Piotr Kowalczyk dr n. med.

AUTOREFERAT

Warszawa 2019

1. Imię i nazwisko

Piotr Kowalczyk

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

- 2017 – podyplomowe studia MBA Executive, Akademia Leona Koźmińskiego, Warszawa
- 2001 - **Doktor nauk medycznych w zakresie biologii**; Klinika Gastroenterologii, Medyczne Centrum Kształcenia Podyplomowego, Instytut Centrum Onkologii w Warszawie

  Tytuł rozprawy doktorskiej: „Znaczenie białka K w proliferacji komórek"
  Promotor: prof. Jerzy Ostrowski

- 1997 – **Magister biologii**, specjalizacja: biologia molekularna; Zakład Genetyki, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

  Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ mutacji jądrowych i mitochondrialnych *Saccharomyces cerevisiae* na stabilność intronu omega z mt 21s rRNA."
  Promotor: prof. Piotr Stępień

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

- 2012-2018: **Kierownik Naukowy Projektów**; Selvita S.A., posiadająca status centrum badawczo-rozwojowego (będąca jednostką naukową w rozumieniu ustawy o zasadach finansowania nauki w Polsce)
- 2010-2012: **Starszy Naukowiec**; Selvita S.A., posiadająca status centrum badawczo-rozwojowego (będąca jednostką naukową w rozumieniu ustawy o zasadach finansowania nauki w Polsce)
- 2009 -2010: **Naukowiec**; Wydział Farmakologii, Uniwersytet Teksański, Centrum Nauki o Zdrowiu w San Antonio, Texas, USA

PK

- 2005 -2009: **Staż podoktorski**; Wydział Farmakologii, Uniwersytet Teksański, Centrum Nauki o Zdrowiu w San Antonio, Texas, USA
- 1997 – 2000: Studia doktoranckie; Klinika Gastroenterologii, Medyczne Centrum Kształcenia Podyplomowego, Instytut Centrum Onkologii w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji dotyczących badania mechanizmów rozwoju nowotworu skóry oraz poszukiwania związków hamujących ten proces.

Łączna wartość bibliometryczna cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe wynosi: Impact Factor = 29,725 (w tym jako pierwszy autor IF = 12,163); MNiSW = 198 (w tym jako pierwszy autor MNiSW = 87)

4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągniecia naukowego

Kowalczyk P, Kinjo T, Kowalczyk M, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. Effect of phosphodiesterase antagonists on glucocorticoid mediated growth inhibition in murine skin cell lines. Eur J Pharmacol. 2009;610(1-3):29-36.

IF = 2,585; MNiSW = 27

Kowalczyk MC, Walaszek Z, **Kowalczyk P**, Kinjo T, Hanausek M, Slaga TJ. Differential effects of several phytochemicals and their derivatives on murine keratinocytes in vitro and in vivo: implications for skin cancer prevention. Carcinogenesis. 2009;30(6):1008-15.

IF = 4,795; MNiSW = 32

PK

Kinjo T, **Kowalczyk P**, Kowalczyk M, Walaszek Z, Nishimaki T, Slaga TJ, Hanausek M. Desipramine inhibits growth of a mouse skin squamous cell carcinoma cell line and affects glucocorticoid receptor-mediated transcription. Mol Carcinog. 2009;48(12):1123-30.

IF = 3,202; MNiSW = 27

Kowalczyk MC, **Kowalczyk P**, Tolstykh O, Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. Synergistic effects of combined phytochemicals and skin cancer prevention in SENCAR mice. Cancer Prev Res (Phila). 2010;3(2):170-8.

IF = 4,978;

Kinjo T, **Kowalczyk P**, Kowalczyk M, **Walaszek** Z, Slaga TJ, Hanausek M. Effects of desipramine on the cell cycle and apoptosis in Ca3/7 mouse skin squamous carcinoma cells. Int J Mol Med. 2010;25(6):861-7.

IF = 1,814; MniSW = 27

Kowalczyk P, Kowalczyk MC, Junco JJ, Tolstykh O, Kinjo T, Truong H, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. The possible separation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation and hyperplasia by compound A. Mol Carcinog. 2013;52(6):488-96.

IF = 4,770; MNiSW = 30

Kowalczyk MC, Junco JJ, **Kowalczyk P**, Tolstykh O, Hanausek M, Slaga TJ, Walaszek Z. Effects of combined phytochemicals on skin tumorigenesis in SENCAR mice. Int J Oncol. 2013;43(3):911-8.

IF = 2,773; MNiSW = 25

Kowalczyk P, Junco JJ, Kowalczyk MC, Sosnowska R, Tolstykh O, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. The effects of dissociated glucocorticoids RU24858 and RU24782 on TPA-induced skin tumor promotion biomarkers in SENCAR mice. Mol Carcinog. 2014;53(6):488-97.

IF = 4,808; MNiSW = 30

PK

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

WPROWADZENIE:

Związek pomiędzy stanem zapalnym a rozwojem nowotworów postulowany był już prawie dwieście lat temu. W przypadku nowotworów skóry obserwacja, że zmiany nowotworowe zaczynają się w miejscach przewlekłego podrażnienia i stanu zapalnego, sięga XIX wieku i zapoczątkowała cały nowy obszar badań. Związek między rakiem a stanem zapalnym potwierdzono licznymi badaniami epidemiologicznymi i histopatologicznymi i skutecznością leków przeciwzapalnych w profilaktyce raka. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że warunki, takie jak długotrwałe narażenie na dym papierosowy, azbest, krzemionka [1, 2] i UVB [3], związane z przewlekłym podrażnieniem i późniejszym stanem zapalnym, stanowią podstawę wielu nowotworów.

Zostało opisanych wiele zwierzęcych modeli łączących proces zapalny z rozwojem nowotworu. Dobrym przykładem jest wieloetapowy model skórnej karcynogenezy u myszy. W modelu tym, zastosowanie genotoksycznego karcynogenu w bardzo niskiej dawce, która sama w sobie jest niewystarczająca do powstania guza nowotworowego, zapoczątkowuje proces karcynogenezy - tzw. fazę inicjacji. W głównej mierze polega ona na mutacji w komórkowym DNA prowadzącej do aktywacji onkogenów i inaktywacji genów supresorowych. Powstanie samego guza nowotworowego następuje dopiero w wyniku kolejnych, powtarzalnych dawek związków promujących rozwój guza. Utrzymujący się stan zapalny, hiperplazja, nieprawidłowe różnicowanie się komórek w połączeniu z niestabilności genetyczną prowadzą do ekspansji zainicjowanych komórek brodawczaków i guzów rakowych [4, 5, 6], co charakteryzuje kolejne etapy karcynogenezy: etapy promocji i progresji nowotworu skóry. Zwykle etap promocji nie jest związany z genotoksycznością, ponieważ nawet najsilniejsze związki promujące powstawanie nowotworów nie są mutagenne i nie są w stanie zainicjować powstawania nowotworu. Wydaje się, że estry forbolu, zwłaszcza 12-O-tetradekanoylforbol-13-octan (TPA), alkaloidy indolowe i związki polioctanowe działają poprzez aktywację kinazy białkowej C, podczas gdy benzo[e]pireny, chryzarobina i niektóre nadtlenki mogą działać poprzez wytwarzanie wolnych rodników [7, 6].

PK

Etap promocji wzrostu guza wywołuje plejotropową odpowiedź stymulowanej tkanki polegającą m.in. na bardzo silnej reakcji zapalnej, przypominającej stan zapalny powstawały w wyniku zranienia. Etap ten wymaga nie tylko przeżycia zainicjowanych komórek, ale także ich ekspansji. Wiele mediatorów stanów zapalnych, takich jak cytokiny, chemokiny czy eikozanoidy, jest w stanie stymulować proliferację zarówno komórek nietransformowanych, jak i transformowanych komórek nowotworowych [1].

