność β -Glu (Kumari i Sahib 1993). Wcześniejsze badanie Panina i in. (1982) wykazali zwiększoną aktywność β -Glu w wątrobie królików z cukrzycą, którym dodatkowo podawano hydrokortyzon i adrenalinę. Podobnie Grötsch i in. (1986) donieśli również o zwiększonym β -Glu w wątrobie szczura w cukrzycy wywołanej streptozotocyną. Co ciekawe, w niniejszym badaniu nie stwierdzono różnic w β -Glu po dłuższym czasie od podania alloksanu, który wynosił osiem i dwanaście dni. Aktywność N-acetylo-heksozoaminidazy (Hex) nie wykazała żadnych zmian po czterech dniach podawania alloksanu, ale znacznie wzrosła po 8 dniach z wyższym alloksanem 75 mg/kg; od $0,59 \pm 0,24$ do $0,72 \pm 0,01$ nmol/mg białka/h w wątrobie i od $0,48 \pm 0,12$ do $0,58 \pm 0,09$ w nerkach ($p < 0,05$). Hex pozostał znacząco zwiększony również 12 dni po obu dawkach alloksanu w obu narządach. Tutaj największy wzrost nastąpił po większej dawce alloksanu 75 mg/kg zmieniającej się z $0,60 \pm 0,16$ na $0,87 \pm 0,13$ nmol/mg białka/h ($p < 0,001$) w wątrobie oraz z $0,52 \pm 0,11$ na $0,71 \pm 0,07$ nmol /mg białka/h ($p = 0,01$) w nerkach. Wyniki dotyczące aktywności Hex uzyskane w niniejszym badaniu są zgodne z obserwacjami innych autorów. W badaniu Takumi et al. (1985) w cukrzycy wywołanej streptozotocyną u szczurów. Mohanam i Bose (1983) donieśli, że aktywność niektórych hydrolaz lizosomalnych, w tym Hex, znacznie wzrosła w porównaniu z wyjściowym poziomem kontrolnym w cukrzycy wywołanej przez alloksan i streptozotocynę u szczurów. Alloksan przyczynił się do szybkiego wzrostu zawartości glukozy, zwiększenia aktywności peroksydazy glutationowej i zmniejszenia

stosunku aminotransferazy asparaginianowej/aminotransferazy alaninowej, zmiany, które mogą leżeć u podstaw zwiększenia aktywności. Hex. Bhimji i in. (1985) stwierdzili znaczny wzrost aktywności Hex w sercu królików z cukrzycą, co zinterpretowali jako spowodowane kardiomiopatią cukrzycową. Zgodnie z powyższym, Kutryk i in. (1987) stwierdzili późny wzrost aktywności Hex w kardiomiopatii wywołanej streptozotocyną u szczurów, wyrażany 16 tygodni po wystąpieniu cukrzycy. Według Mohanama i Bose (1984) oraz Gambaro i in. (1994), procesy degradacji glikozaminoglikanów są niezbędne do rozwoju nefropatii cukrzycowej, objawiającej się również zwiększoną aktywnością Hex. McAuliffe i in. (1996) stwierdzili podwyższony poziom siarczanu heparanu w moczu osób z cukrzycą typu 2 w porównaniu z osobami zdrowymi. Mohanam i Bose (1983) wskazali na indukcyjne działanie alloksanu, objawiające się zwiększoną aktywnością Hex nie tylko w wątrobie czy nerkach, ale także w skórze, śledzionie i osoczu szczurów doświadczalnych. Wielowymiarowa analiza wariancji wykazuje znaczący wpływ na zmienne zależne, tj. badane enzymy, warunków doświadczalnych, tj. zmiennych dawek alloksanu i czasu po podaniu alloksanu, dla wszystkich z wyjątkiem enzymu β -Glu. Analiza nie wykazała żadnych interakcji między narządem (wątroba lub nerka) a warunkami doświadczalnymi. Głównymi odkryciami niniejszego badania były to, że aktywność panelu pięciu enzymów lizosomalnych w tkance wątroby i nerek znacznie wzrosła w przebiegu doświadczalnej cukrzycy wywołanej alloksanem u myszy. Warto zauważyć, że aktywność enzymów lizosomalnych dla większości enzymów osiągnęła szczyt 12 dni po wystąpieniu cukrzycy, w czasie, gdy hiperglikemia i hiperinsulinemia już zaczęły słabnąć po osiągnięciu szczytu w 8 dniu przebiegu cukrzycy. Chociaż nie staraliśmy się szczegółowo śledzić związku aktywności enzymu lizosomalnego i hiperglikemii/hiperinsulinemii, aktywność enzymu była w większości przypadków wyższa przy wyższej dawce alloksanu, a tym samym wyższym poziomie glikemii. Wyniki tego badania potwierdzają wzrost enzymów lizosomalnych w różnych modelach cukrzycy wywołanej u zwierząt doświadczalnych, a także u ludzi, jak omówiono powyżej (Waters i wsp. 1992). Tak więc, wzrost aktywności enzymu lizosomalnego ma związek z hiperglikemią, a nie z bezpośrednim toksycznym działaniem na komórki beta wysp trzustkowych środka stosowanego do wywołania cukrzycy doświadczalnej. Cukrzyca, niezależnie od jej patogenezy i rodzaju, jest spowodowana zaburzonym metabolizmem komórkowym; jako pierwotnej konsekwencji hiperglikemii i hiperinsulinemii (Dell'aquila i Ellger 2013; Mandrup-Poulsen 2013). Rolą enzymów lizosomalnych jest utrzymywanie komórek w stanie dynamicznej równowagi biochemicznej (Witek i wsp. 2001, 2004). Dlatego cukrzyca musi wpływać na aktywność

enzymu, co prawdopodobnie odzwierciedla adaptację komórkową na poziomie molekularnym. Enzymy lizosomalne degradują glikokoniugaty błonowe, klasę węglowodanów powiązanych z różnymi innymi gatunkami chemicznymi powstającymi w procesie glikozylacji. Cząsteczki te są obecne w błonie podstawnej komórek śródbłonna, gdzie mają stanowić integralną część właściwości przepuszczalności ściany naczyń włosowatych. Zmniejszona zawartość glikokoniugatów błonowych, spowodowana zwiększoną aktywnością enzymów lizosomalnych, może stanowić zasadniczą cechę w progresji mikroangiopatii i miażdżycy cukrzycowej, szczególnie rozwijającej się w słabo kontrolowanej hiperglikemii (Waters i wsp. 1992; Rohrbach i Martin 1982). Chociaż dokładna rola molekularna enzymów lizosomalnych nadal nie została w pełni wyjaśniona w alternatywnych projektach badań, uważamy, że ostatecznie wykazaliśmy, że aktywność tych enzymów jest zwiększona w niekontrolowanej cukrzycy doświadczalnej. Ponieważ aktywność enzymu lizosomalnego silnie sprzyja rozwojowi mikroangiopatii cukrzycowej a ocena tej aktywności może być potencjalnie użyteczna w monitorowaniu leczenia cukrzycy i powikłań mikronaczyniowych.

