

AUTOREFERAT

Dr Małgorzata Opydo

**Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński**



Kraków, 2023

1. Imię i nazwisko

Małgorzata Opydo

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

- **Doktor nauk biologicznych**, stopień uzyskany 19.06.2007 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Rozprawa doktorska przygotowana w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej (obecnie Pracownia Hematologii Eksperymentalnej) Instytutu Zoologii (obecnie Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych).

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ komórek podścieliska szpikowego na proces regeneracji uszkodzonej kory mózgowej”.

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Dąbrowski (Uniwersytet Jagielloński)

Recenzenci: prof. dr hab. Mariusz Ratajczak (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie, obecnie: - Warszawski Uniwersytet Medyczny, - University of Louisville)
prof. dr hab. Marian Lewandowski (Uniwersytet Jagielloński)

- **Magister biologii**, tytuł uzyskany 5.06.2003 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Praca magisterska przygotowana w Pracowni Hematologii i Toksykologii (obecnie Pracownia Hematologii Eksperymentalnej) Instytutu Zoologii (obecnie Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych).

Tytuł pracy magisterskiej: „Zabliźnianie uszkodzenia tkanki mózgowej u szczura po podaniu zawiesiny komórek szpikowych w miejsce uszkodzenia”.

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Dąbrowski (Uniwersytet Jagielloński)

Recenzent: dr hab. Grażyna Barbacka-Surowiak (Uniwersytet Jagielloński)

- **Dyplom Studium Pedagogicznego** uzyskany na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2003 roku.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

10.2012 – obecnie	Uniwersytet Jagielloński, stanowisko: adiunkt w Pracowni Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
10.2007 – 09.2012	Uniwersytet Jagielloński, stanowisko: asystent w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii (urlop macierzyński 19.08.2008 – 22.12.2008)
05.2005 – 09.2007	Uniwersytet Jagielloński, stanowisko: asystent ; umowa na zastępstwo w wymiarze ½ etatu w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii

4. 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 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

I. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Ocena aktywności przeciwbiałaczkowej mimetyków BH3 – selektywnych inhibitorów anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2 w badaniach in vitro

II. Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Współczynnik wpływu impact factor (IF) podano według JCR zgodnie z rokiem opublikowania pracy; punkty MNiSW/MEiN według punktacji z roku opublikowania pracy oraz według aktualnego wykazu czasopism naukowych z dnia 17.07.2023 roku. Liczbę cytowań podano według bazy Web of Science, Scopus oraz Google Scholar z dnia 7.08.2023 roku.

Moje publikacje ukazywały się pod nazwiskami: Opydo-Chanek oraz Opydo (od 2021 r.)

P01. Opydo-Chanek M., Mazur L. Comparison of *in vitro* antileukemic activity of obatoclax and ABT-737. *Tumor Biology* 37: 10839-10849, 2016.
doi: 10.1007/s13277-016-4943-z

*IF*₂₀₁₆ – 3.650; punkty *MNiSW*₂₀₁₆ - 30; *MEiN*₂₀₂₃ - 100

Cytowania: Web of Science – 6; *Scopus* - 5; *Google Scholar* -7

P02. Opydo-Chanek M., Rak A., Cierniak A., Mazur L. Combination of ABT-737 and resveratrol enhances DNA damage and apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. *Toxicology in vitro* 42: 38-46, 2017.
doi:10.1016/j.tiv.2017.03.013

*IF*₂₀₁₇ – 3.105; punkty *MNiSW*₂₀₁₇ - 30; *MEiN*₂₀₂₃ - 100

Cytowania: Web of Science - 10; Scopus - 11; Google Scholar - 12

P03. Opydo-Chanek M., Cichoń, I., Rak, A., Kołaczowska, E., Mazur, L. The pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax promotes differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Investigational New Drugs* 38: 1664-1676, 2020.
doi: 10.1007/s10637-020-00931-4

*IF*₂₀₂₀ – 3.850; punkty *MNiSW*₂₀₂₀ - 100; *MEiN*₂₀₂₃ - 100

Cytowania: Web of Science - 3; Scopus - 3; Google Scholar - 5

P04. Opydo, M., Mlyczyńska, A., Mlyczyńska, E., Rak, A., Kołaczowska, E. Synergistic action of MCL-1 inhibitor with BCL-2/BCL-XL or MAPK pathway inhibitors enhances acute myeloid leukemia cell apoptosis and differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 7180, 2023.
doi:10.3390/ijms24087180

*IF*₂₀₂₃ – 5.6; punkty *MEiN*₂₀₂₃ - 140

Cytowania: Web of Science - 0; Scopus - 0; Google Scholar - 0

P05. Opydo-Chanek M., Gonzalo O., Marzo I. Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: current evidence and future prospects. *Biochemical Pharmacology* 136: 12-23, 2017.
doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.006

*IF*₂₀₁₇ – 4.235; punkty *MNiSW*₂₀₁₇ - 40; *MEiN*₂₀₂₃ - 140

Cytowania: Web of Science - 45; Scopus - 46; Google Scholar - 71

Sumaryczny IF prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe: 20.44

Suma punktów MNiSW/MEiN według punktacji z roku opublikowania pracy: 340

Suma punktów MEiN według aktualnego wykazu czasopism (2023): 580

Liczba cytowań: Web of Science- 64, Scopus- 65, Google Scholar- 95

III. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Podstawę rozprawy habilitacyjnej stanowi cykl 4 oryginalnych prac badawczych oraz 1 pracy przeglądowej, opublikowanych w latach 2016-2023, które stanowią znaczący wkład do obecnego stanu wiedzy na temat mechanizmów działania mimetyków BH3, będących inhibitorami anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2, w komórkach białaczkowych.

Wprowadzenie

Dzięki znacznemu postępowi, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie poznania molekularnych podłoży rozwoju nowotworów, możliwe stało się poszukiwanie terapii ukierunkowanych na swoiste cele w komórce nowotworowej. Do takich celów należą między innymi białka, kodowane przez geny, zwane onkogenami. W komórkach nowotworowych onkogeny, które powstały w wyniku mutacji proto-onkogenów, powodują zmiany w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, a w konsekwencji zwiększenie proliferacji i zahamowanie apoptozy tych komórek (Chial, 2008). Unikanie śmierci apoptotycznej jest jedną z cech charakterystycznych nowotworów (Hanahan i Weinberg, 2011). Jak wykazały liczne badania, deregulacja apoptozy w komórkach nowotworowych ma znaczenie nie tylko w kontekście nowotworzenia, ale również stanowi ważny mechanizm oporności terapeutycznej i istotny czynnik rokowniczy (Sharma i wsp., 2019). Stąd poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na indukowanie apoptozy w komórkach nowotworowych jest niezbędne w celu zwiększenia efektywności leczenia. **W badaniach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego skupiłam się na zagadnieniach dotyczących celowanego oddziaływania na aktywność anti-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2**, których najważniejszą i najlepiej poznaną funkcją jest regulacja szlaku wewnętrznego apoptozy.

Białka z rodziny BCL-2 stanowią stosunkowo dużą grupę białek, którą cechuje różnorodność strukturalna i funkcjonalna. Do tej rodziny białek zalicza się zarówno białka hamujące, jak i promujące proces apoptozy. Wspólną cechą wszystkich białek z rodziny BCL-2 jest obecność w strukturze konserwatywnych domen (ang. *Bcl-2 homology domain*, BH). Anti-apoptotyczne białka podrodziny BCL-2, do której zaliczamy m.in. BCL-2, MCL-1, BCL-xL, wykazują w swojej budowie obecność czterech domen BH. Wśród białek proapoptotycznych wyróżniamy wielodomenowe białka podrodziny BAX (białko BAX i BAK) zbudowane z domen BH1-BH3 oraz białka zawierające wyłącznie domenę BH3, tzw. „BH3-only”, do których zaliczamy m.in. białko BIM i BAD (Tzifi et al. 2012). Wzajemne interakcje między białkami rodziny BCL-2 decydują o losie komórki, jej przeżyciu lub śmierci. Funkcją białek anti-apoptotycznych jest zachowanie integralności błony mitochondrialnej przez wiązanie i hamowanie pro-apoptotycznych białek podrodziny BAX. Białka podrodziny BAX indukują zmiany w błonie mitochondrialnej, prowadzące do uwolnienia białek pro-apoptotycznych, w tym cytochromu c, co powoduje aktywację proteolitycznej aktywności kaspaz i w konsekwencji śmierć komórki. Funkcja białek BH3-only jest natomiast realizowana przez bezpośrednią aktywację pro-apoptotycznych białek podrodziny BAX lub pośrednio przez oddziaływanie z anti-apoptotycznymi białkami podrodziny BCL-2 (Tzifi et al. 2012).