Najnowsze badania nad rolą czynnika κB (NF-κB), czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w regulację odpowiedzi zapalnej, dostarczyły również bardziej szczegółowych informacji na temat roli zapalenia w rozwoju nowotworów. W modelu indukowalnego nowotworu związanego z zapaleniem jelita grubego inaktywacja szlaku NF-κB w komórkach nabłonka okrężnicy spowodowała znaczny spadek częstości występowania guzów [8]. Wykazano również, że przewlekłe zapalenie wywołane przez wielokrotne podawanie siarczanu dekstranu nasilało rozwój guzów nowotworowych, podczas gdy pojedyncza dawka karcynogenu nie miała żadnego wpływu na powstawanie nowotworu [8]. Pikarsky i in. odkryli, że NF-κB działa jako promotor nowotworu w modelach rakowych związanych z zapaleniem. Używając modelu nowotworu wątroby związanego z zapaleniem, naukowcy wykazali, że inaktywacja NF-κB zapobiega rozwojowi raka i prowadzi do zwiększonej apoptozy hepatocytów [9].

Wielostopniowy model procesu rozwoju nowotworu w mysiej skórze był niezwykle przydatny do badania różnych czynników wpływających na ten proces. Korzystając z tego modelu doświadczalnego, można dokładnie zbadać wpływ badanych związków niezależnie na etap inicjacji i etapy promocji całego procesu nowotworzenia.

Ogólnym celem przeprowadzonych badań było zbadanie i przeanalizowanie efektu częściowej aktywacji receptora glukokortykoidowego, a także wpływu związków pochodzenia roślinnego na proces zapalny w skórze, proliferację keratynocytów oraz na sam rozwój nowotworu skóry.

PKC

OPIS PUBLIKACJI – CZĘŚĆ I:
rozdzielone aktywności receptora glikokortykoidowego i jego udział w procesie nowotworzenia

GLIKOKORTKOIDY

Glikokortykoidy (GC) są powszechnie stosowanymi lekami przeciwzapalnymi, ale ich stosowanie jest ograniczone poprzez liczne działania niepożądane [10]. Są one również silnymi inhibitorami zarówno proliferacji komórek epidermalnych, jak i całego procesu nowotworowego w mysiej skórze, wywołanego przez promieniowanie UV lub przez czynniki chemiczne, działające zwłaszcza podczas etapu promocji procesu nowotworowego [11]. Powstałe już brodawczaki i guzy nowotworowe (carcinomas) stają się jednak oporne na działanie glikokortykoidów. Efekt glikokortykoidów na funkcjonowanie komórek wywierany jest za pośrednictwem receptora glikokortykoidowego (GR), pełniącego funkcję czynnika transkrypcyjnego.

Receptor glikortykoidowy działa poprzez dwa różne mechanizmy: regulację transkrypcji, która wymaga wiązania DNA (trans-aktywacja) i niezależnej od wiązania się z DNA, interakcji białko-białko między GR i innymi czynnikami transkrypcyjnymi (trans-represja), takimi jak NF-κB lub białko aktywatora 1 (AP-1) [12, 13]. Po związaniu glikokortykoidów, receptor glikortykoidowy dysocjuje z kompleksu białka szoku cieplnego i migruje jako homodimer do jądra, gdzie wiąże się ze specyficzną sekwencją DNA (GRE, ang. glucocorticoid response element) w obrębie promotora genów regulowanych przez GR. Doświadczenia z genetycznie zmodyfikowanymi myszami, u których receptor glikokortykoidowy pozbawiony był możliwości wiązania się do DNA, a tym samym możliwości regulacji ekspresji genów, wyraźnie wskazują, że wiele kluczowych efektów glikokortykoidów, w tym ich działanie przeciwzapalne i blokowanie odpowiedzi indukowanej przez TPA w skórze, zależy od oddziaływania GR z NF-κB i AP-1 [14]. Ponadto, aktywność czynników AP-1 i NF-κB jest znacząco podwyższona w guzach skórnych u myszy, co wydaje się być związane z utratą funkcji GR i brakiem odpowiedzi na glikokortykoidy.

Niestety, leki te wywołują również niepożądane skutki uboczne. Wprawdzie niekorzystne działania nie ograniczają ich szerokiego stosowania, to długotrwałe, ogólnoustrojowe podawanie glikokortykoidów może powodować: immunosupresję, cukrzycę steroidową (hiperglikemia z powodu zwiększonej glukoneogenezy, insulinooporność i upośledzona tolerancja glukozy),

PK

zwiększoną pękliwość skóry, osteoporozę wywołaną steroidami (ujemna równowaga wapnia z powodu zmniejszonego wchłaniania wapnia w jelitach prowadzącego do zmniejszenia gęstości kości), przyrost masy ciała spowodowany zwiększonym łaknieniem i odkładaniem się tłuszczu, niewydolność nadnerczy, zmniejszoną masę mięśniową i upośledzoną regenerację mięśni, brak owulacji i nieregularność miesiączek, brak wzrostu, opóźnienie dojrzewania, wzrost stężenia aminokwasów w osoczu, zwiększoną produkcję mocznika; ujemny bilans azotowy, jaskrę i zaćmę. Natomiast najbardziej charakterystycznym skutkiem ubocznym miejscowego stosowania glikokortykoidów jest atrofia skóry [15]. Zjawisko to charakteryzuje się wzrostem przezroczystości skóry, zmniejszeniem jej grubości, z towarzyszącą zwiększoną kruchością, podatnością na pękanie i zasinienia [16], powierzchnia skóry staje się cienka i błyszcząca[17, 18]. Opisano również ogólnoustrojowe działania niepożądane ze strony kortykosteroidów podawanych miejscowo na skórę. Przezskórne wchłanianie glikokortykoidów może prowadzić do hiperglikemii i insulinooporności [19], obrzęku i możliwej hipokalcemii [20], jak również do powstawania jaskry i zaćmy [21].

Pod koniec ubiegłego wieku pojawił się pomysł, że oddzielenie działania przeciwzapalnego glikokortykoidów od niektórych skutków ubocznych można osiągnąć przez modyfikację ich struktury. W 1997 opisano serie związków, które były wstanie częściowo aktywować receptor glikokortykoidowy, oddzielając aktywację transkrypcyjną od represji (RU24858, RU40066 i RU24782) [22, 23]. Cząsteczki te, wykazujące właściwości przeciwzapalne *in vivo*, były w stanie zahamować aktywność czynników AP-1 i NF-κB, czemu towarzyszył równoczesny spadek aktywności trans-aktywacyjnej receptora glikokortykoidowwego. Co ciekawe, związki zdolne do silnej trans-aktywacji i słabych właściwościach represyjnych nie były w stanie zmniejszyć stanu zapalnego [24]. Od tego czasu podjęto kilka prób znalezienia nowych zdysocjowanych GC, ale żadna z nich nie doprowadziła do zastąpienia obecnych glukokortykoidów [25, 26]. Celem tej części badań było zbadanie wpływu częściowej aktywacji GR na proces nowotworzenia w skórze.

***Kowalczyk P**, Kinjo T, Kowalczyk M, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. **Effect of phosphodiesterase antagonists on glucocorticoid mediated growth inhibition in murine skin cell lines**. Eur J Pharmacol. 2009 May 21;610(1-3):29-36*

Fosfodiesterazy typu 4 (PDE4) należą do rodziny składającej się z co najmniej 11 izozymów i katalizują rozkład cyklicznego AMP (cAMP) i / lub cyklicznego GMP (cGMP), kontrolując tym samym ich stężenie wewnątrz komórek. cAMP i cGMP wykorzystywane są jako cząsteczki sygnałowe [27], których poziom gwałtownie wzrasta na skutek stymulacji komórki . Obniżenie ich poziomu może prowadzić do zahamowania wydzielania cytokin czy wytwarzania reaktywnych form tlenu. Opisano również, że zmniejszenie aktywności PDE4 może zwiększyć wrażliwość receptora glukokortykoidowego, wpływając na zahmowanie proliferacji komórek i zwiększenie śmierci komórkowej na drodze apoptozy zależnej od GC [28, 29, 30]. Inhibitory PDE4 mogą również wpływać na wzrost mysich komórek nowotworowych [31]. W opisywanej pracy badano, czy dwa strukturalnie różne inhibitory PDE4 (YM976 i rolipram) są w stanie zwiększyć wrażliwość transformowanych linii keratynocytów na glikokortykoidy (FA - fluocinolon acetonide).

