

*Załącznik nr 2*



Alicja Chrzanowska

## **AUTOREFERAT**

Katedra i Zakład Biochemii  
Wydział Lekarski  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Warszawa 2023**

## Spis treści

1. Dane personalne .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Dane bibliometryczne: .....	3
5. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) .....	4
6. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
6.1. Wprowadzenie i omówienie celu naukowego .....	5
6.2. Szczegółowy opis wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
6.3. PODSUMOWANIE .....	21
7. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	23
7.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.....	23
7.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora .....	26
8. Piśmiennictwo .....	35
9. Pozostałe publikacje oryginalne i poglądowe .....	37
10. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych .....	38
11. Udział w projektach badawczych .....	40
12. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	40
13. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	41
13.1. Recenzje prac naukowych .....	41
13.2. Nagrody i stypendia za działalność naukową.....	42
13.3. Kursy i szkolenia/staże naukowe .....	42
13.4. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych .....	43
14. Działalność organizacyjna, dydaktyczna i popularyzująca naukę:.....	44
14.1. Nagrody i wyróżnienia.....	44
14.2. Działalność dydaktyczna .....	44
14.3. Działalność organizacyjna.....	44
14.4. Działalność popularyzująca naukę:.....	44

## 1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Alicja Chrzanowska

Zajmowane stanowisko i adres: adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, Polska

tel. + 48 22 572 06 93

ORCID: 0000-0002-6928-4561

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**2000 r.** – dyplom magistra farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Bioanalizy Środowiska, tytuł pracy magisterskiej: „Oznaczanie zawartości czterochlorku węgla i chloroformu w powietrzu na stanowisku pracy metodą HPLC”. Obrona z wynikiem bardzo dobrym, promotor: Prof. dr. hab. n. farm. Józef Sawicki, recenzent: Prof. dr hab. Jan Pachecka

**2008 r.** – stopień doktora nauk medycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, tytuł rozprawy doktorskiej: „Zmiany aktywności i ekspresji arginazy w marskości i pierwotnym raku wątroby”, obrona z wyróżnieniem  
promotor: Prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma  
recenzenci: Prof. dr hab. Edward Bańkowski, Prof. dr hab. Sławomir Maśliński

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

**11.2000 – 10.2008** – asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

**11.2008 – 06.2015** – adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

**11.2017 – obecnie** – adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

## 4. Dane bibliometryczne:

Dorobek naukowy (jako pierwszy autor i współautor) na dzień wykonania dołączonej do autoreferatu analizy bibliometrycznej (2.03.2023):

- 30 oryginalnych, pełnotekstowych prac naukowych, w tym 20 w czasopismach z IF (21 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora); z czego 11 jako pierwszy/korespondencyjny autor
- 5 prac poglądowych, w tym 3 w czasopismach z IF (3 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)
- 19 doniesień/komunikatów na zjazdach międzynarodowych lub krajowych); z czego 11 jako pierwszy autor (streszczenia prezentowane w formie plakatu lub prezentacji ustnej)

**Sumaryczny Impact Factor** wszystkich publikacji wg listy Journal Citation Reports JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **94,058**

**Sumaryczna punktacja MEiN (dawniej MNiSW)** wszystkich publikacji: **1997**

**Liczba cytowań** (wg bazy Web of Science/Scopus) z dnia 02.03.2023, bez autocytoowań: **313/372**

**Indeks Hirscha** (wg bazy Web of Science/Scopus) z dnia 02.03.2023: **10**

**5. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).**

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Ocena potencjału cytotoksycznego nowych koniugatów fluorochinolonów z kwasami tłuszczowymi oraz ich wpływu na metabolizm komórek nowotworowych i bakteryjnych**

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Cykl 4 oryginalnych publikacji pełnotekstowych:

**H1. Chrzanowska A**, Roszkowski P, Bielenica A, Olejarz W, Stępień K, Struga M. Anticancer and antimicrobial effects of novel ciprofloxacin fatty acids conjugates. *Eur J Med Chem.* 2020;185:1–11.

IF = 6,514; Punkty MEiN = 140; kwartyle Q1

**Wkład:** autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, hodowli komórkowej, wykonywaniu większości oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, zebraniu i interpretacji piśmiennictwa, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Udział oszacowany na 70%.

**H2. Chrzanowska A\***, Olejarz W, Kubiak-Tomaszewska G, Ciechanowicz A, Struga M. The Effect of Fatty Acids on Ciprofloxacin Cytotoxic Activity in Prostate Cancer Cell Lines - Does Lipid Component Enhance Anticancer Ciprofloxacin Potential? *Cancers (Basel).* 2022;87:905–917.

IF = 6,575; Punkty MEiN = 140; kwartyle Q1

**Wkład:** autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, hodowli komórkowej, wykonywaniu oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, zebraniu i interpretacji piśmiennictwa, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Udział oszacowany na 70%.

**H3. Chrzanowska A**, Struga M, Roszkowski P, Koliński M, Kmiecik S, Jałbrzykowska K, Zabost A, Augustynowicz-Kopeć E, Wrzosek M, Stefańska J, Bielenica A. The effect of conjugation of ciprofloxacin and moxifloxacin with fatty acids on their antibacterial and anticancer activity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):1-28.

IF = 6,208; Punkty MEiN = 140; kwartyle Q1

**Wkład:** autorka uczestniczyła w prowadzeniu hodowli komórkowej, wykonywaniu części oznaczeń w fazie eksperymentalnej, koordynacji i nadzorze nad zadaniami badawczymi, zebraniu i interpretacji piśmiennictwa, przygotowywaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Udział oszacowany na 60%.

**H4. Chrzanowska A**, Kurpios-Piec D, Żyżyńska-Granica B, Kiernożek-Kalińska E, Lay WX, Ciechanowicz A, Struga M. Anticancer activity and metabolic alteration in colon and prostate cancer cells by novel moxifloxacin conjugates with fatty acids. *Eur J Pharmacol.* 2023; 940:1-12.

IF = 5,195; Punkty MEiN = 100; kwartyle Q1

**Wkład:** autorka uczestniczyła we wszystkich etapach przygotowywania pracy tj.: opracowaniu pomysłu badania, hodowli komórkowej, wykonywaniu większości oznaczeń w części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników, zebraniu i interpretacji piśmiennictwa, przygotowywaniu pierwotnej wersji manuskryptu. Udział oszacowany na 70%.

Sumaryczny wynik punktacji IF i MEiN publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

Łączny IF **24,492**

Łączna punktacja MEiN **520**

\* – prace, w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

## **6. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

### **6.1. Wprowadzenie i omówienie celu naukowego**

Przedstawiony cykl badań dotyczy poszukiwań efektywnych i selektywnych pochodnych fluorochinolonów i kwasów tłuszczowych, które mogą zostać zastosowane w prewencji i/lub leczeniu nowotworów. Przeprowadzone badania pozostają w ścisłym związku z moimi obecnymi i wcześniejszymi zainteresowaniami naukowymi, koncentrującymi się wokół metabolizmu komórki nowotworowej i poszukiwaniu jego „słabych punktów”, które mogłyby stać się celem terapeutycznym.

Choroby nowotworowe należą do grupy chorób cywilizacyjnych i obejmują coraz szerszą grupę populacji ludzkiej stanowiąc jedną z głównych przyczyn zgonów bez względu na płeć i wiek. Co roku dane statystyczne wskazują na raka jelita grubego, płuc, prostaty i piersi jako dominujących wśród zdiagnozowanych guzów litych u pacjentów [1]. Większość nowotworów prostaty jest zależna od androgenów na początku ich rozwoju, co pozwala na skuteczną terapię blokowania aktywności hormonalnej. Jednak z czasem część komórek nowotworowych staje się oporna na terapię przez uniezależnienie się od działania androgenów. Prawdopodobnie dzieje się tak z powodu reaktywacji i endogennej, nieprawidłowej aktywacji receptora androgenowego (AR) [2]. W tym momencie rak nazywany opornym na kastrację (CRPC) powoduje większą śmiertelność, wskutek braku skutecznych terapii celowanych. Ciekawym jest fakt, że coraz więcej uwagi poświęca się zmianie metabolizmu lipidów w komórkach nowotworowych, jako procesowi zaangażowanemu w progresję guza. Okazują się, że nie wszystkie tkanki nowotworowe korzystają intensywnie z glikolizy i glutaminolizy jako szlaków dostarczających energii oraz metabolitów do syntez [3]. Rak prostaty (PCa) jest szeroko opisany jako nowotwór „bogaty w lipidy”, który wykorzystuje głównie kwasy tłuszczowe do produkcji energii i w dużym zakresie pozyskuje je ze środowiska pozakomórkowego. Okazuje się, że w warunkach stresu metabolicznego, w komórkach raka prostaty następuje zmiana profilu metabolicznego i oprócz wzmożonej syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych (FA), rośnie również wychwytywanie lipidów pozakomórkowych. Poza tym PCa jako jeden z kilku nowotworów, charakteryzuje się nieprawidłową akumulacją lipidów w postaci kropelek (LD). Proces ten może być ściśle związany z progresją nowotworu w kierunku fenotypu CRPC oraz z lekoopornością poprzez zwiększenie wewnątrz nowotworowej syntezy androgenów, co promuje patologiczną reaktywację AR [4]. Również komórki raka jelita

grubego charakteryzują się zmienionym profilem lipidowym poprzez zwiększony wychwyty nasyconych i jednonienasyconych łańcuchów acylowych, które między innymi wchodzi w skład błon komórkowych. Częsteczki lipidowe w tkance nowotworowej zostają wykorzystane nie tylko do budowy błon, ale również do przekazywania sygnałowego oraz są doskonałym materiałem energetycznym dla szybko proliferujących komórek. Tym samym wszelkie zmiany dotyczące metabolizmu lipidów wpływają na wiele procesów komórkowych, takich jak wzrost, autofagia, apoptoza lub nekroza, czy też lekooporność [5].

W terapii nowotworowej wciąż kluczowe znaczenie ma zastosowanie chemioterapii, gdyż zarówno resekcja chirurgiczna jak i radioterapia nie zawsze mogą być użyte ze względu na lokalizację guza, jego rodzaj czy też stopień zaawansowania. Obecnie w celu hamowania proliferacji komórek nowotworowych stosuje się wiele substancji aktywnych, ale wciąż istnieje potrzeba znalezienia związków charakteryzujących się skutecznością i selektywnością, bez wywołania poważnych działań niepożądanych, które często uniemożliwiają kontynuację terapii. Dlatego też cały czas prowadzone są badania mające na celu uzyskiwanie nowych, coraz bardziej skutecznych leków przeciwnowotworowych, zapewniających efektywną farmakoterapię tych chorób. Dobrą strategią, która pozwala skrócić czas, obniżyć koszty wprowadzania nowych leków na rynek, a także zmniejszyć ryzyko nieoczekiwanych skutków ubocznych jest zmiana przeznaczenia leku, nazywana również reproficylizacją lub reproficylizacją. Obejmuje ona identyfikację nowych zastosowań już zatwierdzonych i przebadanych leków, które wykaczają poza zakres ich pierwotnego wskazania medycznego [6]. Biorąc pod uwagę potencjał cytotoksyczny nie tylko przeciwko komórkom bakteryjnym, ale również jak wykazały badania *in vitro* i *in vivo* przeciwko komórkom nowotworowym, doskonałymi kandydatami wydają się być fluorochinolony. Jest to szeroka grupa chemioterapeutyków, znanych z aktywności hamującej bakteryjne topoisomerazy typu II: gyrazę DNA i topoisomerazę IV, które są odpowiedzialne za replikację, transkrypcję, a także naprawę i rekombinację DNA bakterii [7]. Z biegiem lat modyfikacja chinolonów doprowadziła do zmian w ich składzie chemicznym oraz strukturze, zwiększając siłę działania, optymalizując właściwości farmakokinetyczne, rozszerzając spektrum antybakteryjne i zmniejszając rozwój oporności bakterii. Cyprofloksacyna (CXP) jako fluorochinolon drugiej generacji charakteryzuje się szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego o zwiększonej aktywności przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym. Taki efekt uzyskano dzięki włączeniu fluoru w pozycji C6 oraz grupy piperazynowej w pozycji C7. Kolejne modyfikacje takie jak wprowadzenie grupy azabicyklicznej czy też grupy metoksylowej w pozycji C8 zwiększyły działanie przeciwko mikroorganizmom Gram+ czy też dodatkowo przeciwko beztlenowcom i zapoczątkowało erę fluorochinolonów IV generacji, do której należy moksifloksacyna (MXF) [8]. Co istotne, dopiero przy stężeniach stukrotnie wyższych niż konieczne do zahamowania enzymów bakteryjnych, związki te działają na topoisomerazy eukariotyczne. Jednak właśnie tę cechę wykorzystano przy wstępnych testach cytotoksyczności w komórkach nowotworowych [9]. Badania te prowadzone były w warunkach *in vitro* na różnych rodzajach nowotworów i pozwoliły one na identyfikację jeszcze innych mechanizmów działania tych chemioterapeutyków, takich jak indukowanie apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego, wpływ na transformację komórek nabłonkowych w mezenchymalne i macierzyste, biogenezę miRNA, stres oksydacyjny, zaburzenie bioenergetyki mitochondrialnej oraz zahamowanie inwazji i migracji komórek nowotworowych [10]. Dodatkowym atutem jest samo działanie antybakteryjne fluorochinolonów, które również w przypadkach niektórych nowotworów np. raka piersi czy też prostaty wpisuje się w działanie hamujące rozwój guza [11, 12]. Zidentyfikowano bowiem w środowisku guza wiele patologicznych szczepów bakterii, które wydają się być zaangażowane w mechanizmy prokancerogenne.

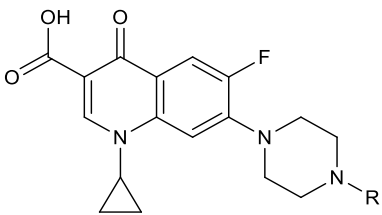
Jednocześnie znane są próby sprzężenia cytostatyków z komponentem lipidowym, które dały pozytywny efekt usprawnienia wychwyty przez komórki nowotworowe tak

zmodyfikowanych substancji oraz zwiększenia ich cytotoksyczności [13]. Powstałe w ten sposób związki mogą omijać mechanizmy oporności, a często jest to kluczowe, ponieważ do osłabienia efektu cytotoksycznego dochodzi właśnie pod wpływem zjawiska „efflux”. Dodatkowo okazuje się, że lipofilne koniugaty mogą wykazywać działanie ochronne na zdrowe komórki. Przykładowo, koniugowanie gemcytabiny z kwasem linolowym (CLA) czy też z ugrupowaniem kardiolipinowym pozwoliło na uzyskanie mniej toksycznego związku dla zdrowych komórek, który natomiast chętniej wiązał się z błonami i pokonywał oporność komórek nowotworowych [14]. Podobnie, aby zwiększyć indeks terapeutyczny i złagodzić toksyczność w stosunku do zdrowych tkanek, zsyntetyzowano koniugaty doksorubicyny (DOX) z kwasem alfa-linolenowym (LNA) i kwasem palmitynowym (PA). Wśród nich hydrazon DOX-LNA wydłużył znacząco czas przeżycia i zmniejszył rozmiar guza w badaniach *in vitro* [15]. Poza tym, taka modyfikacja leku przeciwnowotworowego może wydłużyć jego okres półtrwania we krwi, zwłaszcza jeżeli jest to połączenie przez wiązania amidowe. Wiązanie to charakteryzuje się dużą stabilnością *in vitro*, a leki z wiązaniem amidowym mogą również być całkowicie odporne na hydrolizę *in vivo* i wtedy ich biotransformacja zachodzi przy użyciu szlaków oksydacyjnych [16, 17].

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej opisane aspekty, ciekawym projektem wydawało się wzbogacenie cząsteczki dwóch fluorchinolonów cyprofloksacyny (II generacja) i moksyfloksacyny (IV generacja) o reszty kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha oraz liczbie i położeniu wiązań podwójnych, jak również zbadanie efektu cytotoksycznego nowo powstałych koniugatów na komórki raka jelita grubego i prostaty. Wiele kwasów tłuszczowych takich jak oleinowy (OA), linolowy (LA) czy też dokozaheksaenowy (DHA) jest opisanych w literaturze jako cząsteczki o potencjale przeciwnowotworowym [18-20]. W niektórych przypadkach kwasy tłuszczowe działały również synergistycznie, wzmacniając działanie cytotoksyczne leku. Ze względu na potwierdzone w literaturze obiecujące wyniki uzyskane ze sprzęgania cytostatyków z kwasami tłuszczowymi, zostały zaprojektowane, a następnie zsyntetyzowane przez dr hab. Piotra Roszkowskiego z Pracowni Chemii Związków Naturalnych UW, koniugaty cząsteczki cyprofloksacyny i moksyfloksacyny z kwasami tłuszczowymi. Następnie uzyskane amidy przebadalam i oceniłam ich potencjał cytotoksyczny oraz porównalam ich działanie w zależności od rodzaju kwasu tłuszczowego użytego do modyfikacji, jak i typu linii komórkowej. Analiza danych pozwoliła na wyselekcjonowanie optymalnych połączeń wyjściowego fluorchinolonu z odpowiednim fragmentem acylowym. Umożliwiło to przeprowadzenie bardziej zaawansowanych badań nad mechanizmami cytotoksycznego działania najaktywniejszych nowych pochodnych. Oceniałam również wpływ tych związków na intensywność ekspresji białek enzymatycznych, magazynujących czy też transportujących oraz metabolitów zaangażowanych w przemiany lipidów w komórkach nowotworowych. Efektem poszerzonych badań miało być ponadto ustalenie, czy nowo zsyntetyzowane koniugaty ze zwiększoną aktywnością cytotoksyczną nie tracą jednocześnie aktywności przeciwbakteryjnej, czy też może zyskują jakiś dodatkowy potencjał np. przeciwko szczepom lekoopornym. W tym celu koordynowałam, jak również uczestniczyłam w wielośrodkowych badaniach przeciwbakteryjnej aktywności otrzymanych amidów. Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 4 rozbudowanych prac doświadczalnych (H1-H4) opublikowanych w latach 2020-2023.

## 6.2. Szczegółowy opis wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

**Publikacja H1** – Badania cytotoksycznego potencjału cyprofloksacyny po połączeniu z kwasami tłuszczowymi w pierwotnych i przerzutowych komórkach raka jelita grubego i raka prostaty oraz w komórkach bakteryjnych

<p><b>R- grupa acylowa kwasu</b></p> <p>(1) C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>– kwas krotonowy 4:1  (2) C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>– kwas sorbowy 6:2  (3) C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>– kwas geranowy 10:2  (4) C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>– kwas oleinowy 18:1  (5) C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>–kwas elaidynowy 18:1  (6) C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>–kwas α-linolenowy 18:3  (7) C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>–kwas erukowy 22:1  (8) C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>–kwas dokoheheksaenowy 22:6</p>	
---	--

**Schemat 1.** Ogólny wzór koniugatu cyprofloksacyny z kwasem tłuszczowym

Cykl otwiera praca **H1**, w której został przeanalizowany i opisany wstępny przesiewowy test cytotoksyczności dziewięciu nowo zsyntetyzowanych koniugatów cyprofloksacyny z kwasami tłuszczowymi. Grupa piperazyńlowa szkieletu chinolonowego cząsteczki cyprofloksacyny (CXP) została połączona wiązaniem amidowym z grupą karboksylową odpowiedniego kwasu tłuszczowego. W celu zapewnienia zmienności strukturalnej, pula kwasów tłuszczowych jaka została wykorzystana do syntezy koniugatów była zróżnicowana pod względem długości łańcucha, stopnia nienasylenia i izomerii geometrycznej. We wstępie pracy skupiłam się na charakterystyce raka prostaty (PC), który w pierwszej fazie zaawansowania zależy od androgenów, ale w miarę rozwoju prezentuje fenotyp niezależny od hormonów, co w konsekwencji daje oporność na wtórną terapię hormonalną i chemioterapię [2]. W takiej zmienionej fenotypowo tkance nowotworowej można zaobserwować kilka zmian molekularnych, m.in. obniżoną szybkość apoptozy oraz wzrost interleukiny-6. Niezależne badania pokazały, że między innymi właśnie ta cytokina uczestniczy w procesie transformacji PC z zależnego od androgenów do fenotypu niezależnego [21]. Udowodniono również, że wiele guzów ludzkich m.in. nowotwór jelita grubego charakteryzował się wyższą inwazyjnością poprzez aktywację zarówno autokrynych, jak i parakrynych szlaków sygnałowych regulowanych przez IL-6. Co ciekawe, lite guzy nowotworowe często rozwijają się w wyniku stanu zapalnego, a zatem przewlekłe zapalenie gruczołu krokowego może predysponować do rozwoju raka tego narządu. Dlatego w zapobieganiu, a nawet leczeniu raka prostaty ważne może być wyhamowanie stanu zapalnego, który często jest powiązany z infekcją bakteryjną. Najczęściej stosowane w leczeniu stanu zapalnego zarówno gruczołu krokowego jak i pęcherza moczowego są właśnie chemioterapeutyki z grupy fluorochinolonów, w tym przede wszystkim cyprofloksacyna. Posiada ona również zdolność hamowania proliferacji komórki eukariotycznej poprzez reakcje z mitochondrialną izoformą topoizomeryazy II i uszkodzeniem mitochondrialnego DNA. Cytotoksyczność indukowana przez CXP w komórkach może być także wynikiem generowania wolnych rodników. Te wyżej opisane właściwości mają proapoptotyczny wpływ na komórki nowotworowe i dają perspektywy zastosowania CXP jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego. Jednak ten cytotoksyczny efekt był osiągalny przy wysokich, niefizjologicznych stężeniach leku w zakresie od 50 do 400 mg/ml, a w przypadku komórek raka jelita grubego te dawki były jeszcze wyższe i sięgały nawet 500 mg/ml [22, 23].