Nadekspresja anti-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2 obserwowana w wielu typach nowotworów, w tym w białaczkach, jest odpowiedzialna za oporność komórek nowotworowych na leczenie, a tym samym ma przełożenie na niedostateczną skuteczność stosowanej terapii (Quian i wsp. 2022). W ostatnich latach dokonano istotnej obserwacji, że komórki nowotworowe "uzależniają się" od wysokiej ekspresji białek anti-apoptotycznych w celu unikania śmierci, co czyni je bardziej wrażliwymi na czynniki, które hamują funkcję tych białek (zjawisko określane jako "*primed to death*") (Certo i wsp. 2006). Dlatego też poszukiwanie i testowanie nowych związków hamujących aktywność anti-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2 ma bardzo duże znaczenie dla rozwoju przeciwnowotworowej terapii

celowanej. W świetle istniejących doniesień, **głównym celem badań stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe była ocena aktywności przeciwbiałaczkowej inhibitorów białek BCL-2, określanych jako mimetyki BH3**. Związki te naśladują pod względem funkcjonalnym i strukturalnym pro-apoptotyczne białka BH3-only, najważniejszych w komórce antagonistów anty-apoptotycznych białek BCL-2. Mimetyki BH3 w sposób specyficzny wiążą się z bruzdą hydrofobową białek anty-apoptotycznych, co prowadzi do zablokowania ich funkcji, a w konsekwencji inicjuje śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy (Billard, 2013). Mimetyki BH3 mogą być zarówno związkami o charakterze peptydów analogicznych do domeny BH3 białek pro-apoptotycznych, jak i związkami o charakterze niepeptydowym, pochodzenia naturalnego lub syntetycznego (Billard, 2013). Jak dotąd zsyntetyzowano szereg mimetyków BH3 o różnej selektywności wobec anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2, spośród których kilka zakwalifikowało się do badań klinicznych, m.in. ABT-263, MIK665 (S64315) i ABT-199 (Vogler i wsp. 2017). Ostatni z wymienionych, pod nazwą wenetoklaks, został jako pierwszy dopuszczony do stosowania klinicznego w 2016 roku w monoterapii nawrotowej lub odpornej na leczenie przewlekłej białaczki limfocytowej z delecją 17p (Deeks, 2016). Był to sukces, będący wynikiem dekady badań nad mimetykami BH3.

Publikacje, stanowiące prezentowane osiągnięcie naukowe, włączają się w obszar badań nad znaczeniem mimetyków BH3 w terapii skierowanej przeciwko nowotworom układu krwiotwórczego - białaczkom. Biorąc pod uwagę dostępną wiedzę o aktywności mimetyków BH3, **w prowadzonych badaniach przyjąłam ogólną hipotezę, iż mimetyki BH3 mogą uwrażliwiać komórki białaczkowe na sygnały śmierci, a tym samym zwiększać skuteczność związków o aktywności cytotoksycznej i potencjale przeciwbiałaczkowym**. Uważam, że podjęty problem i realizacja tych badań są szczególnie istotne w świetle danych dotyczących zachorowalności na białaczkę. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) białaczka była 15-tym najczęściej diagnozowanym nowotworem oraz 11-tą najczęstszą przyczyną śmierci z powodu nowotworu na świecie w roku 2020. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowalności na białaczkę, a co istotne, oszacowano, że do roku 2040 liczba chorych na białaczkę wzrośnie aż o 45 % (dane *Global Cancer Observatory*, międzynarodowej platformy współprowadzonej przez WHO oraz *International Agency for Research of Cancer*, IARC). Wśród białaczek najbardziej agresywnym przebiegiem charakteryzują się ostre białaczki, zarówno szpikowe (wywodzące się z linii mieloidalnej hematopoezy), jak i limfoblastyczne (wywodzące się z linii limfoidalnej hematopoezy). Mimo intensywnego rozwoju nowych kierunków leczenia białaczek z zastosowaniem między innymi terapii celowanej, ze względu na dużą heterogenność tej grupy nowotworów hematologicznych, nie wszyscy chorzy odnoszą korzyści z leczenia. Dlatego niezbędne jest prowadzenie badań w celu określenia dodatkowych punktów uchwytu w komórce nowotworowej, na których ukierunkowane oddziaływanie w monoterapii lub w terapii skojarzonej zwiększyłoby efektywność leczenia.

Poniżej prezentuję 5 prac składających się na moje osiągnięcie naukowe, z wyszczególnieniem celów badawczych i otrzymanych wyników zawartych w 4 pracach oryginalnych. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmów działania mimetyków BH3 w komórkach białaczkowych oraz odpowiadają na pytanie, jakie

terapię skojarzone z mimetykami BH3 mogą zapewnić wysoką skuteczność przeciwbiałaczkową.

P01. Opydo-Chanek M., Mazur L. Comparison of *in vitro* antileukemic activity of obatoclax and ABT-737. *Tumor Biology* 37: 10839-10849, 2016.

Celem badań zawartych w publikacji P01 było określenie i porównanie aktywności przeciwbiałaczkowej dwóch mimetyków BH3, obatoklaksu i ABT-737, podanych pojedynczo i w skojarzeniu ze związkami chemioterapeutycznymi, mafosfamidem lub daunorubicyną. Obatoklaks jest syntetycznym związkiem chemicznym, pochodną bakteryjnej prodygininy, znanym również pod nazwą GX15-070. Obatoklaks należy do tzw. pan-inhibitorów BCL-2, wykazuje bowiem specyficzność wobec wszystkich białek anty-apoptotycznych z rodziny BCL-2 (Townsend i wsp., 2021). ABT-737 został zaprojektowany jako drobnocząsteczkowy inhibitor, który wiąże się z dużym powinowactwem do białek anty-apoptotycznych BCL-2, BCL-xL oraz BCL-W, ale wykazuje niewielkie powinowactwo do MCL-1 (Marzo i Naval, 2008). Zademonstrowano, iż związek ten strukturalnie naśladuje domenę BH3 białka BAD (Lee i wsp., 2007).

Badania były prowadzone *in vitro* na ludzkich liniach komórkowych wyprowadzonych z komórek pacjentów z różnym typem ostrej białaczki: komórkach białaczki promielocytarnej linii HL-60, komórkach ostrej białaczki mieloblastycznej linii ML-1 i komórkach białaczki monocytowej linii U937, jak również na komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej T-komórkowej linii MOLT-4. W pierwszym etapie badań dokonano oceny zmian w żywotności komórek białaczkowych w efekcie działania mimetyków BH3 zastosowanych pojedynczo. Testowane inhibitory spowodowały zależny od stężenia spadek żywotności komórek białaczkowych, przy czym obatoklaks wpłynął na obniżenie żywotności komórek w większym stopniu niż ABT-737. Ponadto, porównując wartości IC₅₀ (ang. *inhibitory concentration*, stężenie związku powodujące spadek żywotności komórek o 50%), wykazano, iż najbardziej wrażliwą na działanie związków była linia komórek białaczki limfoblastycznej MOLT-4, natomiast znaczną opornością charakteryzowały się komórki ostrej białaczki szpikowej linii ML-1 i U937. Różnica w odpowiedzi komórek na obatoklaks i ABT-737 może wynikać z profilu ekspresji białek z rodziny BCL-2, wykazano bowiem, iż komórki U-937 i MCL-1 mają wysoką ekspresję białka MCL-1 (Kozopas i wsp. 1993), co jest stwierdzonym w licznych badaniach czynnikiem oporności komórek nowotworowych na ABT-737 (Konoplewa i wsp. 2006, van Delft i wsp. 2006).