Rezultaty: Inhibitory PDE4 są zdolne do uwrażliwiania komórek nowotworowych na działanie glikokortykoidów polegające na zahamowaniu proliferacji komórkowej. Równoczesne traktowanie inhibitorami PDE4 i FA powodowało zahamowanie ekspresji genu regulowanego przez glikokortykoidy (MT-1) we wszystkich liniach komórkowych (transformowanych lub nietransformowanych) w sposób zależny od stężenia. Wyniki te sugerują, że zahamowanie aktywności PDE4 wpływa negatywnie na aktywację receptora glikokortykoidowego, a działanie FA w komórkach brodawczaka i komórkach rakowych w obecności inhibitorów PDE4 przypomina działanie zdysocjowanych glikokortykoidów stymulujących tylko część odpowiedzi receptora glikokortykoidowego.

Wnioski: inhibitory PDE4 mogą wywierać podwójny wpływ na receptor glikokortykoidowy: przywracać zdolność receptora glukokortykoidowego do hamowania wzrostu komórek nowotworowych oraz zmniejszać skutki uboczne poprzez hamowanie trans-aktywacji receptora glikokortykoidowego. Odkrycia te wymagają dalszych badań *in vivo* w celu określenia, czy

PK

jednoczesne podawanie inhibitorów PDE4 z glikokortykoidami jest w stanie wpływać na wzrost brodawczaków lub ich przekształcenie w guzy nowotworowe (carcinoma).

---

*Kinjo T, **Kowalczyk P**, Kowalczyk M, Walaszek Z, Nishimaki T, Slaga TJ, Hanausek M.* ***Desipramine inhibits growth of a mouse skin squamous cell carcinoma cell line and affects glucocorticoid receptor-mediated transcription.*** *Mol Carcinog. 2009 Jul 2*

*Kinjo T, **Kowalczyk P**, Kowalczyk M, Walaszek Z, Slaga TJ, Hanausek M.* ***Effects of desipramine on the cell cycle and apoptosis in Ca3/7 mouse skin squamous carcinoma cells.*** *Int J Mol Med. 2010 Jun;25(6):861-7.*

W pracach zostało wykazane, że antydepresyjny lek, dezypramina (DMI), ma cytotoksyczne właściwości w przypadku większości komórek nowotworowych, działając synergistycznie z powszechnie stosowanymi chemioterapeutykami. Wydaje się, że efekt ten może być wywierany poprzez modulację aktywności receptora glikokortykoidowego możliwą na wielu etapach: translokacji jądrowej, transkrypcji i translacji [34–39]. Wykazano, że DMI nasila transkrypcję genów zależnych od receptora glikokortykoidowego w mysich fibroblastach [40] poprzez ułatwianie jego translokacji do jądra komórkowego. Jest bardzo prawdopodobne, że oporność komórek nowotworowych na działanie GC może być wynikiem zablokowania funkcjonowania receptora glikokortykoidowego. Wykazano bowiem, że niektóre ludzkie nowotwory i mysie nowotworowe linie komórkowe są oporne na hamowanie ich wzrostu za pośrednictwem glikokortykoidów [41–44], co potwierdza analiza ekspresji GR w mysich guzach skóry niewykazująca obniżenia poziomu jego ekspresji. W opisywanej pracy badany był wpływ DMI na translokację GR i jego zdolność do regulacji ekspresji genów przy pomocy panelu mysich nowotworowych linii komórkowych reprezentujących różne etapy transformacji nowotworowej.

Rezultaty: DMI zahamowało wzrost wszystkich trzech linii komórkowych (unieśmiertelniona linia komórkowa keratynocytów (3PC), brodawczaka (MT1/2) i raka płaskonabłonkowego (Ca3/7)), przy czym najsilniejszy efekt zaobserwowano w przypadku komórek Ca3/7. W przypadku traktowania komórek Ca3/7 (opornych na hamowanie wzrostu przez syntetyczne GC - acetonid fluokinolonu (FA)) DMI wywołało zarówno indukcję apoptozy, jak i również zatrzymanie cyklu komórkowego. Translokacja GR do jądra komórkowego wywoływana była przez oba związki FA i DMI oraz ich kombinację, ale tylko FA był zdolny do indukowania zależnej od GR transkrypcji w

komórkach Ca3/7. W przypadku równoczesnego traktowania komórek oboma związkami, DMI hamowało indukowaną przez FA , zależną od GR transkrypcję.

Wnioski: DMI spowodowało zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, jak również zwiększenie translokacji GR do jądra komórkowego, nie wpływając na aktywność transkrypcyjną GR. DMI podane równocześnie z FA działało hamująco na zależną od GR aktywność transkrypcyjną.

Kowalczyk P**, Kowalczyk MC, Junco JJ, Tolstykh O, Kinjo T, Truong H, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ.* ***The possible separation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation and hyperplasia by compound A. *Mol Carcinog. 2013 Jun;52(6):488-96*

Związek A jest związkiem pochodzenia roślinnego (wyizolowanym z jednego z gatunków solanek *Salsola tuberculatiformis Botschantzev*) oddziałującym na receptor glikokortykoidowy. Wykazano, że związek ten współzawodniczy z deksametazonem, agonistą GR, o wiązanie do tego receptora, nie indukując jednak wiązania GR do DNA i nie indukując zależnej od GR transkrypcji (De Bosscher et al., 2005). Równocześnie przejawia on działanie przeciwzapalne obniżając ekspresję genów prozapalnych indukowanych przez TNF-α. Wyniki te wskazują, że związek A może być nowym, niesteroidowym modulatorem receptora glikokortykoidowego o właściwościach zbliżonych do zdysocjowanych glikokortykoidów. W opisywanej pracy testowana była hipoteza sprawdzająca, czy częściowa aktywacja receptora glikokortykoidowego przez związek A jest wystarczająca do odwrócenia indukowanego przez TPA stanu zapalnego i hiperplazji skóry.

Rezultaty: Systematyczne podawanie TPA u myszy (dwa razy na tydzień, przez dwa tygodnie) wywołuje stan zapalny i hiperplazję naskórka. Dodatkowo w skórze obserwuje się również wzrost poziomu białka c-jun (składnik AP-1), cyklooksygenazy-2 (COX-2), p50 (składnik NF-κB), interleukiny-6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów (TNF-α). Podanie związku będącego pełnym aktywatorem GR było w stanie całkowicie odwrócić efekty wywoływane przez aplikację TPA. Podanie samego związku A powodowało co prawda zarówno zwiększenie grubości naskórka i proliferacji keratynocytów, jak i poziomów białek: c-jun, COX-2, IL-6 i IFN-γ, ale również

PK

zmniejszenie liczby komórek z widoczną translokacją do jądra białka p50 (wchodzącego w skład czynnika NF-κB), co może sugerować jego rolę w hamowaniu aktywności NF-κB. Poziom mRNA dla genu MT-1 zależnego od GR był również znacząco obniżony w próbkach skóry traktowanej związkiem A.

Wnioski: Związek A jest w stanie zahamować aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB nie wpływając jednak na aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1. Uzyskane wyniki sugerują, że związek A może aktywować tylko niektóre transrepresyjne właściwości GR. Wpływ związku A może być również bardziej złożony, na przykład, może on wpływać na więcej niż jeden cel

---

***Kowalczyk P**, Junco JJ, Kowalczyk MC, Sosnowska R, Tolstykh O, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. **The effects of dissociated glucocorticoids RU24858 and RU24782 on TPA-induced skin tumor promotion biomarkers in SENCAR mice**. Mol Carcinog. 2013 Jul 12*

---

molekularny w komórce lub tkance.

Glikokortykoidy są bardzo skuteczne w zapobieganiu procesom zapalnym, hiperplazji naskórka i tworzeniu się nowotworu skóry u myszy. Efekt ten wywierany jest poprzez aktywację receptora glikokortykoidowego. Receptor ten działa poprzez dwa różne mechanizmy: regulację transkrypcji, która wymaga wiązania się do DNA (transaktywacja) i niezależne od wiązania się do DNA odziaływanie receptora glikokortykoidowego z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak NF-kB lub białko AP- 1 (transrepresja). W opisywanej pracy postawiono hipotezę mówiącą o tym, że częściowa aktywacja GR (transrepresja) jest wystarczająca do zahamowania promocji procesu nowotworowego. W badaniu tym przetestowaliśmy wpływ pełnych i częściowych aktywatorów GR na indukowaną przez TPA promocję nowotworu skóry.