Testy przesiewowe *in vitro* to pierwszy etap selekcji bezpiecznych dla zdrowych komórek, a jednocześnie skutecznych, cytotoksycznych substancji dla komórek nowotworowych. Dobrą praktyką podczas oceny cytotoksyczności związków jest zastosowanie co najmniej dwóch testów, z których każdy bazuje na innej przemianie biochemicznej. Kierując się tą zasadą zastosowałam dwa różne oznaczenia z których pierwsze opiera się na badaniu aktywności oksydacyjnej mitochondriów poprzez sprawdzenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (test MTT), natomiast drugie na badaniu aktywności enzymu cytoplazmatycznego jakim jest dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Enzymy te uwalniane są z



uszkodzonych komórek. Miarą aktywności cytotoksycznej danego związku jest wartość  $IC_{50}$ . Jest to stężenie badanego związku, przy którym żywotność komórek spada do 50%, w porównaniu do kontroli. Przeprowadzona analiza wyników wykazała, że potencjał przeciwnowotworowy wszystkich badanych pochodnych wyrażony jako wartość stężenia  $IC_{50}$ , był kilku a nawet kilkunastokrotnie silniejszy od wyjściowej CXP, która pozostawała słabo aktywna wobec pierwotnych (SW480) i przerzutowych (SW620) komórek raka jelita grubego oraz przerzutowych raka prostaty (PC3). Zaobserwowaliśmy, że komórki raka prostaty PC3 okazały się najbardziej wrażliwe na działanie wszystkich badanych koniugatów. Najsilniejsze działanie miał koniugat cyprofloksacyny z jednonienasyconym kwasem oleinowym (OA) (4) oraz z jego izomerem kwasem elaidynowym (EA) (5) ( $IC_{50} < 10\mu M$ ) i z krótkim, dwunienasyconym kwasem sorbowym (2) ( $IC_{50} < 15\mu M$ ). Tymczasem najbardziej obiecujący efekt hamujący pierwotnego raka jelita grubego (SW480) zanotowałam dla pochodnych sprzężonych z kwasami tłuszczowymi takimi jak sorbowy (2), geranowy (3), elaidynowy (5) oraz dokozaheksaenowy (DHA) (8), a wartości  $IC_{50}$  dla tych związków mieściły się w zakresie od 20 do 40  $\mu M$ . Bardzo podobna grupa koniugatów CXP hamowała wzrost przerzutowych linii komórkowych raka okrężnicy SW620. Drugą ważną cechą jaką powinien się charakteryzować dobry chemoterapeutyk jest nietoksyczność dla zdrowych komórek. Przydatnym parametrem do oceny selektywności jest wskaźnik SI (selectivity index) wyrażony jako stosunek wartości  $IC_{50}$  dla prawidłowych, zdrowych komórek do  $IC_{50}$  oszacowanego dla komórek nowotworowych. 72-godzinna ekspozycja prawidłowych, ludzkich keratynocytów (HaCaT) na nowo zsyntetyzowane amidy CXP wykazała wysokie stężenia  $IC_{50}$  powyżej 100  $\mu M$ , wyłączając koniugat z kwasem geranowym. Selektywność oszacowana dla nowotworu prostaty była najwyższa dla koniugatów z kwasem oleinowym (4), elaidynowym (5) oraz sorbowym (2) natomiast dla pierwotnego i przerzutowego raka okrężnicy (SW480 i SW620) dla pochodnej DHA (8). Otrzymane wyniki wskazały jednoznacznie, że badane koniugaty są selektywne i w przeciwieństwie do leku referencyjnego doksorubicyny nie działają toksycznie na prawidłowe komórki. Analiza zależności między potencjałem przeciwnowotworowym a obliczoną wartością  $\log P$  nowo zsyntetyzowanych związków wykazała, że silne cytotoksyczne, jednonienasycone pochodne CXP (4) i (5) charakteryzują się wysokimi współczynnikami podziału n-oktanol-woda. Co ciekawe, wykazano, że niektóre kwasy tłuszczowe regulują strukturę lipidów w błonach, ułatwiając wiązanie i aktywację ważnych błonowych białek sygnałowych. Badania *in vivo* guzów nowotworowych ujawniły zróżnicowaną aktywność cytotatyczną różnych hybryd cytarabiny i kwasów tłuszczowych, a najbardziej obiecujące okazało się połączenie leku z kwasem elaidynowym [24]. Podobnie pakowanie koniugatu doksorubicyny z kwasem oleinowym w nanostrukturalne nośniki lipidowe, zwiększyło jego wychwyt przez komórki raka okrężnicy [25]. Nasze wyniki potwierdziły tę zależność i właśnie sprzężenie z kwasem oleinowym i elaidynowym znacznie zwiększyło aktywność przeciwnowotworową CXP. Co ciekawe, wolny kwas sorbowy nie ma potwierdzonych właściwości cytotoksycznych, ale może wywierać negatywny wpływ np. na stabilność lipidów błonowych, prowadząc do powstawania nadtlenków i innych produktów utleniania. Biorąc pod uwagę znaną aktywność prooksydacyjną CXP, może to oznaczać synergistyczne działanie podczas traktowania komórek koniugatem CXP i kwasu sorbowego. Wyniki uzyskane w teście MTT potwierdziłam testem LDH. Zgodnie z oczekiwaniami, uwalnianie LDH z prawidłowych komórek HaCaT było niskie, nawet przy wysokich stężeniach koniugatów (60  $\mu M$ ). Potwierdziliśmy również silniejszy wpływ koniugatów w linii komórkowej raka prostaty (PC3), w porównaniu z pierwotnymi i przerzutowymi liniami komórkowymi raka okrężnicy (SW480, SW620). Pochodna z kwasem oleinowym (4), zastosowana w stężeniu 10  $\mu M$ , wykazała najwyższą odpowiedź wobec linii komórkowej PC3 (wyzwalanie LDH wynosiło powyżej 70%), w porównaniu do koniugatów 2 i 5, gdzie uwalnianie LDH wynosiło około 40%. Jednocześnie pierwotne komórki raka jelita grubego

(SW480), traktowane amidami **2** i **8** w dawce 10  $\mu$ M wykazywały najwyższe uwalnianie LDH (około 30%). Natomiast najwyższy poziom uwalniania LDH (około 20-30%) zaobserwowano po traktowaniu komórek SW620 związkami **4** i **5**. Użyte testy cytotoksyczności pomogły mi wyselekcjonować najbardziej obiecujące koniugaty i rozpocząć badania nad mechanizmami ich cytotoksycznego działania. Rozpoczęliśmy więc testowanie wybranych koniugatów CXP **2**, **4**, **5** i **8** pod względem możliwości indukowania apoptozy. Do pomiaru apoptozy użyliśmy cytometrii przepływowej, która pozwala na rozróżnienie jej etapów, czyli apoptozy wczesnej, późnej czy też nekrozy. Inkubacja komórek SW480, SW620 i PC3 ze związkami wykazała znacznie wyższy odsetek komórek w późnym okresie apoptozy. Koniugacja za pomocą długołańcuchowych, jednonienasyconych izomerów: oleinowego (**4**) i elaidynowego (**5**) dała najsilniejsze działanie indukujące późną apoptozę w komórkach PC3 (ok 70%), ale również wielonienasycone koniugaty kwasu sorbowego (**2**) i DHA (**8**) znacząco wpłynęły na poziom komórek wprowadzonych w to stadium procesu (ok 60%). Jednocześnie najsilniejsze proapoptotyczne właściwości indukujące w liniach komórkowych SW480 były wywierane przez koniugaty kwasu DHA (**8**), sorbowego (**2**) i elaidynowego (**5**) (na około 50% komórek). Indukcja późnej apoptozy w przerzutowych komórkach raka jelita grubego nie była tak spektakularna, bowiem aktywność proapoptotyczna koniugatów **2**, **4**, **5** i **8** w komórkach SW620 dotyczyła około 30% komórek. Hodowla komórek HaCaT z badanymi związkami, pokazała słabą indukcję apoptozy w zakresie od 6,2% do 12%. Wcześniejsze badania wskazują na to, że w aktywność przeciwnowotworową CXP wpisany jest jej efekt proapoptotyczny. Jednakże, zdolność tę zaobserwowano w zakresie stężeń 600-1500 mM, podczas gdy działanie hamujące wzrost *in vitro* często występowało przy niższych dawkach. Wydaje się więc, że CXP wykazuje aktywność przeciwnowotworową poprzez mechanizmy niezależne od apoptozy. Ponadto badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że kwas oleinowy posiada cenne działanie przeciwnowotworowe takie jak wpływ na zatrzymanie cyklu komórkowego G0/G1, autofagię, zaburzenia mitochondrialne, hamowanie proteasomów oraz adhezję komórek. Rzeczywiście, w naszym badaniu potwierdziliśmy, że amid CXP z kwasem oleinowym (**4**) wykazywał największą aktywność proapoptotyczną. Ze względu na to, że niektóre tkanki nowotworowe, między innymi prostaty i raka jelita grubego charakteryzują się zwiększonym wydzielaniem IL-6, co jest wskaźnikiem agresywnego wzrostu komórek i zmniejszeniem odpowiedzi komórkowej na zastosowaną terapię, sprawdziliśmy jak badane koniugaty wpływają na jej sekrecję. We wszystkich badanych nowotworach zaobserwowałam znaczące zahamowanie wydzielania IL-6. Najsilniejszy efekt w komórkach PC3 zaobserwowano dla amidu kwasu oleinowego (**4**), który czterokrotnie zmniejszył uwalnianie badanej interleukiny. Ta odpowiedź była większa niż wpływ referencyjnej doksorubicyny, która zmniejszyła wydzielanie IL-6 jedynie dwukrotnie. Tymczasem wartości hamowania dla związku (**2**) kwasu sorbowego i referencyjnej CXP była bardzo podobna. Obie substancje obniżyły stężenie IL-6 2,5-krotnie. Natomiast w przypadku linii komórkowych SW480 i SW620 połączenie z kwasem elaidynowym (**5**) okazało się bardziej skuteczne. Wspomniany amid hamował wydzielanie IL-6 odpowiednio 3 i 4 razy w komórkach pierwotnych i przerzutowych okrężnicy.

Kolejnym etapem pracy było określenie wstępnego profilu aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych pochodnych. Badania te zostały wykonane we współpracy z zespołem dr hab. Joanny Stefańskiej z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Nowe koniugaty CXP zostały przetestowane *in vitro* wobec serii standardowych szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Najlepszą aktywność przeciwbakteryjną wykazały skoniugowane E-izomery krótko- i średniołańcuchowych pochodnych kwasów tłuszczowych. Wśród nich, najsilniejsze działanie przeciwko serii izolatów gronkowców wywierały związki krótkołańcuchowe, reprezentowane przez amidy kwasu krotonowego (**1**) i sorbowego (**2**) (MIC 0,5-1  $\mu$ g/ml). Z tą samą siłą oba związki hamowały wzrost Gram-ujemnych szczepów *Escherichia coli*. Ich aktywność wobec izolatów *Staphylococci* i *E. coli*

była porównywalne z potencjałem referencyjnego CXP (MIC 0,5 µg/ml). Macierzysty chemoterapeutyk był skuteczniejszy jedynie przeciwko pałeczkom *Enterococcus hirae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Średniołańcuchowa pochodna kwasu geranowego (**3**) wykazała również wysokie właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec standardowych szczepów *Staphylococcus aureus* i *epidermidis* (MIC 1 µg/ml) i umiarkowaną aktywność w stosunku do szczepu *E. coli* (MIC 8µg/ml). Przeciętną siłą działania przeciwbakteryjnego przeciwko gronkowcom odnotowaliśmy także dla wielonienasyconych koniugatów długołańcuchowych, ponadto pochodna **8** była skuteczna również przeciwko jednemu ze szczepów *E. coli* (MIC 2 µg/ml). Warto zauważyć, że amidy z najniższą lipofilowością wykazywały najwyższy poziom aktywności przeciwbakteryjnej. Wśród testowanych koniugatów najlepsze właściwości antybakteryjne miało połączenie kwasu sorbowego (**2**), a wykorzystywane również w przemyśle jego antybakteryjne działanie, może wynikać ze zmiany błon komórkowych lub hamowania systemów transportowych i kluczowych enzymów w metabolizmie bakteryjnym.

Podsumowując jako pierwsi zsyntetyzowaliśmy i wykazaliśmy cytotoksyczne właściwości zróżnicowanej serii koniugatów cyprofloksacyny z kwasami tłuszczowymi zarówno w komórkach nowotworowych jak i bakteryjnych. Jednocześnie nie były one toksyczne dla prawidłowych komórek w klinicznie osiągalnych stężeniach. Zaobserwowaliśmy, że najbardziej aktywne amidy to połączenia CXP z nienasyconymi kwasami takimi jak sorbowy, oleinowy i elaidynowy. Wykazywały one działanie cytotoksyczne, proapoptyczne i redukujące wydzielanie IL-6, co może zahamować wzrost i inwazyjność komórek nowotworowych.

Jednoznacznie stwierdziliśmy, że strukturalna modyfikacja CXP przez połączenie z kwasami skutkowało wyższą wartością terapeutyczną w porównaniu do wyjściowego związku. Porównując wrażliwość linii komórkowych dostrzegliśmy, że komórki raka prostaty były bardziej podatne na działanie testowanych koniugatów niż pierwotne i przerzutowe komórki raka jelita grubego. Tymczasem badając ich potencjał przeciwbakteryjny wykazaliśmy, że to krótkołańcuchowe amidy kwasu krotonowego (**1**) i sorbowego (**2**) były najbardziej aktywne przeciwko serii gronkowców i szczepom *Escherichia coli* z siłą porównywalną do referencyjnego, macierzystego chemoterapeutyku - cyprofloksacyny. Ze względu na to, że same kwasy: sorbowy, oleinowy i elaidynowy mogą wykazywać właściwości przeciwnowotworowe lub antybakteryjne, wnioskujemy, że mogą one działać synergistycznie poprzez wzmocnienie działania cytotoksycznego lub hamującego wzrost bakterii. Biorąc pod uwagę fakt, że często zapalenie gruczołu krokowego poprzedza raka prostaty, podwójne działanie przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne koniugatu CXP z kwasem sorbowym (**2**) może stanowić nowe podejście terapeutyczne w prewencji i terapii onkologicznej.

**Publikacja H2** – Ocena cytotoksycznego działania i zmian w profilu proteomicznym pod wpływem koniugatów CXP w zależności od zaawansowania i hormono-wrażliwości różnych rodzajów nowotworów prostaty oraz zasadność stosowania sprzęgniętego układu flurochinolon – kwas tłuszczowy

Rezultaty opisane w publikacji **H1** wskazywały na większą wrażliwość komórek raka prostaty PC3 na badane koniugaty, a także na wyższą skuteczność skoniugowanej formy cyprofloksacyny w stosunku do wyjściowej, wolnej cząsteczki fluorochinolonu. Dlatego kolejnym ważnym pytaniem było, czy istnieje różnica w działaniu przedmiotowych związków w zależności od rodzaju i zaawansowania tego typu nowotworu. Dodatkowo zamierzaliśmy zweryfikować czy połączenie flurochinolonu i kwasu tłuszczowego w jednym koniugacie miało kluczowe znaczenie, czy wystarczyła w medium obecność obu związków w wolnej postaci w stężeniu odpowiadającym temu uzyskanemu w amidzie.

W tym celu użyliśmy do badań dwóch różnych linii komórkowych raka prostaty LNCaP i DU145 oraz prawidłowego nabłonka prostaty RWPE-1. Porównaliśmy również uzyskane wyniki z otrzymanymi wcześniej w trakcie badań nad linią komórkową raka prostaty PC3, która charakteryzuje się dużą inwazyjnością (stadium IV), tymczasem komórki DU145 dużo niższą (stadium II). Obie linie PC-3 i DU-145 są niewrażliwe na terapię hormonalną [26, 27]. Natomiast linia LNCaP charakteryzuje się wolnym wzrostem komórek, ma niski stopień inwazyjności, a także jest wrażliwa na terapię hormonalną [28].

Spośród dziewięciu testowanych związków trzy sprzężone z kwasem oleinowym (**4**), elaidynowym (**5**) i dokozaheksaenowym (**8**) wykazywały najsilniejsze działanie cytotoksyczne. Wykorzystując metodę MTT wykazaliśmy, że wartości IC<sub>50</sub> dla tych wyselekcjonowanych koniugatów cyprofloksacyny były znacząco niższe dla obu linii komórek nowotworowych (LNCaP i DU145) niż dla wolnej cyprofloksacyny. Jednak trzeba tu podkreślić, że wszystkie nowo zsyntetyzowane koniugaty wykazywały wyższą cytotoksyczność w porównaniu do niezmodyfikowanej cyprofloksacyny. Silna aktywność cytotoksyczna koniugatów została również potwierdzona testem LDH w komórkach DU-145, natomiast efekt ten był słabszy dla komórek LNCaP. Interesującym jest fakt, że obecność w medium nieskoniugowanej cyprofloksacyny i wolnego kwasu tłuszczowego wywołała dużo słabszy efekt cytotoksyczny. Wartości IC<sub>50</sub> dla zastosowanych oddzielnie składników koniugatów były dwukrotnie wyższe, natomiast uwalnianie dehydrogenazy co najmniej o połowę niższe niż otrzymane wartości dla formy skoniugowanej.

Dalsze badania nad mechanizmami cytotoksyczności skupiały się na sprawdzeniu aktywności proapoptycznej i hamującej wydzielanie interleukiny 6. Okazało się, że wybrane koniugaty indukowały wczesną apoptozę w androgeno-zależnych komórkach LNCaP, natomiast wczesną i późną apoptozę w linii DU145 niezależnej od działania androgenów. Co ciekawe, jak ustaliliśmy w poprzednim badaniu, komórki hormono-niezależnej linii PC3 zostały również w dużym stopniu wprowadzone w stan późnej apoptozy. Z kolei analiza wyników testu ELISA sprawdzającego stężenie IL-6 wykazała, że koniugat cyprofloksacyny z kwasem elaidynowym (**5**) najsilniej zmniejszył ilość wydzielanej interleukiny w komórkach DU145, z kolei w komórkach LNCaP poszczególne koniugaty (**4**), (**5**) i (**8**) ale również nieskoniugowana cyprofloksacyna w podobnym stopniu zahamowały wydzielanie tej cytokiny. Zarówno indukcja apoptozy w prawidłowych komórkach prostaty RWPE-1, jak i hamujący efekt koniugatów na wydzielanie interleukiny były znikome.

Już na poziomie tych badań zauważyliśmy różnice we wrażliwości komórek nowotworowych i skuteczności koniugatów. Po zestawieniu i porównaniu siły działania w poszczególnych liniach okazało się, że najwyższą skuteczność otrzymano dla najbardziej zaawansowanej, niewrażliwej na działanie hormonów linii komórkowej PC3. Mając na uwadze to, że metabolizm lipidów i zmiany w sygnalizacji komórkowej są charakterystyczne dla złośliwego fenotypu raka prostaty i obejmują aktywacje zarówno lipogenicznych jak i lipolitycznych enzymów oraz zmiany w metabolizmie cholesterolu i fosfolipidów, a także zwiększone zapotrzebowanie na lipidy, zaplanowaliśmy przeprowadzenie analizy proteomicznej [29]. Układ badawczy stanowiła linia komórkowa PC3 jak również prawidłowy nabłonek prostaty RWPE-1. Przeprowadzone badania w kooperacji z dr Andrzejem Ciechanowiczem z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej WUM działającego w ramach Centrum Badań Przedklinicznych CEPT WUM, wykazały zmiany w białkach zaangażowanych w metabolizm lipidów i tym samym w progresję nowotworu. Ciekawym celem terapeutycznym wydają się białka transportujące i tu okazuje się, że FABP5 jest kluczowym białkiem, dostarczającym cytozolowe lipidy do jądra, promując tym samym agresywny fenotyp PCa [30]. Badane koniugaty, zwłaszcza połączenie z kwasem sorbowym (**2**) i oleinowym (**4**), znacząco obniżyły ekspresję FABP5. Co ciekawe, wydaje się, że ze względu na amfifilowy charakter koniugatów, flippazy mogą być zaangażowane w transport koniugatów cyprofloksacyny.