W kolejnej części badań, testowane mimetyki BH3 zastosowano w połączeniu z dwoma związkami chemioterapeutycznymi o odmiennym mechanizmie działania: daunorubicyną (DAU) oraz mafosfamidem (MAF). Daunorubicyna należy do grupy antybiotyków antracyklinowych i jest stosowana w leczeniu ostrej białaczki szpikowej w połączeniu z cytarabiną. Jednym z mechanizmów działania DAU jest hamowanie topoizomerazy II (Nadas i Sun, 2006). Mafosfamid jest pochodną cyklofosfamidu, należy do grupy związków alkilujących, a mechanizm jego działania polega na indukowaniu uszkodzeń DNA w komórce (Mazur i wsp. 2012). Poprzez szczegółową analizę typu interakcji za pomocą metody Chou-Talalay'a (Chou 2006), wyznaczono współczynnik CI (ang. *combination index*, indeks

kombinacji), który w przypadku każdej kombinacji mimetyku BH3 (ABT-737 lub obatoklaksu) ze związkiem chemioterapeutycznym (DAU lub MAF) we wszystkich liniach komórek białaczkowych miał wartość poniżej 1, co oznacza działanie synergistyczne zastosowanych skojarzeń. Dalsze analizy cytometryczne i mikroskopowe pozwoliły na stwierdzenie, iż synergizm ten może być wynikiem wzrostu efektywności indukowania apoptozy w komórkach białaczkowych. Interesująca była obserwacja, iż ABT-737 w połączeniu z MAF lub DAU indukował apoptozę w komórkach HL-60 skuteczniej niż obatoklaks, mimo iż ten inhibitor wykazywał wysoki synergizm w obniżeniu żywotności komórek. Obserwacja ta sugeruje istnienie oprócz pro-apoptotycznego również innego mechanizmu działania obatoklaksu w komórkach białaczkowych (tzw. efekt „off-target”).

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach wykazano wysoki potencjał przeciwbiałaczkowy obatoklaksu i ABT-737 oraz ich kombinacji z antybiotykiem antracyklinowym i związkiem alkilujacym. Różnice w odpowiedzi komórek białaczkowych na zastosowane związki wskazują na istotne znaczenie selektywności zastosowanych inhibitorów wobec anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2. Warto podkreślić, że otrzymane wyniki były pierwszymi pokazującymi synergizm działania zastosowanych kombinacji mimetyków BH3 w komórkach białaczkowych.

P02. Opydo-Chanek M., Rak A., Cierniak A., Mazur L. Combination of ABT-737 and resveratrol enhances DNA damage and apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. Toxicology in vitro 42: 38-46, 2017.

Wyniki otrzymane w pierwszej pracy skłoniły mnie do poszerzenia badań nad możliwością zastosowania ABT-737 w ostrej białaczce limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL). ALL jest grupą nowotworów wywodzących się z komórek prekursorowych limfocytów w szpiku kostnym, które nie dojrzewają i nadmiernie proliferują. Wyszczególnia się podział ALL na pochodzące z linii limfocytów T oraz B. T-ALL stanowi 85% ostrych białaczek u pacjentów pediatrycznych i jest najczęstszym nowotworem wieku dziecięcego, natomiast u dorosłych pacjentów cechuje się szczególnie złym rokowaniem (Pui i wsp., 2008). Co istotne, unikanie apoptozy poprzez nieprawidłową ekspresję białek z rodziny BCL-2, jest powszechną cechą T-ALL. Podwyższony poziom anty-apoptotycznych członków rodziny BCL-2 został odnotowany w liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej i w komórkach izolowanych od pacjentów (Campana i wsp. 1993).

W przeprowadzonych badaniach postanowiłam zastosować ABT-737 w skojarzeniu ze związkiem pochodzenia naturalnego, resweratrolem (RES), który jest polifenolem z grupy flawonoidów. Wybór skojarzenia podyktowany był licznymi doniesieniami dotyczącymi aktywności przeciwnowotworowej związków polifenolowych. W dotychczasowych badaniach potwierdzono działanie resweratrolu na wszystkich trzech głównych etapach kancerogenezy: inicjacji, promocji oraz progresji (Barjot i wsp., 2007). Stwierdzono również, że resweratrol zastosowany w stężeniu 50 μ M zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce już po 2 godzinach od podania, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia DNA, aktywacji białka p53 i indukcji apoptozy na szlaku wewnętrznym (Hussain i wsp., 2011). W świetle istniejących doniesień wskazujących, że ABT-737 i resweratrol aktywują mitochondrialny

szlak apoptozy przez różne, ale uzupełniające się mechanizmy, postawiłam hipotezę, że połączenie ABT-737 i resweratrolu może nasilać ich cytotoksyczność w komórkach nowotworowych poprzez zwiększenie apoptozy.

Celem badań zawartych w publikacji P02 było określenie aktywności cytotoksycznej ABT-737 zastosowanego pojedynczo oraz w skojarzeniu ze związkiem pochodzenia naturalnego – resweratolem w komórkach białaczki limfoblastycznej T-komórkowej linii MOLT-4. Aby uzyskać wgląd w mechanizmy działania ABT-737 i RES, określono ich wpływ na żywotność komórek MOLT-4, uszkodzenia DNA, przebieg cyklu komórkowego i indukcję apoptozy w komórkach białaczkowych.

W przeprowadzonych badaniach za pomocą testu kometowego wykazano, iż ABT-737 i RES podane pojedynczo indukowały uszkodzenie DNA w komórkach MOLT-4. Działanie genotoksyczne ABT-737 i RES uległo nasileniu, gdy związki te podano w skojarzeniu. Aktywacja p53 jest dobrze znanym zjawiskiem występującym jako odpowiedź komórki na uszkodzenie DNA, które prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i/lub apoptozy, dlatego kolejnym krokiem było zbadanie przebiegu cyklu komórkowego i ekspresji p53 po podaniu ABT-737 i/lub RES. Zaobserwowano wzrost poziomu białka p53 po ekspozycji komórek białaczkowych na resweratrol, czemu towarzyszyło zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S. Interesująca była obserwacja, iż ABT-737 zastosowany pojedynczo nie indukował zmian w cyklu komórkowym oraz ekspresji p53. Jednakże, gdy ABT-737 zastosowano w połączeniu z RES, stwierdzono wyraźny wzrost poziomu białka p53. Ponadto zaobserwowano redystrybucję komórek w cyklu komórkowym z fazy S do fazy G0/G1. Co istotne, kumulacja komórek w fazie G0/G1 cyklu komórkowego była związana z wyraźnym wzrostem apoptotycznej fragmentacji DNA w tej fazie cyklu. Opierając się na badaniach Kojima et al. (2006), które wykazały, że ABT-737 indukował apoptozę w komórkach ostrej białaczki szpikowej, głównie w fazie G1 cyklu komórkowego, co było związane z niskim stosunkiem BCL-2/BAX, w dalszej części badań sprawdziłam ekspresję tych białek, jak również indukcję apoptozy (poprzez analizę eksternalizacji fosfatydyloseryny, aktywację kaspazy 3/7 oraz zmiany w potencjale mitochondrialnym). Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały, iż kombinacja ABT-737 i RES działa synergistycznie w celu aktywacji białka BAX i supresji białka BCL-2 i wykazuje znacząco wyższe działanie pro-apoptotyczne w porównaniu do efektów obserwowanych po zastosowaniu tych związków pojedynczo.

Podsumowując, **otrzymane rezultaty dowodzą, iż zastosowanie ABT-737 w skojarzeniu z RES w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej może wzmocnić działanie pro-apoptotyczne każdego związku z osobna, a tym samym przyczynić się do bardziej efektywnego usuwania komórek białaczkowych na drodze apoptozy.** Wyniki tych badań stanowią znaczący wkład do istniejącej wiedzy na temat mechanizmów działania ABT-737 i potencjalnych kombinacji tego związku dla terapii ALL.

P03. Opydo-Chanek M., Cichoń, I., Rak, A., Kołaczowska, E., Mazur, L. The pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax promotes differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Investigational New Drugs 38: 1664-1676, 2020.