Rezultaty: Desoksymetazon i acetonid fluocinolonu (pełni agoniści GR) były w stanie odwrócić hiperplazję indukowaną przez TPA w sposób zależny od stężenia, nie wywierając żadnego efektu, gdy były stosowane pojedynczo. Żaden zdysocjowany glukokortykoid (RU24858 i RU24782) nie wykazał znaczącego wpływu ani na grubość naskórka, ani na wskaźnik inkorporacji BrdU,. Po zastosowaniu tylko RU 24858 obserwowano zmniejszoną hiperplazję naskórka w sposób zależny od stężenia. Wszystkie badane związki były w stanie obniżyć poziom mRNA genu c-jun zarówno

PK

w skórze traktowanej acetonem, jak i TPA. Związki DES, FA i RU24858 były również zdolne do obniżenia podwyższonego przez TPA poziomu mRNA dla IL-6, COX-2 i iNOS. RU24782 nie wpływał na poziomy mRNA tych genów.

Wnioski: Wyniki te sugerują, że RU24782 nie wywierał wpływu na przebieg odpowiedzi zapalenej i hiperplazję indukowaną TPA u myszy SENCAR, podczas gdy RU24858 był w stanie zmniejszyć wszystkie badane markery zapalenia wpływając równocześnie na hiperplazję naskórka.

OPIS PUBLIKACJI – CZĘŚĆ II:
combined natural inhibitors in skin cancer prevention

NATURALNE ZWIĄZKI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

W ostatnich latach odkryto, że związki o właściwościach przeciwutleniających, takie jak proantocyjanidyny i kwas moczowy są zdolne do hamowania procesu nowotworzenia indukowanego chemicznie. Mechanizm działania może być różny, np. kaventol hamuje uwalnianie TNF-α i izoprenylację białka. Wiele przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego również hamuje promowanie i / lub progresję nowotworu skóry u myszy. Ich mechanizm działania nie jest całkowicie znany, dowody wskazują na kilka możliwości: (a) wychwytują różne rodniki wytwarzane bezpośrednio lub pośrednio przez związki promujące powstawanie nowotworów; (b) zwiększają poziomy enzymów, które są ważne w detoksykacji komórkowej; lub (c) mają inne specyficzne funkcje. Działanie przeciwutleniaczy może mieć charakter synergistyczny, tak jest w przypadku witaminy C i E, witaminy E i selenu. Badania epidemiologiczne wykazały mniejsze ryzyko zachorowania na raka u osób, których dieta zawiera stosunkowo dużą ilość warzyw, owoców i innych produktów roślinnych. Popularnym wyjaśnieniem tego zjawiska zarówno wśród społeczności naukowej, jak i wśród społeczeństwa jest to, że różne witaminy i inne mikroelementy zawarte w warzywach, owocach i innych naturalnych produktach roślinnych zapobiegają karcynogenezie poprzez eliminację szkodliwego wpływu działania mutagenów i innych czynników rakotwórczych. Co więcej, te naturalne związki są najczęściej nietoksyczne lub znacznie mniej toksyczne niż syntetyczne środki chemoprewencyjne.

Chociaż ogólnie przyjmuje się, że dieta zawierająca duże ilości warzyw, owoców i innych produktów roślinnych obniża zachorowalność na choroby nowotworowe, nadal istnieje potrzeba zidentyfikowania najskuteczniejszych składników diety, a także wyjaśnienia ich mechanizmów działania. Obecnie większość ludzi jest eksponowana na różne kombinacje takich związków. Ponieważ wiele z tych związków przyjmuje się doustnie, tj. w diecie lub jako suplementy diety, podczas gdy niektóre są obecne w wielu kosmetykach, przeprowadzone badania mają ogromne znaczenie praktyczne. Ogólnym celem badań było określenie mechanizmu (-ów) synergistycznego działania związków pochodzenia naturalnego, o których wiadomo, że hamują jeden lub więcej etapów karcynogenezy skóry, tj. inicjacji i promocji / progresji. Hipoteza była taka, że

---

Kowalczyk MC, Walaszek Z, ***Kowalczyk P****, Kinjo T, Hanausek M, Slaga TJ.* ***Differential effects of several phytochemicals and their derivatives on murine keratinocytes in vitro and in vivo: implications for skin cancer prevention.*** *Carcinogenesis. 2009 Jun;30(6):1008-15*

---

równoczesne leczenie miejscowe i ogólnoustrojowe (tj. dietetyczne) z wybranymi inhibitorami pochodzącymi z naturalnego źródła na różnych etapach karcynogenezy skóry skutkuje efektami synergicznymi prowadzącymi do skuteczniejszego zapobiegania rakowi skóry.

Badanie miało na celu zbadanie wpływu ekstraktu z pestek winogron (ang. grape seed extractGSE), resweratrolu (RES), kwasu ursolowego (URA), kwasu elagowego (ELA), likopenu i N-acetylo-L-cysteiny (NAC) i określenia molekularnych mechanizmów, dzięki którym związki te mogą hamować proces powstawania nowotworu skóry u myszy. Ekstrakt z pestek winogron (GSE) jest bogatym źródłem jednej z bardziej obiecujących grup flawonoidów roślinnych, oligomerów proantocyjanidynowych. Wywierają one wiele działań prozdrowotnych (46), w tym aktywność przeciwutleniającą (47) lub hamowanie wzrostu komórek nowotworowych w hodowli (48). Kwas elagowy (ELA) jest związkiem fenolowym wykazującym różnorodne aktywności biologiczne, w tym silne właściwości antyoksydacyjne (49), przeciwnowotworowe (50) i antymutagenne (51). Resweratrol (RES) jest naturalnie występującą fitoaleksyną, której spożywanie wiąże się z wieloma korzyściami zdrowotnymi, w szczególności łagodzeniem chorób związanych z wiekiem, w tym neurodegeneracją, powstawaniem nowotworów i miażdżycą (52, 53). Kwas ursolowy (URA) jest pentacyklicznym triterpenoidem, który, jak wykazano, hamuje powstawanie nowotworów i

PK

angiogenezę (54, 55). Stwierdzono również, że URA indukuje apoptozę w wielu różnych typach komórek nowotworowych (56, 57). N-acetylo-L-cysteina (NAC), aminokwas zawierający siarkę, jest N-acetylową pochodną L-cysteiny. NAC działa jako źródło cysteiny i stymuluje produkcję glutationu, który chroni organizm przed stresem oksydacyjnym (58). Zwiększone stężenie likopenu (LYC) wiązało się ze zmniejszeniem ryzyka różnych rodzajów nowotworów i chorób układu krążenia (59, 60).

Rezultaty: GSE, ELA i RES są związkami o właściwościach umożliwiających usuwanie wolnych rodników. Statystycznie istotny wpływ na aktywność kaspazy-3 i -7 obserwowano tylko po zastosowaniu GSE i URA. Wszystkie badane związki chroniły komórki przed uszkodzeniem DNA wywołanym nadtlenkiem wodoru. Stosując krótkoterminowy model karcynogenezy, stwierdziliśmy, że wszystkie wybrane związki powodowały znaczne zmniejszenie grubości naskórka i (z wyjątkiem RES) obniżenie odsetka myszy z mutacją w kodonie 61 onkogenu Ha-ras.

Wniosek: Różnicowy wpływ badanych związków na procesy krytyczne dla hamowania wzrostu keratynocytów in vitro i in vivo wskazuje, że kombinacje badanych związków mogą w przyszłości lepiej przeciwdziałać zarówno inicjacji nowotworu, jak i promocji / progresji nowotworu.