Ekspresja ATPazy IA była istotnie statystycznie zwiększona pod wpływem działania koniugatów CXP z kwasem elaidynowym, oleinowym i DHA, podczas gdy wpływ amidu kwasu sorbowego na to białko transportowe był niewielki [31]. W celu utrzymania intensywnej proliferacji, komórki nowotworowe potrzebują również nadmiaru cholesterolu, a także intermediatów uczestniczących w jego biosyntezie. W nowotworach, w tym również prostaty zaobserwowano zwiększony wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu poprzez białko 2NPC [32]. W naszym badaniu zarówno koniugat z kwasem elaidynowym jak i oleinowym obniżyły ekspresję tego transportera. Równie ważnym integralnym białkiem błonowym tratw lipidowych odpowiedzialnym za transdukcję sygnału jest kaweolina-1 (CAV1), a badania w raku prostaty pokazały, że może ona wpływać na zwiększoną przeżywalność komórek nowotworowych i aktywność angiogenną [33]. Jej obniżona ekspresja została zaobserwowana pod wpływem koniugatów (2), (4) i (5). Jedynie koniugat (8) nieznacznie zwiększył ekspresję tego białka. Duże zmiany w komórkach nowotworowych zachodzą również na poziomie syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych. Jeden z kluczowych enzymów tej przemiany, syntaza kwasów tłuszczowych (FASN) została zidentyfikowana jako onkogen, a jej nadekspresja udokumentowana jest również w nowotworze prostaty. Najsilniejszym reduktorem ekspresji FASN okazał się koniugat z kwasem elaidynowym, zmniejszając intensywność tego enzymu aż o 80%. Również koniugaty OA i DHA znacząco obniżyły intensywność tego białka enzymatycznego odpowiednio o 50% i 40%.

Konsekwentnie również intensywność anabolicznego, regulacyjnego enzymu jakim jest karboksylaza acetylo-CoA (ACC) została wyciszona przez badane koniugaty, a wiadomym jest, że zwiększona ekspresja i aktywność ACC została potwierdzona w przypadku wzmożonego zapotrzebowania na lipidy w różnych rodzajach nowotworów [34]. Oba koniugaty 4 i 5 silnie obniżyły poziom izoformy ACC, bo aż o 80%. Słabszym reduktorem okazał się koniugat DHA (o 45%), a naj słabszym połączenie z kwasem sorbowym (o 20%). Strategicznymi punktami mogą być również białka magazynujące, gdyż fenotyp nowotworowy charakteryzuje się zwiększonym magazynowaniem kropelek lipidów (LD), których zewnętrzna warstwa składa się z fosfolipidów i białek powierzchniowych takich jak perylipina-3 (PLIN3). Silna ekspresja tego białka w raku prostaty była dodatkowo skorelowana ze stopniem zaawansowania nowotworu, a dodatkowo taka intensywna akumulacja lipidów może przyspieszać syntezę androgenów, co najprawdopodobniej promuje endogenną reaktywację AR i patologiczną aktywację, prowadząc ostatecznie do ugruntowania fenotypu CRPC [35]. Nowe amidy skutecznie obniżyły poziom białka PLIN3, a wśród nich najaktywniejszy okazał się koniugat (5) (o 57%), natomiast połączenia z kwasem sorbowym i oleinowym miały słabsze działanie (o 20%). Podobnie jak w przypadku enzymów anabolicznych, białka enzymatyczne związane z katabolizmem lipidów wykazywały zmniejszoną ekspresję pod działaniem koniugatów. Poziom mitochondrialnego enzymu acylotransferazy CoA (ACAT1) został zmniejszony o połowę, gdy komórki potraktowano koniugatem 2 i 5, natomiast o 30% po dodaniu koniugatu (4). Jedynie pod działaniem koniugatu DHA nieznacznie wzrosła ekspresja ACAT1, tymczasem to zmniejszona aktywność tego enzymu prowadzi do upośledzenia proliferacji i wzrostu guza poprzez regulowanie kompleksu enzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej [36]. Poziom innego enzymu katabolicznego 2,4-dienoilo-reduktazy CoA (DEC1) został również zmniejszony o 70% w obecności koniugatu sorbowego i o prawie 50% po użyciu koniugatów z OA i EA, natomiast koniugat DHA słabiej wyciszył enzym, bo jedynie o 35%. Odkryto, że delecja DEC1 aktywuje stres w retikulum endoplazmatycznym (ER) i uwrażliwia komórki CRPC na ferroptozę. Badania *in vivo* z wyciszonym genem dla DEC1 wykazały osłabienie metabolizmu lipidów i spowolnienie wzrostu CRPC [37].

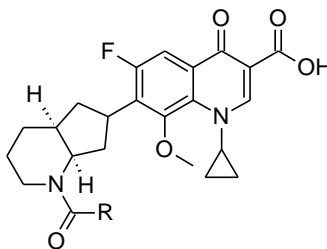
Analiza badania proteomicznego uzyskanego dla niezmodyfikowanej cyprofloksacyny wykazała brak istotnego wpływu na białka metabolizmu lipidów. Podobnie w prawidłowym

nabłonku prostaty te zmiany były nieznaczne i mieściły się w granicach prawidłowego, fizjologicznego oddziaływania testowanych koniugatów.

Podsumowując, w omawianej pracy wykazaliśmy różnice w sile działania amidów CXP w zależności od zaawansowania i rodzaju nowotworu prostaty. Zaskakujące jest to, że badane koniugaty okazały się być wyjątkowo skuteczne względem najbardziej zaawansowanej, androgeno-niezależnej linii komórkowej (PC3), natomiast najslabiej zareagowała hormonowrażliwa linia LNCaP o niskim stopniu inwazyjności. Potwierdziliśmy również w naszych badaniach przewagę formy skoniugowanej, wykazując słabsze działanie cytotoksyczne oddzielnie zastosowanej nieskoniugowanej cyprofloksacyny i kwasu tłuszczowego. Wśród badanych związków trzy amidy z kwasem oleinowym (OA), elaidynowym (EA) oraz kwasem dokozaheksaenowym (DHA) wykazywały najsilniejsze działanie przeciwnowotworowe, ale jednocześnie pozostawały one bezpieczne dla prawidłowego nabłonka prostaty. Należy również podkreślić, że w ramach tej pracy odkryliśmy nowy, dotychczas niezbadany wpływ koniugatów CXP na białka zaangażowane w metabolizm lipidów. Porównując dane otrzymane z badań proteomicznych komórki nowotworowej i prawidłowej potwierdziliśmy zmieniony stan zapotrzebowania na lipidy przez wzmożoną intensywność białek transportujących i magazynujących, jak również wzmożoną syntezę kwasów tłuszczowych *de novo* oraz jednocześnie ich zwiększony katabolizm.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, postawiliśmy hipotezę, że koniugacja z kwasem tłuszczowym może być formą „konia trojańskiego” która po dostaniu się do komórki nasili przeciwnowotworowe działanie cyprofloksacyny. Oprócz indukcji apoptozy i obniżenia sekrecji IL-6, cytotoksyczny lub cytostatyczny potencjał koniugatów cyprofloksacyny, może stanowić redukcja białek zaangażowanych w metabolizm lipidów jednocześnie zaangażowanych w progresję nowotworu. Optymalnymi połączeniami, które skutecznie wyciszały kluczowe dla rozwoju nowotworu białka były koniugaty z OA i EA, tymczasem efekt redukujący koniugatów z kwasem sorbowym czy też DHA był słabszy, przy czym ten ostatni w niektórych przypadkach intensyfikował patologiczne białka nowotworowe. Obecne ustalenia potwierdziły znaczenie metabolizmu lipidów w karcynogenezie prostaty i pozwoliły zidentyfikować cel dla potencjalnych, nowych strategii terapeutycznych, a biorąc pod uwagę również wcześniejsze obserwacje wydaje się, że wzbogacanie leku o cząsteczkę lipidową może dawać wymierne korzyści w podniesieniu efektu terapeutycznego.

**Publikacja H3** – Koniugacja fluorchinolonu wyższej generacji – moksifyloksacyny z kwasami tłuszczowymi i wstępny test przesiewowy ich potencjału cytotoksycznego w komórkach nowotworowych. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwpłatkowej, a także mechanizmów tego działania w kontekście interakcji z topoizomerazami II w warunkach *in vitro* i *in silico*

<p><b>R- grupa acylowa kwasu</b></p> <p>(1m) C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>– kwas krotonowy 4:1</p> <p>(2m) C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>– kwas sorbowy 6:2</p> <p>(3m) C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>– kwas geranowy 10:2</p> <p>(4m) C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>– kwas oleinowy 18:1</p> <p>(5m) C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>– kwas elaidynowy 18:1</p> <p>(6m) C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>– kwas α-linolenowy 18:3</p> <p>(7m) C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>– kwas erukowy 22:1</p> <p>(8m) C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>– kwas dokoheheksaenowy 22:6</p>	<p>(9m) C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>–kwas palmitynowy 16:0</p> <p>(10m) C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>–kwas hept-6-enowy 6:0</p> <p>(11m) C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>–kwas linolowy 18:2</p> <p>(12m) C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>–kwas γ-linolenowy 18:3</p> <p>(13m) C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>–kwas arachidonowy 22:4</p> <p>(14m) CH<sub>3</sub>– kwas octowy 1:0</p> <p>(15m) C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>– kwas kaprylowy 7:0</p> <p>(16m) C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>– kwas stearynowy 18:0</p>	
---	--	---

**Schemat 2.** Ogólny wzór koniugatu moksifyloksacyny z kwasem tłuszczowym

Zwiększenie potencjału cytotoksycznego cyprofloksacyny poprzez sprzężenie z kwasami tłuszczowymi zaowocowało poszukiwaniami nowego kandydata z grupy fluorchinolonów wyższej generacji. Wybór padł na moksifyloksacynę – chemoterapeutyk IV

generacji, którego aktywność przeciwnowotworowa została potwierdzona zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [10]. Jednocześnie rozszerzono grupę kwasów tłuszczowych wykorzystanych do procesu koniugacji. Grupa kwasów nienasyconych została wzbogacona o kwas linolowy,  $\gamma$  – linolenowy i arachidonowy, natomiast grupa kwasów nasyconych o octowy, hepta-6-enowy, kaprylowy i stearynowy (STA). Synteza podobnie jak w przypadku CXP została przeprowadzona w pracowni Chemii Związków Naturalnych UW, a cząsteczka flurochinolonu została połączona wiązaniem amidowym z grupą karboksylową odpowiedniego kwasu tłuszczowego. Wiadomym jest, że działanie antybakteryjne zarówno CXP jak i MXF opiera się na hamowaniu dwóch kluczowych enzymów bakteryjnych: gyrazy DNA i topoizomerazy IV. Badania nad mechanizmami tej aktywności pokazały również, że głównym punktem uchwytu chinolonów jest gyraza, natomiast często topoizomeraza IV bywa celem drugorzędny. Jednakże szereg eksperymentów wykazał, że tak naprawdę cel enzymatyczny w niektórych bakteriach zależy ostatecznie od struktury odpowiedniego fluorochinolonu [38]. Dodatkowo, zarówno CXP, jak i przede wszystkim MXF są zalecane jako uzupełnienie podstawowego schematu leczenia przeciwgruźliczego w gruźlicy wielolekoopornej [39]. Wiadomo również, że w komórkach prokariotycznych kwasy tłuszczowe są częścią wielu struktur bakteryjnych w tym błon biologicznych, dlatego synteza kwasów tłuszczowych jest niezbędna do przeżycia bakterii [40]. Co ciekawe, zarówno CXP, jak i MXF wykazują działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne na wybranych komórkach nowotworowych, które opiera się na ich powinowactwie do eukariotycznej, mitochondrialnej topoizomerazy DNA, będącej w pewnym stopniu homologiczną z bakteryjną [10].

Dlatego przedmiotem badań była ocena aktywności cytotoksycznej nowo zsyntetyzowanych koniugatów MXF, gdzie w celu porównania użyliśmy podobnego układu badawczego jak w przypadku CXP, a mianowicie trzech ludzkich linii komórek nowotworowych (SW480, SW620 i PC3) i linii kontrolnej zdrowych keratynocytów (HaCaT). Komórki były hodowane przy różnych stężeniach związków w celu ustalenia ich wartości IC<sub>50</sub>, a ponadto zdolność cytotoksyczna przeciwko komórkom nowotworowym i zdrowym została przedstawiona jako wskaźnik selektywności (SI). Ustaliliśmy, że wszystkie badane amidy były bardziej cytotoksyczne wobec patologicznych komórek nowotworowych niż wobec kontrolnej linii HaCaT, natomiast analiza wrażliwości komórek w poszczególnych liniach wykazała najlepszą skuteczność badanych amidów MXF dla linii komórkowej PC3. Najwyższy potencjał cytotoksyczny (IC<sub>50</sub><5 $\mu$ M) przeciwko wszystkim badanym liniom nowotworowym odnotowaliśmy przy modyfikacji MXF z kwasem oleinowym (**4m**), kaprylowym (**15m**) i stearynowym (**16m**). Natomiast podobny poziom aktywności (< 10 $\mu$ M) zaobserwowaliśmy dla koniugatów kwasu sorbowego (**2m**), elaidynowego (**5m**), DHA (**8m**), palmitynowego (**9m**), hept-6-enowego (**10m**) i linolowego (**11m**). Ponadto wyżej wymienione koniugaty charakteryzowały się wysokimi współczynnikami selektywności, wahającymi się od 11,9 do 71 (dla komórek raka prostaty) oraz od 8,7 do 30,2 (dla komórek raka okrężnicy). Nieskoniugowana MXF miała kilkakrotnie, a nawet kilkunastokrotnie słabszą cytotoksyczność wobec komórek rakowych niż jej formy sprzężone. Warto podkreślić jest fakt, że większość koniugatów dla komórek SW480 i PC3 oraz koniugaty **2m**, **4m**, **10m**, **15m** i **16m** dla komórek przerzutowych SW620 okazały się bardziej skuteczne niż rutynowo stosowany cytostatyk cisplatyna. Z kolei mimo tego, że koniugaty wykazywały słabsze działanie niż doksorubicyna, to jednak odznaczały się dużo wyższą selektywnością w stosunku do zdrowych komórek.

Byliśmy ciekawi czy potwierdzone przez nas cytotoksyczne działanie na komórki nowotworowe również przełoży się na komórki bakteryjne, dlatego kolejnym etapem pracy było sprawdzenie jaki wpływ miała modyfikacja na aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych pochodnych. Badania te zostały wykonane ponownie we współpracy z zespołem z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM na panelu standardowych szczepów bakterii, w tym gronkowców Gram-dodatnich (*S. aureus* i *epidermidis*) i Gram-ujemnych (*E. coli*, *P.*

*aeruginosa*). Najwyższą aktywność wobec standardowych gronkowców zaobserwowano dla amidów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych **1m**, **2m** i **14m** (MIC 0,25 – 2 µg/ml). Koniugaty wielo- (**8m**) i jednonienasyconych (**10m**) kwasów były umiarkowanie aktywne (MIC 2 – 4 µg/ml), podobnie jak nasycony amid **15m** (MIC 4 – 8 µg/ml). Szczepy Gram-ujemne były bardziej odporne na obecność badanych związków. Tylko pochodne **1m**, **8m**, **13m** i **14m**, stosowane w stężeniu 2 – 16 µg/ml hamowały wzrost bakterii *E. coli*. W obrębie amidów MXF, pochodna **14m** była równie lub nawet dwukrotnie bardziej aktywna wobec wybranych szczepów *S. aureus* w porównaniu z powszechnie stosowanym fluorochinolonem II generacji - CXP. Niestety, żaden z amidów MXF nie był tak skuteczny jak lek nieskoniugowany. Analiza profilu antybakteryjnego zarówno amidów MXF jak i przeprowadzona w poprzednim badaniu koniugatów CXP wskazała na wysoką aktywność tych związków przeciwko szczepom gronkowców. Dlatego podjęto próbę rozszerzenia testów mikrobiologicznych o panel kliniczny zawierający trudne z punktu widzenia terapeutycznego metycylino-oporne *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), izolowane od pacjentów szpitali klinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Były to patogeny typu dzikiego, wrażliwe na chinolony (5 izolatów) i dwa gatunki odporne na chinolony (KR4047 i T5253). Optymalną modyfikacją MXF okazała się być reszta acetylowa (**14m**), z MIC 0,5 µg/ml dla wszystkich izolatów wrażliwych na chinolony. Co ciekawe jedynie skoniugowanie MXF z kwasem kaprylowym i geranowym wpłynęło na wzrost aktywności przeciwko izolatom opornym na chinolony, a w przypadku 9-węglowego podstawnika acylowego była ona nawet wyższa od otrzymanej dla CXP. Uniwersalne zdają się być połączenia z krótkimi kwasami: krotonowym (**1**, **1m**) i sorbowym (**2**, **2m**), gdyż zarówno CXP jak i MXF wzbogacona o te reszty acylowe, znacznie hamowała wzrost bakterii. Ciekawym wyjątkiem zdaje się być modyfikacja przy użyciu długołańcuchowego DHA, który nieoczekiwanie wykazał się zadowalającą aktywnością przeciwbakteryjną względem wybranych patogenów. Fluorochinolony m.in. moksyflokscyna należą do rekomendowanej grupy leków w leczeniu gruźlicy, dlatego zaplanowane przez nas badania przeciwdrobnoustrojowe obejmowały również szczepy *Mycobacterium tuberculosis*. Badania przesiewowe *in vitro* na nowo zsyntetyzowanych pochodnych zarówno CXP jak i MXF przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie na standardowym szczepie H<sub>37</sub>Rv *M. tuberculosis* i dwóch szczepach „dzikich” izolowanych od pacjentów chorych na gruźlicę, szczepie Spec. 210, opornym na kwas *p*-aminosalicylowy (PAS), izoniazyd (INH), etambutol (ETB) i rifampicynę (RMP) oraz szczepie Spec.192, wrażliwym na stosowane tuberkulostatyki. Nowe pochodne wykazały umiarkowane działanie przeciwpłatkowe, a szczególnie wrażliwy zwłaszcza na działanie koniugatów zmodyfikowanych średnio i długołańcuchowymi kwasami wielonienasyconymi okazał się wielolekooporny szczep Spec. 210. Optymalne dla przeciwigruźliczej aktywności było połączenie MXF z DHA (**8m**) i kwasem arachidonowym (**13m**) które było od 8 – 16 razy silniejsze niż referencyjne tuberkulostatyki. Podobnie zestawienie CXP i DHA (**8**) okazało się 4-8 razy bardziej aktywne. Jednak dla tego fluorochinolonu to połączenie z kwasem sorbowym (**2**) wykazywało najwyższą aktywność przeciwpłatkową (8 - 16 razy). W przeciwieństwie do swoich silnych właściwości przeciwigronkowcowych, grupa krótkołańcuchowych amidów (**1**, **1m**, **12m**, **14m**) była słabo aktywna (MIC 64 µg/mL). Jest to być może spowodowane wyjątkową budową ściany komórkowej płatków, niespotykaną u innych grup bakterii, która stanowi szczególnie, silnie selektywną barierę przepuszczalności.