Bożena Witek, Danuta Rochon-Sznejchel, Iwona Stanisławska (autor korespondujący), Marek Łyp, Krzysztof Wróbel, Arkadiusz Zapala, Agnieszka Kamińska, Adam Kołataj. Activities of Lysosomal Enzymes in Alloxan-Induced Diabetes in the Mouse. *Exp. Medicine Biology - Neuroscience and Respiration*. DOI 10.1007/5584_2017_102. IF=2.126; MNiSW=25

Bożena Witek, Teodora Król, Adam Kołataj, Ewa Ochwanowska, Iwona Stanisławska, Alina Ślewa. (2001). The insulin, glucose and cholesterol level and activity of lysosomal enzymes in the course of the model alloxan diabetes. *Neuroendocrinology Letters*, (Szwecja), 22, 240 – 244. (IF: 0,46)

Iwona Stanisławska, Marek Łyp, Piotr Tederko. Rola śródbłonna naczyniowego w patogenezie chorób układu krążenia. Najnowsze doniesienia z zakresu medycyny i nauk pokrewnych. red. Marcin Szklarczyk, Kamil Maciąg, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2017, str. 128-143. ISBN 978-83-65598-86-8 (MNiSW: 5 pkt.).

W ostatnim czasie obserwuje się szybki rozwój hybrydowych nanożeli dedykowanych do różnych zastosowań. Zastosowanie konstrukcji hybrydowych nanożeli ma olbrzymi potencjał z punktu widzenia modelowania procesów metabolicznych poprzez dostarczanie różnych substancji aktywnych i ich uwalnianiu w odpowiednich warunkach biologicznych. W tym kontekście nanożele wprowadzające biomolekuły do swoich nanosieci są obiecującymi innowacyjnymi nośnikami, które zyskują ogromny potencjał w zastosowaniach biomedycznych. Hybrydowe nanożele zawierające różne rodzaje biocząsteczek są przeznaczone do ulepszonych i kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych,

celowanego dostarczenia, poprawy biogodności oraz przezwyciężenia odpowiedzi immunologicznej, samoobrony komórek. Obecnie stanowią wyzwanie w aspekcie leczenia oraz diagnostyki chorób cywilizacyjnych. Choroby cywilizacyjne powiązane są mocno z warunkami środowiskowymi, zanieczyszczeniem środowiska, źle zbilansowaną dietą oraz stresem. Do chorób cywilizacyjnych zalicza się m.in. nadciśnienie, miażdżycę, chorobę niedokrwienną serca, zawały mięśnia sercowego, udar mózgu, miażdżycę tętnic, choroby nowotworowe, otyłość oraz nadwagę, cukrzycę, osteoporozę, nadwrażliwości pokarmowe, choroby psychiczne, alergię, astmę, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. W aspekcie diagnostyki oraz leczenia chorób cywilizacyjnych rozwiązania nanotechnologiczne przynoszą coraz bardziej wymierne korzyści. W szczególności związane jest to z zastosowaniem nanostruktur (nanocząstek, nanorurek, nanożeli) w terapii oraz obrazowaniu diagnostycznym gdzie pożądana jest wysoka specyficzność, skuteczność i zmniejszenie skutków ubocznych leczenia. Zasadniczo nanotechnologie stosowane są w diagnostyce chorób cywilizacyjnych, jako warstwy czujnikowe sensorów, części urządzeń diagnostycznych, czy nośniki substancji obrazujących stan chorobowy oraz w leczeniu oraz zapobieganiu chorobom cywilizacyjnym, jako nośniki substancji leczniczych, elementy biomateriałów stosowanych w leczeniu operacyjnym, pooperacyjnym oraz jako nośniki substancji odżywczych i suplementów diety. Skuteczny nośnik substancji leczniczej powinien być zdolny do łączenia silnych aspektów ukierunkowanego dostarczenia z kontrolowaną redystrybucją leku w tkance zmienionej chorobowo. Skutecznie musi pokonywać lekooporność np. bariery krew-mózg. Ma zapewniać możliwie jednolitą dystrybucję biologicznie aktywnej substancji w tkankach objętych procesem chorobowym podczas całego cyklu leczenia. Dzięki temu unikamy częstych iniekcji leczniczych a aktywna substancja jest utrzymywana na poziomie minimalnych dawek terapeutycznych. Związane jest to z uwalnianiem aktywnej substancji w czasie a jednocześnie być skutecznie degradowalna, metabolizowana i skutecznie usuwana z organizmu. Powinna posiadać zdolność do przenoszenia dużych ilości aktywnej substancji oraz do przedłużonego, podtrzymywanego uwalniania substancji leczniczej jak również przezwyciężać oporność wielolekową (ang. *multidrugresistance*, MDR). Nanonośniki, w tym hybrydowe nanożele, mają potencjał poprawy indeksu terapeutycznego leków, zdolności do wielofunkcyjności, zmiany mechanizmu wpływu aktywnej substancji biologicznie aktywnej oraz selektywnego kierowania do komórek zmienionych chorobowo. Hybrydowe nanożele modyfikowane dodatkowo biomolekułami i znacznikami posiadają aspekt kontrolowanego dostarczenia leków oraz posiadania ligandów o różnym powinowactwie do komórek zmienionych chorobowo w tym do komórek nowotworowych. Efekty działania kapsuł

nanotechnologicznych mających zdolność akumulacji dawek terapeutycznych oraz przedłużonego uwalniania leków powoduje zmniejszenie działań niepożądanych. Nanocząstki oraz nanożele są efektywnymi platformami elektronicznych urządzeń, sensorów i systemów typu „system-on-chip”. Biorąc pod uwagę zalety dostarczania substancji aktywnych biologicznie bazujących na nanotechnologii w porównaniu do klasycznych terapii stosunkowo prowadzone są prace nad przeprowadzeniem pełnego zakresu badań klinicznych. Dziedzina związana z rozwojem nanotechnologii i jej zastosowań medycznych rozwija się bardzo dynamicznie i wymaga badań na dużą skalę, w szczególności w aspekcie rozwoju metodologii oceny aspektu metabolizowania i ocena tego typu rozwiązań w badaniach *in vivo*. Istnieje potrzeba dogłębnej oceny biokompatybilności, biodegradowalności, biodystrybucji i eliminacji NG po podaniu *in vivo*. Współczesna medycyna koncentruje się m.in. na znalezieniu metod kontrolowanego dostarczania leków tylko do wymaganych miejsc. Pod tym względem kombinacje biocząsteczek i NG są perspektywiczne, ponieważ mogą jednocześnie pełnić funkcję skutecznych rezerwuarów leków i w sposób ukierunkowany te leki dostarczać. Wiązanie biomolekuł z NG pozwoliło na zwiększenie stężenia cząsteczek-ligandów, które celują w cząsteczkę komórki tak aby poprawić aspekt akumulacji oraz ochrony aktywnej postaci leku, a przede wszystkim kontrolowane uwalnianie leku. Grupa stosowanych biocząsteczek obejmują białka, aminokwasy, kwasy nukleinowe i aptamery. Wskazać można, że wiele reagujących na bodźce hybryd biomolekuła-nanożel znacząco wzmacnia działanie terapeutyczne. Bardzo ciekawym aspektem jest wzajemny wpływ związanych biocząsteczek i NG na parametry fizykochemiczne/właściwości hybrydy. Właściwości te pozwalają na projektowanie nośników o unikalnych możliwościach kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych. Należy dodać, że wskazane są badania *in vivo*, aby opisać i wyjaśnić szlaki metaboliczne i usuwanie hybryd biomolekuła - nanożel. Zrozumienie mechanizmów degradacji i labilności koniugatów biocząsteczka-nanożel w warunkach *in vivo* jest niezbędne dla bezpiecznego stosowania kompleksów hybrydowych. Poznanie zachowania NG w warunkach *in vivo* przyczyni się do rozwoju nowych nośników z nowymi mechanizmami uwalniania i kontrolowanego dostarczania substancji aktywnych biologicznie.