---

*Kowalczyk MC, **Kowalczyk P**, Tolstykh O, Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. **Synergistic effects of combined phytochemicals and skin cancer prevention in SENCAR mice**. Cancer Prev Res (Phila). 2010 Feb;3(2):170-8*

Celem badania było określenie hamującego działania połączonych związków pochodzenia roślinnego na indukowany chemicznie proces nowotworzenia w mysiej skórze. Hipoteza zakładała, że równoczesne podawanie, miejscowe i dietetyczne, wybranych związków prowadzi do skuteczniejszego zapobiegania nowotworom skóry. Testowano kwas elagowy i D-glukaran wapnia jako składniki diet, podczas gdy resweratrol stosowano miejscowo; ekstrakt z pestek winogron był stosowany miejscowo lub w diecie. D-glukaran wapnia (CG) jest solą i handlową formą kwasu D-glukarowego, który występuje naturalnie w różnych produktach spożywczych, w tym brokułach, pomarańczach i jabłkach. Po podaniu doustnym D-glukaran przekształca się w D-glukaro-1,4-lakton, który hamuje β-glukuronidazę i nasila detoksykację fazy II (15). Niektóre dane

PK

z badań in vitro i na zwierzętach sugerują, że hamowanie β-glukuronidazy może hamować karcynogenezę (16), jak również hamować fazy inicjacji i promocji / progresji nowotworu (6, 17, 18).

Rezultaty: Wszystkie wybrane kombinacje powodowały znaczący spadek grubości naskórka w porównaniu z grupą traktowaną samym DMBA, a także z grupami traktowanymi pojedynczymi związkami i DMBA. Wszystkie kombinacje resweratrolu z innymi związkami wykazały synergistyczny wpływ na hiperplazję i mutację Ha-ras. Tkanka skóry myszy otrzymujących kombinacje wykazywała zmniejszoną proliferację komórek i ekspresję Bcl2; zmniejszony poziom p21, regulatora cyklu komórkowego; i zmniejszony poziom markera zapalenia –cyklooksygenazy-2. Wszystkie wybrane kombinacje zmniejszyły indukowaną DMBA ekspresję CYP1B1, a także spowodowały obniżenie poziomu protoonkogenów c-jun i c-fos, składników czynnika AP-1.

Wniosek: Wszystkie badane kombinacje wykazały efekty addytywne lub synergistyczne. Zwłaszcza połączenie resweratrolu z kwasem elagowym, ekstraktem z pestek winogron i innymi badanymi związkami miało bardzo silne działanie hamujące powstawanie nowotworu skóry. Działanie to oparte było na hamowaniu hiperplazji naskórka, jak również na modulacji biomarkerów proliferacji komórek, śmierci w drodze apoptozy czy procesów zapalenych.

Kowalczyk MC, Junco JJ, ***Kowalczyk P****, Tolstykh O, Hanausek M, Slaga TJ, Walaszek Z.* ***Effects of combined phytochemicals on skin tumorigenesis in SENCAR mice.*** *Int J Oncol. 2013 Jul 5*

Celem badania było określenie wpływu połączonego działania różnych związków pochodzenia roślinnego na wczesne stadia transformacji nowotworowej, etapu inicjacji i promocji.

Badano D-glukaran wapnia (CG) podawany w diecie, podczas gdy resweratrol (RES) i kwas ursolowy (UA) stosowane były miejscowo na skórę w wieloetapowym modelu karcynogenezy skóry, inicjowanej 7,12-dimetylobenz [a] antracenem (DMBA) i promowanej 12-O-tetradekanoiloforbol-13-octan (TPA) w myszach SENCAR.

Rezultaty. Wyłącznie traktowanie myszy kwasem ursolowym, zarówno pojedynczo, jak w kombinacji z glukaranem wapnia, na etapie promocji było wstanie wpłynąć na częstotliwość

PKC

występowania guzów nowotworowych i hamować hiperplazję naskórka. Traktowanie myszy DMBA / TPA spowodowało zarówno znaczny wzrost poziomu białek c-jun i p50, jak i mRNA takich markerów stanu zapalnego, jak COX-2 i IL-6. Podawanie badanych związków we wszystkich przypadkach spowodowało obniżenie ich poziomów (c-jun, p50, COX-2 i IL-6).

Wnioski. Wyniki te pokazują, że UA jest silnym inhibitorem rozwoju nowotworów skóry i sygnalizacji zapalnej. Jego działanie może być wykorzystane w zapobieganiu powstawania nowotworów skóry oraz potencjalnie innych nowotworów o pochodzeniu nabłonkowym.

LITERATURA

1. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001;357(9255):539-545.
2. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002;420(6917):860-867.
3. Chen J, Ruczinski I, Jorgensen TJ, Yenokyan G, Yao Y, Alani R, Liégeois NJ, Hoffman SC, Hoffman-Bolton J, Strickland PT, Helzlsouer KJ, Alberg AJ. Nonmelanoma skin cancer and risk for subsequent malignancy. J Natl Cancer Inst 2008;100(17):1215-1222.
4. Aldaz CM, Conti CJ, Klein-Szanto AJ, Slaga TJ. Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: relevance to malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84(7):2029-2032.
5. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. Adv Cancer Res 1988;50:25-70
6. DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. Pharmacol Ther 1992;54(1):63-128.
7. O'Connell JF, Nesnow S, Slaga TJ. Initiation, promotion and complete carcinogenesis by N-methyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine or ethylnitrosourea in the Sencar mouse skin tumorigenesis model. Cancer Lett 1987;37(3):301-310.
8. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell 2004;118(3):285-296.
9. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature 2004;431(7007):461-466.
10. Rosen J, Miner JN. The search for safer glucocorticoid receptor ligands. Endocr Rev 2005;26(3):452- 464.
11. Slaga TJ. Can tumour promotion be effectively inhibited? IARC Sci Publ 1984(56):497-506. PMID: 6536609
12. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. PNAS 1994;91(2):752-756.
13. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. Cell 1990;62(6):1205-1215.
14. Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, Angel P. The DNA binding independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. J Cell Biol 1999;147(7):1365-1370.

PK

15. Sterry W, Asadullah K. Topical glucocorticoid therapy in dermatology. Ernst Schering Res Found Workshop 2002(40):39-54.
16. Kimura T, Doi K. Dorsal skin reactions of hairless dogs to topical treatment with corticosteroids. Toxicol Pathol 1999;27(5):528-535.
17. Booth BA, Tan EM, Oikarinen A, Uitto J. Steroid-induced dermal atrophy: effects of glucocorticosteroids on collagen metabolism in human skin fibroblast cultures. Int J Dermatol 1982;21(6):333-337.
18. Mills CM, Marks R. Side effects of topical glucocorticoids. Curr Probl Dermatol 1993;21:122-131.
19. Pagano G, Cavallo-Perin P, Cassader M, Bruno A, Ozzello A, Masciola P, Dall'omo AM, Imbimbo B. An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. J Clin Invest 1983;72(5):1814-1820.
20. Montoliu J, Botey A, Trilla A, Revert L. Pseudoprimary aldosteronism from the topical application of 9- alpha-fluorprednisolone to the skin. Clin Nephrol 1984;22(5):262-266.
21. Aggarwal RK, Potamitis T, Chong NH, Guarro M, Shah P, Kheterpal S. Extensive visual loss with topical facial steroids. Eye (Lond) 1993;7 (Pt 5):664-666.
22. Vayssière BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeau C, Gronemeyer H, Resche-Rigon M. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. Mol Endocrinol 1997;11(9):1245-1255.
23. Belvisi MG, Wicks SL, Battram CH, Bottoms SE, Redford JE, Woodman P, Brown TJ, Webber SE, Foster ML. Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. J Immunol 2001;166(3):1975-1982.
24. Belvisi MG, Brown TJ, Wicks S, Foster ML. New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? Pulm Pharmacol Ther 2001;14(3):221-227.
25. Schäcke H, Hennekes H, Schottelius A, Jaroch S, Lehmann M, Schmees N, Rehwinkel H, Asadullah K. SEGRAs: a novel class of anti-inflammatory compounds. Ernst Schering Res Found Workshop 2002(40):357-371
26. Miner JN, Ardecky B, Benbatoul K, Griffiths K, Larson CJ, Mais DE, Marschke K, Rosen J, Vajda E, Zhi L, Negro-Vilar A. Antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein-protein interaction profile. PNAS U S A 2007;104(49):19244-19249. PMID: 18032610
27. Beavo, J.A., 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol. Rev. 75, 725–748.
28. Miller, A.H., Vogt, G.J., Pearce, B.D., 2002. The phosphodiesterase type 4 inhibitor, rolipram, enhances glucocorticoid receptor function. Neuropsychopharmacology 27, 939–948.
29. Ogawa, R., Streiff, M.B., Bugayenko, A., Kato, G.J., 2002. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21(WAF1/CIP1) proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. Blood 99, 3390–3397.
30. Meyers, J.A., Taverna, J., Chaves, J., Makkinje, A., Lerner, A., 2007. Phosphodiesterase 4 inhibitors augment levels of glucocorticoid receptor in B cell chronic lymphocytic leukemia but not in normal circulating hematopoietic cells. Clin. Cancer Res. 13, 4920–4927.
31. Marko, D., Romanakis, K., Zankl, H., Furstenberger, G., Steinbauer, B., Eisenbrand, G., 1998. Induction of apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific PDE in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterparts. Cell Biochem. Biophys. 28, 75–101.