Ostatnim etapem badań mikrobiologicznych nad koniugatami obu fluorochinolonów było ustalenie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego. Wiadomym jest, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe fluorochinolonów II, ale również, chociaż w mniejszym stopniu IV generacji opierają się na oddziaływaniu z enzymami z grupy bakteryjnych topoizomeraz: gyrazą DNA oraz topoizomerazą IV. Działanie pierwszego z nich jest związane z rozluźnianiem superhelikalnych skrętów nici DNA podczas aktywnej replikacji i transkrypcji



natomiast drugiego umożliwia segregację chromosomów potomnych. Badania najbardziej aktywnych koniugatów (**1–3**, **8**, **1m–3m**, **8m**, **14m**) jak i macierzystych chinolonów zostały przeprowadzone we współpracy z dr hab. Małgorzatą Wrzosek z Zakładu Biochemii i Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego WUM. Działanie koniugatów CXP **2** i **3** oraz pochodzącego od MXF amidu **14m** było preferencyjnie ukierunkowane na gyrazę, mimo tego wyniki IC<sub>50</sub> hamującego superskręcenie DNA przez gyrazę *S. aureus* były wyższe niż dla wyjściowych fluorochinolonów CXP i MXF. Na podstawie uzyskanych rezultatów, ale i też danych literaturowych ustaliliśmy, że oba macierzyste związki celują głównie w topoizomerazę IV *S. aureus*, chociaż badane koniugaty **2**, **3** i **14m** również posiadały właściwości hamujące aktywność tego enzymu. Największą skuteczność w hamowaniu aktywności topoizomeraz DNA wykazywał koniugat CXP z kwasem sorbowym (**2**), natomiast umiarkowane właściwości hamujące, zwłaszcza wyselekcjonowanych przez nas najbardziej bioaktywnych związków (**3**, **1m**, **14m**), sugerują jednak inne mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego. Interesujący jest fakt, że modelowanie molekularne potwierdziło słabą interakcję analizowanych koniugatów z gyrazą DNA. Taka symulacja była możliwa dzięki współpracy nawiązanej z Sebastianem Kmieciem i Michałem Kolińskim z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego oraz z Laboratorium Bioinformatyki Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Analiza wyników *in silico* wykazała, że wszystkie dokowane ligandy preferowały schemat wiązania bardzo podobny do obserwowanego w kompleksach gyrazy DNA oraz cząsteczek macierzystego fluorochinolonu CXP lub MXF. Jednocześnie wskaźniki oceniające energię wiązania ligandów o różnej wielkości oraz spójność dokowania związanego z entropią konformacyjną wskazały jednoznacznie na nieskoniugowane fluorochinolony jako cząsteczki wiążące się w optymalnym układzie. Okazuje się, że duży rozmiar podstawników kwasów tłuszczowych utrudnia dopasowanie się cząsteczek do miejsca wiążącego. Ponadto wartości energii wiązania wskazują na to, że fragment lipidowy był mało atrakcyjny energetycznie, a pozytywny efekt energetyczny był znaczący jedynie w przypadku pochodnej z kwasem DHA (**8**, **8m**). Najbardziej korzystną energię wiązania odznaczała się nieskoniugowana CXP, a zaraz po niej MXF. Należy podkreślić, że wyniki badań *in vitro* i *in silico* bardzo dobrze ze sobą korelowały. Oba badania nad hamowaniem topoizomeraz bakteryjnego DNA i wirtualnego dokowania molekularnego do gyrazy DNA sugerują dodatkowe mechanizmy aktywności przeciwbakteryjnej, dzięki którym działają nowo zsyntetyzowane związki. Biorąc pod uwagę potencjał antybakteryjny specyficznych kwasów tłuszczowych i możliwego mechanizmu poprzez hamowanie FABI, wydaje się, że może to być jeden z dodatkowych mechanizmów działania przeciwbakteryjnego. Co więcej, nasze poprzednie badania proteomiczne koniugatów CXP (praca **H2**) i niepublikowane dane dotyczące amidów MXF wykazały ich potencjał do regresji ludzkiej odmiany izoforny reduktazy FAB5.

Reasumując, uzyskane wyniki potwierdziły przewagę formy skoniugowanej moksyflokscyny, a nowo zsyntetyzowane koniugaty były selektywnie silnie cytotoksyczne wobec testowanych linii nowotworowych, z wyróżnieniem komórek raka prostaty (PC3), które podobnie jak w przypadku CXP były bardziej podatne na ich działanie. Interesującym faktem jest to, że sama MXF w badaniu MTT okazała się silniejszym cytostatykiem niż CXP, a porównanie wartości IC<sub>50</sub> odpowiednich koniugatów obu fluorochinolonów jednoznacznie wskazało na silniejszą aktywność pochodnych MXF. Wśród przebadanych kwasów tłuszczowych powiązanych z MXF, najskuteczniejszymi okazały się kwasy sorbowy (**2m**), oleinowy (**4m**), hept-6-enowy (**10m**), linolowy (**11m**), kaprylowy (**15m**) i stearynowy (**16m**). Tymczasem najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec standardowych szczepów wykazywały pochodne kwasów o długości łańcucha nie dłuższym niż 6 węgli, czyli koniugaty (**1m**, **2m**, **14m**), a najsilniej bioaktywnym amidem wobec szczepów klinicznych była pochodna

acetylowa **14m**. Poza tym również modyfikacje z kwasem krotonowym (**1, 1m**) i sorbowym (**2, 2m**) i to obu fluorochinolonów okazały się być skuteczne przeciw testowanym mikroorganizmom. Co ciekawe, w badaniu przeciwprątkowym wykazaliśmy, że to koniugaty MXF i CXP pochodzące od średnio- i długołańcuchowych kwasów wielonienasyconych takich jak DHA (**8 i 8m**) i arachidonowego (**13m**), ale także 5 - węglowego kwasu sorbowego połączonego z CXP (**2**) działały najskuteczniej i wykazywały nawet 8–16-krotnie większą aktywność niż referencyjne tuberkulostatyki. Nasze ustalenia dotyczące mechanizmów działania antybakteryjnego zarówno prowadzone *in vitro* jak i *in silico* wskazały jednoznacznie na odmienne punkty uchwytu badanych koniugatów niż hamowanie kluczowych enzymów bakteryjnych: gyrazy DNA i topoizomerazy IV. W związku z tym dalsze planowane badania nad potencjalnymi mechanizmami działania przeciwdrobnoustrojowego koniugatów, pozwolą na identyfikację optymalnej modyfikacji oraz nowych słabych punktów w metabolizmie bakterii, które mogą się stać celem terapeutycznym w antybiotykoterapii. Jednak jak się okazuje, samo działanie przeciwdrobnoustrojowe jest również wpisane w ogólne działanie przeciwnowotworowe. Wiele badań potwierdziło udział mikroflory obecnej w guzie w jego progresji. Dlatego antybiotykoterapia prowadziła do zmniejszenia wielkości guza *in vitro*, a także tłumiała lekooporność. Obiecujące wydają się wyniki badania klinicznego moksyflokscyny w grupie pacjentek z rakiem piersi (BC). Zastosowanie tego fluorochinolonu w połączeniu z rutynowym leczeniem spowodowało zmniejszenie wielkości guza we wszystkich podtypach BC z wyjątkiem potrójnego negatywnego raka piersi (TNBC) [12]. Tym bardziej wydaje się, że zastosowanie preparatu o podwójnym, cytotoksycznym działaniu na komórki zarówno nowotworowe jak i bakteryjne może przynieść więcej korzyści w terapii onkologicznej.

**Publikacja H4** - Ustalenie mechanizmów działania przeciwnowotworowego dla wyselekcjonowanych, najbardziej aktywnych koniugatów moksyflokscyny oraz ich wpływ na profil metaboliczny w komórkach nowotworu jelita grubego i prostaty

Wstępne, obiecujące wyniki aktywności przeciwnowotworowej nowych koniugatów moksyflokscyny (**H3**) pozwoliły na wyselekcjonowanie optymalnych połączeń i zaplanowanie badań nad mechanizmami ich cytotoksycznego działania. W tym celu wybraliśmy koniugaty MXF (**2m, 4m, 5m, 8m, 10m, 11m, 16m**) z najniższym stężeniem IC50 i najwyższym wskaźnikiem SI i przetestowaliśmy ich wpływ na apoptozę, uwalnianie IL-6, jak również na aktywność kaspaz 3 i 7, czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz na zmiany metaboliczne w pierwotnej (SW480) i przerzutowej (SW620) linii komórkowej nowotworu jelita grubego i prostaty (PC3). Wykonany w poprzednim badaniu test MTT potwierdziliśmy testem żywotności TB (trypan blue). Najlepsze właściwości cytotoksyczne posiadały koniugaty **4m** i **16m** z kwasem oleinowym i stearynowym w linii PC3 (żywotność ok. 40%), chociaż były one również skuteczne w linii SW620 (żywotność ok. 60%). Pozostałe koniugaty o dość silnej cytotoksyczności to były połączenia z kwasem sorbowym, elaidynowym, DHA, hept-6-enowym i linolowym w linii komórkowej PC3, natomiast w SW620 z wyłączeniem koniugatu z kwasem hept-6-enowym, który wykazywał jedynie aktywność cytostatyczną. Testowane związki miały znacznie mniejszy wpływ cytotoksyczny w linii komórkowej SW480 i dopiero modyfikacja kwasem linolowym obniżyła żywotność pierwotnej linii komórkowej raka jelita grubego do około 60%. Niezmodyfikowana moksyflokscyna wykazywała słabą aktywność przeciwnowotworową z wyjątkiem linii PC3, gdzie dała umiarkowaną aktywność cytostatyczną. To również potwierdzają inne badania prowadzone na komórkach raka trzustki czy też białaczki, gdzie wolna MXF była skuteczna tylko w wysokich dawkach (400  $\mu$ g/ml) i dawała efektywność zahamowania proliferacji rzędu 20% [41, 42]. Dużym atutem nowo zsyntetyzowanych bioaktywnych amidów MXF jest nietoksyczność w stosunku do zdrowych

komórek HaCaT (żywołność powyżej 80%). Jak już zostało to zasygnalizowane wcześniej, bardzo pożądaną cechą związków ograniczających rozwój nowotworu jest zmniejszenie stężenia cytokiny IL-6 w komórkach nowotworowych. Z tego względu dokonaliśmy analizy stężeń tej interleukiny po potraktowaniu testowanych linii nowotworowych zarówno nieskoniugowaną MXF jak i jej koniugatami i co ciekawe zaobserwowaliśmy najbardziej wyraźną redukcję jej wydzielania w komórkach SW480. Bazując na wynikach cytotoksyczności, gdzie ta linia pierwotnego raka jelita grubego była słabo podatna na działanie koniugatów, było to dość zaskakujące odkrycie. Istotne różnice w hamowaniu uwalniania interleukiny-6 zaobserwowano również w komórkach PC3, zwłaszcza w przypadku koniugatów z kwasem sorbowym (**2m**), oleinowym (**4m**), linolowym (**11m**) i stearynowym (**16m**), jednak w tej linii komórkowej wolna forma MXF nie wykazywała potencjału hamującego. Uzyskane wyniki z badania komórek SW620 wykazały, że jedynie pojedyncze połączenia z kwasem oleinowym (**4m**) i stearynowym (**16m**) wykazywały podobny efekt tłumiący wydzielanie cytokiny. Pozostałe koniugaty, w tym niezmodyfikowana moksyflokscyna, nie zmieniały stężeń IL-6. Również komórki kontrolne HaCaT pozostawały nieaktywne w stosunku do koniugatów oraz wolnej MXF. Innym oczekiwanym wynikiem badania przesiewowego *in vitro* leków przeciwnowotworowych jest indukcja apoptozy. W naszym badaniu działanie proapoptotyczne badanych koniugatów zostało potwierdzone metodą cytometrii przepływowej i wzrostem aktywności kaspaz 3 i 7. Najbardziej nasilony efekt proapoptotyczny był widoczny w przerzutowych komórkach raka okrężnicy SW620 i prostaty PC3. Co ciekawe, komórki PC3 zostały wprowadzone przede wszystkim we wczesną lub późną apoptozę w obecności związków **4m** i **16m**, podczas gdy reszta koniugatów raczej w umiarkowany sposób indukowała późną apoptozę lub nekrozę. Tymczasem w komórkach raka jelita grubego z przerzutami (SW620) połączenia z kwasem sorbowym i stearynowym charakteryzowały się najsilniejszym potencjałem proapoptotycznym, ale również amidy z kwasem oleinowym, DHA, linolowym i hepta-6-enowym w dużym stopniu indukowały późną apoptozę lub nekrozę. Najsilniejszym induktorem wczesnej oraz późnej apoptozy i nekrozy w komórkach SW480 był koniugat z kwasem stearynowym, jednakże modyfikacje z kwasem oleinowym, DHA, linolowym i hepta-6-enowym dość silnie indukowały późną apoptozę i nekrozę. Ten proapoptyczny mechanizm działania testowanych związków został potwierdzony aktywacją kaspaz 3 i 7. Na tym etapie badań postanowiliśmy zawęzić grupę badanych koniugatów tylko do najsilniej działających. Zgodnie z uzyskanymi wcześniej wynikami testu MTT (**H3**) i zastosowanych w obecnym badaniu analiz wybrano najsukuteczniejsze amidy moksyflokscyny **4m** i **16m**, które to charakteryzowały się wysoką cytotoksycznością i selektywnością, silną zdolnością do indukowania apoptozy i hamowania uwalniania IL-6. Oba amidy stymulowały aktywację kaspazy 3 i 7, ale w różnym przedziale czasowym. Koniugat z kwasem stearynowym aktywował te proteazy po 12 i 24 godzinach, natomiast koniugat z kwasem oleinowym po 48 godzinach w linii pierwotnego nowotworu jelita (SW480). W komórkach raka prostaty (PC3) schemat aktywacji był podobny dla obu substancji co ciekawe, nawet nieskoniugowana moksyflokscyna znacząco wyzwała aktywację kaspaz 3 i 7 po 12 godzinach, podczas gdy w przerzutowym raku jelita grubego amid **16m** aktywował proteazy po 24h, a efekt ten był nawet silniejszy po 48 godz., kiedy to również koniugat **4m** indukował kaspazy. W zdrowych keratynocytach HaCaT poddanych działaniu pochodnej **4m** i **16m** oraz niezmodyfikowanej MXF aktywność kaspaz pozostawała przez cały czas trwania badania na poziomie tej w komórkach kontrolnych. Ponieważ indukcja apoptozy jest często poprzedzona zmianami w cyklu komórkowym sprawdziliśmy również jak wybrane związki w stężeniu  $\frac{1}{2}$  IC50 i IC50 wpływają na schemat cyklu komórkowego. Analiza cyklu komórkowego w pierwotnym i przerzutowym nowotworze jelita SW480 i SW620 wykazała, że oba badane amidy **4m** i **16m** znacznie zwiększyły odsetek komórek w fazie sub-G1 i G0/G1 co wskazuje na ich

preferencyjne działanie antyproliferacyjne jak i w mniejszym stopniu cytotoksyczne. Natomiast ekspozycja komórek raka prostaty PC3 na badane koniugaty dała najwyższy procentowy wzrost komórek w fazie sub-G1, co potwierdza głównie ich cytotoksyczny efekt. Nieskoniugowana MXF wpływała w dużo mniejszym stopniu, a nieznaczny efekt był widoczny jedynie przy wyższych stężeniach. Co ważne, zarówno moksyflokscyna jak i amid **4m** nie wpływały istotnie na prawidłowy przebieg cyklu komórkowego w zdrowych komórkach HaCaT, jedynie związek **16m** w wyższym stężeniu indukował zatrzymanie cyklu komórkowego i zwiększony procent komórek w fazie sub-G1. Kolejną pożądaną cechą skutecznego leku antynowotworowego jest hamowanie aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B, który to konstytutywnie indukowany w wielu typach nowotworów m.in. prostaty odgrywa kluczową rolę w regulacji docelowych genów zaangażowanych w proliferację, blokowanie apoptozy, indukowanie angiogenezy i przerzutowanie [43]. Moksyflokscyna i jej pochodne **4m** i **16m** preferencyjnie w pierwotnych komórkach SW480 hamowały aktywację NF- $\kappa$ B prawie o 50%, natomiast w przerzutowych SW620 o 40%. Co było dla nas zaskakujące, najsłabiej zareagowały komórki prostaty PC3, gdzie potencjał hamowania aktywności tego białka spadł jedynie o 30% w porównaniu do kontroli. W prawidłowych komórkach HaCaT ten spadek był najniższy i wynosił około 20%.

Wzbogacenie macierzystych fluorochinolonów o cząsteczkę lipidową, jak również potwierdzony udział metabolitów pochodzących z przemian lipidów w progresji nowotworów, stały się inspiracją do przeprowadzenia analizy metabolomicznej pochodnych lipidów. Na podstawie naszego poprzedniego, ale i obecnego badania zaobserwowaliśmy, że optymalnym połączeniem dla obu badanych fluorochinolonów był kwas oleinowy należący do grupy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA - monounsaturated fatty acids). Ta kombinacja była bardzo skuteczna głównie przeciwko komórkom raka prostaty, a jednocześnie dane literaturowe wskazują na preferencyjny wychwyty jednonienasyconych kwasów tłuszczowych przez komórki nowotworowe, gdyż włączenie MUFA do kluczowego lipidu wewnętrznej błony mitochondrialnej – kardiolipiny powoduje skuteczne wiązanie cytochromu c i może zapobiegać apoptozie [3]. W znacznym stopniu nowotworowy metabolizm lipidów zmienia się na korzyść wykorzystania lipidów zewnętrznych i zwiększenia metabolizmu kwasów tłuszczowych. W przypadku leczenia raka prostaty ingerencja w szlak wewnątrznowotworowej syntezy steroidów po lub w trakcie terapii deprivacji androgenów może mieć duże implikacje terapeutyczne. Zestawienie uzyskanych wyników wykazało najbardziej intensywne zmiany metaboliczne w przerzutowej linii SW620, ale także interesujący profil zmian w pierwotnym nowotworze jelita (SW480) jak i komórkach raka prostaty (PC3), eksponowanych na działanie skoniugowanej MXF z kwasem oleinowym (**4m**), jak i jej wolnej formy. Zaobserwowaliśmy zwiększony poziom eikozanoidów włączając prostaglandyny H2, D2, E2, I2 i G2, tromboksan A2 i leukotrieny w pierwotnej linii nowotworu jelita SW480, natomiast w jego bardziej zaawansowanym stadium - komórkach SW620 wymienione pochodne kwasu arachidonowego były na niskim poziomie. Podobnie w przerzutowym nowotworze prostaty PC3 odnotowaliśmy zmniejszenie tych aktywnych biolipidów wspólnie z pochodnymi kwasu arachidonowego, takimi jak 5-HETE i 11,12,15 i 11,14,15 TETA. Wiadomo, że te prozapalne metabolity mogą zwiększać progresję nowotworu poprzez wpływ na adhezję, migrację i inwazję komórek nowotworowych [44]. W komórkach nowotworu jelita grubego zauważyliśmy również wzrost ilości hormonów steroidowych. Poziom progesteronu, pregnenolonu i kortyzonu wzrastał w komórkach SW480 i to zarówno w obecności koniugatu jak i wolnej MXF natomiast w przerzutowym typie tych komórek (SW620) wzrosło stężenie estronu i testosteronu natomiast intensywność progesteronu, glukuronidu androsteronu, aldosteronu i kortyzonu zmniejszyła się. Wpływ hormonów na progresję nowotworu okrężnicy jest zróżnicowany, bo jakkolwiek estrogen i glikokorykoidy mogą być zaangażowane we wzmocnienie procesu nowotworowego tak androgeny i

progesteron mogą działać supresyjnie [45]. Kontrowersyjne jest również działanie progesteronu w nowotworze prostaty, gdyż może on stać się kluczowym prekursorem *de novo* steroidogenezy androgenowej, ale także aktywować nieprawidłowy receptor dla tego typu hormonów. Ostatnie doniesienia podkreślają jednak inną rolę tego steroidu działającego jako inhibitor łagodnego rozrostu gruczołu krokowego i progresji PCa. Podobnie funkcja estrogenów może być dwojaka i mogą one zarówno stymulować, jak i hamować ekspansję nowotworu poprzez hamowanie androgenowego wpływu na rozrost nieprawidłowych komórek [46]. Działanie koniugatu **4m** na komórki raka prostaty PC3 skutkowało wzrostem estronu natomiast spadkiem dihydrotestosteronu, podczas gdy wolną MXF obejmowało zwiększenie stężenia progesteronu przy jednoczesnym spadku kortyzonu, aldosteronu, dihydrotestosteronu i glukuronidu testosteronu. Wiadomym jest, że intensywnie proliferujące komórki nowotworowe potrzebują nadmiaru cholesterolu, a także intermediatów uczestniczących w jego biosyntezie. Nadmiar tego steroidu może blokować również infiltracje efektorowych komórek T, co może osłabić immunoterapię i dlatego niekorzystny może być wzrost intensywności siarczanu cholesterolu w komórkach SW480 po dodaniu samej MXF [47]. Wydaje się, że zwiększenie metabolitów triacylogliceroli (TG) i nasilenia syntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych i cholesterolu po dodaniu koniugatu **4m** do przerzutowych komórek SW620 może tworzyć sprzyjające warunki do rozwoju nowotworu. W przeciwieństwie do raka jelita grubego w komórkach PC3 zaobserwowaliśmy zmniejszenie intensywności półproduktów do syntezy cholesterolu po podaniu koniugatu. Udowodniono, że wyciszenie szlaku mewanonianu może hamować wzrost i progresję guza. Zmiany metaboliczne w prawidłowych keratynocytach były zaniedbywalne w porównaniu do kontroli zarówno po podaniu koniugatu MXF jak i jej nieskoniugowanej formy. Przeprowadzenie wyżej opisanych badań było możliwe dzięki współpracy z dr Andrzejem Ciechanowiczem z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej.