Stanisławska Iwona; Liwinska Wioletta; Lyp Marek; et al. Recent Advances in Degradable Hybrids of Biomolecules and NGs for Targeted Delivery. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, Volume: 24, Issue:10, 1873. IF=3.267; MNISW= 100

Liwinska Wioletta, Stanisławska Iwona, Lyp Marek, Mackiewicz Marcin, Stojek, Zbigniew, Zabost, Ewelina. Degradable nanogel drug carrier crosslinked with three-oligonucleotide hybrids for two-way drug release in

mild- and high hyperthermia treatment. *Journal of Materials Chemistry B.*, 2017, 5(24):4713-4724. IF= 4.776
MNIŚW=35.

Liwińska W., Symonowicz M., Stanisławska I., Lyp M., Stojek Z., Zabosta E.. Environmentally sensitive nanohydrogels decorated with three-strand oligonucleotide helix for controlled loading and prolonged release of intercalators. *RSC Advances*, Volume 6, Issue 93, 2016, Pages 91045-91059. (IF:3,108; MNIŚW:35).

Liwińska, W., Stanisławska, I., Lyp, M., Stojek, Z., Zabost, E. Switchable conformational changes of DNA nanogel shells containing disulfide-DNA hybrids for controlled drug release and efficient anticancer action. *RSC Advances*, 2019, 9(24), pp.13736-13748. (IF: 2.936; MNIŚW: 30pkt.).

Jednym z najistotniejszych kierunków badań z zastosowaniem hybryd nanożelowych jest dostarczanie substancji aktywnych w leczeniu najgroźniejszych chorób dla człowieka. Jednym z najbardziej obiecujących działań w tym kierunku jest wykorzystanie trójsegmentowych hybryd oligonukleotydowych. Trójsegmentowe hybrydy oligonukleotydowe wprowadzono jako środki sieciujące do nanosieci PNIPA-AAc. Otrzymane nanożele można było specyficznym przekształcać i degradować. Specyficzna architektura prezentowanego nośnika ma na celu osiągnięcie skutecznego leczenia chorób nowotworowych przy zmniejszonej toksyczności ubocznej. W rezultacie, w porównaniu z żelami z regularnymi środkami sieciującymi, uwalnianie leku może być realizowane niezależnie poprzez zmianę struktury sieci żelowej i konformacji hybryd DNA w sposób oscylacyjny oraz degradację środków sieciujących DNA przez denaturację. Badano średnicę hydrodynamiczną i potencjał zeta nanożeli w funkcji T i pH. Obecność helisy DNA w nanożelach doprowadziła do znacznego, prawie trzykrotnego wzrostu wydajności przechowywania wybranego leku przeciwnowotworowego w porównaniu z nanożelami ze zwykłymi środkami sieciującymi. Ponadto nanożele pozwoliły na 98% skuteczność uwalniania leku w warunkach wysokiej hipertermii i 70% skuteczność w łagodnych warunkach hipertermicznych. Skuteczność cytotoksyczności komórek insulinoma była lepsza w porównaniu z wolną doksorubicyną. Ponieważ w proponowanym podejściu oprócz leku może być uwolniona także trzecia nić DNA, otwiera to nowe możliwości w rozwoju terapii genowych. Ten nowy biokompatybilny nośnik wykazuje zwiększone obciążenie lekiem, ma właściwości dostrajalne i degradowalne w warunkach hipertermicznych i zapewnia kontrolowane uwalnianie substancji aktywnej.

Liwińska Wioletta, Stanisławska Iwona, Lyp Marek, Mackiewicz Marcin, Stojek, Zbigniew, Zabost, Ewelina. Degradable nanogel drug carrier crosslinked with three-oligonucleotide hybrids for two-way drug release in mild- and high hyperthermia treatment. *Journal of Materials Chemistry B.*, 2017, 5(24):4713-4724. IF= 4.776
MNIŚW=35.

Stanisławska Iwona; Liwińska Wioletta; Łyp Marek; et al. Recent Advances in Degradable Hybrids of Biomolecules and NGs for Targeted Delivery. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, Volume: 24, Issue: 10, 1873. IF=3.267; MNiSW= 100

Udział w projektach badawczych:

2007-2010 Wpływ 1-metylonikotynamidu na biochemiczny i histochemiczny fenotyp śródbłonna z uwzględnieniem zmian zachodzących w glikokaliksie w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonna. Projekt realizowany w Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w Wydziale Lekarskim. POL-POSTDOC III, Nr PBZ/MNiSW/07/2006/26. **Kierownik projektu**

Śródbłonek jest skomplikowaną, aktywną metabolicznie strukturą, która bierze udział w: uwalnianiu cytokin, regulacji procesów zakrzepowych, kontroli napięcia naczyń krwionośnych i ciśnienia tętniczego, kontroli transportu molekuł, regulacji procesu perfuzji i przepuszczalności w mikrokrążeniu, wydzielaniu czynników wzrostu dla procesu neowaskularyzacji, zachowania właściwości anty-trombogennych, współdziałaniu w adhezji i transmigracji leukocytów i komórek nowotworowych z nieuszkodzonych naczyń krwionośnych do otaczających tkanek oraz prezentacji antygenów dla limfocytów T.

Badania doświadczalne i kliniczne dowodzą, że śródbłonek jest narządem utrzymującym hemostazę układu krążenia. Na jego powierzchni występuje glikokaliks, który pełni funkcje ochronne (Van den Berg i wsp., 2006). Zmiany w składzie i czynności glikokaliksu poprzedzają stan zapalny śródbłonna naczyniowego a oba procesy odgrywają kluczową rolę w rozwoju *atherothrombosis* i jej klinicznych konsekwencji takich jak: zawał serca, niedokrwienny udar mózgu, a także choroby naczyń obwodowych (Nieuwdorp i wsp., 2006). Wraz z postępowaniem wiedzy o roli dysfunkcji śródbłonna w chorobach układu krążenia pojawiły się odkrycia śródbłonkowych mechanizmów działania leków, np. statyn, inhibitorów ACE-I (Gryglewski i wsp., 2001), tienopirydyn (Gryglewski i wsp., 1996). Wciąż istnieje potrzeba poszukiwania nowych substancji o silniejszym działaniu śródbłonkowym, aby skutecznie bronić układu krążenia jego własną bronią.

Do osiągnięcia tego celu potrzebne są dobre modele zwierzęce dysfunkcji śródbłonna *in vivo*; oraz szczegółowe badania zmian fenotypu śródbłonna w tych modelach pod wpływem leków śródbłonkowych.

W przedstawionym projekcie oceniono biochemiczny i histochemiczny fenotyp śródbłonna w kilku modelach zwierzęcych patologii układu krążenia, a potem zbadać wpływ 1-metylonikotynamidu (MNA^+) na różne parametry fenotypu rozwijającej się dysfunkcji śródbłonna. 1-metylonikotynamidu (MNA^+) był dotychczas uważany za nieaktywny metabolit nikotynamidu. Jednak ostatnie badania sugerowały jego działanie na śródbłonek.

Badania w pierwszym etapie obejmowały następujące elementy fenotypu dysfunkcji śródbłonna:

- I. ocenę stresu oksydacyjnego w śródbłonku naczyniowym;
- II. ocenę zaburzeń glikokaliksu śródbłonna poprzedzającego rozwój dysfunkcji śródbłonna;
- III. ocenę nasilenia procesu zapalnego śródbłonna naczyniowego na podstawie badania ekspresji cząstek adhezyjnych;
- IV. fluorescencyjną analizę poziomu elektrolitów w śródbłonku naczyniowym.

W drugim etapie projektu oceniono wpływ 1-metylonikotynamidu (MNA^+) na wyżej wymienione elementy fenotypu dysfunkcji śródbłonna, jak również badano bezpośredni wpływ 1-metylonikotynamidu *in vitro* na czynność śródbłonna w izolowanych naczyniach krwionośnych.