Celem badań zawartych w artykule P03 było określenie wpływu obatoklaksu na indukowanie różnicowania i apoptozy w komórkach ostrej białaczki szpikowej linii HL-60. Hipoteza i cel tej pracy powstały podczas prowadzenia badań, których wyniki opublikowano w artykule P01. W trakcie obserwacji mikroskopowych odnotowałam obecność komórek różnicujących się w analizowanej populacji komórek HL-60 potraktowanych obatoklaksem. Opierając się na dostępnej wiedzy oraz na wstępnych obserwacjach postawiłam hipotezę, że celowane oddziaływanie na aktywność anty-apoptotycznych białek rodziny BCL-2 może nie tylko indukować apoptozę w komórkach ostrej białaczki szpikowej (ang. acute myeloid leukemia, AML), ale również uruchomić proces ich różnicowania. Obserwacja ta jest istotna z terapeutycznego punktu widzenia. Główną przyczyną rozwoju AML jest bowiem zahamowanie procesu różnicowania hematopoetycznych komórek prekursorowych linii mieloidalnej, czemu towarzyszy ich wzmożona proliferacja oraz oporność na sygnały śmierci. W badaniach nad AML wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu terapii indukującej różnicowanie komórek białaczkowych. Dla skutecznego leczenia AML ważne jest wznowienie procesu różnicowania, a następnie indukcja śmierci komórki. Przykładem takiej terapii jest zastosowanie ATRA (kwas całkowicie trans-retinowy) w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (podtyp AML), które znacznie poprawiło rokowania wśród pacjentów (Nowak i wsp. 2009). Jednak dla pozostałych podtypów AML nie ma skutecznej alternatywy. Biorąc to pod uwagę, zbadanie jak dotąd niepoznanych mechanizmów działania pro-różnicującego obatoklaksu w komórkach AML stanowiło zagadnienie interesujące i istotne do realizacji. Badania te prowadziłam w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Mimetyki BH3 jako potencjalne związki indukujące różnicowanie komórek ostrej białaczki szpikowej – poszukiwanie nowego mechanizmu działania” w programie *Miniatura 1* finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki.

Badania przeprowadzono na komórkach ostrej białaczki szpikowej linii HL-60, która jest dobrze poznanym i szeroko stosowanym modelem do badań procesu różnicowania komórek białaczkowych *in vitro*. Ekspozycja komórek HL-60 na obatoklaks spowodowała zmiany morfologiczne charakterystyczne dla komórek ulegających różnicowaniu w linii granulocytarnej. Równocześnie w obrazie mikroskopowym obserwowano zależny od stężenia i czasu inkubacji wzrost liczby komórek wykazujących cechy morfologiczne apoptozy. Aby zweryfikować wyniki analizy mikroskopowej, przeprowadzono analizę ekspresji CD11b (marker różnicowania komórek linii granulocytarnej), analizę produkcji ROS (test NBT), cytometryczną ocenę przebiegu cyklu komórkowego i indukcji apoptozy w komórkach HL-60. W efekcie działania obatoklaksu zaobserwowano kumulację komórek w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, zwiększenie odsetka komórek wykazujących ekspresję CD11b oraz komórek, mających zdolność wytwarzania ROS. Wyniki te wyraźnie wskazały, iż obatoklaks indukuje różnicowanie komórek HL-60. Wraz z indukcją dojrzewania komórek, obatoklaks uruchomił proces apoptozy w komórkach białaczkowych, które wykazywały eksternalizację fosfatydyloseryny oraz aktywację kaspazy 3/7. Ponadto, obatoklaks spowodował obniżenie ekspresji białka BCL-2 w komórkach HL-60, które korelowało ze wzrostem różnicowania i apoptozy komórek, sugerując, że zmniejszona ekspresja BCL-2 może być jednym ze zdarzeń wyzwalających obserwowane procesy w tych komórkach. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, które wskazują, iż w trakcie różnicowania w komórkach HL-60 obserwuje się stopniowy spadek ekspresji białka BCL-2, czemu towarzyszy wzmożony

proces apoptozy (Benito i wsp. 1995). Nowych wyników dostarczyły również kolejno wykonane pomiary cytometryczne, w których przeprowadzono dwuparametryczną analizę ekspresji CD11b i znakowania fosfatydyloseryny. Otrzymane wyniki pozwoliły wyciągnąć wniosek, iż apoptoza indukowana przez obatoklaks w komórkach AML może odbywać się na drodze zależnej od różnicowania.

Podsumowując, wyniki otrzymane w przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy pokazały wpływ mimetyku BH3, obatoklaksu, na indukcję różnicowania i apoptozy zależnej od różnicowania w komórkach ostrej białaczki szpikowej. Wyniki te przyczyniły się do poszerzenia wiedzy o aktywności przeciwbiałaczkowej obatoklaksu i dostarczyły nowych danych dotyczących mechanizmów jego działania.

P04. Opydo, M., Mlyczyńska, A., Mlyczyńska, E., Rak, A., Kolaczowska, E. Synergistic action of MCL-1 inhibitor with BCL-2/BCL-XL or MAPK pathway inhibitors enhances acute myeloid leukemia cell apoptosis and differentiation. International Journal of Molecular Sciences 24: 7180, 2023.

Istotną rolę w różnicowaniu prawidłowych komórek hematopoetycznych i komórek AML obok białka BCL-2 odgrywa również białko MCL-1 (Craig 2002). W świetle wyników badań zawartych w artykule **P03**, zasadnym było zbadanie, czy selektywne hamowanie aktywności białka MCL-1 w komórkach AML może również indukować, poza apoptozą, różnicowanie tych komórek. Stąd **celem badań** opublikowanych w artykule **P04** było **określenie wpływu inhibitora białka MCL-1, S63845, na apoptozę i różnicowanie komórek ostrej białaczki szpikowej.** Pierwsze dane dotyczące tego inhibitora pochodzą z 2016 roku, które to wykazały, iż w porównaniu do wcześniej opracowanych inhibitorów białka MCL-1, S63845 charakteryzuje się najwyższym powinowactwem do tego białka, bez zauważalnego wiązania z BCL-2 i BCL-xL (Kotschy i wsp., 2016). Ostatnie badania wskazały również, że S63845 jest silnym induktorem apoptozy i wzmacnia efekt cytotoksyczny innych związków stosowanych w terapii różnego typu nowotworów, w tym znosi oporność na ABT-737. Dlatego też, **w przeprowadzonych badaniach S63845 zastosowano pojedynczo oraz w skojarzeniu z ABT-737.** Co więcej, mając na uwadze fakt, że MCL-1 może być fosforylowany przez białko ERK1/2, co prowadzi do zwiększenia jego stabilności i wzmocnienia jego aktywności anty-apoptotycznej (Boucher i wsp. 2000), **określono również wpływ hamowania szlaku MAPK na wrażliwość komórek AML na S63845.** Przeprowadzone badania były częścią badań, które są obecnie realizowane w ramach kierowanego przeze mnie grantu Naukowej Fundacji Polpharmy pt. „Poszukiwanie nowej strategii uwrażliwienia komórek ostrej białaczki szpikowej na przeciwciała monoklonalne - ocena skuteczności działania mimetyków BH3, będących inhibitorami anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2”.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii ostrej białaczki szpikowej: HL-60 oraz ML-1. S63845 powodował spadek żywotności komórek białaczkowych, przy czym jego działanie było silniejsze w przypadku komórek linii HL-60 (IC₅₀=1.205 μM) niż linii ML-1 (IC₅₀=9.276 μM). Co interesujące, wykazano, iż S63845 (w stężeniu niższym niż IC₅₀) pojedynczo nie indukował różnicowania komórek AML, natomiast po połączeniu z ABT-737 obserwowano wyraźny efekt pro-różnicujący zastosowanej kombinacji. Obserwowano

charakterystyczne dla procesu różnicowania zmiany morfologiczne komórek, wzrost ekspresji markerów różnicowania (CD11b w linii HL-60 oraz CD14 w linii ML-1) oraz wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (test NBT). Połączenie S63845 z ABT-737 spowodowało również obniżenie poziomu białka MCL-1 i wykazało znacząco wyższe działanie pro-apoptotyczne w porównaniu do efektów obserwowanych po zastosowaniu tych związków pojedynczo. Ponadto, otrzymane wyniki pokazały, iż wrażliwość komórek AML na S63845 może być zwiększona przez hamowanie szlaku sygnałowego MAPK, co wskazuje na istotną rolę tego szlaku w utrzymaniu funkcji białka MCL-1 w komórkach białaczkowych.