PK

32. Arimochi H, Morita K. Desipramine induces apoptotic cell death through nonmitochondrial and mitochondrial pathways in different types of human colon carcinoma cells. Pharmacology 2008;81:164–172.
33. Jan CR, Lu YC, Tseng LL, et al. Effect of the antidepressant desipramine on cytosolic Ca(2þ) movement and proliferation in human osteosarcoma cells. Pharmacology 2003;69: 190–196.
34. Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Kajta M, Lason W. Antidepressant drugs inhibit glucocorticoid receptor-mediated gene transcription—A possible mechanism. Br J Pharmacol 2000;130:1385–1393.
35. Okugawa G, Omori K, Suzukawa J, Fujiseki Y, Kinoshita T, Inagaki C. Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurones. J Neuroendocrinol 1999;11:887–895.
36. Herr AS, Tsolakidou AF, Yassouridis A, Holsboer F, Rein T. Antidepressants differentially influence the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in vitro. Neuroendocrinology 2003;78:12–22.
37. Pariante CM, Makoff A, Lovestone S, et al. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. Br J Pharmacol 2001;134:1335–1343.
38. Pepin MC, GovindanMV, Barden N. Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. Mol Pharmacol 1992;41:1016–1022.
39. Lai M, McCormick JA, Chapman KE, Kelly PA, Seckl JR, Yau JL. Differential regulation of corticosteroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. Neuroscience 2003;118:975–984.
40. Funato H, Kobayashi A, Watanabe Y. Differential effects of antidepressants on dexamethasone-induced nuclear translocation and expression of glucocorticoid receptor. Brain Res 2006;1117:125–134.
41. Okret S, Dong Y, Tanaka H, Cairns B, Gustafsson JA. The mechanism for glucocorticoid-resistance in a rat hepatoma cell variant that contains functional glucocorticoid receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 1991;40:353–361.
42. Langeveld CH, van Waas MP, Stoof JC, et al. Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone. J Neurosci Res 1992;31: 524–531.
43. Moalli PA, Rosen ST. Glucocorticoid receptors and resistance to glucocorticoids in hematologic malignancies. Leuk Lymphoma 1994;15:363–374.
44. Droms KA, Hanson LA, Malkinson AM, Beer DG. Altered dexamethasone responsiveness and loss of growth control in tumorigenic mouse lung cell lines. Int J Cancer 1993;53: 1017–1022.
45. Budunova IV, Carbajal S, Kang H, Viaje A, Slaga TJ. Altered glucocorticoid receptor expression and function during mouse skin carcinogenesis. Mol Carcinog 1997;18:177– 185.
46. Singh,R.P. et al. (2004) Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. Int. J. Cancer, 108, 733–740.
47. Yamaguchi,F. et al. (1999) Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H(2)O(2)/NaOH/DMSO system. J. Agric. Food Chem., 47, 2544–2548.
48. Sharma,G. et al. (2004) Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. Breast Cancer Res. Treat., 85, 1–12.
49. Hassoun,E.A. et al. (2004) The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. J. Biochem. Mol. Toxicol., 18, 196–203.
50. Whitley,A.C. et al. (2003) Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid—extensive binding to protein and DNA. Biochem. Pharmacol., 66, 907–915.

PK

51. Loarca-Pina,G. et al. (1998) Inhibitory effects of ellagic acid on the directacting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay. Mutat. Res., 398, 183–187.
52. Ferguson,L.R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutat. Res., 475, 89–111.
53. Middleton,E. Jr et al. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev., 52, 673–751.
54. Huang,M.T. et al. (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. Cancer Res., 54, 701–708.
55. Sohn,K.H. et al. (1995) Anti-angiogenic activity of triterpene acids. Cancer Lett., 94, 213–218.
56. Hollosy,F. et al. (2001) Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. Anticancer Res., 21, 3485–3491.
57. Konopleva,M. et al. (2002) Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. Blood, 99, 326–335.
58. Hoffer,E. et al. (1996) N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. Toxicol. Lett., 84, 7–12.
59. Rao,A.V. et al. (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J. Am. Coll. Nutr., 19, 563–569.
60. Porrini,M. et al. (2005) Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. Br. J. Nutr., 93, 93–99.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a. Dane bibliometryczne

Jestem autorem /współautorem 19 pełno tekstowych prac naukowych o łącznej punktacji

IF = 55,002 i MNiSW = 393 przy czym wartość bibliometryczna wynosiła dla:

- cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe:

IF = 29,725 (jako pierwszy autor IF = 12,163); **MNiSW = 198** (jako pierwszy autor MNiSW = 87)

- **prac** opublikowanych **przed doktoratem: IF=7,250 i MNiSW = 27**
- **prac** opublikowanych **po doktoracie: IF=47,752 i MNiSW = 366**

Liczba cytowań z bazy Web OF Science z dn. 20.03.2019 (bez autocytowań) = **193**

Index Hirscha z bazy Web of Science z dn. 20.03.2019 = **8**

b. Lista publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. Emanuel K, Ostrowski J, Kowalczyk P, Pytkowski B, Lewartowski B. Morphological and Physiological Properties of Entricular Myocytes of the Transgenic Rats TGR (mREN2)27, J. Expper. Clin. Cardiology, 1999; 4(2):113-121
2. Ostrowski J, Woszczynski M, Kowalczyk P, Wocial T, Hennig E, Trzeciak L, Janik P, Bomsztyk K. Increased activity of MAP, p70S6 and p90rs kinases is associated with AP-1 activation in spontaneous liver tumours, but not in adjacent tissue in mice. Br J Cancer 2000 Mar; 82(5):1041-50 **IF = 3,489; MNiSW = 13**
3. Ostrowski J, Woszczynski M, Kowalczyk P, Trzeciak L, Hennig E, Bomsztyk K. Treatment of mice with EGF and orthovanadate activates cytoplasmic and nuclear MAPK, p70S6k, andp90rsk in the liver. J Hepatol 2000 Jun; 32(6):965-74 **IF = 3,761; MNiSW = 14**
4. Kowalczyk P, Woszczynski M, Ostrowski J. Increased expression of ribosomal protein S2 in liver tumors, posthepactomized livers, and proliferating hepatocytes in vitro. Acta Biochim Pol 2002; 49(3):615-24 **IF = 0,6; MNiSW = 8**
5. Hanausek M, Spears E, Walaszek Z, Kowalczyk MC, Kowalczyk P, Wendel C, Slaga TJ. Inhibition of murine skin carcinogenesis by freeze-dried grape powder and other grape-derived major antioxidants. Nutr Cancer. 2011;63(1):28-38. **IF = 2,783; MNiSW = 30**