Powyższe badania przeprowadzono przy użyciu kilku modeli zwierzęcych dysfunkcji śródbłonna, takich jak: szczury z hipertriglicydemią wywołaną dietą bogatą w fruktozę, szczury z cukrzycą spowodowaną iniekcją dootrzewnową streptozotocyny, oraz modele genetycznie zmodyfikowanych myszy, które stanowią unikatowe modele miażdżycy (myszy double knock-out-Apo-E/LDLR KO) lub niewydolności krążenia (myszy transgeniczne Tg α q*44).

Do realizacji projektu wykorzystano metody: spektrofotometryczne, detekcji immunohistochemicznej, techniki mikroskopii konfokalnej i klasyczne metody farmakologii doświadczalnej.

W trakcie realizacji projektu współpracowano z ośrodkami:

- Pracownią Mikroskopii Konfokalnej oraz Zakładem Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytutu Biologii Doświadczalnej im Nenckiego, PAN Warszawa;

- Zakładem Ultrastruktury Komórki, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie
- Zakładem Biofizyki Wydziału Biotechnologii UJ, Kraków;
- Zakładem Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii UJ, Kraków;
- Pracownią Patomorfologii Szpitala Uniwersyteckiego im. Jana Pawła II w Krakowie;
- Katedrą Histologii UJ Collegium Medicum w Krakowie;
- Zakładem Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Wydziału Nauk o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;
- Katedrą Żywienia Człowieka, Wydziału Technologii Żywienia, Akademii Rolniczej, w Krakowie;
- Zakładem Wstępnych Badań Farmakologicznych, Wydziału Farmacji UJ CM w Krakowie
- Department of Cardiovascular Research University Hospital, Wiedeń, Austria
- Department of Biological Chemistry, Faculty of Biology, University of Konstanz, Niemcy
- Katedrą Farmakologii, Uniwersytetu Medycznego w Grodnie, Białoruś
- Department of Medicinal Chemistry, Latvian Institute of Organic Synthesis, Ryga
- Department of Pharmacology, University of Arhus, Dania
- Department of Biochemistry, University of Gratz , Austria

Niniejszy projekt pozwolił na rozwinięcie nowych metod analizy fenotypu śródbłonka w unikatowych modelach dysfunkcji śródbłonka *in vivo*, które oparte były na biochemicznych pomiarach aktywności NO i aktywności wolnych rodników tlenowych, na analizie stanu glikokaliksu i zaburzeń elektrolitowych śródbłonka. Z kolei rozwinięcie tych metod pozwoliło lepiej zbadać wpływ 1-metylonikotynamidu (MNA^+) na różne parametry fenotypu rozwijającej się dysfunkcji śródbłonka. Projekt przybliżył do zrozumienia śródbłonkowych mechanizmów działania 1-metylonikotynamidu, w czterech doświadczalnych modelach patologii układu krążenia, a proponowane w tym projekcie metody posłużą w przyszłości do oceny działania śródbłonkowego innych leków innowacyjnych które będą mogły znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób układu krążenia przebiegających z dysfunkcją śródbłonka.

Staże naukowe:

4.05-31.10. 2016 Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Staż naukowy pod opieką dr hab. Artura Józwika.

W ramach stażu wykonano szereg badań na zwierzętach doświadczalnych związanych z wpływem unieruchomienia na aktywność enzymów lizosomowych. Zapoznałam się z technikami analiz biochemicznych i nutrigenomicznych w celu ustalenia znaczenia suplementów diet. Współpraca zakończyła się publikacją w renomowanym czasopiśmie naukowym oraz wystąpieniami na konferencjach naukowych.

Józwik A., Strzałkowska N., Lipińska P., Markiewicz-Kęszycka, Lysek-Gładysińska M., Wróblewska B., Stanisławska I. The effect of breed and the feeding system on the activity of glycosidases in cow's milk, *Animal Science Papers and Reports* 2016, vol.34, 1,41-52.

Stanisławska I., Zielińska K., Kamińska A., Włostowska E., Józwik A., Trylińska-Tekielska E., Lyp M., Kołątaj A. The influence of immobilization and physical effort on some lysosomal enzyme activity in hepatocytes of experimental mice. 20th European Congress Physical and Rehabilitation Medicine, Lisbon 2016.

Włostowska E., Stanisławska I., Fronczyk W., Strzałkowska N., Lipińska-Palka P., Lyp M., Józwik A. The age-related changes on the haematological parameters in the mice after supplementation on iron, 6th International Young Scientists Conference, Human/Nutrition/ Environment, Rzeszów 2016.

3.04-30.09.2017 Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu. Staż naukowy został odbyty pod opieką dr hab. Artura Józwika.

W ramach stażu wykonano szereg doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych związanych z wpływem suplementów antyoksydacyjnych na stan zdrowia badanych zwierząt. Zapoznałam się z technikami analiz z wykorzystaniem spektroskopii bliskiej podczerwieni, chromatografii cieczonej oraz zmian kinetyki enzymów.

1.07.2017-30.06.2018 Katedra i Zakład Farmakognozji, Collegium Medicum w Bydgoszczy. Staż pod kierunkiem dr hab. Daniela Załuskiego.

W ramach stażu wykonano badania wielu nowych substancji stosowanych w prewencji i leczeniu chorób cywilizacyjnych przebiegających z wyniszczeniem organizmu. Współpraca zakończyła się publikacją w renomowanym czasopiśmie naukowym *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

Iwona Stanisławska, Bożena Witek, Marek Lyp, Danuta Rochon-Szmejchel, Adam Wróbel, Wojciech Fronczyk, Agnieszka Kamińska, Adam Kołataj, Daniel Zaluski. Effects of Glutathione on Hydrolytic Enzyme Activity in the Mouse Hepatocytes. *Adv Exp Med Biol Clinical and Experimental Biomedicine*.2018;1116:81-87.

**2006-2009 Wydział Lekarski, Katedra Farmakologii, Zakład Farmakologii
Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie.
Staż podoktorski pod kierunkiem prof. dr hab. Stefana Chłopickigo**

W ramach stażu wykonano badanie parametrów stresu oksydacyjnego w śródbłonku naczyniowym *in vivo*. Produkcję reaktywnych form tlenu i azotu oznaczono w naczyniach krwionośnych przy użyciu sond fluorescencyjnych (dioctanu 2', 7'-dichlorodihydrofluorescyny, dihydroetydyny i dihydrorodaminy) i mikroskopii konfokalnej. Do badania poziomu reaktywnych form azotu wykorzystano sondy fluorescencyjne: diaminoantrachinon (DAA) i dioctan 4-amino-5-metyloamino-2', 7'-difluorofluoresceiny (DAF-FM), które jak wykazały przeprowadzone wcześniej badania w układach bezkomórkowych oraz na komórkach śródbłonka naczyniowego HUVEC, jest wysoce specyficzna względem tlenku azotu. Pomiary intensywności fluorescencji DAF-FM przeprowadziłam w pracowni mikroskopii konfokalnej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im Nenckiego w Warszawie w ramach współpracy z Profesorem Adamem Szewczykiem. Dokonałam oceny stanu glikokaliksu śródbłonka poprzedzającą jego dysfunkcję na podstawie analizy aktywności N-acetylo- β -glukozaminidazy (NAG), która hydrolizuje β -acetamido-2-deoksy-D-glukozyd na fenol i N-acetylo-glukozaminę lub N-acetylo-galaktozaminę, działając na nieredukujące końce β -oligosacharydów zawartych w glikopeptydach i glikoproteinach, powstających między innymi przy rozkładzie kwasu hialuronowego. W ramach stażu nauczyłam się oceniać nasilenie procesu zapalnego śródbłonka naczyniowego na podstawie badania ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka (selektyna E, selektyna P, ICAM-1, VCAM-1) techniką immunofluorescencji.