Podsumowując, nasze badanie potwierdziły silny potencjał cytotoksyczny koniugatów moksyflokscyny, który był dużo wyższy niż wolnej formy fluorochinolonu, a jednocześnie amidy pozostawały bezpieczne dla prawidłowych komórek HaCaT. Podobnie jak w przypadku CXP to komórki raka prostaty PC3 były bardziej wrażliwe na koniugaty MXF niż komórki raka okrężnicy. Najbardziej obiecującą aktywność cytotoksyczną wykazywały koniugaty **4m** i **16m** z kwasem oleinowym i stearynowym, które nie tylko skutecznie zmniejszały żywotność przerzutowych komórek PC3 i SW620, ale również silnie indukowały w tym typie komórek kaspazy 3/7 i późną apoptozę. Kontrowersyjnym rezultatem było najbardziej nasilone hamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B i wydzielania IL-6 zaobserwowane w pierwotnej linii SW480, która okazała się najmniej wrażliwa w pozostałych testach cytotoksyczności. Bardzo ważnym wnioskiem wyciągniętym na podstawie analizy metabolicznej jest identyfikacja optymalnego profilu metabolomicznego w komórkach raka prostaty PC3, który może służyć supresji nowotworu. Tymczasem wzrost aktywnych biolipidów w komórkach SW480 i intermediatów biosyntezy TAG oraz cholesterolu korzystnych dla progresji nowotworu w komórkach SW620 może skutkować gorszą odpowiedzią na działanie koniugatów i dawać słabszy efekt w testach cytotoksyczności. Nasze odkrycia jednoznacznie wykazały potencjał koniugatów moksyflokscyny, który może być wykorzystany w terapii onkologicznej ze względu na udowodnione przez nas działanie cytotoksyczne i przeciwzapalne.

### 6.3. PODSUMOWANIE

Wyniki prac stanowiących osiągnięcie naukowe są nie tylko źródłem nowych danych na temat potencjału cytotoksycznego cyprofloksacyny i moksyflokscyny, a także ich koniugatów wzbogaconych o cząsteczkę lipidową, ale również stanowią pionierskie badania identyfikujące zmiany w profilu proteomicznym i metabolicznym w przemianach lipidów, jakie zaszły pod ich wpływem. Przedstawione cele naukowe mają charakter interdyscyplinarny i

łączą kompetencje kilku zespołów badawczych. Badania potencjału cytotoksycznego nowo zsyntetyzowanych koniugatów pozwoliły na wybranie tych, które bioaktywnością mogą konkurować z wiodącymi cytostatykami np. cisplatyną. Identyfikacja profilu działania określa dalszy kierunek poszukiwań potencjalnych substancji leczniczych, jak i wytycza nowe cele terapeutyczne w walce z chorobami nowotworowymi, a zwłaszcza z zaawansowaną postacią nowotworu prostaty. Jednocześnie identyfikacja optymalnych modyfikacji dla wzmocnienia i rozszerzenia aktywności antybakteryjnej wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad metabolizmem lipidów w komórkach bakteryjnych i wykorzystaniem go w walce z mikroorganizmami chorobotwórczymi.

### **Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac (wnioski)**

1. Zaplanowanie utworzenia serii koniugatów dwóch fluorochinolonów z kwasami tłuszczowymi o zróżnicowanej aktywności biologicznej, w zależności od rodzaju użytego kwasu (stopnia nasycenia i długości łańcucha)
2. Potwierdzenie lepszej bioaktywności dla formy skoniugowanej fluorchinolonu z kwasem tłuszczowym niż podczas zastosowania składników oddzielnie w mieszaninie, jak również większego potencjału cytotoksycznego koniugatów MXF w porównaniu do CXP.
3. Ustalenie mechanizmu działania przeciwnowotworowego oraz przeciwbakteryjnego poprzez badania *in vitro* i *in silico*, a także potwierdzenie bezpieczeństwa stosowania nowych związków poprzez wykazanie braku cytotoksycznego działania na ludzkie komórki prawidłowe.
4. Wyselekcjonowanie optymalnych połączeń macierzystego fluorochinolonu - CXP z kwasem sorbowym, OA, EA i DHA, oraz MXF z kwasem OA i STA jak również potwierdzenie ich silnego supresyjnego działania na rozwój nowotworu z preferencyjnym działaniem na raka prostaty
5. Zidentyfikowanie różnic we wrażliwości komórek nowotworowych raka prostaty w zależności od typu i zaawansowania i ustalenie najlepszej skuteczności koniugatów dla hormono-niewrażliwego raka o najwyższym stopniu inwazyjności.
6. Wskazanie koniugatów o dwukierunkowym działaniu, które działają silnie cytotoksycznie zarówno na komórki nowotworowe jak i bakteryjne, co może wzmacniać działanie supresyjne na guza w warunkach *in vivo*.
7. Uzyskanie w grupie pochodnych CXP i MXF związków o wysokim potencjale przeciwgruźliczym, porównywalnym lub silniejszym niż systemowo stosowane tuberkulostatyki.
8. Potwierdzenie zmienionego metabolizmu lipidów w komórkach nowotworowych ze wzmożoną intensywnością białek transportujących i magazynujących lipidy, jak również syntezą kwasów tłuszczowych *de novo* oraz jednocześnie ich zwiększonym katabolizmem.
9. Redukcja intensywności białek zaangażowanych w progresję nowotworu przez koniugaty CXP z kwasem sorbowym, OA i EA.
10. Potwierdzenie optymalnego profilu metabolicznego dla regresji procesu nowotworowego w raku prostaty pod działaniem koniugatu 4m oraz wyjaśnienie możliwych mechanizmów słabszej odpowiedzi na leczenie koniugatami komórek pierwotnych i przerzutowych raka jelita grubego.

## 7. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 7.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Moja działalność naukowa była od początku związana z Katedrą i Zakładem Biochemii, gdzie trafiłam do zespołu pani Prof. Zofii Poremskiej, zaangażowanego w pracę nad badaniem aktywności arginazy u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Ten kluczowy enzym cyklu mocznikowego poza udziałem w procesie detoksykacji amoniaku uczestniczy w syntezie bioaktywnych związków. Ze względu na współzawodnictwo z syntazą tlenu azotu o L-argininę oraz udział w syntezie proliny i glutaminianu, arginaza odgrywa istotną rolę w takich schorzeniach jak urazy, stany zapalne oraz udary, natomiast jej udział w szlaku syntezy poliamin i regulacji układu odpornościowego sprawia, że może być również zaangażowana w proces kancerogenezy. Efektem poszukiwań materiału badawczego było rozpoczęcie współpracy z dr Grzegorzem Luboińskim z Kliniki Chirurgii Onkologicznej Centrum Onkologii w Warszawie, w wyniku której badaliśmy krew pacjentek pod kątem oznaczania aktywności arginazy. Okazało się, że aktywność tego enzymu jest wyższa u pacjentek z rakiem piersi, niż u zdrowych dawców krwi, a ponowny wzrost po leczeniu sugerował albo rozwijające się przerzuty albo niecałkowite usunięcie zmiany pierwotnej. Ponadto, wzrost aktywności arginazy u kobiet z łagodnymi nowotworami piersi mógł być sygnałem rozwijającego się raka.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach:

- Poremska Z, Luboiński G, **Chrzanowska A**, Mielczarek M, Magnuska J, Barańczyk-Kuźma A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2003; 328:105–11. IF=1,633
- Poremska Z, **Chrzanowska A**, Ścibior D, Czeczot H, Ashamiss F, Luboiński G. Usefulness of postoperative assay of arginase activity in blood serum of women after breast cancer resection. *Pol Merkur Lekarski*. 2004;17(102):583-5.

Możliwość wykorzystania oznaczania aktywności arginazy jako testu diagnostycznego dała podstawy do bardziej zaawansowanych badań nad tym enzymem, mających na celu identyfikację jego izoenzymów. Wiadomo, że u ssaków arginaza występuje w postaci dwóch izoenzymów – AI i AII, a ich ekspresja ulega zmianie w zależności od potrzeb metabolicznych komórki. Ze względu na to, że chcieliśmy rozszerzyć zakres badań również o tkanki nowotworowe i prawidłowe, rozpoczęliśmy kolejne współprace z Klinikami Chirurgii. W grupie badanej znaleźli się pacjenci z Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej oraz Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby WUM, a eksperymenty były prowadzone na tkankach (wątrobie marskiej, guzach wątroby, guzach jelita grubego i przerzutach) oraz płynach ustrojowych (surowica, żółć). Celem zaplanowanych eksperymentów było porównanie aktywności arginazy w tkankach zdrowych i nowotworowych pobieranych śródoperacyjnie oraz w surowicy krwi pobieranej w różnych odstępach czasu, a także identyfikacja jej izoenzymów i próba określenia ich roli w patogenezie i diagnostyce badanych schorzeń. Do realizacji tych założeń wykorzystaliśmy różne metody biologii molekularnej (badanie aktywności enzymatycznej, chromatografię jonowymienną, Western – blot, PCR)

Przeprowadzone badania wykazały, że aktywność arginazy w surowicy chorych z rakiem jelita grubego była kilkukrotnie wyższa, a u chorych z przerzutami tego nowotworu do wątroby nawet kilkunastokrotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Test arginazowy okazał się również przydatny do monitorowania pacjentów po resekcji chirurgicznej, po której następował spadek aktywności enzymu, z wyjątkiem przypadków pacjentów z guzami nieresekcyjnymi lub z rozsianym procesem nowotworowym, u których nie doszło do

doszczętnego usunięcia zmiany nowotworowej. Analiza wyników z 3-letnich obserwacji aktywności arginazy w surowicy pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego i/lub przerzutów do wątroby wskazywała na to, że pojawiająca się i/lub utrzymująca się wysoka aktywność arginazy mogła wiązać się z większym ryzykiem i szybszym nawrotem choroby. Z kolei aktywność arginazy w guzach pierwotnych i przerzutowych raka jelita grubego i pacjentów z przerzutami raka jelita grubego do wątroby była znacznie większa w porównaniu z niezmienną nowotworowo tkanką jelita (oceniona histopatologicznie tkanka pobrana z marginesu okalającego guz).

Poniżej przedstawiam najważniejsze publikacje dotyczące tego tematu:

- Mielczarek M, **Chrzanowska A**, Ścibior D, Skwarek A, Ashamiss F, Lewandowska K, Barańczyk-Kuźma A. Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases. *Int J Biol Markers*. 2006;21(1):40-4. IF= 0.966
- Mielczarek- Puta M, **Chrzanowska A**, Barańczyk-Kuźma A. Arginase and arginine in diagnostics of patients with colorectal cancer and patients with colorectal cancer liver metastases. *Contemp Oncol*. 2008;12(2):51-55.

Ze względu na wysoką aktywność arginazy w wątrobie, a także brak danych dotyczących udziału izoform arginazy w chorobach wątroby, ciekawym wydawał się temat zbadania zmian aktywności i ekspresji izoenzymów arginazy w marskości i raku wątrobowo-komórkowym. Dlatego moje badania skupiły się na badaniu surowicy, żółci oraz tkanek pochodzących od pacjentów z tymi schorzeniami, a wyniki tych doświadczeń stały się tematem rozprawy doktorskiej obronionej w roku 2008 jak również kilku publikacji i komunikatów zjazdowych. Zaplanowanie i realizacja badań była też możliwa dzięki uzyskaniu finansowania z trzech projektów, w których pełniłam rolę kierownika lub głównego wykonawcy (1WK/3E125, 1WK/WP3/07 oraz 0779/P05/2005/29).

Wykazałam, że aktywność arginazy w surowicy krwi pacjentów z marskością i rakiem wątrobowo-komórkowym wzrastała kilkukrotnie (silniej u pacjentów z nowotworem), a w okresie pooperacyjnym (przeszczepienie wątroby, resekcja guza) u większości chorych obniżała się do wartości kontrolnych, wskazując na prawidłowe działanie przeszczepionej tkanki lub potwierdzając całkowite usunięcie guza. Identyfikacja izoenzymów potwierdziła fakt, że w surowicy osób zdrowych jest obecna tylko izoforma kationowa AI, natomiast w surowicy pacjentów z marskością i rakiem wątrobowo-komórkowym pojawia się dodatkowa, anionowa izoforma AII. Wzrost aktywności arginazy stwierdziłam również w żółci pacjentów z przeszczepioną wątrobą. Bezpośrednio po transplantacji aktywność była kilkukrotnie wyższa niż 14 dni po zabiegu, chyba że przeszczep został odrzucony, wtedy z 2-3 dniowym wyprzedzeniem pojawiał się wzrost aktywności enzymu. Obecna w żółci arginaza mogła pochodzić z hepatocytów uszkodzonych podczas przechowywania/transportu wątroby lub z cytotoksycznej reakcji układu immunologicznego biorcy. W żółci bezpośrednio po transplantacji wątroby, stwierdziłam obecność obu izoform arginazy, przy czym większość aktywności była związana z izoformą AII, co mogło wynikać z większej wrażliwości hepatocytów okołozylnych (lokalizacja AII) na niedotlenienie i martwicę niż hepatocytów okołowrotnych (lokalizacja AI), natomiast po 14 dniach profil izoenzymatyczny ulegał odwróceniu na korzyść izoformy AI.

Badania nad aktywnością i profilem enzymatycznym arginazy obecnym w tkankach przyniosły również wiele ciekawych odkryć. Odnotowałam trzykrotne obniżenie aktywności enzymu w tkance marskiej, które postępowało wraz z obniżeniem wydolności wątroby (ocenianej wg 3-stopniowej klasyfikacji Childa-Pugha), a ten spadek był dużo większy (8-14



razy) w raku wątrobowo-komórkowym, ale nie w guzach łagodnych. Takie obniżenie aktywności arginazy w tkance marskiej może być przyczyną hiperamonemii, natomiast w raku wątrobowo-komórkowym możliwe jest działanie protekcyjne przed nadmierną hydrolizą argininy niezbędnej do progresji nowotworu, tym bardziej, że jest to nowotwór auksotroficzny względem tego aminokwasu. W wątrobie zdrowej badanie profilu izoenzymatycznego wskazywało na dominującą izoformę AI, natomiast w wątrobie marskiej stwierdziłam obniżenie aktywności izoformy AI i jednoczesny wzrost aktywności izoformy AII, która to izoforma stawała się przeważającą w nowotworze wątroby. Zmiany aktywności były efektem zmian ekspresji poszczególnych izoform na poziomie mRNA i białka. Wydaje się, że zmiana rozkładu izoform w wątrobie marskiej służyła uruchomieniu mechanizmów kompensacyjnych w strefie okołozylnej w celu zobojętnienia amoniaku, który nie uległ detoksykacji przez niesprawnie działający w strefie okółwrotnej cykl mocznikowy (spadek ekspresji AI) jak również dostarczaniu proliny do wzmożonej syntezy kolagenu podczas rozwoju procesu marskiego. Z kolei wysoka aktywność arginazy AII w raku wątrobowo-komórkowym mogła być związana ze zwiększonym zapotrzebowaniem tkanki nowotworowej na duże ilości ornityny wykorzystywanej do syntezy poliamin, proliny oraz glutaminianu - związków biorących udział w intensywnej proliferacji i ekspansji komórek nowotworowych.

Efektom wyżej opisanych badań były następujące publikacje:

- **Chrzanowska A**, Mielczarek-Putna M, Skwarek A, Krawczyk M, Barańczyk-Kuźma A. Serum arginase activity in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Wiad. Lek.* 2007; 60: 215–218.
- **Chrzanowska A**, Krawczyk M, Barańczyk-Kuźma A. Changes in arginase isoenzymes pattern in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(2):337-340. IF=2,648

Podsumowując, badania naszego zespołu nad arginazą dały solidne podstawy do wykorzystania jej jako pomocnego testu w diagnostyce chorób nowotworowych. Oznaczanie arginazy charakteryzowało się większą czułością i swoistością niż markery nowotworowe CEA i Ca19-9 - powszechnie stosowane w diagnostyce raka jelita grubego, jak i białko AFP - rutynowo oznaczane w nowotworach wątroby. Pomimo tego, że podwyższona aktywność arginazy nie jest różnicująca dla rodzaju nowotworu, gdyż odnotowaliśmy ją w raku piersi, jelita grubego, wątroby, żołądka i trzustki, to jednak u chorych z przerzutami osiągnęła wartości nawet kilkadziesiąt razy wyższe od wartości kontrolnych. Ponadto badanie profilu izoenzymatycznego może dawać dodatkowe informacje na temat lokalizacji guza. Jednocześnie test arginazowy wydaje się być przydatny w monitorowaniu pacjentów nowotworowych po resekcjach chirurgicznych, jak również po przeszczepieniu wątroby.

Obecnie badania nad arginazą, przeżywają reaktywację ze względu na jej potwierdzony udział w immunooporności nowotworów, co daje perspektywę wykorzystania inhibitorów tego enzymu w terapii przeciwnowotworowej.

Te wszystkie obiecujące dane jak i to, że test arginazowy jest tani, prosty i szybki w wykonaniu jednak wymagający użycia sporej objętościowo ilości odczynników, nasuwają pomysł opracowania mikrometody oznaczania aktywności arginazy, która jako „rapid test” mogłaby zafunkcjonować w diagnostyce nowotworów lub badaniach przesiewowych pacjentów z grup ryzyka. Dlatego wspólnie z Molecular Epidemiology Laboratory Queen Mary University of London należącego do jednostek Cancer Prevention Unit zrodził się pomysł stworzenia w 2023 międzynarodowego projektu i opracowania szybkiego, praktycznego testu do oznaczania aktywności arginazy.

Mój dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 9 publikacji oryginalnych i 2 prace poglądowe, oraz 15 komunikatów prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Całkowity IF artykułów opublikowanych przed obroną pracy doktorskiej wynosi 5,247, a ich wartość odpowiada 109 punktom MEiN.

## 7.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, wraz z naszym zespołem badawczym postanowiliśmy kontynuować badania nad metabolizmem komórek nowotworowych z uwzględnieniem zmian w białkach enzymatycznych czy też metabolitach. Jednak dla usprawnienia, rozszerzenia i powtarzalności badań, rozpoczęliśmy eksperymenty „*in vitro*” na liniach komórkowych, wzbogacając układ badawczy o jak najwierniejsze odtworzenie warunków panujących w tkance nowotworowej. Zastosowaliśmy komorę hipoksyjną, gdzie można ustalać odpowiednie stężenia tlenu m.in. warunki normoksji tkankowej 10% lub hipoksji 1%. Już pierwsze wyniki badań pokazały ogromne różnice w badaniach przeprowadzanych rutynowo w większości laboratoriów, czyli w normoksji atmosferycznej (21%), a w warunkach realnie odtwarzających te panujące w guzie (1% i 10% tlenu). Poniżej przedstawiam i opisuję najważniejsze publikacje z tego okresu:

- Graboń W, Otto-Ślusarczyk D, **Chrzanowska A**, Mielczarek-Puta M, Joniec-Maciejak I, Słabik K, Barańczyk-Kuźma A. Lactate Formation in Primary and Metastatic Colon Cancer Cells at Hypoxia and Normoxia. *Cell Biochem Funct.* 2016; 34 (7):483-490. IF=2,186

Powszechnie wiadomo, że zmiany w metabolizmie komórek nowotworowych wiążą się z adaptacją do warunków różnej dostępności tlenu i składników odżywczych, niezbędnych do przeżycia i intensywnej proliferacji. To szczególnie wysokie tempo namnażania się komórek prowadzi do ich przejściowego niedotlenienia z powodu wadliwego i niedostatecznego wytwarzania nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza) zaopatrujących tkankę nowotworową. Zapotrzebowanie na tlen i energię może różnić się też pomiędzy pierwotnymi i przerzutowymi komórkami nowotworowymi, stwierdzono bowiem, że komórki przerzutowe charakteryzują się lepszym przystosowaniem do mikrośrodowiska guza i bardziej dynamicznym wzrostem [48]. Wspólną cechą komórek nowotworowych jest również efekt Warburga, czyli wytwarzanie dużych ilości mleczanu z glukozy nawet przy dostępie wystarczającej ilości tlenu. Obecnie wiadomo, że źródłem mleczanu może być nie tylko glikoliza, lecz także glutaminoliza, która może zachodzić w mitochondriach klasyczną drogą zależną od tlenu, jak również indukowanymi hipoksją drogami alternatywnymi zlokalizowanymi zarówno w mitochondriach, jak i cytoplazmie [49]. W ten sposób komórki nowotworowe nabierają częściowej niezależności energetycznej od zmiennych stężeń tlenu występujących w obszarze guza. Oba procesy zachodzą bardzo intensywnie w rozwijającym się nowotworze i oprócz mleczanu dostarczają aminokwasów takich jak L-seryna (glikoliza) i L-asparaginian (glutaminoliza), niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych. Ciekawiło nas, jak dostępność tlenu oraz dwóch kluczowych aminokwasów nukleogennych w intensywnie rosnących komórkach, wpłyną na tempo proliferacji, syntezę mleczanu, zużycie glukozy i ekspresję izoenzymów aminotransferazy asparaginianowej (cytozolowego AST1 i mitochondrialnego AST 2), kluczowego enzymu w szlakach glutaminolizy. Dowiedliśmy, że komórki szybciej proliferują w warunkach hipoksji (1% O<sub>2</sub>) niż normoksji tkankowej (10% O<sub>2</sub>). Suplementacja L-Ser spowodowała wzrost proliferacji zarówno pierwotnych jak i przerzutowych komórek jelita grubego SW480 i SW620 w normoksji atmosferycznej, ale nie w hipoksji. Co ciekawe, jedynie w komórkach przerzutowych jelita grubego SW620 we wszystkich stężeniach tlenu w medium po hodowli nie była obecna L-Ser, co wskazywało na

większe zużycie aminokwasu przez ten rodzaj komórek. Produkcja mleczanu w komórkach hodowanych z L-Asp była bardzo wysoka w 10% tlenu w obu liniach komórkowych, z przewagą ilościową w linii pierwotnej. Wywnioskowaliśmy, że efekt Warburga jest bardziej nasilony w pierwotnych komórkach raka jelita grubego w porównaniu do przerzutowych. Ustaliliśmy również, że w obu liniach komórkowych w hipoksji mleczan powstaje głównie z glukozy, ale w 10% normoksji również z L-Asp w procesie glutaminolizy, a jego synteza jest większa w pierwotnej linii raka okrężnicy. Potwierdziliśmy, że hipoksja nie jest czynnikiem ograniczającym proliferację komórek. W tym aspekcie, angiogeneza ma na celu przywrócenie dostawy nie tylko tlenu, lecz także substancji odżywczych i jednocześnie ma za zadanie usuwać ze środowiska mleczan, który w wysokim stężeniu hamuje proliferację komórek nowotworowych. Udowodniliśmy również, że w szybko proliferujących komórkach wzrasta endogenna synteza jak również zużycie tych kluczowych aminokwasów nukleogennych. Ważną uwagą jest spostrzeżenie, że normoksja atmosferyczna obecna w hodowli komórkowej nigdy nie występuje w guzie, stąd konieczność jest prowadzenia badań na komórkach w warunkach hipoksji lub normoksji tkankowej.