PK

6. Zoltaszek R, Kowalczyk P, Kowalczyk MC, Hanausek M, Kilianska ZM, Slaga TJ, Walaszek Z. Dietary D-glucarate effects on the biomarkers of inflammation during early post-initiation stages of benzo[a]pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. Oncol Lett. 2011 Jan;2(1):145-154 **IF = 0,106**
7. Kowalczyk MC, Spears E, Narog M, Zoltaszek R, Kowalczyk P, Hanausek M, Yoshimi N, Slaga TJ, Walaszek Z. Modulation of biomarkers related to tumor initiation and promotion in mouse skin by a natural β-glucuronidase inhibitor and its precursors. Oncol Rep. 2011 Sep;26(3):551-6 **IF = 1,835 ; MNiSW = 20**
8. Liang H, Kowalczyk P, Junco JJ, Klug-De Santiago HL, Malik G, Wei SJ, Slaga TJ. Differential Effects on Lung Cancer Cell Proliferation by Agonists of Glucocorticoid and PPARα Receptors. Mol Carcinog. 2014 Sep;53(9):753-63 **IF = 4,808; MNiSW = 30**
9. Boutard N, Białas A, Sabiniarz A, Guzik P, Banaszak K, Biela A, Bień M, Buda A, Bugaj B, Cieluch E, Cierpich A, Dudek Ł, Eggenweiler HM, Fogt J, Gaik M, Gondela A, Jakubiec K, Jurzak M, Kitlińska A, Kowalczyk P, Kujawa M, Kwiecińska K, Leś M, Lindemann R, Maciuszek M, Mikulski M, Niedziejko P, Obara A, Pawlik H, Rzymski T, Sieprawska-Lupa M, Sowińska M, Szeremeta-Spisak J, Stachowicz A, Tomczyk MM, Wiklik K, Włoszczak Ł, Ziemiańska S, Zarębski A, Brzózka K, Nowak M, Fabritius CH. Discovery and Structure-Activity Relationships of N-Aryl 6-Aminoquinoxalines as Potent PFKFB3 Kinase Inhibitors. ChemMedChem. 2019 Jan 8;14(1):169-181. **IF = 3,009; MNiSW = 30**
10. Boutard N, Białas A, Sabiniarz A, Guzik P, Banaszak K, Biela A, Bień M, Buda A, Bugaj B, Cieluch E, Cierpich A, Dudek Ł, Eggenweiler HM, Fogt J, Gaik M, Gondela A, Jakubiec K, Jurzak M, Kitlińska A, Kowalczyk P, Kujawa M, Kwiecińska K, Leś M, Lindemann R, Maciuszek M, Mikulski M, Niedziejko P, Obara A, Pawlik H, Rzymski T, Sieprawska-Lupa M, Sowińska M, Szeremeta-Spisak J, Stachowicz A, Tomczyk MM, Wiklik K, Włoszczak Ł, Ziemiańska S, Zarębski A, Brzózka K, Nowak M, Fabritius CH. Synthesis of amide and sulfonamide substituted N-aryl 6-aminoquinoxalines as PFKFB3 inhibitors with improved physicochemical properties. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Feb 15;29(4):646-653. **IF = 2,442; MNiSW = 25**
11. Boutard N, Sabiniarz A, Czerwińska K, Jarosz M, Cierpich A, Kolasińska E, Wiklik K, Gluza K, Commandeur C, Buda A, Stasiowska A, Bobowska A, Galek M, Fabritius CH, Bugaj M, Palacz E, Mazan A, Zarębski A, Krawczyńska K, Żurawska M, Zawadzki P, Milik M, Węgrzyn P, Dobrzańska M, Brzózka K, Kowalczyk P. 5-Keto-3-cyano-2,4-diaminothiophenes as selective maternal embryonic leucine zipper kinase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Feb 15;29(4):607-613 **IF = 2,442; MNiSW = 25**

c. Tematyka prac badawczych

Po uzyskaniu tytułu magistra rozpocząłem pracę nad doktoratem jako stypendysta Polskiej Fundacji „Gastroenterologia" w warszawskim Centrum Onkologii (w Laboratorium Badawczym Kliniki Gastroenterologii) pod kierunkiem i opieką prof. J. Ostrowskiego. Byłem zaangażowany w

PK

liczne projekty badawcze, począwszy od badania interakcji pomiędzy *Helicobacter pylorii* i komórkami nabłonkowymi żołądka, poprzez próby stworzenia konwencjonalnych szczepionek przeciwko niektórym szczepom H. pylori (z wykorzystaniem białek rekombinowanych oraz „nagiego" DNA), a skończywszy na badaniach mechanizmów zachodzących w nowotworach jelita grubego. Ostatecznie moja praca doktorska dotyczyła badania roli jednego szczególnego białka (białka K) w regulacji cyklu komórkowego i jego wpływu na proliferację komórek w nowotworach jelita grubego.

Bezpośrednio po obronie pracy doktorskiej i uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii, postanowiłem moją wiedzę i umiejętności, zdobyte przez wszystkie lata nauki wykorzystać w praktyce. Rozpocząłem pracę w dziale badawczo rozwojowym polskiej firmy farmaceutycznej Adamed. Pracowałem jako kierownik projektu mającego na celu stworzenie innowacyjnych małocząsteczkowych związków chemicznych, które poprzez modulację aktywności receptora PPAR gamma mogłyby służyć jako lek w chorobach związanych z zaburzeniami metabolizmu cukrów i lipidów (głównie cukrzycy typu II). Wynikiem pracy całego zespołu było stworzenie kilkutysięcznej biblioteki nowych cząsteczek chemicznych, przeszukanie jej pod kątem zdolności wiązania się z receptorem PPARgamma, a następnie zbadania właściwości biologicznych wybranych związków (oraz bezpieczeństwa ich stosowania) na liniach komórkowych i w modelach in vivo. Wytypowaliśmy kilka grup związków o największej potencjalnie aktywności biologicznej (i najmniejszej toksyczności), które zostały przetestowane wstępnie na liniach komórkowych jak i na zwierzęcych modelach cukrzycy typu II. W owym czasie projekt wygenerował 3 zgłoszenia patentowe, a projekt, według mojej wiedzy, został doprowadzony do I fazy badań klinicznych.

Patenty:

1. Patent#: WO/2006/077206, Co-Inventor(s): Majka Zbigniew, Rusin Katarzyna, Kludkiewicz Dominik, Sulikowski Daniel, Kurowski Krzysztof, Matusiewicz Katarzyna, Stawinski Tomasz, Kowalczyk Piotr NEW 3-PHENYLPROPIONIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS PPAR- GAMMA REZEPTOR LIGANDEN
2. Patent#: WO/2006/077217, Co-Inventor(s): Majka Zbigniew, Rusin Katarzyna, Sawicki Andrzej, Kludkiewicz Dominik, Sulikowski Daniel, Kurowski Krzysztof, Matusiewicz Katarzyna, Stawinski Tomasz, Kowalczyk Piotr NEW 3-PHENYLPROPIONIC ACID DERIVATIVES

PK

3. Patent#: WO/2006/067086, Co-Inventor(s): Majka Zbigniew, Stawinski Tomasz, Rusin Katarzyna, Sawicki Andrzej, Kurowski Krysztof, Matusiewicz Katarzyna, Sulikowski Daniel, Kowalczyk Piotr NEW 3-PHENYLPROPIONIC ACID DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF DIABETES

Po czteroletnim okresie pracy w Adamedzie, rozpocząłem staż podoktorski na Wydziale Farmakologii Uniwersytetu Teksańskiego w San Antonio, gdzie pod opieką prof. TJ Slagi badałem procesy związane ze stanami zapalnymi i procesami nowotworzenia w skórze, oraz roli receptora glukokortykoidowego i jego interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi AP-1 i NF-kB w nowotworach. Kontynuowałem moje zainteresowanie w obszarze poszukiwania nowych leków i możliwości terapii. W badaniach koncentrowaliśmy się na poszukiwaniu związków, pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego, które mogłyby być wykorzystane w zapobieganiu i leczeniu nowotworów o pochodzeniu nabłonkowym. Ten okres kariery jest głównym źródłem prac składających się na opisane we wcześniejszych sekcjach osiągnięcie naukowe. Zaowocował on jeszcze 4 dodatkowymi publikacjami (5-8) oraz szeregiem doniesień zjazdowych prezentowanych przez szereg kolejnych lat na konferencji AACR (American Association for Cancer Research).