Do oznaczania poszczególnych jonów wykorzystywałam następujące sondy:

- Na^+ - Analiza poziomu jonu sodowego przeprowadzona została z użyciem sondy fluorescencyjnej Molecular Probes Sodium Green™ Na^+ Indicator ($\lambda_{ex} = 488$ nm).

- K^+ - Do oznaczenia jonu potasowego w śródbłonku naczyniowym wykorzystałam znacznik fluorescencyjny będący pochodną benzofuranu, a mianowicie PBFI ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$; Molecular Probes).
- Ca^{2+} - Analiza zmian poziomu jonu Ca^{2+} przeprowadzona była z użyciem sondy fluorescencyjnej Molecular Probes Fluo-3 AM ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$).
- Cl^- - Poziom jonów chlorkowych zbadalam przy użyciu 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ, $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$, Molecular Probes).

Opracowałam w ramach programu badawczego, strategicznego projektu Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET) „Śródbłonek naczyniowy w rozwoju i leczeniu chorób cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym” części badań, które przeprowadzane były w modelach zapalenia śródbłonka w izolowanych komórkach śródbłonka i izolowanych krążkach naczyniowych *in vitro*. Celem niniejszego zadania badawczego było opracowanie i walidacja panelu doświadczalnych modeli zapalenia śródbłonka w izolowanych komórkowych, w izolowanych krążkach naczyniowych oraz ocena śródbłonkowego działania nowych związków w opracowanych modelach zapalenia śródbłonka. Co ważne ocena śródbłonkowego działania badanych związków w opracowanych modelach opierała się na całościowej ocenie fenotypowej obejmujące wszystkie najważniejsze aspekty odpowiedzi zapalnej śródbłonka, a opracowane modele zapalenia śródbłonka odzwierciedlały mechanizmy rozwoju dysfunkcji śródbłonka w określonej patologii *in vivo*. Badania wykonano z wykorzystaniem różnych linii komórek śródbłonka: EA.hy.926 (linia otrzymana z śródbłonka ludzkiej żyły pępkowej) HDMEC (linia otrzymana z śródbłonka ludzkich małych naczyń skórnych), HCMEC (linia otrzymana z śródbłonka ludzkiego małych naczyń serca), HCAEC (linia otrzymana z śródbłonka ludzkiej tętnicy wieńcowej, HAEC (linia otrzymana z śródbłonka aorty ludzkiej). W hodowli użyto różne rodzaje pożywek (z surowicą, osoczem lub bez) w związku z występowaniem innej odpowiedzi komórek na bodźce zapalne w zależności od warunków hodowli i te różnice zamierzamy scharakteryzować. Badania zostały rozpoczęte od opracowania modelu zapalenia komórek śródbłonka wywołanego przez $TNF \alpha$ (czynnik martwicy nowotworu). W planowanych badaniach stan zapalny śródbłonka wywoływany został również przez: trombinę, angiotensynę II, LPS (lipopolisacharyd bakteryjny, z i bez obecności osocza i białek LBP), IL 1β (interleukina 1 β), LPS+ IL 1β , IL 6 (interleukina 6), sCD40, wysoki poziom glukozy

(30 mM), FFA (wolne kwasy tłuszczowe np. stearynowy, oleinowy,) poprzez utlenione LDL (oxLDL), lub związki wywołujące stres oksydacyjny komórek śródbłonka (np. menadion). Po 1, 3, 6, 12, 24h od stymulacji zapalnej badana zostanie ekspresja cząstek adhezyjnych: ICAM-1, VCAM-1, selektyny E i selektyny P przy wykorzystaniu cytometru przepływowego oraz nowoczesnej aparatury „ScanR”, która umożliwia badanie immunocytochemiczne równocześnie w 96 dołkach w czasie rzeczywistym. Jest to alternatywna i konkurencyjna metoda do cytometrii przepływowej i jak można sądzić lepiej nadaje się do opracowania fenotypowej analizy działania śródbłonkowego związków w opracowywanych modelach, bowiem do oceny ekspresji molekuł adhezyjnych tą metoda nie jest konieczne odrywanie komórek od podłoża. W ramach tego zadania podjęte zostały również próby opracowania modelu zapalenia śródbłonka w warunkach przepływu.

W opracowywanych modelach, obok analizy ekspresji cząsteczek adhezyjnych zbadane zostały również wytwarzanie cytokin zapalnych przez aktywowany zapalnie śródbłonek (np. IL-8, IL-6), chemokin zapalnych (np. MCP-1) eikozanoidów (np. 6 keto PGF-1, PGE2, TXB2) oraz parametrów odpowiedzi prozakrzepowej śródbłonka (PAI-1).

Badania umożliwiły opracowanie kilku komplementarnych modeli zapalenia śródbłonka *in vitro* i kompleksową ocenę odpowiedzi zapalnej śródbłonka w opracowanych modelach, a opracowana metodyka stanowi podstawę do oceny jakościowej i ilościowej działania związków o działaniu śródbłonkowym w tych modelach.

Opracowanie modeli zapalenia śródbłonka w krążkach naczyń i nowych metod oceny fenotypowej odpowiedzi zapalnej śródbłonka w tych modelach

Celem tego podzadania było opracowanie modelu zapalenia śródbłonka w krążkach naczyń kompatybilnych do tych w izolowanych hodowanych komórkach śródbłonka. Warunki doświadczalne, w których komórki śródbłonka znajdują się w naczyniu krwionośnym, a nie w hodowli komórkowej, stanowią kolejne przybliżenie modelu zapalenia śródbłonka do warunków *in vivo*. Jest to jednak model o mniejszej możliwości badań typu przesiewowego, stanowić będzie jednak ważne uzupełnienie modelu zapalenia śródbłonka w hodowanych komórkach śródbłonka. W pierwszej kolejności opracowano model zapalenia śródbłonka w aorcie szczura, wywołany przez TNF- α . W badaniach wykorzystano krążki naczyń z naczyń o różnej wielkości od szczurów i myszy, (makro i mikro naczynia, naczynia wieńcowe, aorta, płucne, z innych łożysk naczyń). Pobrane zostały krążki 2-3 mm do inkubacji z czynnikiem zapalnym (analogicznym jak w podzadaniu 1). Inkubacja

prowadzona była przez 1, 3, 6, 12, 24h w warunkach bez i z przepływem. Do badań wykorzystano unikatowy układ hodowli krążków naczyńniowych (cell culture DMT system), który w warunkach przepływu umożliwił utrzymywanie czynności krążków naczyńniowych w warunkach podobnych do hodowlanych przez 24 godziny lub nawet dłużej. Taka metodyka pozwoliła na opracowanie modelu rozwoju dysfunkcji śródbłonka w warunkach *in vitro*, który odzwierciedlił rozwój dysfunkcji śródbłonka *in vivo*, lepiej niż modele komórek w hodowli. W tych modelach zapalenie śródbłonka rozwija się *in situ*, w całej ścianie naczynia a nie w odosobnionych komórkach śródbłonka co może mieć istotne znaczenie. W efluencie z krążków naczynia oznaczone zostały (metodą ELISA) stężenia cytokin zapalnych, chemokin oraz eikozanoidów (np. IL-8, MCP-1, 6-keto PGF-1, PGE₂), wytwarzanie NO i O²⁻ (metodą EPR) oraz ekspresja cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) metodą immunohistochemiczną. Barwienia zostały wykonane na tkankach mrożonych krążków naczyń przy użyciu opracowanej już wstępnie metodyki. Obok krążków naczyńniowych ze zwierząt kontrolnych dla porównania badane były krążki naczyńniowe ze zwierząt z dysfunkcją śródbłonka, w których to modelach w badaniach czynnościowych oraz biochemicznych stwierdzono dysfunkcję śródbłonka w izolowanych krążkach aort. W badaniach wykorzystano krążki naczyńniowe od szczurów z hipertriglicydemią (wywołaną przez 8 tygodniową dietę AIN93 wzbogaconą we fruktozę), szczurów z cukrzycą (wywołaną przez dootrzewnowe wstrzyknięcie streptozotocyny), myszy transgenicznym Tg αq*44 z niewydolnością krążenia, myszy knock-out-Apo-E/LDLR KO z miażdżycą. Ten cykl badań b miał na celu analizę czy fenotyp zapalenia śródbłonka uzyskany w modelach *in vitro* jest zbliżony do tego, który występuje *in vivo* oraz pozwoli opracować metodykę badań która umożliwi badanie wpływu związków podawanych *in vivo*, na fenotyp śródbłonka oceniany *ex vivo*.