- Skrzycki M, Czeczot H, **Chrzanowska A**, Otto-Ślusarczyk D. "The level of superoxide dismutase expression in primary and metastatic colorectal cancer cells in hypoxia and tissue normoxia." *Pol Merkur Lekarski*. 2015; 233:281–286.

Te ciekawe spostrzeżenia z poprzedniego badania były inspiracją do sprawdzenia, jak zmienne stężenie tlenu wpływa na izoenzymy (SOD1 i SOD2) dysmutazy nadadtlenkowej, kluczowego enzymu antyoksydacyjnego chroniącego komórki przed stresem oksydacyjnym, który to może indukować kancerogenezę. Układ badawczy stanowiły dwa rodzaje komórek nowotworowych jelita grubego: pierwotne (SW 480) i przerzutowe (SW 620) hodowane w trzech różnych stężeniach tlenu (1%, 10 % tlenu i 21%). Podobnie jak w poprzednim badaniu, liczba komórek była wyższa w warunkach niedotlenienia (1% tlenu) w porównaniu do normoksji tkankowej (10%). Zmienny profil ekspresji SOD1 i SOD2 w obu liniach komórkowych wskazywał na zróżnicowaną odpowiedź w zależności od dostępności tlenu. Najniższą ekspresję obu izoenzymów SOD obserwowaliśmy w warunkach hipoksji. Mimo niskiej ilości tlenu mitochondrialny łańcuch oddechowy jest nadal aktywny w komórkach nowotworowych i generuje wolne rodniki (RFT), jednak w mniejszym stopniu w porównaniu z normoksją atmosferyczną. Biorąc pod uwagę, że we wszystkich badanych stężeniach tlenu poziom ekspresji SOD1 jest wyższy w komórkach linii SW620 niż w SW480, może to sugerować adaptację komórek przerzutowych do ataku układu immunologicznego, na który są narażone podczas migracji i inwazji tkanek. W komórkach linii SW480 w warunkach normoksji atmosferycznej, poziom ekspresji obu izoenzymów SOD był niższy w porównaniu z linią SW620, a co za tym idzie zapewniał im słabszą obronę antyoksydacyjną, czego potwierdzeniem była zmniejszona liczba żywych komórek. Wywnioskowaliśmy, że ogromnie ważne jest utrzymanie na odpowiednim poziomie aktywności i regulacji ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, szczególnie izoenzymów dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1 i SOD2), a odmienny profil zmian ich ekspresji wskazuje na różne mechanizmy przystosowania komórek pierwotnych i przerzutowych do stresu oksydacyjnego.

- Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Barańczyk-Kuźma A. "Effect of antioxidants on human primary and metastatic colon cancer cells at hypoxia and normoxia." *Wiad. Lek.* 2017;70(5):946-952.

Kompensacja stresu oksydacyjnego przez komórki nowotworowe nasunęła pytanie o działanie antyoksydantów i sprawdzenie, czy będą one hamować proliferację i indukować apoptozę. Wykorzystaliśmy do tego celu naturalnie występujące antyoksydanty, w tym dwa

flawonoidy: kwercetynę i epigalusan epigallokatechiny (EGCG), ale również nasycony kwas tłuszczowy  $\alpha$ -liponowy (ALA) oraz kwas hydroksycytrynowy (HCA). Warto podkreślić, że związki te odgrywają istotną rolę w szlaku glikolizy i glutaminolizy. Wiadomym jest, że naturalne antyoksydanty spożywane w zbilansowanej diecie oraz ich suplementacja powoduje osiągnięcie we krwi stężeń o potwierdzonym działaniu profilaktycznym. Dlatego celem obecnej pracy była ocena działania wybranych antyoksydantów na proliferację i przeżywalność ludzkich komórek raka pierwotnego i przerzutowego jelita grubego w ilościach osiągalnych w surowicy krwi człowieka oraz poziomu tlenu występującego *in vivo*. Okazało się, że fizjologiczne stężenia badanych antyoksydantów nie wykazują cytotoksycznego działania na komórki pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego, a najsilniejsze działanie cytostaticzne wykazano w obecności mieszaniny badanych związków, co potwierdziło możliwość ich synergistycznego działania. W 1% hipoksji pod wpływem niższych stężeń EGCG i HCA uzyskano działanie cytostaticzne, natomiast w normoksji tkankowej jedynie pod wpływem EGCG. W normoksji atmosferycznej nie wykazaliśmy różnic istotnych statystycznie jedynie pod wpływem niższego stężenia HCA. Odmiennie rezultaty jakie otrzymaliśmy z hodowli prowadzonych w 10% i 21% stężeniu tlenu wskazują, że tlen jest istotnym czynnikiem, który musi być brany pod uwagę w badaniach wpływu antyoksydantów na komórki nowotworowe.

- Mielczarek-Puta M, Otto-Ślusarczyk D, **Chrzanowska A**, Filipek A, Graboń W. Telmisartan Influences the Antiproliferative Activity of Linoleic Acid in Human Colon Cancer Cells. *Nutr Cancer*. 2020;72(1):98-109. IF=2,9

Dążenie naszego zespołu do jak najwierniejszego odtworzenia warunków panujących *in vivo* w hodowlach komórkowych, zwróciło naszą uwagę na niefizjologiczne, sztuczne parametry jakie są utrzymywane w wyniku rutynowo stosowanych mediów hodowlanych pozbawionych egzogennych kwasów tłuszczowych (PUFA) (poza niskimi stężeniami pochodzącymi z FBS). Prowadzi to do syntezy lipidów niezawierających PUFA, co może skutkować mniejszą wrażliwością na peroksydację błon komórkowych i w rezultacie niedoszacowaniem działania cytotoksycznego związków generujących RFT w komórkach nowotworowych. Z tego względu badane komórki były hodowane z kwasem linolowym (LA) oraz palmitynowym i oleinowym – głównymi wolnymi kwasami tłuszczowymi osocza, w stężeniach odpowiadających występującym w środowisku nowotworu. Oprócz kwasu linolowego, który jest znanym agonistą receptora PPAR $\gamma$  o potencjale przeciwnowotworowym, podobne działanie, jako częściowy agonista tego receptora, wykazuje lek hipotensyjny telmisartan. Cytotoksyczny efekt LA został już odnotowany w różnych badaniach dla wysokich, nieosiągalnych fizjologicznie stężeń przy krótkim czasie hodowli. Jednak zasadą poprawnej suplementacji jest właśnie długi okres jego stosowania, a zatem i działania, natomiast czas standardowo prowadzonej hodowli komórkowej wynosi najczęściej od 24 do 72 godzin. W naszych badaniach postanowiliśmy ten czas wydłużyć do 8 tygodni, żeby obserwować długotrwałe działanie obu związków. Okazało się, że fizjologiczne stężenie LA (20  $\mu$ M) nie miało wpływu ani na wzrost, ani żywotność zarówno komórek raka okrężnicy, jak i prawidłowych keratynocytów, natomiast LA w stężeniach osiągalnych w surowicy krwi przy intensywnej suplementacji (60  $\mu$ M) wpływał cytotoksycznie wyłącznie na komórki nowotworowe. Z kolei telmisartan w stężeniu farmakologicznym (0,2  $\mu$ M) nie zmniejszał żywotności komórek SW480 jak i SW620. Zaskakujący był fakt, że krótkoterminowe podawanie skojarzone telmisartanu i LA chroniło komórki nowotworowe przed cytotoksycznym działaniem LA w stężeniu 60  $\mu$ M. Natomiast długotrwałe podawanie 60  $\mu$ M LA zmniejszało żywotność komórek nowotworowych już po tygodniu, podczas gdy telmisartan opóźniał wystąpienie tego efektu do ponad dwóch tygodni. Tak więc nie zaobserwowaliśmy spodziewanego, synergistycznego działania LA i telmisartanu jako agonistów receptora

PPARgamma. Różne dane literaturowe donoszą jednak o dwuznacznym działaniu receptora, który w zależności od czynników fizjologicznych i osobniczych może funkcjonować jako supresor lub onkogen. Te sprzeczne dane wskazują na potrzebę dodatkowych badań mające na celu określenie roli PPARgamma w nowotworach. Podsumowując, nasze badania pokazują, że nie ma korzyści klinicznych z jednoczesnego podawania telmisartanu i LA, ale jednocześnie potwierdzają działanie cytotoksyczne kwasu linolowego pod warunkiem prowadzenia długotrwałej i intensywnej suplementacji.

Sama praca była również impulsem do zainteresowania się kwasami tłuszczowymi, a niektóre z nich jak wiadomo są chętnie pobierane przez komórki nowotworowe. Kwasy te w istotny sposób wpływają na fizykochemiczne właściwości błon komórkowych. Na bazie tych ustaleń powstał pomysł modyfikacji chemioterapeutyków przez koniugowanie właśnie z kwasami tłuszczowymi, który stał się tematem przewodnim mojego cyklu habilitacyjnego.

Obecnie poszukiwanie możliwości monitorowania hodowli komórkowych pod kątem ich żywotności, cytotoksyczności, adhezji, morfologii, a także zmieniających się warunków metabolicznych zapoczątkowały współpracę z zespołem dr hab. Mateusza Śmietany z Politechniki Warszawskiej oraz lek. Krzysztofem Bartnikiem z II Zakładu Radiologii WUM. Projekt ten skupia się nad wykorzystaniem sensorów światłowodowych nowej generacji do bezznacznikowego monitorowania komórek w czasie rzeczywistym, co może dostarczać informacji na temat zmian w metabolizmie niemożliwych do uchwycenia podczas rutynowo prowadzonej hodowli. Ten rodzaj czujników ma istotną przewagę nad obecnie wykorzystywanymi rozwiązaniami, ze względu na ocenę w czasie rzeczywistym, miniaturowe rozmiary sensora, bezznacznikowy pomiar, niewrażliwość na czynniki zakłócające (np. promieniowanie jonizujące) czy też pasywny charakter pomiaru.

W roku 2012 nasza Katedra i Zakład Biochemii połączyły się z Zakładem Chemii Medycznej WUM tym samym zyskując ogromny materiał do badań, gdyż prężnie rozwijająca się chemia medyczna dostarcza ciekawych związków, które w zależności od budowy czy też modyfikacji zyskują aktywność biologiczną, wykorzystywaną w terapiach różnych chorób. Ze względu na zakres moich wcześniejszych badań zostałam zaproszona do współpracy z różnymi ośrodkami naukowymi, gdzie mogłam zaplanować i zrealizować przesiewowe badania cytotoksyczności nowo zsyntetyzowanych związków, a dla najbardziej bioaktywnych przedstawicieli badanej grupy dokonać analizy mechanizmów działania przeciwnowotworowego. Pierwszą grupą związków były pochodne tiomocznika, który jest strukturą o dużym potencjale i wielokierunkowej aktywności, a jego pochodne są również postrzegane jako jedne z najbardziej obiecujących klas leków przeciwnowotworowych. Badania nad ich pochodnymi zostały opublikowane w sześciu kolejnych pracach, a najistotniejsze cele i wnioski zostały przedstawione poniżej.

- Bielenica A, Sanna G, Madeddu S, Giliberti G, Stefańska J, Kozioł A, Savchenko O, Strzyga-Łach P, **Chrzanowska A**, Kubiak-Tomaszewska G, Struga M. Disubstituted 4-chloro-3-nitrophenylthiourea Derivatives: Antimicrobial and Cytotoxic Studies. *Molecules*. 2018; 23(10):1-18. IF=3,06

Tiomocznikowe pochodne 1,2,4-triazolu zostały opisane jako substancje cytotoksyczne i indukujące apoptozę. Wprowadzenie dodatkowego podstawnika o wysokiej elektrojemności, takiego jak atom halogenu, miało zwiększyć bioaktywność dipodstawionej pochodnej. Dlatego zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane pochodne 4-chloro-3-nitrofenylotiomocznika i dla tej grupy ustaliliśmy profil cytotoksyczności zarówno w stosunku do komórek bakteryjnych, jak i nowotworowych. Większość z tych związków wykazywała silną lub umiarkowaną aktywność

przeciwdrobnoustrojową, a reprezentatywne arylo-tiomoczniki były nawet bardziej aktywne wobec wybranych klinicznych szczepów gronkowców niż referencyjna cyprofloksacyna. W celu uzupełnienia profilu biologicznego nowo zsyntetyzowanej serii tiomoczników oceniono ich aktywność przeciwwirusową w komórkach MT-4, a także cytotoksyczną w ludzkich liniach komórek białaczkowych i guzów litych: czerniaka i prostaty. Wyselekcjonowane związki okazały się cytotoksyczne w niskim zakresie stężeń rzędu poniżej  $<10 \mu\text{M}$  (CC50). Przeprowadzone badania na linii komórkowej ludzkich keratynocytów (HaCaT), wykazały, że są one umiarkowanie selektywne, dlatego wymagają szerszych i bardziej zaawansowanych badań w kierunku bezpieczeństwa ich stosowania.

- Szulczyk D, Bielenica A, Głogowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Dobrowolski M, Roszkowski P, Stępień K, **Chrzanowska A**, Struga M. Development of (4-methoxyphenyl) -1H-tetrazol-5-amine regioisomers as a new class of selective antitubercular agents. *Eur J Med Chem.* 2020;186:1-14. IF=6,514

Kolejne modyfikacje tiomocznika to szereg fluorowcowanych regioizomerów (4-metoksyfenylo) -1H-tetrazolo-5-aminy (1a-9a, 1b-9b) które zsyntetyzowano z ich odpowiednich analogów, a które okazały się selektywnie aktywne wobec prątków gruźlicy. Największy potencjał terapeutyczny należał do izomerycznych N-(bromofenylo) tetrazoli, które działały 8-16 razy silniej na wielolekooporne szczepy *Mycobacterium tuberculosis Spec. 210*, niż leki pierwszego wyboru w schemacie leczenia gruźlicy. Badania mogły być wykonane dzięki współpracy z zespołem Prof. dr hab. Ewy Augustynowicz-Kopeć z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Stwierdzono synergistyczne oddziaływanie między wyselekcjonowanym związkiem 9a a streptomycyną, a także addytywność obu 8a i 9a w parach z izoniazydem, ryfampicyną i etambutolem. Żaden z badanych związków nie wykazywał właściwości antybakteryjnych ani cytotoksycznych w stosunku do normalnych i nowotworowych linii komórkowych, co wskazywało na ich wysoce selektywne działanie przeciwprątkowe.

- Strzyga-Łach P, **Chrzanowska A**, Podsadni K, Bielenica A. Investigation of the Mechanisms of Cytotoxic Activity of 1,3-Disubstituted Thiourea Derivatives. *Pharmaceuticals.* 2021;14(11):1-17. IF=5,863

Jedną z najbardziej pożądanых strategii w dziedzinie projektowania leków jest połączenie dwóch bioaktywnych części. Szkielet (tio)mocznika jest składnikiem kilku leków o profilach przeciwnowotworowych, takich jak sorafenib natomiast (hetero)arylowe końcowe fragmenty ugrupowania tiomocznika, wzbogacone podstawnikami elektroujemnymi, mogą zapewniać różnorodną odpowiedź biologiczną m.in. przeciwutleniającą, cytotoksyczną czy też przeciwzapalną. Wydawało się, że zmodyfikowanie szkieletu (trifluorometylo) fenylo-tiomocznika grupami terminalnymi wyciągającymi elektrony zwiększy ich właściwości cytotoksyczne. Celem wybrania najbardziej atrakcyjnych przeciwnowotworowo związków i wyjaśnienia mechanizmu tej aktywności, zaplanowaliśmy zbadanie ich na komórkach białaczki K-562 oraz raka jelita grubego (SW480, SW620) i prostaty (PC3). Analiza wyników wykazała, że wybrane dihalogenofenylo- i para-podstawione tiomoczniki były wysoce cytotoksyczne i selektywne w stosunku do patologicznych linii komórkowych ( $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ ) w porównaniu do referencyjnej cisplatyny. Identyfikacja mechanizmów działania cytotoksycznego *in vitro* najbardziej bioaktywnych związków wykazała najsilniejszy efekt aktywujący późną apoptozę w liniach komórkowych SW480, SW620 i co jest rzadką, a tym samym pożądaną cechą antynowotworowych związków, w komórkach białaczki K-562. Najmniej wrażliwa na badane

związki okazała się linia komórkowa raka prostaty PC-3. Testowane pochodne wykazały również aktywność blokującą wydzielanie prozapalnej i uczestniczącej w progresji nowotworu interleukiny IL-6 w pierwotnych i wtórnych komórkach raka okrężnicy. Wysoka bioaktywność zaobserwowana po modyfikacji strukturalnej końcowych ugrupowań tiomocznika wyłoniła dihalogenofenyłową pochodną, jej izomer i para-podstawiony analog jako związki z dużym potencjałem przeciwnowotworowym, które zostały zakwalifikowane do bardziej zaawansowanych badań biologicznych.

- Drzewiecka-Antonik A, Rejmak P, Klepka M, Wolska A, **Chrzanowska A**, Struga M. Structure and anticancer activity of Cu (II) complexes with (bromophenyl)thiourea moiety attached to the polycyclic imide. *J Inorg Biochem.* 2020;212:1-14. IF=4,155

Ciekawym połączeniem, które może stanowić alternatywę dla wysoce skutecznych, ale i też bardzo toksycznych leków na bazie platyny jest miedź, która jako fizjologicznie istotny, endogeny metal jest kluczowym składnikiem wielu enzymów i białek. Wykazano, że miedź odgrywa również wyjątkową rolę w angiogenezie, która jest procesem krytycznym dla wzrostu i przerzutowania guza. Współpraca z dr Aleksandrą Drzewiecką-Antonik z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie, przyniosła kolejną grupę bioaktywnych związków. Opisane już wcześniej pochodne tiomocznika posiadają również inne właściwości, otóż mogą działać jako silne chelatory metali, co zostało wykorzystane przy projektowaniu kompleksów. Wykorzystaliśmy w naszych badaniach znany fakt, że aktywność biologiczna kompleksów miedzi z tiomocznikiem może być wyższa niż macierzystych ligandów i skupiliśmy się na ocenie działania przeciwnowotworowego kompleksów Cu (II) i (bromofenyl)tiomocznika przyłączonego do różnych cyklicznych imidów. Nowe kompleksy wraz z dwoma dobrze znanymi chemoterapeutykami: cisplatyną i doksorubicyną zostały ocenione pod kątem działania cytotoksycznego na pierwotnych i wtórnych nowotworach okrężnicy SW480 i SW620 oraz gruczołu krokowego (PC3) jak i również na prawidłowej linii komórkowej – HaCaT. Zaobserwowaliśmy, że kompleksy Cu (II) nie tylko zmniejszają tempo proliferacji komórek nowotworowych, ale także obniżają ich żywotność, co potwierdza ich cytotoksyczne działanie. Dwa wyselekcjonowane, najskuteczniejsze kompleksy indukowały późną apoptozę głównie w komórkach SW480, ale również w komórkach PC3. Uzyskane przez nas dane wskazały również, że jeden z możliwych mechanizmów tłumiących rozwój nowotworu może wynikać z redukcji uwalniania IL-6, która była najbardziej wyeksponowana w przypadku linii komórkowej raka prostaty. Wszystkie te wyniki sugerują, że Cu (II) tworzy kompleksy z bromofenylem przyłączonym do ugrupowania tiomocznika, utrzymując optymalną geometrię, zarówno w stanie stałym jak i w roztworze DMSO/H<sub>2</sub>O wykorzystanym do badań komórkowych co daje solidne podstawy w kierunku opracowania nowych skutecznych leków w leczeniu raka okrężnicy i prostaty.