Prezentacje zjazdowe:

- Junco J, Kowalczyk M, Kowalczyk P, Swan W, Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. Differential effects of promising phytonutrients on critical features of skin tumor promotion in SENCAR mice (Proceedings of the 100th Annual Meeting of the AARR 2009; vol. Abstr, no. 3898).
- Kinjo T, Kowalczyk P, Kowalczyk M, Walaszek Z, Nishimaki T, Slaga TJ, Hanausek M. Cytotoxic effect of desipramine on a mouse skin squamous cell carcinoma cell line (Proceedings of the 100th Annual meeting of the AACR 2009; vol. Abstr, no. 4091).
- Kowalczyk P, Kowalczyk M, Tolstykh O, Walaszek Z, Slaga TJ, Hanausek M. The effect of Compound A on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced acute skin inflammation in SENCAR mice (Proceedings of the 100th Annual Meeting of the AACR 2009; vol. Abstr, no. 2622).
- Kowalczyk M, Kowalczyk P, Tolstykh O, Hanausek M, Slaga TJ, Walaszek Z. Effects of combined natural source phytochemicals on expression of intermediate biomarkers during early stages of skin tumorgenesis in SENCAR mice 2(Proceedings of the 100th Annual Meeting of the AACR 2009; vol. Abstr, no. 4789).

PK

- Kinjo T, Kowalczyk P, Kowalczyk M, Walaszek Z, Nishimaki T, Slaga TJ, Hanausek M. Desipramine inhibits the growth of a mouse skin squamous cell carcinoma line independently of glucocorticoid receptor-mediated signal transduction (Proceedings of the 99th Annual Meeting of the AACR 2008; vol. Abstr, no. 2216).
- Kowalczyk M, Kowalczyk P, Swan W, Kinjo T, Grzelak M, Slaga TJ, Hanausek M, Walaszek Z. Combined effects of selected natural source inhibitors in murine skin cancer prevention (Proceedings of the 99th Annual Meeting of the AACR 2008; vol. Abstr, no. 5569).
- Kowalczyk P, Truong H, Kinjo T, Kowalczyk M, Swan W, Wendel C, Walaszek Z, Slaga TJ, Hanausek M. The effect of compound A on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced skin inflammation and keratinocyte proliferation in SENCAR mice (Proceedings of the 99th Annual Meeting of the AACR 2008; vol. Abstr, no. 2217).
- Kowalczyk M, Walaszek Z, Kowalczyk P, Slaga TJ, Hanausek M. Antiproliferative and proapoptotic effects of selected antioxidants in murine skin cancer prevention (AACR Annual Meeting Proceedings 2007; vol. Abstr, no. 30).
- Kowalczyk P, Kinjo T, Hillis A, Kowalczyk M, Walaszek Z, Slaga TJ, Hanausek M. Differential effect of two phosphodiesterase inhibitors on modulation of glucocorticoid receptor function in mouse skin tumorigenesis 2007 Apr. (AACR Annual Meeting Proceedings 2007; vol. Abstr, no. 2635).

Od wielu lat moja praca skupia się na rozwoju innowacyjnych terapii z zastosowaniem związków małocząsteczkowych. Ostatnie osiem lat pracowałem w Dziale B + R polskiej firmy biotechnologicznej Selvita na stanowisku kierownika naukowego projektów i byłem odpowiedzialny za realizację szeregu projektów badawczych. Były one realizowane zarówno we współpracy z firmami zagranicznymi (H3 Biomedicine, Nodthera Ltd), jak i rozwijane w ramach prac wewnętrznych. Projekty prowadzone w ramach współpracy były moimi oryginalnymi pomysłami, które dzięki potencjałowi terapeutycznemu i obiecującym wynikom znalazły zainteresowanie u partnerów zagranicznych, a obecnie znajdują się na etapie selekcji kandydatów klinicznych. Celem prowadzonych projektów był rozwój nowych terapii w zakresie szerokiego spektrum chorób onkologicznych jak i chorób o podłożu autoimmunologicznym. Projekty w dużej części finansowane były przez granty ze środków unijnych (MARR, PARP, NCBiR), których byłem autorem i / lub kierownikiem. Okres ten zaowocował 3 publikacjami z zakresu rozwoju nowych leków (9-11) oraz szeregiem publikacji zajadowych (AACR, EORTC). Obecnie kontynuuje moje poszukiwania nowych terapii w polskiej firmie OncoArendi.

PK

Prezentacje zjazdowe:

- Anna Bartosik, Pawel Guzik, Marta Sowinska, Karolina Gluza, Marcin Krol, Anna Wrobel, Agnieszka Dreas, Faustyna Iwanska, Magdalena Zastawna, Urszula Kulesza, Nicolas Boutard, David Schultz, Justyna Wujkowska, Karolina Pyziak, Agnieszka Sroka-Porada, Agnieszka Przybylowicz, Agnieszka Adamus, Magdalena Sieprawska-Lupa, Przemyslaw Golik, Piotr Kowalczyk, Krzysztof Brzozka, Tomasz Rzymski and Mateusz Nowak Discovery of novel SHMT small molecule inhibitors for cancer treatment (Proceedings: AACR Annual Meeting 2018; Abstract 3516) doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-3516
- P. Wegrzyn, P. Kowalczyk, M. Dobrzanska, M. Knop, M. Obacz, K. Gluza, C. Commandeur, A. Sabiniarz, K. Wiklik, A. Golas, F. Vaillancourt, N. Larsen, J. Wang, D. Reynolds, D. Ito, J. Zou, M. Aicher, P. Smith, P. Zhu, K. Brzozka Development of selective MELK kinase inhibitors for breast cancer treatment. (European Journal of cancer December 2016 Volume 69, Supplement 1, Page S148)doi.org/10.1016/S0959-8049(16)33040-4
- Piotr Kowalczyk, Paulina Węgrzyn, Monika Prokopowicz, Martyna Knop, Karolina Mazur, Katarzyna Dziedzic, Karolina Gluza, Martyna Knop, Katarzyna Dziedzic, Karolina Mazur, Adam Radzimierski, Claude Commandeur, Magdalena Zawadzka, Kristjan Bloudoff, Fred Vaillancourt, Nick Larsen, John Wang, Dom Reynolds, Daisuke Ito, Jian Zou, Michelle Aicher, Pete Smith, Ping Zhu and Krzysztof Brzózka Development of selective MELK kinase inhibitors for breast cancer treatment (AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics; November 5-9, 2015; Abstract C26) doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-15-C26
- Piotr Kowalczyk, Paulina Wegrzyn, Przemyslaw Zawadzki, Edyta Palacz, Ewa Trebacz, Katarzyna Wiklik, Mariusz Milik, Adrian Zarebski, Karolina Krawczynska and Krzysztof Brzózka Development of selective MELK kinase inhibitors for cancer treatments (Proceedings: AACR 104th Annual Meeting 2013; Abstract 2160) 10.1158/1538-7445.AM2013-2160

Udział w pracach B + R finansowanych przez granty

- Projekt celowy (finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego) nr 6ZR10 2009C/07241 pt. "Inhibitory kinaz - badania i wdrożenie leku przeciwnowotworowego najnowszej generacji". - **kierownik projektu**

- Projekt współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007-2013, nr POIG.01.04.00-12-049/11 pt. „Nowa terapia przeciwnowotworowa w oparciu o inhibitory kinaz białkowych". - **kierownik projektu**

- Projekt współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007-2013, nr POIG.01.04.00-12-120/12 pt. "Innowacyjne

PK

leki onkologiczne odziaływujące na metabolizm komórek nowotworowych" - **główny pomysłodawca i autor biznes planu**

- Projekt współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007-2013, nr POIG.01.04.00-12-100/11 pt. „Innowacyjna terapia chorób o podłożu autozapalnym i autoimmunologicznym". – **główny pomysłodawca i autor biznes planu oraz kierownik projektu**
- Projekt współfinansowany z Funduszów Europejskich w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój, nr POIR.01.01.01-00-1163/15 pt. „Rozwój spersonalizowanej terapii nowotworów litych". - **główny pomysłodawca i autor biznes planu oraz kierownik projektu**

Wdrożenia wyników prac B+R

- Projekt współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007-2013, nr POIG.01.04.00-12-100/11 pt. „Innowacyjna terapia chorób o podłożu autozapalnym i autoimmunologicznym". – **sprzedaż praw do wyników projektu**
- Projekt współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007-2013, nr POIG.01.04.00-12-049/11 pt. „Nowa terapia przeciwnowotworowa w oparciu o inhibitory kinaz białkowych". – **wdrożenie wyników w działalność własną**

Warszawa 23/04/2019

Piotr Kowalczyk

Piotr Kowalczyk