Podsumowując, otrzymane wyniki pokazały, iż S63845 wywiera cytotoksyczny wpływ na komórki białaczkowe, a jego skuteczność przeciw AML może być zwiększona przez jednoczesne celowanie w BCL2/BCL-XL lub inhibicję szlaku sygnałowego MAPK. Co ważne, w niniejszym badaniu, po raz pierwszy pokazano, że zastosowanie kombinacji S63845 z ABT-737 lub inhibitorem MAPK promuje nie tylko apoptozę, ale także różnicowanie komórek AML, co stanowi istotne przesłanie dla dalszych badań dotyczących stosowania tej strategii w terapii AML.

P05. Opydo-Chanek M., Gonzalo O., Marzo I. Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: current evidence and future prospects. Biochemical Pharmacology 136: 12-23, 2017.

Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w obszarze rozwoju mimetyków BH3, należących do inhibitorów anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2. Chociaż włożono wiele wysiłku w zdefiniowanie ich pro-apoptotycznej roli w komórkach nowotworowych, na pytanie o ich dokładny mechanizm działania nie można jeszcze jednoznacznie odpowiedzieć. Należy bowiem pamiętać, że białka z rodziny BCL-2 są ważne dla wielu funkcji fizjologicznych, które wykraczają poza regulację apoptozy. Zatem hamowanie kanonicznych i niekanonicznych funkcji białek z rodziny BCL-2 przez mimetyki BH3 może również leżeć u podstaw odpowiedzi komórek nowotworowych na te związki (co pokazują również powyżej opisane badania, będące podstawą osiągnięcia naukowego). W celu optymalizacji i klinicznego wdrożenia mimetyków BH3, konieczne jest szczegółowe zrozumienie ich roli nie tylko jako aktywatorów apoptozy, ale także ich możliwego wpływu na inne funkcje i procesy komórkowe.

Celem publikacji P05 był przegląd aktualnej wiedzy na temat apoptotycznej i nie-apoptotycznej funkcji białek z rodziny BCL-2 oraz szczegółowe omówienie najlepiej poznanych mimetyków BH3 i ich mechanizmów działania, z naciskiem na zbadane efekty „off-target” (rola w odpowiedzi komórki na stres retikulum endoplazmatycznego, w autofagii, programowanej nekrozie, cyklu komórkowym i proliferacji komórek). W oparciu o obecną wiedzę na temat wieloaspektowego wpływu mimetyków BH3 na komórki nowotworowe, praca P05 przedstawia znaczącą rolę i potencjał tych inhibitorów w rozwoju terapii celowanej nowotworów, ale również krytycznie ocenia możliwe pułapki ich stosowania. Praca ta jest teoretycznym uzupełnieniem prowadzonych przeze mnie badań i zwraca uwagę na nowe, istotne kierunki badań w celu lepszego poznania mechanizmów działania mimetyków BH3 w komórkach nowotworowych.

Podsumowanie

Zaprezentowane jako osiągnięcie naukowe prace stanowią istotny wkład w poznanie mechanizmów działania mimetyków BH3 w komórkach białaczkowych.

Wykazałam, że:

- mimetyki BH3 indukują apoptozę w komórkach ostrej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki limfoblastycznej, przy czym efekt działania mimetyku BH3 zależny jest od jego selektywności względem anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2;

- mimetyki BH3 uwrażliwiają komórki białaczkowe na działanie związku alkilującego (mafosfamid), antybiotyku antracyklinowego (daunorubicyna) oraz związku pochodzenia naturalnego (resweratrol). Współdziałanie mimetyków BH3 z tymi związkami może być wynikiem aktywacji mitochondrialnego szlaku apoptozy przez różne, ale uzupełniające się mechanizmy. Włączenie mimetyków BH3 do konwencjonalnej chemioterapii z zastosowaniem w/w grup związków może obniżyć oporność komórek nowotworowych na leczenie i zwiększyć jego efektywność;

- w komórkach ostrej białaczki szpikowej mimetyki BH3 mogą indukować nie tylko apoptozę, ale również różnicowanie. Silnym induktorem różnicowania komórek AML okazał się obatoklaks, będący pan-inhibitorem anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2. W przypadku selektywnego inhibitora ukierunkowanego na białko MCL-1, indukcja różnicowania możliwa była przy równoczesnym zahamowaniu aktywności pozostałych białek anty-apoptotycznych (BCL-2/BCL-xL). Ponadto, zastosowanie selektywnych inhibitorów białka MCL-1 i białka BCL-2 w kombinacji wykazało wyraźny synergizm w działaniu pro-apoptotycznym w komórkach białaczkowych.

- szlak sygnałowy MAPK odgrywa istotną rolę w odpowiedzi komórek białaczkowych na inhibitor białka MCL-1. Aktywacja tego szlaku może być jedną z przyczyn oporności komórek białaczkowych na tą grupę mimetyków BH3. Zastosowanie inhibitora MCL-1 przy równoczesnym zahamowaniu szlaku sygnałowego MAPK może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną.

Dla rozwoju mimetyków BH3 i ich potencjalnego zastosowania w terapii istotne jest zbadanie i lepsze poznanie mechanizmów ich działania w komórce nowotworowej, w tym roli tych związków w aktywacji procesów innych niż apoptoza.

Literatura:

1. Barjot C, Tournaire M, Castagnino C, Igor C, Vercauteren J, Rossi JF. 2007. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. *Life Sci* 81:1565-1574.
2. Benito A, Grillot D, Nuhez G, Fernandez-Luna JL. 1995. Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *Am J Pathol*, 146:481-490.

3. Billard C. 2013. BH3 mimetics: status of the field and new developments. *Mol Cancer Ther* 12:1691-700.
4. Boucher MJ, Morisset, J, Vachon PH, Reed JC, Lainé J, Rivard N. 2000. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79:355–369.
5. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A, Buschle M, Raimondi SC i in. 1993. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of Bcl-2 protein. *Blood* 8:1025-1031.
6. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M i in. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9:351– 365.
7. Chial, H. 2008. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1:33.
8. Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58: 621–681.
9. Craig RW. 2002. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16:444–454.
10. Deeks ED. 2016. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* 76:979-987.
11. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
12. Hussain A R, Uddin S, Bu R, Khan O.S, Ahmed SO, Ahmed M, Al-Kuraya KS. 2011. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PLoS One* 6:1-12.
13. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Schober WD, Bornmann WG, Andreeff M. 2006. Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. *Cell Cycle* 5:2778–2786.
14. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S i in. 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10:375–388.
15. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL i in. 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538:477-482.
16. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:3516–3520.
17. Lee EF, Czabotar PE, Smith BJ, Deshayes K, Zobel K, Colman PM, Fairlie WD. 2007. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Diff* 14:1711-1713.
18. Marzo I, Naval J. 2008. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 76:939-46.
19. Mazur L, Opydo-Chanek M, Stojak M, Wojcieszek K. 2012. Mafosfamide as a new anticancer agent: preclinical investigations and clinical trials. *Anticancer Res* 32:2783–9.
20. Nadas J, Sun D. 2006. Anthracyclines as effective anticancer agents. *Expert Opin Drug Discov* 1:539–548.
21. Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. 2009. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* 113:3655-3665.
22. Pui CH, Robison LL, Look AT. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030–1043.
23. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y and Wang J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol* 12:985363.
24. Sharma A., Boise LH., Shanmugam M. 2019. Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers (Basel)* 11:1144.

25. Townsend P, Kozhevnikova M, Cexus O, Zamyatnin A, Soond S. 2021. BH3- mimetics: recent developments in cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 40: 1-33.
26. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D i in. 2012. The role of Bcl2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol* 2012:524308.
27. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE i in. 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10:389–399.
28. Vogler M, Walter HS, Dyer MJS. 2017. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. *Br J Haematol* 178:364-379.