- **Chrzanowska A**, Drzewiecka-Antonik A, Dobrzyńska K, Stefańska J, Pietrzyk P, Struga M, Bielenica A. The Cytotoxic Effect of Copper (II) Complexes with Halogenated 1,3-Disubstituted Arylthioureas on Cancer and Bacterial Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21): 1-25. IF=5,924

Obiecujące wyniki jakie otrzymaliśmy badając kompleksy Cu (II) były inspiracją do zaprojektowania i zsyntetyzowania serii chelatów miedzi (II) z 3-(4-chloro-3-nitrofenyl)tiomocznikiem. W celu porównania uzyskanych wyników układ badawczy z trzema liniami patologicznymi (SW480, SW620, PC3) i jedną kontrolną (HaCaT) pozostał taki sam. Rozszerzyliśmy jednak zakres badań ze względu na ciekawe doniesienia dotyczące regulującego wpływu kompleksów organicznych z metalami na poziom ROS, który to może

indukować autofagię i/lub apoptozę. Chcieliśmy również sprawdzić czy uzyskane właściwości cytotoksyczne będą też zachowane w stosunku do komórek bakteryjnych. Oba testy cytotoksyczności MTT oraz LDH dały spójne wyniki. Wybrane kompleksy były cytotoksyczne dla badanych komórek nowotworowych w niskim zakresie mikromolarnym i uwalniały dehydrogenazę mleczanową we wszystkich badanych liniach komórek nowotworowych, ale pozostawały nietoksyczne dla komórek prawidłowych. Również testy genotoksyczności potwierdziły bezpieczeństwo stosowania kompleksów. Nowo zsyntetyzowane, wyselekcjonowane chelaty wprowadzały komórki nowotworowe, a zwłaszcza komórki SW480 i PC3 w stan wczesnej apoptozy. Dodatkową ich zaletą było zahamowanie sekrecji znanej cytokiny prozapalnej IL-6, której stężenie po zastosowaniu wyselekcjonowanych kompleksów spadało nawet dwukrotnie, co dawało wynik lepszy od referencyjnej doksorubicyny. Poprowadziliśmy również pionierskie badania wpływu najbardziej obiecujących kompleksów Cu (II) na intensywność detoksykacji ROS przez białka enzymatyczne komórek nowotworowych takich jak: transferaza i reduktaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa czy też peroksyredoksyny. Nasze wstępne badania wykazały ogólną tendencję badanych związków do zaburzania systemów antyoksydacyjnych i detoksykujących w komórkach nowotworowych. Sugeruje to, że może to być jeden z mechanizmów cytotoksyczności. Wykazaliśmy również działanie cytotoksyczne wszystkich koniugatów miedzi (II) na standardowe i szpitalne szczepy bakteryjne. Aktywność antybakteryjna większości z nich była umiarkowana, ale znalazły się wśród nich również związki o potencjale przeciwoznaczonym, 64 razy silniejszym w porównaniu z antybiotykiem referencyjnym, cyprofloksacyną.

W ramach naszych badań nad opracowaniem biologicznie aktywnych 1,3-dipodstawionych tiomoczników zaobserwowaliśmy ich właściwości cytotoksyczne, prooksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe. Ważnym aspektem naszych badań jest to, że wykazany tłumiący wpływ na obronę antyoksydacyjną komórek nowotworowych może wspomagać działanie innych czynników prooksydacyjnych, w tym w procesie lekooporności, jak również wspomagać leczenie radioterapią.

Ostatnią, najnowszą pracą dotyczącą kompleksów Cu (II) jest publikacja:

- Drzewiecka-Antonik A, Struga M, Głogowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Dobrzyńska K, **Chrzanowska A**, Wolska A, Rejmak P, Klepka M, Wrzosek M, Bielenica A. Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity Evaluation of Novel Cu (II) Complexes with 3 (trifluoromethyl)phenylthiourea Derivatives. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):1-19. IF=6,208

Zsyntetyzowano kompleksy miedzi z 1,3-dipodstawionymi pochodnymi tiomocznika, z których wszystkie zawierały podstawniki 3-(trifluorometylo)fenylowy z podstawnikiem alkilo- lub halogenofenylowym. Kolejnym etapem było zbadanie potencjału przeciwbakteryjnego nowo zsyntetyzowanych kompleksów na panelu standardowych i klinicznych szczepów bakteryjnych, a także prątków. Dimeryczne halogenopochodne wykazywały wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z kompleksami alkilofenylotiomocznika, a wśród nich jeden był aktywny wobec 19 szczepów gronkowców opornych na metycylinę (MIC = 2 µg/ml). Dodatkowo kompleksy halogenofenylotiomocznika silnie hamowały wzrost prątków izolowanych od pacjentów z gruźlicą, nawet czterokrotnie silniej niż referencyjny izoniazyd. Celem wyjaśnienia mechanizmu aktywności przeciwbakteryjnej, zaplanowano zbadanie wpływu jednego z najsilniejszych kompleksów na dwa kluczowe enzymy bakteryjne: topoizomerazę IV i gyrazę DNA. Pochodna ta działała jako podwójny inhibitor obu enzymów wyizolowanych ze *Staphylococcus aureus*. Ponadto



określiłiśmy działanie cytotoksyczne pochodnych tiomocznika wobec komórek nowotworowych i prawidłowych keratynocytów. Okazało się, że związki są selektywne wobec komórek bakteryjnych, gdyż badania cytotoksyczności prowadzone na komórkach nowotworowych wykazywały słabą lub umiarkowaną aktywność cytotoksyczną (w kierunku SW480, SW620 i PC3), jednocześnie pozostając bezpieczne w stosunku do zdrowych komórek HaCaT.

Zupełnie odmienną grupę bioaktywnych związków przyniosła współpraca z zespołem dr hab. Anny Więckowskiej z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ Collegium Medicum w Krakowie. Projekt badań dotyczył bezpieczeństwa stosowania nowo opracowanej serii związków pochodnych 5-arylidenuhydantoiny z fragmentem arylpiperazyiny.

- Czopek A, Bucki A, Kołaczkowski M, Zagórska A, Drop M, Pawłowski M, Siwek A, Głuch-Lutwin M, Pękala E, **Chrzanowska A**, Struga M, Partyka A, Wesołowska A. Novel multitarget 5-arylidenehydantoin with arylpiperazinealkyl fragment: Pharmacological evaluation and investigation of cytotoxicity and metabolic stability. *Bioorg Med Chem.* 2019;27(18):4163-4173. IF=3,073

Badania receptorowe wyselekcjonowanych związków wykazały bardzo wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT1A i 5-HT7 w badaniach *in vitro* i *in silico*, a badania cytotoksyczności w teście MTT potwierdziły niską aktywność w stosunku do prawidłowych keratynocytów.

Mój dorobek naukowy zawiera również prace poglądowe, które okazały się nowatorskie i były/są chętnie wykorzystywane i cytowane przez inne ośrodki naukowe.

Pierwsza z nich dotyczyła nośnego i przyszłościowego tematu w świecie naukowym, mianowicie egzosomów i procesu angiogenezy.

- Olejarsz W, Kubiak-Tomaszewska G, **Chrzanowska A**, Lorenc T. Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16):1-25. IF=5,924

Ilość cytowań wg bazy WoS/Scopus na dzień 2.03.23 r – **63/65**

Wiadomym jest, że nadmierna i nieprawidłowa angiogeneza odgrywa kluczową rolę w progresji nowotworu, a komórki nowotworowe wykorzystują różne strategie komunikowania się z sąsiednimi tkankami m.in. przez sekrecję egzosomów, które mogą zawierać „ładunki” takie jak mikroRNA, fragmenty DNA, białka czy też lipidy. Związki te mogą przyspieszać proces angiogenezy czy też osłabiać odpowiedź immunologiczną, tym samym odgrywając strategiczną rolę w inwazyjności raka. Istnieją dowody na to, że niekodujące RNA, zwłaszcza długie niekodujące RNA (lncRNA) i mikroRNA, mogą regulować angiogenezę. Wychwyt egzosomów pochodzenia nowotworowego (TEX) przez normalne komórki śródbłonna, aktywuje angiogenne szlaki sygnałowe i stymuluje tworzenie nowych naczyń. Od czasu wprowadzenia pierwszego inhibitora angiogenezy, bewacyzumabu w leczeniu przerzutowym raka jelita grubego, ingerencja w proces angiogenezy stała się atrakcyjnym celem w terapii antynowotworowej. W naszej pracy przeglądowej omawiamy na jakie pułapki jesteśmy narażeni wdrażając strategie antyangiogenne. Wynikają one z potencjalnego zaangażowania zbyt wielu czynników proangiogennych, ale też modulujących efektów komórek układu odpornościowego. Lepsze zrozumienie wzajemnego oddziaływania między komórkami nowotworowymi, komórkami śródbłonna i komórkami odpornościowymi podczas terapii celowanej w punkty kontrolne układu odpornościowego, może prowadzić do

nowych schematów leczenia skojarzonego. Duże znaczenie będzie miała tutaj specyfikacja składu egzosomów, która może również posłużyć jako skuteczna strategia zwiększania długoterminowej skuteczności terapii antyangiogennych. W celu przewidywania możliwych punktów uchwytu dla miRNA, mRNA i białek przy użyciu zasobów baz danych (analiza *in silico*) i wyjaśnienia mechanizmów molekularnych, dzięki którym egzosomalne „ładunki” hamują angiogenezę w komórkach śródbłonna czy też prowadzą do lekooporności, będzie można korygować leki wykorzystywane w terapii antynowotworowej. Ważnym aspektem tych badań jest też znaczenie kliniczne egzosomów u pacjentów z nowotworem, gdyż pomimo dość intensywnych badań potrzebna jest ciągle walidacja na większej grupie badanej. Reasumując, połączone strategie oparte na immunoterapii i inhibitorach angiogenezy mogą być wykorzystywane w leczeniu nowotworów, ale ich skuteczność wymaga dalszych badań.

Czas pandemii podsunął kolejny temat, jakim było poszukiwanie możliwości walki z koronawirusem zespołu ostrej niewydolności oddechowej (SARS – COV-2). Publikacja ta ukazała się na łamach czasopisma *Phytotherapy Research* i od razu zdobyła ogromną popularność, a także jest bardzo chętnie cytowana (36 cytacji na dzień 2.03.23). Na bazie tej publikacji planowaliśmy również opracowanie składu wyrobu medycznego zawierającego także inne składniki, które miały na celu zaburzenie różnych etapów infekcji wirusowej od wnikania poprzez replikację i namnażanie. Oryginalnym pomysłem była droga podania preparatu, gdyż miało to być działanie miejscowe w błonie śluzowej jamy nosowej i ustnej.

- Chrzanowski J, **Chrzanowska A**, Graboń W. Glycyrrhizin: An old weapon against a novel coronavirus. *Phytother Res.* 2021;35(2):629-636. IF=5,882

Ze względu na duże podobieństwo w budowie i genomie SARS-CoV i SARS-CoV-2, spośród różnych związków pochodzenia naturalnego, których skuteczność została już potwierdzona w czasie epidemii w 2003 roku w Chinach wywołanej SARS-CoV, wybraliśmy glicyryzynę (GZ), która jest saponiną obecną w korzeniu lukrecji. GZ wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez zmniejszenie produkcji prostaglandyny E<sub>2</sub>, TNF-alfa i wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) oraz zmniejszenie ekspresji cyklooksygenazy-2. Ze względu na podobieństwo budowy chemicznej do hormonów steroidowych hamuje również fosfolipazę A<sub>2</sub>. Znana jest też jej aktywność przeciwwirusowa wobec rodziny Flawirusów, a także HIV, HBV, HCV, HPV i wirusa grypy. Jej działanie antywirusowe jest wielopoziomowe, bo jak wiadomo, może ona indukować produkcję tlenu azotu w makrofagach, wpływać na czynniki transkrypcyjne (czynnik jądrowy NF-κB, białko aktywatorowe-1) i szlaki sygnałowe (kinaza kazeiny II, kinaza białkowa C). Ponadto GZ posiada właściwości amfifilne i może bezpośrednio wpływać na dwuwarstwową błonę wirusową i co najważniejsze, wiąże się z receptorem ACE2, główną drogą wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórki. Wysoką ekspresję ACE2 potwierdzono w drogach oddechowych, a niezależne badania wykazały, że w jamie nosowej występuje większe miano wirusa SARS-CoV-2 niż w jamie ustnej. Odkrycia te sugerują, że zastosowanie wirusobójczych właściwości GZ miejscowo w jamie nosowej może być korzystne i mogłoby zmniejszyć potencjał zakaźny zarówno u pacjentów objawowych, jak i bezobjawowych. Badania kliniczne prowadzone na pacjentach leczonych GZ podczas epidemii w 2003 roku wykazały, że objawy suchego kaszlu, dyskomfortu w klatce piersiowej i duszności ustąpiły stosunkowo szybko, a ponadto średni czas do pojawienia się przeciwciał swoistych dla SARS-CoV oraz hospitalizacji uległy skróceniu. Podsumowując dystrybucja receptora ACE2 w organizmie człowieka oraz udokumentowane wiązanie GZ z tym receptorem, a także jej różnorodna aktywność przeciwwirusowa sugerują, że GZ jest dobrym kandydatem do stosowania w prewencji i terapii COVID-19.

Najnowsza praca poglądowa jest kontynuacją moich dotychczasowych, wiodących badań dotyczących fluorochinolonów.

- Jałbrzykowska K, **Chrzanowska A**, Roszkowski P, Struga M. The New Face of a Well-known Antibiotic. A Review of Anticancer Activity of Enoxacin and its Derivatives. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13):1-23. IF=6,639

Poza CXP i MXF ciekawe właściwości bioaktywne ma również inny fluorochinolon II generacji – enoksacyna (ENX), która może regulować biogenezę miRNA. Ze względu na to, że moja przyszła praca badawcza ma być związana z egzosomami i indukowaniem komórek do produkcji i sekrecji odpowiednich rodzajów miRNA o właściwościach antynowotworowych, stąd pomysł opisanie szczególnych właściwości cytotoksycznych enoksacyny, które wyróżniają ją spośród innych fluorochinolonów. ENX ma potencjał do regulacji biogenezy miRNA poprzez interferowanie z białkiem PIWIL3 lub helikazą DHX9, częścią kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (RISC), a także z białkami kompleksu ładującego DICER i TRBP. Dodatkowo wpływa ona również na apoptozę, cykl komórkowy i proliferację i posiada właściwości prooksydacyjne, które wzmacniają jej działanie cytotoksyczne. W publikacji opisaliśmy również modyfikacje leku macierzystego, które silnie indukowały stres oksydacyjny, blokowały cykl komórkowy i zakłócały biosyntezę miRNA. Zaobserwowano również pod ich wpływem hamowanie wiązania V-ATPazy z mikrofilamentem. Reasumując, wydaje się nam, że ENX jest niedocenianym lekiem przeciwnowotworowym o działaniu plejotropowym. Ponadto zastosowanie tak szeroko przebadanego chemoterapeutyku, o dobrze znanej farmakokinetyce i selektywności może przyczynić się do szybszego jej wykorzystania w strategii leczenia przeciwnowotworowego.

Niektóre związki wykorzystywane w leczeniu mają właściwości regulujące syntezę miRNA, który transportowany w egzosomach może wpływać na sąsiadujące lub nawet odległe komórki. Dlatego jednym z projektów jaki został zaplanowany na najbliższy rok, jest rozpoczęcie hodowli komórkowej 3D w celu zwiększenia efektywności produkcji egzosomów, a także możliwości prowadzenia ko-kultur komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi. Pozwoli to na określenie regulującego działania wyselekcjonowanych, bioaktywnych związków na sekrecję miRNA i tym samym ich wpływu na metabolizm komórek nowotworowych i zdrowych.

## 8. Piśmiennictwo

1. Siegel, R.L., et al., *Cancer Statistics, 2021*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(1): p. 7-33.
2. Saraon, P., et al., *Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer*. EJIFCC, 2014. **25**(1): p. 42-54.
3. Bian, X., et al., *Lipid metabolism and cancer*. J Exp Med, 2021. **218**(1).
4. Butler, L.M., et al., *Lipidomic Profiling of Clinical Prostate Cancer Reveals Targetable Alterations in Membrane Lipid Composition*. Cancer Res, 2021. **81**(19): p. 4981-4993.
5. Snaebjornsson, M.T., S. Janaki-Raman, and A. Schulze, *Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer*. Cell Metab, 2020. **31**(1): p. 62-76.
6. Gonzalez-Fierro, A. and A. Duenas-Gonzalez, *Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done*. Semin Cancer Biol, 2021. **68**: p. 123-131.
7. Jia, Y. and L. Zhao, *The antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives: An update (2018-2021)*. Eur J Med Chem, 2021. **224**: p. 113741.
8. Majalekar, P.P. and P.J. Shirote, *Fluoroquinolones: Blessings Or Curses*. Curr Drug Targets, 2020. **21**(13): p. 1354-1370.

9. Hangas, A., et al., *Ciprofloxacin impairs mitochondrial DNA replication initiation through inhibition of Topoisomerase 2*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(18): p. 9625-9636.
10. Yadav, V. and P. Talwar, *Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth*. Biomed Pharmacother, 2019. **111**: p. 934-946.
11. Kustrimovic, N., et al., *Microbiome and Prostate Cancer: A Novel Target for Prevention and Treatment*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(2).
12. Wang, X., et al., *Efficacy of Moxifloxacin plus Treatment of Physician's Choice in Patients with Metastatic Breast Cancer*. Oncologist, 2020. **25**(10): p. e1439-e1445.
13. Jozwiak, M., et al., *Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives*. Eur J Pharmacol, 2020. **871**: p. 172937.
14. Zaro, J.L., *Lipid-based drug carriers for prodrugs to enhance drug delivery*. AAPS J, 2015. **17**(1): p. 83-92.
15. Liang, C.H., et al., *Synthesis of doxorubicin alpha-linolenic acid conjugate and evaluation of its antitumor activity*. Mol Pharm, 2014. **11**(5): p. 1378-90.
16. Simplicio, A.L., J.M. Clancy, and J.F. Gilmer, *Prodrugs for amines*. Molecules, 2008. **13**(3): p. 519-47.
17. Duhem, N., et al., *Self-assembling doxorubicin-tocopherol succinate prodrug as a new drug delivery system: synthesis, characterization, and in vitro and in vivo anticancer activity*. Bioconj Chem, 2014. **25**(1): p. 72-81.
18. Siddiqui, R.A., et al., *Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects*. Biofactors, 2011. **37**(6): p. 399-412.
19. Xu, Y. and S.Y. Qian, *Anti-cancer activities of omega-6 polyunsaturated fatty acids*. Biomed J, 2014. **37**(3): p. 112-9.
20. Carrillo, C., M. Cavia Mdel, and S.R. Alonso-Torre, *Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review*. Nutr Hosp, 2012. **27**(6): p. 1860-5.
21. Nguyen, D.P., J. Li, and A.K. Tewari, *Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6)*. BJU Int, 2014. **113**(6): p. 986-92.
22. Aranha, O., et al., *Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis*. Int J Oncol, 2003. **22**(4): p. 787-94.
23. Herold, C., et al., *Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells*. Br J Cancer, 2002. **86**(3): p. 443-8.
24. Breistol, K., et al., *Antitumor activity of P-4055 (elaidic acid-cytarabine) compared to cytarabine in metastatic and s.c. human tumor xenograft models*. Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2944-9.
25. Zhao, S., et al., *Doxorubicin hydrochloride-oleic acid conjugate loaded nanostructured lipid carriers for tumor specific drug release*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **145**: p. 95-103.
26. Kaighn, M.E., et al., *Prostate carcinoma: tissue culture cell lines*. Natl Cancer Inst Monogr, 1978(49): p. 17-21.
27. Stone, K.R., et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. Int J Cancer, 1978. **21**(3): p. 274-81.
28. Horoszewicz, J.S., et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. Cancer Res, 1983. **43**(4): p. 1809-18.
29. Zekovic, M., et al., *Alteration of Lipid Metabolism in Prostate Cancer: Multifaceted Oncologic Implications*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(2).
30. Naeem, A.A., et al., *Fatty acid-binding protein 5 (FABP5)-related signal transduction pathway in castration-resistant prostate cancer cells: a potential therapeutic target*. Precis Clin Med, 2019. **2**(3): p. 192-196.
31. Coleman, J.A., F. Quazi, and R.S. Molday, *Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 555-74.
32. Cruz, P.M., et al., *The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 119.
33. Thompson, T.C., et al., *The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. **13**(1): p. 6-11.