Opisany cykl badań umożliwił opracowanie modeli zapalenia śródbłonka i ściany naczynia w krążkach naczyńniowych *in vitro* i kompleksową ocenę fenotypową odpowiedzi zapalnej śródbłonka w warunkach *in situ*. Ocena śródbłonkowego działania związków referencyjnych o działaniu śródbłonkowym oraz nowych związków w opracowanych modelach zapalenia śródbłonka *in vitro*.

Farmakologiczna korekcja dysfunkcji śródbłonka powinna prowadzić do zahamowania aktywacji zapalnej i mechanizmów zakrzepowych śródbłonka oraz przywrócić prawidłową czynność naczyńochronnych przekazników śródbłonka. W wyżej opracowanych modelach w oparciu o szeroki panel parametrów oceny fenotypowej zapalenia śródbłonka

(wytwarzanie prekaźników naczynioprotekcyjnych śródbłonna np. NO, PGI₂, mediatorów zapalnych np. ICAM-1, MCP-1, prekaźników zakrzeporodnych np. PAI-1) analizowany będzie wpływ związków referencyjnych o działaniu śródbłonkowym: B-adrenolityki (karwedilol, nebiwolol), statyny (simwastatyna, atorwastatyna), inhibitory ACE-I (perindopril, ramipril), sartany (lozartan), tienopirydyny (clopidogrel, prasugrel), CO donory (CORM3, CORMA1), NO donory (DEA/NO), chlorek 1-metylonikotynamidu (MNA). Następnie oceniono wpływ nowo badanych związków w tym np. soli pirydyniowych: hlorek 1,4-dimetylopirydyniowy (DMP), chlorek 1-metylo-3-acetylopirydyniowy (MAP), związków o podejrzanym podwójnym działaniu naczynioprotekcyjnym (via PGI₂ i NO) taki jak np. chlorek 1-metylo-3-pirydyloamidoksymu, oraz nowych pochodnych nikorandilu w tym metylonikorandil.

W ramach planowanych badań oceniono również toksyczność badanych związków na komórki śródbłonna przy użyciu spektrofotometrycznej analizy redukcji MTT i innych metod. W trakcie stażu prezentowano wyniki badań na konferencjach naukowych:

Lojek A., Stanisławska I., Wrzosek A., Szewczyk A., Dołowy K., Chłopicki S (2008). TNF-L induced ICAM-1 expression in inhibited by mitochondrial complex I inhibitor – rotenone in endothelial cell line. 8th Meeting of France – New EU Members 16th JMRC Symposium „New Frontiers in Cardiovascular Research” Krakow 41.

Bartuś M., Stanisławska I., Chmura-Skirińska A., Gajda M., Kostogryś R., Chłopicki S. (2008). The liver steatosis and endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic rats. 8th Meeting of France – New EU Members 16th JMRC Symposium „New Frontiers in Cardiovascular Research” Krakow 42.

Chmura-Skirińska A., Bartuś M., Stanisławska I., Chłopicki S., Szewczyk A. (2008). The influence of channel openers NS1619 and CGS7184 on endothelial vasodilatation. 43th Meeting of the Polish Biochemical Society. Olsztyn

Stanisławska I., Chmura-Skirińska A., Bartuś M., Chłopicki S., Szewczyk A. (2008). The influence of channel openers NS1619 and CGS7184 as regulator of endothelial cells function. XIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Białystok

Chmura-Skirińska A., Bartuś M., Stanisławska I., Chłopicki S., Szewczyk A. (2008). The estimate of endothelial dysfunction by EPR measurements of nitric oxide production. Basic and clinical aspects of cardiac arrhythmia's Baltic Summer School, 17-29 August, Copenhagen, Denmark.

Chmura-Skirińska A., Stojak M., Stanisławska I., Szewczyk A., Chłopicki S. (2009). The influence of carbon monoxide on endothelial function. Acta Biochimica Polonica 56 (4):186. 44th Meeting of the Polish Biochemical Society. Łódź.

Współpraca międzynarodowa w zakresie działalności naukowej :

od 2020 współpracę z Uniwersytetem w Jaen (Hiszpania) zaowocowała przeprowadzeniem dwóch recenzji w przewodzie doktorskim Daniela Rodrigueza Almagro i Estebana Obrero Gaitan realizowanych w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Jaen w Hiszpanii.

Aktywny udział w kongresach krajowych i międzynarodowych z prezentacjami popularyzującymi prowadzone badania:

1. XIV Ogólnopolskie Seminarium pt. „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków, 2000.
2. X International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2001.
3. XV Ogólnopolskie Seminarium pt. „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków.
4. XI International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2002.
5. XVI Ogólnopolskie Seminarium pt. „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków, 2002.
6. 12 International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS “Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2003.
7. XVII Ogólnopolskie Seminarium pt. „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków, 2003
8. Konferencja „Chemia a edukacja prozdrowotna”. Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2003.
9. V Sympozjum Podstawy proekologiczne u progu XXI wieku, Sułów, 2003.
10. XVIII Ogólnopolskie Seminarium pt. „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków, 2004.

11. XIII International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2004.
12. XIV International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2005.
13. XV International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PA „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Kraków, 2006.
14. 16th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS- Krakow, 2007.
15. 8th Meeting of France – New EU Members 16th JMRC Symposium „New Frontiers in Cardiovascular Research” Krakow 2008.
16. 8th Meeting of France – New EU Members 16th JMRC Symposium „New Frontiers in Cardiovascular Research” Krakow, 2008.
17. 43th Meeting of the Polish Biochemical Society. Olsztyn, 2008.
18. XIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Białystok, 2008.
19. Seminarium STM/AFM Zakopane, 2008.
20. Basic and clinical aspects of cardiac arrhythmia's Baltic Summer School, 17-29 August 2008, Copenhagen, Denmark.
21. 44th Meeting of the Polish Biochemical Society. Łódź, 2009.
22. XIV Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Dobieszków 2009.
23. Seminarium STM/AFM Zakopane, 2010.
24. VI Wiosna z Fizjoterapią Cykliczne Sympozjum Studenckich Kół Naukowych nt. Aktualne Kierunki Rozwoju Fizjoterapii i Rehabilitacji (opiekun naukowy p. Moniki Całus) Warszawa, 16 kwietnia 2012.
25. VII Wiosna z Fizjoterapią Cykliczne Sympozjum Studenckich Kół Naukowych nt. Aktualne Kierunki Rozwoju Fizjoterapii i Rehabilitacji (opiekun naukowy p. Pauliny Lisowskiej i Krzysztofa Psoty), Warszawa, 19 kwietnia 2013.
26. 20th European Congress Physical and Rehabilitation Medicine, Lisbon, 2016.
27. 6th International Young Scientists Conference, Human/Nutrition/ Environment, Rzeszów 2016.