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

W czasie swojej kariery naukowej odbyłam trzy staże naukowe, w tym dwa zagraniczne. Odbyte staże oraz współpraca z naukowcami z różnych ośrodków naukowych umożliwiły mi opanowanie i wprowadzenie do swoich badań nowych technik badawczych, które z powodzeniem nadal stosuję lub planuję wykorzystać w przyszłych projektach. Wszystkie odbyte przeze mnie staże naukowe zaowocowały opublikowaniem artykułów naukowych (załącznik 3, poz. **P05, P18, P20**) i doniesień konferencyjnych z naukowcami z ośrodków, w których przebywałam.

1). W 2014 roku zostałam laureatką programu SET – *Society-Environment-Technology* współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, dzięki któremu odbyłam miesięczny staż naukowy pod kierunkiem prof. Isabel Marzo w Zakładzie Biochemii, Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu w Saragossie (Hiszpania; 1-29.06.2014). Udział w stażu umożliwił mi zapoznanie się z nowoczesnymi metodami molekularnymi, które mają zastosowanie w analizie funkcji białek z rodziny BCL-2 i interakcji między tymi białkami. W trakcie stażu zapoznałam się z techniką klonowania DNA, metodą transfekcji komórek oraz metodą fluorescencyjnego dopełniania BiFC (ang. *bimolecular fluorescence complementation*), która pozwala na śledzenie wzajemnego oddziaływania białek w żywych komórkach. Zdobyta wiedza teoretyczna i praktyczna w zakresie transfekcji komórek pozwoliła mi na opracowanie protokołu transfekcji dla wykorzystywanych przeze mnie linii komórkowych, co było jednym z zadań badawczych zaplanowanych w projekcie *Miniatura 1*.

Współpraca z prof. Marzo zaowocowała wspólną publikacją przeglądową dotyczącą mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej mimetyków BH3 (**P05**, artykuł wchodzący w skład osiągnięcia naukowego).

2). W 2012 roku odbyłam tygodniowy staż naukowy w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Pavla Jozefa Šafárika w Koszycach (Słowacja) pod kierunkiem prof. Peter'a Fedoročko (14-17.02.2012). Podczas stażu miałam możliwość pogłębienia praktycznej wiedzy w zakresie cytometrii przepływowej oraz techniki sortowania komórek z

wykorzystaniem sortera komórkowego BD FACSAria (pod okiem dr Jaromír'a Mikeš - obecnie Karolinska Institutet w Sztokholmie w Szwecji). Poznane w czasie stażu metody cytometryczne wprowadziłam do repertuaru badawczego Zakładu Hematologii Eksperymentalnej UJ i z powodzeniem wykorzystuję we własnych badaniach do chwili obecnej. Pomoc merytoryczna i metodyczna prof. Fedoročko oraz dr Mikeš zaowocowała wspólnymi doniesieniami konferencyjnymi oraz publikacją (P20).

3). W 2011 roku odbyłam tygodniowy staż naukowy w **Zakładzie Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej (obecnie Zakład Biologii Medycznej) Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach pod kierunkiem dr hab. Teodory Król, prof. UJK** (28.11-02.12.2011). Udział w stażu umożliwił mi zapoznanie się z podstawami mikroskopii elektronowej (przygotowanie materiału do obserwacji, analiza obrazu) oraz obserwacji komórek *in vitro* w czasie rzeczywistym. W czasie stażu nawiązałam współpracę z dr Wojciechem Trybus i dr Ewą Trybus, która jest nadal kontynuowana. Efektem naszej współpracy jest jeden artykuł naukowy, dotyczący wpływu pochodnych fenytoiny na komórki białaczkowe (P18), a kolejna praca z zakresu efektów działania nowych pochodnych dokсорubicyny jest w trakcie przygotowania. Obecnie w ramach tej współpracy wykonujemy analizy ultrastruktury komórek białaczkowych i komórek podścieliska szpiku kostnego w efekcie działania obatoklaksu.

Ponadto w 2019 roku zostałam zakwalifikowana na wyjazd w celach szkoleniowych w ramach Programu Erasmus+, dzięki któremu miałam odbyć staż w Pracowni Immunobiologii, Uniwersytetu w Leuven w Belgii (decyzja z dnia 28.10.2019). W trakcie stażu planowane było zdobycie praktycznej wiedzy w zakresie technik analizy aktywności enzymów z grupy proteaz pod okiem dr Jennifer Vandooren, z którą nawiązałam kontakt dzięki jej wieloletniej współpracy z dr hab. Elżbietą Kołaczkowską, prof. UJ, kierownikiem mojej Pracowni. Staż ten musiał zostać odwołany ze względu na sytuację epidemiologiczną oraz moje długotrwałe problemy zdrowotne. W najbliższym czasie planuje ponownie aplikować o środki na wyjazd w ramach Erasmus plus w celu odbycia tego stażu.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Poza działalnością naukową, w swojej pracy jestem zaangażowana w inne aktywności akademickie, które obejmują działalność dydaktyczną, organizacyjną oraz popularyzatorską.

6.1. Działalność dydaktyczna

Moja działalność dydaktyczna obejmuje prowadzenie zajęć na studiach I, II i III stopnia na kierunku Biologia oraz opiekę naukową nad studentami w ramach wykonywania prac

dyplomowych (licencjackich i magisterskich). Ponadto, od 2008 roku pełnię funkcję **koordynatora obowiązkowych, zawodowych praktyk studenckich** dla studentów II roku I stopnia na kierunku biologia. Do moich zadań należy ustalenie miejsca odbywania praktyki, przygotowanie porozumienia, wydawanie i odbiór dokumentów niezbędnych do odbycia praktyki, zaliczenie praktyki na podstawie analizy dziennika praktyk.

W latach 2013 – 2016 byłam **członkiem Zespołu ds. Ewaluacji Efektów Kształcenia na kierunku biologia** na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ (obecnie Wydział Biologii), a do moich zadań należało opracowanie raportów z oceny jakości praktyk zawodowych.

Do prowadzonych przeze mnie zajęć dydaktycznych należały/należą:

1). Ćwiczenia laboratoryjne prowadzone w ramach kursów:

- Fizjologia zwierząt (od roku akademickiego 2007/2008 - obecnie dla kierunku biologia; w latach 2004-2015 również dla kierunku biologia-geologia)
- Fizjologiczne techniki badań (od roku akademickiego 2007/2008 - obecnie)
- Regulowana śmierć komórki (od roku akademickiego 2014/2015 - obecnie)
- Techniki i metody stosowane w naukach biologicznych (od roku akademickiego 2018/2019 - obecnie)
- Biochemia (rok akademicki 2018/2019)

2). Seminarium prowadzone w ramach kursu Hematologia (od roku akademickiego 2012/2013 - obecnie)

3). Konwersatoria prowadzone w ramach kursów:

- Badania biomedyczne: teoretyczne wprowadzenie do metodologii badań (od roku akademickiego 2019/2020 - obecnie)
- Biomedical research methods: from antigen to antibody and beyond (od roku akademickiego 2019/2020 - obecnie)
- Fizjologiczne aspekty funkcjonowania człowieka w środowisku przyrodniczym (w latach 2016-2018).

W ankietach przeprowadzanych corocznie wśród studentów, które oceniają prowadzących zajęcia, otrzymuję oceny „bardzo wysoko” oraz pozytywne opinie studentów.

W przypadku 2 kursów: Techniki i metody stosowane w naukach biologicznych oraz Fizjologiczne techniki badań brałam aktywny udział w przygotowaniu sylabusu tych przedmiotów, a aktualnie **pełnię również funkcję koordynatora ćwiczeń** z tych kursów.

Od 2013 roku pełnię rolę opiekuna naukowego. Dotychczas **wypromowałam 10 licencjatów i 13 magistrów biologii**. Kolejna praca magisterska i praca licencjacka są w trakcie realizacji. Ponadto, wykonałam **recenzję 22 prac licencjackich i 13 prac magisterskich** studentów kierunku biologia na Wydziale Biologii UJ.