34. Galbraith, L., H.Y. Leung, and I. Ahmad, *Lipid pathway deregulation in advanced prostate cancer*. *Pharmacol Res*, 2018. **131**: p. 177-184.
35. Zhou, L., et al., *ACSS3 represses prostate cancer progression through downregulating lipid droplet-associated protein PLIN3*. *Theranostics*, 2021. **11**(2): p. 841-860.
36. Fan, J., et al., *Tetrameric Acetyl-CoA Acetyltransferase 1 Is Important for Tumor Growth*. *Mol Cell*, 2016. **64**(5): p. 859-874.
37. Nassar, Z.D., et al., *Human DECR1 is an androgen-repressed survival factor that regulates PUFA oxidation to protect prostate tumor cells from ferroptosis*. *Elife*, 2020. **9**.
38. Pham, T.D.M., Z.M. Ziora, and M.A.T. Blaskovich, *Quinolone antibiotics*. *Medchemcomm*, 2019. **10**(10): p. 1719-1739.
39. Peloquin, C.A. and G.R. Davies, *The Treatment of Tuberculosis*. *Clin Pharmacol Ther*, 2021. **110**(6): p. 1455-1466.
40. Desbois, A.P. and V.J. Smith, *Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. **85**(6): p. 1629-42.
41. Fabian, I., et al., *Moxifloxacin enhances antiproliferative and apoptotic effects of etoposide but inhibits its proinflammatory effects in THP-1 and Jurkat cells*. *Br J Cancer*, 2006. **95**(8): p. 1038-46.
42. Yadav, V., et al., *Moxifloxacin and ciprofloxacin induces S-phase arrest and augments apoptotic effects of cisplatin in human pancreatic cancer cells via ERK activation*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 581.
43. Jin, R.J., et al., *The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth*. *Cancer Res*, 2008. **68**(16): p. 6762-9.
44. Johnson, A.M., E.K. Kleczko, and R.A. Nemenoff, *Eicosanoids in Cancer: New Roles in Immunoregulation*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 595498.
45. Mahbub, A.A., *Therapeutic Strategies and Potential Actions of Female Sex Steroid Hormones and Their Receptors in Colon Cancer Based on Preclinical Studies*. *Life (Basel)*, 2022. **12**(4).
46. Chen, R., Y. Yu, and X. Dong, *Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017. **166**: p. 91-96.
47. Tatsuguchi, T., et al., *Cancer-derived cholesterol sulfate is a key mediator to prevent tumor infiltration by effector T cells*. *Int Immunol*, 2022. **34**(5): p. 277-289.
48. Siemann, D.W. and M.R. Horsman, *Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy*. *Pharmacol Ther*, 2015. **153**: p. 107-24.
49. Altman, B.J., Z.E. Stine, and C.V. Dang, *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(10): p. 619-34.

## 9. Pozostałe publikacje oryginalne i poglądowe

- Ashamiss F, Wierzbicki Z, **Chrzanowska A**, Ścibior D, Pacholczyk M, Kosieradzki M, Łągiewska B, Porembska Z, Rowiński W. Clinical Significance of Arginase after Liver Transplantation. *Ann Transplant*. 2004;9:58-60.
- Grodzicki M, Pawlak J, **Chrzanowska A**, Porembska Z, Krawczyk M. Arginase Activity Concentration Marking in Monitoring of Hepatocytes Function After Orthotopic Liver Transplantation- Preliminary Report. *Ann Transplant*. 2004;9:54-57.
- Porembska Z, Skwarek A, Chrzanowska A, Mielczarek M, Nyckowski P, Barańczyk-Kuźma A. Arginaza jako marker procesu nowotworowego. III. Porównanie aktywności arginazy z CEA i Ca 19-9 w przerzutach raka jelita grubego do wątroby. *Pol Merk Lekarski*. 2004;16(91):31-33.
- Mielczarek-Putka M, **Chrzanowska A**, Barańczyk-Kuźma A. New insights into arginase. Part I. Structure and characteristics. *Postępy Hig Med Dosw*. 2008;62:206-213

- Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Graboń W, Barańczyk-Kuźma A. New insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology. *Postępy Hig Med Dosw.* 2008;62:214-2.
- Graboń W, Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Barańczyk-Kuźma A. L-arginine as a factor increasing arginase significance in diagnosis of primary and metastatic colorectal cancer. *Clin Biochem.* 2009;42(4-5):353-7. IF= 2,019
- **Chrzanowska A**, Gajewska B, Barańczyk-Kuźma A. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(3):465-9 IF=2,019
- Skrzycki M, Czeczot H, Barańczyk-Kuźma A, Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Gajewska B. "Evaluation of  $\beta$ 2-microglobuline expression level in gastrointestinal tract tumors due to usefulness as a reference gene in PCR method". *Pol Merk Lek* 2011;31:24-30.
- **Chrzanowska A**, Graboń W, Mielczarek-Puta M, Barańczyk-Kuźma A. Significance of arginase determination in body fluids of patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis before and after surgical treatment. *Clin Biochem.* 2014;47:1056-9, IF=2,275.
- Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**. Teriflunomide – The common drug with underestimated oxygen - Dependent anticancer potential. *Biochem Biophys Rep.* 2021;28:1-6.
- Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Barańczyk-Kuźma A. Influence of oxygen availability on expression of glutaminolysis genes in human colon cancer cells. *Postępy Hig Med Dosw.* 2021;75(1):923-932. IF=0,27

Praca popularno naukowa:

- **Chrzanowska A**. Zmiany aktywności i ekspresji arginazy w marskości i pierwotnym raku wątroby. *Medycyna Dydaktyka Wychowanie.* 2008;40 (7-8):31-32.

## 10. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

- **K1. Chrzanowska A**, Czeczot H, Rahden-Staroń I, Poremska Z. Arginase isoenzymes distribution in hepatocellular carcinoma. 10th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, Cracow 5-6 June 2001
- **K2. Chrzanowska A**, Krawczyk M, Nyckowski P, Skwarek A, Poremska Z. Arginaza w wątrobie z marskością oraz w guzie pierwotnym wątroby. XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 10-14 IX, 2001
- **K3.** Mielczarek M, Skwarek A, Czeczot H, **Chrzanowska A**, Poremska Z. Przydatność diagnostyczna arginazy, CEA i Ca 19-9 w wykrywaniu przerzutów raka jelita grubego do wątroby. XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław 18-22 IX 2002
- **K4. Chrzanowska A**, Ścibior D, Fathi A, Poremska Z. Arginase in serum and bile after liver transplantation. 12th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, 5-6 June 2003 Cracow
- **K5. Chrzanowska A**, Czeczot H, Ścibior D, Poremska Z. Arginase in blood serum of patients with liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and colorectal cancer liver metastases. XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 16-20 IX 2003

- **K6.** Ścibior D, Fathi A, **Chrzanowska A**, Poremska Z. Arginase activity in bile after liver transplantation. XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 16-20 IX 2003
- **K7.** **Chrzanowska A**, Ścibior D. Arginase in blood serum of patients with liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and colorectal cancer liver metastases. CROBSA-CEEPPUS Summer University July 21-28, 2004, Zadar (oral presentation)
- **K8.** **Chrzanowska A**, Mielczarek M, Barańczyk-Kuźma A. Changes in expression of arginase in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis XL Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin, 19-23 IX 2005
- **K9.** Mielczarek M, **Chrzanowska A**, Barańczyk-Kuźma A. Arginase expression in human colorectal cancer. XL Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin, 19-23 IX 2005
- **K10.** Mielczarek-Puta M, Ozvald I, **Chrzanowska A**. Arginase activity in patients with inflammations of digestive tract. CROBSA-CEEPPUS Summer University July 24-31, 2006, Zadar (oral presentation)
- **K11.** Mielczarek-Puta M, **Chrzanowska A**, Krawczyk M, Barańczyk-Kuźma A. Arginase isoenzymes in human primary and metastatic colorectal cancer, 15th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology, June 1-2, 2006 Cracow
- **K12.** **Chrzanowska A**, Mielczarek-Puta M, Barańczyk-Kuźma A. Preoperative arginase activity in blond serum of patients with hepatocellular carcinoma-comparison with liver markers, XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 12-15 IX 2006
- **K13.** **Chrzanowska A**, Mielczarek-Puta M, Barańczyk-Kuźma A. Structure and metabolic function of the kidney, Ceepus-International Biomedicine Student's Council Summer, July 23-30, 2007, Zadar, Croatia (oral presentation)
- **K14.** **Chrzanowska A**, Graboń W, Barańczyk-Kuźma A. Participation of arginase isoenzymes in pathogenesis of hepatocellular carcinoma, 11th Ceepus-International Biomedicine Student's Council Summer, July 28-August 4, 2008, Zadar, Croatia (oral presentation)
- **K15.** Barańczyk-Kuźma A, **Chrzanowska A**. Arginase in pathogenesis and diagnosis of hepatocellular carcinoma. An AACR International Conference, Advances in Cancer Research: from the laboratory to the clinic, March 16-19, 2008, Jordan
- **K16.** Kryczka A, Soin M, **Chrzanowska A**, Graboń W. Effect of mitochondria respiration inhibitors on proliferation and metabolism of colon cancer cells under tissue normoxia and hypoxia. 10th Warsaw International Medical Congress for young scientists. Warsaw 15-18 May 2014
- **K17.** Kryczka A, **Chrzanowska A**, Graboń W. The cytostatic effect of leflunomide on colon cancer cell lines under tissue normoxia and hypoxia 11th Warsaw International Medical Congress for young scientists. Warsaw 7-10 May 2015
- **K18.** **Chrzanowska A**, Jałbrzykowska K, Struga M. Evaluation of the cytotoxic effect of ciprofloxacin conjugates with fatty acids on cancer cells. IX Medical Chemistry Seminar. Lublin 15-19 September 2018
- **K19.** Jałbrzykowska K, **Chrzanowska A**, Roszkowski P, Struga M. Synthesis of novel derivatives of moxifloxacin and enoxacin with fatty acids and evaluation of their cytotoxicity on cancer cells. X Medical Chemistry Seminar. Lublin, 3-5 September 2021

## 11. Udział w projektach badawczych

W trakcie dotychczasowej pracy naukowej uczestniczyłam w realizacji następujących projektów i grantów badawczych:

### Projekty finansowane przez AM/WUM

- 2005-2006, Projekt młodego badacza (WUM), 1WK/3E125 “Rola izoenzymów arginazy w patogenezie chorób wątroby”; **kierownik projektu**
- 2007-2008, Projekt promotorski (WUM), 1WK/WP3/07 “Ekspresja arginazy w marskości i raku wątrobowo-komórkowym”; **główny wykonawca**
- 2014-2015, Projekt własny (WUM) nr 1WK/N/2013/2014, “Glutaminoliza jako szlak kluczowy dla przeżycia i proliferacji komórek raka jelita grubego w warunkach obniżonej dostępności tlenu”; **wykonawca projektu**

### Granty KBN/MEiN

- 2005-2007, Projekt badawczy promotorski nr 0779/P05/2005/29 Komitetu Badań Naukowych “Changes in arginase activity and expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma”; **kierownik projektu**

## 12. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

### a) Krajowe ośrodki naukowe

- Pracownia Chemii Związków Naturalnych, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr hab. Piotr Roszkowski – w zakresie syntez zmodyfikowanych związków bioaktywnych
- Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM; dr hab. Joanna Stefańska – w zakresie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych związków
- Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej WUM; dr Andrzej Ciechanowicz – w zakresie badań proteomicznych i metabolomicznych
- Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmaceutyczny WUM; dr hab. Małgorzata Wrzosek - w zakresie badań molekularnych mechanizmów aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków oraz dr Wioletta Olejarz – w zakresie badań cytotoksyczności pochodnych flurochinolonów
- Zakład Immunologii, Uniwersytet Warszawski; prof. dr hab. Nadzieja Drela, dr Ewelina Kiernożek – w zakresie badań z użyciem cytometrii przepływowej
- Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie; Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, dr Agnieszka Napiórkowska – w zakresie określenia aktywności przeciwgruźliczej
- Pracownia Teorii Biopolimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr hab. Sebastian Kmiecik oraz Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN; dr Michał Koliński - w zakresie modelowania molekularnego pochodnych CXP i MXF do białek enzymatycznych
- Instytut Fizyki PAN w Warszawie; dr Aleksandra Drzewiecka-Antonik, dr Paweł Rejmak – w zakresie badań spektroskopowych i obliczeń kwantowo-mechanicznych kompleksowych pochodnych tiomocznika



- dr hab. Mateusz Śmietana Politechnika Warszawska oraz lek. Krzysztof Bartnik z II Zakładu Radiologii WUM - w zakresie monitorowania hodowli komórkowych w czasie rzeczywistym

b) Zagraniczne ośrodki naukowe

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università degli Studi di Cagliari, Monserrato, Włochy; Prof. Paolo La Colla, dr Gabriele Giliberti, dr Giuseppina Sanna – w zakresie określenia aktywności przeciwproliferacyjnej i przeciwwirusowej pochodnych tiomocznika
- Molecular Epidemiology Laboratory Centre for Prevention, Diagnosis and Detection (CPDD). Cancer Prevention Unit (CPU) Wolfson Institute of population Health; dr Belinda Nedjai, dr Dorota Ścibior - w ramach badań molekularnych nad rakiem prostaty oraz opracowania szybkiego testu do oznaczania aktywności arginazy
- Department of Medicine Huddinge, Center for Hematology and Regenerative Medicine, Karolinska Institute, dr Joanna Zawadzka - Pankau – w zakresie udziału jako członek komisji rekrutacyjnej d/s zatrudnienia pracowników „post doc”

### 13. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

#### 13.1. Recenzje prac naukowych

Funkcja recenzenta prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym:

- 2020: *Ilościowa ocena egzosomów u pacjentów z orbitopatią Graves’a* Renaty Adamkiewicz, kierunek – analityka medyczna
- 2020: *Ocena aktywności cytotoksycznej nowych pochodnych alloksantoksyletyny wobec komórek A549, HTB-140 i Caco-2* Katarzyny Klimczyk, kierunek – farmacja
- 2021: *Wstępne badanie przeciwbakteryjnego działania nowych 1,3-dipodstawionych pochodnych tiomocznika* Piotra Suskiewicza – kierunek – farmacja

Funkcja Promotora Pomocniczego przy realizacjach doktoratów

- 2018 r. lek. Leszek Kraj pt. „Zmiany metabolizmu L- argininy u dzieci z astmą oskrzelową” Klinika Onkologii UCK WUM

Obecnie:

- Kawthar Safi, Szkoła Doktorska WUM, *The Role of Chemotherapy-induced Exosomes in Pancreatic Cancer*
- mgr Paulina Strzyga, *Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej pochodnych tiomocznika*, Katedra i Zakład Biochemii WUM

Recenzent publikacji w czasopiśmie międzynarodowym

*Cancers, International Journal of Molecular Sciences, Life, Nutrients, Pharmaceuticals, Frontiers in Bioscience*

### 13.2. Nagrody i stypendia za działalność naukową

Jestem laureatką 10 Nagród Naukowych JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach:

- 2022 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za osiągnięcia naukowe badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej 1,3-dwupodstawionych pochodnych mocznika
- 2022 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za opisanie cytotoksycznego wpływu kompleksów pochodnych tiomocznika z miedzią na komórki nowotworowe i bakteryjne
- 2022 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za pracę przeglądową omawiającą zastosowanie gliceryzyny w zapobieganiu zakażeniu oraz w leczeniu Covid-19
- 2021 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za publikację na temat znaczenia egzosomów w procesie angiogenezy oraz wpływu terapii antyangiogennej w zahamowaniu progresji nowotworu
- 2020 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za publikację opisującą nowe pochodne cyprofloksacyny i kwasów tłuszczowych o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym
- 2011 r. - nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących zaburzeń procesów detoksykacji w stanach patologicznych układu pokarmowego i nerwowego człowieka
- 2009 r. - nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt. „Changes in arginase isoenzymes pattern in human hepatocellular carcinoma”
- 2007 r. - nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za współautorstwo pracy pt. „Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases”
- 2005 r.- nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia za współautorstwo prac pt. - „Arginaza jako marker procesu nowotworowego: III. Porównanie aktywności arginazy z CEA i Ca 19-9 w przerzutach raka jelita grubego do wątroby” oraz „Przydatność pooperacyjnego oznaczania aktywności arginazy w surowicy kobiet po resekcji raka sutka”
- 2004 r. - nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia za współautorstwo prac w języku angielskim dotyczących badań nad arginazą w diagnostyce nowotworów.

Oraz specjalnych nagród na konferencjach naukowych

- Pierwsza nagroda sesji “Basic and Preclinical Sciences” na X Kongresie Naukowym Młodych Medyków (Warsaw International Medical Congress for young scientists) oraz specjalna nagroda z Fundacji Rozwoju Nauki i Biznesu w obszarze Nauk Medycznych i Ścisłych za doniesienie naukowe „Effect of mitochondria respiration inhibitors on proliferation and metabolism of colon cancer cells under tissue normoxia and hypoxia”, Warszawa, 15-18 maja 2014
- Specjalna nagroda sesji “Basic and Preclinical Sciences” na XI Kongresie Naukowym Młodych Medyków (Warsaw International Medical Congress for young scientists) za doniesienie naukowe „The cytostatic effect of leflunomide on colon cancer cell lines under tissue normoxia and hypoxia”, Warszawa, 7-10 maja 2015

### 13.3. Kursy i szkolenia/staże naukowe

- czerwiec 2003 - czerwiec 2004 - roczny staż apteczny w aptece ogólnodostępnej

- 2004, 2006, 2007, 2008; wakacyjne staże programu Ceepus “International Biomedicine Student’s Council Summer” Zadar, Chorwacja
- 2014 - New methods of cell analysing organizowany przez Merck oraz Technologia RNA i jej zastosowanie w badaniach biologicznych organizowane przez Abo i TS
- czerwiec/lipiec 2022 –pobył jako “visiting researcher” w Molecular Epidemiology Laboratory Centre for Prevention, Diagnosis and Detection (CPDD). Cancer Prevention Unit (CPU) Wolfson Institute of population Health, London, UK, i poznanie najnowszych metod badań genetycznych i epigenetycznych w onkologii

#### 13.4. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

<u>publikacje</u>	przed doktoratem	po doktoracie
<u>Oryginalne</u>	<b>9</b>	<b>21</b>
<u>Poglądowe</u>	<b>2</b>	<b>3</b>
<u>komunikaty zjazdowe</u>	<b>15</b>	<b>4</b>

<u>punktacja</u>	przed doktoratem	po doktoracie
IF	5,247	88,811
MEiN	109	1888
Liczba cytowań (bez autocytowań)	<b>58</b>	<b>314</b>
Index Hirscha	<b>2</b>	<b>10</b>

**Łącznie:**

**IF = 94,058**

**MEiN = 1997**

**Liczba cytowań =372**

**(bez autocytowań)**

## **14. Działalność organizacyjna, dydaktyczna i popularyzująca naukę:**

### **14.1. Nagrody i wyróżnienia**

**Medal Komisji Edukacji Narodowej** za szczególne zasługi dla oświaty i wychowania (nr legitymacji 180702)

### **14.2. Działalność dydaktyczna**

- od 11.2000 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych z przedmiotu „Biochemia z elementami chemii” dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- od 2002-2006 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych ze studentami Wydziału Nauki o Zdrowiu
- od 2006 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych z Biochemii dla studentów II roku Oddziału English Division - Medicine oraz English Dentistry Division
- od 2012 r. organizacja i prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych a od 2018 również wykładów z biochemii dla studentów II roku Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division
- od 2012 r. przygotowanie egzaminu testowego i kolokwii testowych z biochemii dla studentów drugiego roku Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- od 2017 r. przygotowanie egzaminu testowego i kolokwii testowych z biochemii dla studentów drugiego roku Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division
- 2017 r. przygotowanie skryptu do ćwiczeń laboratoryjnych z biochemii dla studentów II roku Wydziału Lekarskiego oraz studentów Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division

### **14.3. Działalność organizacyjna**

- członek Izby Aptekarskiej od 2004 roku
- członek bazy ekspertów NAWA oraz komisji egzaminacyjnej z biologii kandydatów na WUM z bloku wschodniego od 2018 roku
- członek komisji socjalnej WUM w latach 2007-2009 oraz 2012-2015

### **14.4. Działalność popularyzująca naukę:**

- 2004-2014 r - opieka merytoryczna nad pracami badawczymi studentów z Japonii, Hiszpanii i Chorwacji w ramach wymiany ERASMUS/SOCRATES oraz studentami koła biochemicznego
- pełnienie roli recenzenta serii komunikatów zjazdowych sesji “Basic and Preclinical Sciences” w ramach Kongresu Naukowego Młodych Medyków (Warsaw International Medical Congress for Young Scientists) w latach 2018,2019,2021,2022,2023
- wykład na kongresie Colway International, styczeń 2022, pt. Sen-niedoceniany kosmetyk

Alicja Chrzanowska  
.....  
podpis wnioskodawcy