28. I Konferencja Międzynarodowa „Postępy Nauk o Zdrowiu” Warszawa, 2017.
29. Posiedzenie Naukowe Polskiego Towarzystwa Rehabilitacji Oddziału Mazowieckiego, 7 marca 2017, Warszawa.
30. IX Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel, Lublin, 2017.
31. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa pt. „Wymiary Chorób Cywilizacyjnych i Społecznych XXI wieku”. Lublin, 2017.
32. Konferencja Naukowa, Dietetyka w Kosmetologii, Warszawa, 13 maja 2017.
33. II Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Edukacja-Zdrowie-Środowisko”. Kielce, 1-2 czerwca 2017.
34. III Konferencja Naukowa Wyższej Szkoły Rehabilitacji. Czynniki genetyczne i środowiskowe wpływające na jakość zdrowia i życia konsumentów. Wyższa Szkoła Rehabilitacji w Warszawie, 9 czerwca 2017.
35. III Międzynarodowa Konferencja. Ratownictwo Medyczne w Nauce i Praktyce. Mikołajki, 6-8 września 2017.
36. XVIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Rehabilitacji Rzeszów, 13-14 października 2017.
37. IV Konferencja Naukowa „Czynniki genetyczne i środowiskowe wpływające na jakość życia i zdrowia konsumentów”, Warszawa, 1 grudzień 2018.
38. Konferencja Człowiek-Zdrowie Środowisko ,UJK, Kielce 2018.
39. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa Wymiary Chorób Cywilizacyjnych i Społecznych XXI wieku, Lublin, 7.04.2018.
40. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa – Tygiel „Interdyscyplinarność Kluczem do Rozwoju”, Lublin, 2018.
41. Posiedzenie Naukowe Oddziału Mazowieckiego Polskiego Towarzystwa Rehabilitacji, 9.03.2019, Warszawa.
42. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2019. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju. Lublin, 22-24.03.2019.
43. XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2020. Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju. Lublin, 2020.
44. Posiedzenie Naukowe Oddziału Mazowieckiego PTReh. Warszawa, 6.03.2021.
45. VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa- Wymiary Chorób Cywilizacyjnych i Społecznych XXI wieku, 23 kwietnia 2021, Lublin.

46. VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa WSR „Żywność a Zdrowie Człowieka”, 15.05.2021 Warszawa.
47. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Starzenie się i starość wyzwaniem i zadaniem XXI wieku, 10.06.2021 Jarosław
48. Ogólnopolska Konferencja Naukowa Multidyscyplinarne Aspekty Zdrowia i Choroby, Wyższa Szkoła Rehabilitacji w Warszawie, 27.05.2022
49. Konferencja Naukowa Dług Zdrowotny Wyznaczeniem dla Pielęgniarek i Położnych oraz innych zawodów medycznych, Warszawska Uczelnia Medyczna 27.05. 2023

Działalność dydaktyczna:

- od 2010** Prowadzenie wykładów i ćwiczeń z anatomii człowieka, fizjologii człowieka, biochemii, edukacji zdrowotnej, metodologii badań, patofizjologii
- 2015** Opracowanie programu studiów z zakresu Dietetyki I i II stopnia realizowanego w WSR w Warszawie
- 2015** Opracowanie sylabusów z przedmiotów podstawowych realizowanych na kierunku Dietetyki
- 2019** Opracowanie sylabusów do specjalności: Dietetyka w sporcie oraz Dietetyka Kliniczna
- 2020** Opracowanie programu studiów z Zakresu Zdrowia Publicznego w WSR w Warszawie
- 2010-2023** Przygotowanie i przeprowadzanie egzaminów dla studentów Wyższej Szkoły Rehabilitacji w Warszawie z zakresu: anatomii człowieka, fizjologii człowieka, biochemii, edukacji zdrowotnej oraz metodologii badań

Wykłady w ramach programu Erasmus-Plus w uczelniach zagranicznych:

- 2017** wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Gironie (Hiszpania)
- 2017** wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Peskara-Chieti (Włochy)

- 2018 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Toledo (Hiszpania)
- 2019 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Wydziału Fizjoterapii Uniwersytetu w Faro (Portugalia)
- 2020 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Jaen (Hiszpania)
- 2021 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Jaen (Hiszpania)
- 2022 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Elche-Alicante (Hiszpania)
- 2022 wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Walencja (Hiszpania)
- 2023 wykłady wykłady (Visiting Profesor - Erasmus-Plus) dla studentów Uniwersytetu w Jaen (Hiszpania)
- 2012 – 2023 **Promotor** ponad 250 i recenzent ponad 120 prac licencjackich i magisterskich studentów na kierunku Fizjoterapii, Dietetyki, Zdrowia Publicznego w Wyższej Szkole Rehabilitacji w Warszawie
- 2018 **Promotor pomocniczy** w przewodzie doktorskim pani mgr Ewy Włostowskiej prowadzonym w Uniwersytecie Pedagogicznym w Krakowie
Tytuł rozprawy: Wpływ starzenia na procesy degeneracyjne we krwi i wybranych organach myszy. Promotor: dr hab. Artur Józwik
- 2020 **Recenzja w przewodzie doktorskim** Daniela Rodrigueza Almagro realizowanego w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Jaen w Hiszpanii.
- 2021 **Recenzja w przewodzie doktorskim** Estebana Obrero Gaitan realizowanego w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Jaen w Hiszpanii.
- 2023 Ekspert do przygotowania materiałów szkoleniowych dotyczących zasad prowadzenia edukacji zdrowotnej dla wybranych grup zawodowych w ramach Zadania 5 PIB: Popularyzacja wiedzy i informowanie społeczeństwa o

aktualnej sytuacji epidemiologicznej chorób i zakażeń oraz sytuacji zdrowotnej obywateli, a także popularyzacja wiedzy i zachowań sprzyjających zdrowiu w zakresie profilaktyki chorób, prawidłowego odżywiania oraz prozdrowotnego stylu życia. Temat materiałów szkoleniowych: „Polskie i zagraniczne schematy i rekomendacje w zakresie budowania/planowania i ewaluacji programów zdrowotnych”.

2019-2021 Ekspert ds. opracowania programu, efektów kształcenia i koncepcji modułu „Zdrowe Odżywianie” oraz prowadzenie warsztatów z edukacji żywieniowych w ramach projektu z Funduszy Europejskich pn. „Zdrowe Życie i Zdrowa Kariera – program rozwijania kompetencji kluczowych niestandardowych odbiorców szkolnictwa wyższego” realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, Oś Priorytetowa III: Szkolnictwo Wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.1: Kompetencje w szkolnictwie wyższym.