We współpracy ze studentami, którzy pod moją opieką wykonywali prace dyplomowe, przygotowałam 8 prezentacji posterowych. Za prezentację: „Wpływ zahamowania szlaku sygnałowego MAPK na aktywność cytotoksyczną selektywnego inhibitora białka Mcl-1 wobec komórek ostrej białaczki szpikowej” podczas sesji plakatowej na X Ogólnopolskiej Konferencji „Wejrzenie w Nowotworzenie” w Lublinie (28.05.2021) Pani Anna Mlyczyńska otrzymała nagrodę w kategorii najlepszy poster. Pani Mlyczyńska jest również współautorem artykułu opublikowanego w *Journal of Molecular Sciences* (P04). Obecnie jestem w trakcie przygotowania pracy przeglądowej z Panią Małgorzatą Wojtaszek, dotycząca zastosowania immunokoniugatów w leczeniu białaczek, która zostanie przedłożona do czasopisma *Kosmos*.

W celu rozwijania warsztatu dydaktycznego, uczestniczyłam w kursach organizowanych przez Ars Docendi UJ: "Metody aktywizujące – kierunki przyrodnicze i nauk o życiu" (12.2017-1.2018, liczba godzin: 15) oraz „Edukacyjne nagrania audio-wideo” (17.05.2023, liczba godzin: 3).

6.2. Działalność organizacyjna

W ramach działalności organizacyjnej na Uniwersytecie Jagiellońskim jestem **przedstawicielem niesamodzielnych pracowników naukowych w Radzie Naukowej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych** (od 2012 roku) i **w Radzie Naukowej Wydziału Biologii UJ** (od 2014 roku). Ponadto w latach 2006 i 2007 byłam **sekretarzem komisji rekrutacyjnej** na kierunek Biologia studia niestacjonarne, prowadzonym na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ (obecnie Wydział Biologii). W latach 2017-2019 byłam zaangażowana w realizację dwóch projektów stażowych dla studentek i studentów kierunków biologicznych i nauk o ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, **w ramach programów operacyjnych NCBR**: „Studiujesz? Praktykuj!” oraz „Wiedza Edukacja Rozwój” (załącznik 3, pkt II.10). W ramach pracy zespołów ds. projektu **byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej oraz konsultantem ds. programów stażowych dla kierunku biologia**. Za działalność organizacyjną w 2009 roku otrzymałam Nagrodę J.M. Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Moja działalność organizacyjna obejmuje również funkcje pełnione poza Uniwersytetem Jagiellońskim. Od 2019 r. pełnię funkcję **sekretarza Komisji Biologicznej Oddziału Krakowskiego Polskiej Akademii Nauk**, a w bieżącym roku zostałam wybrana na drugą kadencję (2023-2026). Jestem członkiem powyższej komisji od roku 2017. Trzykrotnie byłam także sekretarzem oraz członkiem Komitetu Organizacyjnego konferencji: International Symposium “Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, organizowanej przez Komisję Biologiczną PAN we współudziale z Instytutem Zoologii i Badań Biomedycznych UJ (lata 2019, 2021 i 2022). W bieżącym roku pełnię również funkcję sekretarza tegorocznej, XXX-tej edycji tej konferencji. Ponadto, byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego XXXII Ogólnopolskiego Seminarium: „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, które odbyło się 23 czerwca 2018 r. w Krakowie. Ponadto jestem **członkiem Zarządu Oddziału Krakowskiego Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki**, obecnie drugą kadencję (kadencja I: 2018-2020; kadencja II: 2021-2023).

6.3. Działalność popularyzująca naukę

W ramach swojej aktywności akademickiej angażuję się również w popularyzację nauki, głównie wśród dzieci i młodzieży. Uczestniczyłam w promocji Wydziału Biologii UJ podczas wydarzeń takich jak **Festiwal Nauki** (2009), **Małopolska Noc Naukowców** (2013 i 2015 rok), oraz **Noc Biologów** (2014), w ramach których prowadziłam dla uczestników warsztaty lub pokazy z zakresu hematologii. W 2018 oraz 2019 roku prowadziłam warsztaty letnie dla uczniów szkół średnich z województwa małopolskiego w ramach projektu "**Małopolska Chmura Edukacyjna - nowy model nauczania**" z zakresu Fizjologii człowieka ("Fizjologia mięśnia sercowego" oraz "Elektrokardiografia", liczba godzin: 5). W ramach programu Wydziału Biologii UJ „**Rozwiń skrzydła – nieograniczone możliwości**” prowadziłam warsztaty laboratoryjne dla licealistów: "Jedna kropla krwi - bezcenna wiedza. Co mówi o nas krew?" (2018 rok, liczba godzin: 6).

W latach 2013-2022 prowadziłam wykłady i ćwiczenia w ramach patronatu UJ nad klasą biologiczno-chemiczną **IV Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie**, a w 2017 roku - zajęcia dla II klasy Gimnazjum w ramach patronatu Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ (obecnie Wydział Biologii) nad **Zespołem Szkół Ogólnokształcących Integracyjnych nr 4** w Krakowie. Ponadto, byłam zaangażowana w prowadzenie warsztatów dla uczniów **VI Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie** (2018) oraz **Szkoły Podstawowej w Biertowicach** (2022).

W ramach popularyzacji nauki w 2007 roku wygłosiłam wykład „Czy komórki szpiku kostnego są nadzieją w leczeniu uszkodzeń mózgu?” na spotkaniu Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika. Jestem również autorem jednego artykułu popularnonaukowego pt. „Komórki macierzyste szpiku kostnego”, który został opublikowany w czasopiśmie „Edukacja Biologiczna i Środowiskowa”. Ponadto, brałam udział w szkoleniu organizowanym przez Centrum Innowacji, Transferu Technologii i Rozwoju UJ: „Publiczna prezentacja nauki – praktyczne wskazówki” (2010 rok).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Osiągnięcia przed uzyskaniem stopnia doktora:

Początki mojej działalności naukowo-badawczej wiążą z realizacją pracy magisterskiej, zatytułowanej „Zabliźnianie uszkodzenia tkanki mózgowej u szczura po podaniu zawiesiny komórek szpikowych w miejsce uszkodzenia”, którą wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Dąbrowskiego, a obroniłam w 2003 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskując tytuł magistra w dziedzinie biologii. Dzięki tym badaniom odkryłam swoją pasję do nauki i zainteresowanie

hematologią. Badania zapoczątkowane w ramach pracy dyplomowej, kontynuowałam na studiach doktoranckich, które rozpoczęłam w 2003 roku. Pracę doktorską, zatytułowaną „Wpływ komórek podścieliska szpikowego na proces regeneracji uszkodzonej kory mózgowej”, wykonałam w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego i obroniłam w 2007 roku. Promotorem pracy był prof. dr hab. Zbigniew Dąbrowski, a recenzentami byli prof. dr hab. med. Mariusz Ratajczak (wybitny hematolog) oraz prof. dr hab. Marian Lewandowski (neurobiolog).

Moje zainteresowania badawcze w trakcie wykonywania pracy doktorskiej związane były z możliwością wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BMSCs) w terapii komórkowej urazowego uszkodzenia mózgu. Prowadzone badania miały na celu określenie wpływu BMSCs, izolowanych z podścieliska szpiku, na proces tworzenia blizny glejowej, który jest nieodłącznym elementem procesów naprawczych zachodzących w uszkodzonym mózgu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, iż BMSCs mają zdolność zasiedlania uszkodzonej tkanki mózgowej i wywierają modulujący wpływ na zachodzące w niej procesy naprawcze (aktywność astrocytów i mikrogleju/makrofagów oraz skład macierzy zewnątrzkomórkowej), a obserwowany efekt zależny jest od drogi podania BMSCs (domózgowo lub dożylnie). Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były współfinansowane ze środków na Badania Własne Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ (obecnie Wydział Biologii) (załącznik 3, pkt II.5).