2021 Ekspert ds. opracowania sylabusów, efektów kształcenia oraz opracowania scenariuszy zajęć z wykorzystaniem VR (wirtualnej rzeczywistości) z Fizjologii na kierunku Fizjoterapii w ramach projektu z Funduszy Europejskich pn. „Regionalny Rozwój Uczelni” (nr POWR.03.05.00-00-ZR56/18) realizowany w ramach III Osi Priorytetowej: Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych, Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

Działalność organizacyjna związana z nauką:

- 2013** Komitet Organizacyjny i Naukowy I Symposium Wyższej Szkoły Rehabilitacji w Warszawie - Fizjoterapia w wybranych dziedzinach medycyny
- 2015** Komitet organizacyjny i naukowy I Konferencji Naukowej dla Dietetyków Czynniki Genetyczne i Środowiskowe wpływające na jakość zdrowia i życia konsumentów, WSR Warszawa
- 2016** Komitet Organizacyjny i Naukowy II Konferencji Naukowej dla Dietetyków – Czynniki Genetyczne i Środowiskowe wpływające na jakość zdrowia i życia konsumentów, WSR Warszawa
- 2017** Komitet Organizacyjny i Naukowy III Konferencji Naukowej dla Dietetyków- Czynniki Genetyczne i Środowiskowe wpływające na jakość zdrowia i życia konsumentów, WSR Warszawa
- 2017** Komitet Organizacyjny III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Edukacja- Zdrowie-Środowisko”, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
- 2017** Komitet Organizacyjny i Naukowy I Konferencji Międzynarodowej „Postępy Nauk o Zdrowiu”, WSR Warszawa
- 2018** Komitet Naukowy i Organizacyjny IV Konferencja Naukowa „Czynniki genetyczne i środowiskowe wpływające na jakość życia i zdrowia konsumentów”, WSR Warszawa
- 2019** Komitet Naukowy i Organizacyjny V Konferencja Naukowa „Czynniki genetyczne i środowiskowe wpływające na jakość życia i zdrowia konsumentów”, WSR Warszawa
- 2021** Komitet Naukowy i Organizacyjny VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Żywność a Zdrowie Człowieka”, WSR Warszawa
- 2021** Komitet Organizacyjny i Naukowy - Ogólnopolska Konferencja „Multidyscyplinarne podejście do zagrożeń zdrowia i życia człowieka w obliczu pandemii COVID-19”, WSR Warszawa
- 2021** Komitet Organizacyjny - III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Starzenie się i starość wyzwaniem i zadaniem XXI wieku, 10.06.2021 PWSTE Jarosław
- 2021** Komitet Organizacyjny – Konferencja Naukowa „Zrozumieć Spektrum

- 2022 Płodowych Zaburzeń Alkoholowych – FASD”, 13.09.2021 Sejm RP
Komitet Organizacyjny i Naukowy – Ogólnopolska Konferencja Naukowa
Multidyscyplinarne Aspekty Zdrowia i Choroby, Wyższa Szkoła Rehabilitacji
w Warszawie
- 2023 Komitet Organizacyjny i Naukowy – Konferencja Spotkania na granicy – Prawo
ochrony środowiska i zdrowia, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Collegium
Medicum Uniwersytet J. Kochanowskiego w Kielcach

Działalność wydawnicza:

- 2018 Recenzent w czasopiśmie „Medical Studies”
- od 2015 Z-ca redaktora naczelnego w czasopiśmie „Postępy Nauk o Zdrowiu”
- 2017 Redaktor Naukowy monografii:
Wpływ żywności i żywienia na zdrowie. red. naukowa. Chmielewski J.,
Florek-Luszczki M., Stanisławska I. Instytut Ochrony Środowiska -
Państwowy Instytut Badawczy, Kielce
- 2020 Recenzent w monografii „Environmental Factors And Health-Educational
Dimension” red. I. Żeber-Dzikowska, J. Chmielewski, J. Kosecka. Instytut
Ochrony Środowiska - Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa.

Prowadzenie studenckich kół naukowych:

- 2014-2023 Prowadzenie Koła Naukowego Edukacji Zdrowotnej w Wyższej Szkole
Rehabilitacji Warszawie
- 2012-2023 Współprowadzenie Koła Naukowego Biorehabilitacji, którego celem było
rozwijanie badań dotyczących podstaw biochemicznych i biologicznych
procesów zachodzących w procesach leczenia i rehabilitacji. Szczególnym

zainteresowaniem są procesy podstawowe stojące u źródeł skuteczności leczenia i rehabilitacji. Opiekunami koła są ściśle ze sobą współpracujący i doświadczeni specjaliści z zakresu nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

VI Wiosna z Fizjoterapią Cykliczne Sympozjum Studenckich Kół Naukowych nt. Aktualne Kierunki Rozwoju Fizjoterapii i Rehabilitacji - opiekun naukowy pani Moniki Całus, WUM, Warszawa, 16 kwietnia 2012.

VII Wiosna z Fizjoterapią Cykliczne Sympozjum Studenckich Kół Naukowych nt. Aktualne Kierunki Rozwoju Fizjoterapii i Rehabilitacji - opiekun naukowy p. Pauliny Lisowskiej i Krzysztofa Psoty, WUM Warszawa, 19 kwietnia 2013.

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

2019 – 2022 Przygotowanie i realizacja warsztatów dotyczących zdrowego odżywiania dla uczniów szkół podstawowych na terenie Warszawy w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, Oś Priorytetowa III: Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.1: Kompetencje w szkolnictwie wyższym.

2020 – 2021 Prowadzenie warsztatów z zakresu zdrowego stylu życia dla uczniów I Katolickiego Liceum Społecznego w Warszawie

2006-2015 Popularyzowanie nauki w trakcie Festiwalów Nauki. Organizowanie warsztatów dotyczących zdrowego stylu życia:

1. **Stanisławska Iwona**, Tytko Joanna (2006). Składniki pokarmowe i ich znaczenie. VII Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe, Akademia Świętokrzyska.
2. Marwicka Justyna, **Stanisławska Iwona** (2006). Profilaktyka chorób cywilizacyjnych. VII Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe, Akademia Świętokrzyska.
3. Gąsiorowski Rafał, **Stanisławska Iwona** (2006). Obliczenia statystyczne w epidemiologii. VII Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe, Akademia Świętokrzyska.
4. Tytko Joanna, **Stanisławska Iwona** (2007). Walka z wolnymi rodnikami. VIII Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe, Akademia Świętokrzyska.

5. **Stanisławska Iwona**, Tytko Joanna (2007). Makroelementy i ich rola w żywieniu. VIII Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe, Akademia Świętokrzyska.
6. **Stanisławska I.**, Całus M. (2012) Kręgosłup: podstawowy element szkieletu. Choroby układu ruchu. XVI Warszawski Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
7. Tokarska A., **Stanisławska I.**, (2012) Jak pracują mięśnie? XVI Warszawski Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
8. **Stanisławska I.**, Gołaszewska K., Całus M. (2012) Budowa i funkcjonowanie układu ruchu. XVI Warszawski Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
9. **Stanisławska I.**, Jankowska M, Hajnrych A. (2013) Tajemnice anatomii – budowa układu ruchu. XVII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe
10. **Stanisławska I.**, Godlewska M., Dziergas-Wnuk R., Kaszyńska I. (2013) Składniki pokarmowe w żywności i ich rola w onanizmie człowieka. XVII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
11. **Stanisławska I.**, Gołaszewska K. (2013) Budowa kręgosłupa oraz jego funkcje. Choroby układu ruchu. XVII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe
12. **Stanisławska I.**, Rzepczak P., Oleszczuk E.(2014) Szkielet człowieka: budowa i funkcje. XVII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
13. **Stanisławska I.**, Godlewska M., Kaszyńska I. (2014) Składniki pokarmowe w żywności i ich funkcje w organizmie. XVIII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
14. **Stanisławska I.**, Jankowska M. (2014). Budowa układu ruchu. XVIII Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
15. **Stanisławska I.**, Ugarenko A., Renclawowicz A., Ambroziak A. (2015). Jak zdrowo się odżywiać? XIX Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.
16. Ugarenko A., Kazimierczuk E., Ruszczyk N., **Stanisławska I.** (2015). Zasady zdrowego odżywiania. XIX Festiwal Nauki. Prezentacje Festiwalowe.

Nagrody i wyróżnienia:

- 2017** Nagroda Rektora Wyższej Szkoły Rehabilitacji prof. dr hab. n. med. Jerzego Kiwerskiego za zaangażowanie w działania organizacyjne i naukowo – dydaktyczne na rzecz rozwoju Uczelni.