Wyniki badań otrzymanych w ramach realizacji pracy doktorskiej, zostały opublikowane w postaci 2 oryginalnych artykułów naukowo-badawczych (załącznik 3; poz. **P29**, **P36**), których byłam pierwszym autorem oraz zaprezentowane na 9 konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Streszczenia wyników badań zaprezentowanych na 7th, 8th i 9th International Congress of Polish Neuroscience Society (lata 2005, 2007, 2009) zostały opublikowane w *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Ponadto, abstrakt zgłoszony na 12th Congress of European Hematology Association w Wiedniu (2007 rok), został opublikowany w czasopiśmie *Haematologica – The Hematology Journal* (załącznik 3, pkt 3a). Problematykę związaną z komórkami macierzystymi szpiku kostnego zaprezentowałam również w formie pracy popularnonaukowej (załącznik 3, poz. **P37**) i 2 prac przeglądowych (załącznik 3, poz. **P08**, **P31**), z których publikacja **P31** była efektem współpracy nawiązanej z dr n. med. Szymonem Pasiutem z Katedry Rehabilitacji Klinicznej, Wydziału Rehabilitacji Ruchowej, Akademii Wychowania Fizycznego w Krakowie.

W trakcie realizacji studiów doktoranckich zostałam zatrudniona na ½ etatu w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii UJ (obecnie Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych) na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego. Włączyłam się w badania prowadzone w Zakładzie przez dr hab. Lidzię Mazur, których celem było określenie efektów działania związków alkilujących z grupy związków oksazafosforynowych na indukowanie programowanej śmierci prawidłowych i patologicznych komórek hematopoetycznych *in vitro* i *in vivo*. W badaniach *in vitro* wykazano wpływ tych związków na indukowanie apoptozy, nekrozy oraz katastrofy mitotycznej w komórkach ostrej białaczki szpikowej. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach wykazano wpływ testowanych związków na występowanie ‘opóźnionej apoptozy’ w układzie erytrocytarnym i zdolności proliferacyjne erytroblastów. Wyniki badań prezentowałam na konferencjach międzynarodowych: ELSO

Conference w Dreźnie (2005 rok), 13th Euroconference on Apoptosis w Budapeszcie (2005 rok) i 14th Euroconference on Apoptosis na Sardynii (2006 rok) (załącznik 3, pkt 3a). Na pokrycie kosztów uczestnictwa w obydwu konferencjach Euroconference on Apoptosis uzyskałam stypendium w ramach ‘European Commission Marie Curie Actions Programme’ (jednostka fundująca: European Cell Death Organization).

W trakcie trwania studiów doktoranckich uczestniczyłam w krajowych i zagranicznych kursach, poszerzając swój warsztat badawczy: 1). w Szkole Wiosennej Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego pt.: „Obrazowanie funkcji i struktury mózgu” (Kraków, 2006 rok); 2) w V Szkole Cytometrii Przepływowej Becton Dickinson poświęconej obsłudze cytometru przepływowego BD FACSCalibur (Konstancin-Jeziorna, 2006 rok), 2nd oraz 3rd Training Course on Concepts and Methods in Programmed Cell Death (Budapeszt, 2005 rok; Sardynia 2006 rok).

Osiągnięcia po uzyskaniu stopnia doktora:

Po ukończeniu studiów doktoranckich w 2007 roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej UJ (obecnie Pracownia Hematologii Eksperymentalnej) na pełen etat, początkowo na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego, a od 2012 roku na stanowisku adiunkta. Główny nurt moich prac badawczych prowadzonych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora to badanie aktywności cytotoksycznej i mechanizmów działania związków chemoterapeutycznych nowej generacji oraz nowych strategii terapeutycznych w białaczkach.

Jednym z istotnych obszarów mojej działalności naukowej stanowiła kontynuacja badań dotyczących potencjału przeciwbiałaczkowego nowych pochodnych związków oksazafosforynowych, kierowanych przez dr hab. Lidę Mazur. Badania te prowadziliśmy we współpracy z Ulf'em Nyemeyer z firmy NIOMECH przy Uniwersytecie w Bielefeld w Niemczech. Badania obejmowały ocenę aktywności cytotoksycznej trzech związków alkilujących: mafosfamidu, 4-hydro-peroksy-cyklofosfamidu i glufosfamidu na komórki ostrych białaczek *in vitro*. Badania miały na celu poznanie mechanizmów działania tych związków w kontekście indukowania procesów śmierci komórki i zaburzenia cyklu komórkowego. Badania te były istotne z punktu widzenia poszukiwania nowych pochodnych leków stosowanych obecnie w terapii, o wyższym niż związek wyjściowy indeksie terapeutycznym. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w postaci 8 oryginalnych artykułów (załącznik 3, poz. **P20, P25, P26, P28, P30, P32, P34, P35**), z czego w 5 jestem pierwszym autorem. Z kolei dwie prace przeglądowe, których jestem współautorem były poświęcone problematyce związków oksazafosforynowych (załącznik 3, poz. **P09, P10**).

Brałam również czynny udział w badaniach zespołu Zakładu Hematologii Eksperymentalnej z zakresu analizy aktywności przeciwbiałaczkowej:

- nowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych, daunorubicyny i epidoksorubicyny, w ramach współpracy z prof. dr hab. Ireną Oszczapowicz i dr Małgorzatą Łukawską z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie (załącznik 3, poz. **P19, P22, P23, P27**).
- nowych pochodnych fenytoiny, w ramach współpracy z prof. dr hab. inż. Jadwigą Handzlik z

Zakładu Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (załącznik 3, poz. **P18**).

Prowadzenie w/w badań pozwoliło mi zapoznać się z wieloma metodami analizy cytotoksyczności, w tym stosowanymi w badaniach regulowanej śmierci komórki. Brałam udział w kilku szkoleniach z tego zakresu, m.in. organizowanymi przez firmy Merck Millipore (2014 rok), Promega (lata 2012, 2019, 2021) i Thermo Fisher Scientific (2014 rok). Uczestniczyłam również w warsztatach 6th Training Course On Concepts and Methods in Programmed Cell Death (Paryż, 2009 rok). Pragnę nadmienić, iż wprowadziłam do repertuaru badawczego Zakładu Hematologii Eksperymentalnej wiele metod/testów opartych o wykorzystanie cytometru przepływowego, takich jak m.in. test aneksyna V/jodek propidyny, metoda TUNEL, analiza potencjału mitochondrialnego, test do oceny aktywności kaspaz, analizy poziomu białka BCL-2, ocena ekspresji antygenów powierzchniowych (immunofenotypowanie), testy proliferacji.

W ostatnim czasie, we współpracy z prof. dr hab. Henrykiem Maroną oraz dr Dorotą Żelaszczyk z Zakładu Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ, prowadzę badania nad aktywnością biologiczną nowo zsyntetyzowanych związków – pochodnych ksantonu, obejmującą działanie mutagenne, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe. Mój udział w badaniach obejmuje analizę aktywności przeciwbiałaczkowej tych związków. Jestem współautorem jednego doniesienia konferencyjnego, prezentowanego na X Konwersatorium Chemii Medycznej w Lublinie (2021 rok). Wspólna publikacja pt. “*In vitro antileukemic activity of new xanthone derivatives*” jest w ostatnim etapie przygotowań i zostanie zgłoszona do czasopisma *Bioorganic Chemistry* (IF=5.1) w najbliższym czasie.

Obecnie główną część mojej działalności naukowej stanowią badania, które są kontynuacją badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe (prezentowane w pkt. 4). Badania te są prowadzone w ramach wspomnianego już projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy. Projekt ten jest pierwszą próbą określenia efektów skojarzonego działania mimetyków BH3 z przeciwciałami monoklonalnymi (mAbs) na komórki ostrej białaczki szpikowej i poznania mechanizmu tego oddziaływania. Prowadzone badania mają na celu ocenić efektywność przeciwbiałaczkową skojarzonego działania mAbs i mimetyków BH3, wyselekcjonować kombinacje testowanych cząsteczek o największej skuteczności, wskazać szlaki/białka zaangażowane w odpowiedź AML na badaną terapię, w tym potencjalne czynniki odpowiedzialne za ich oporność. Część uzyskanych dotychczas wyników została włączona do publikacji **P04**, jak również zaprezentowana podczas konferencji międzynarodowych, w tym 28th Conference of the European Cell Death Organization w Bonn (2022 rok) oraz ECDO-EATI CONFERENCE 2023 on Cell Death in Oncopharmacology and Oncoimmunology w Paryżu (2023) (załącznik 3, pkt 3a). Ponadto, tematyka projektu była przedmiotem wykładu zaprezentowanego na seminarium Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych (tytuł: „Poszukiwanie nowych strategii w terapii celowanej ostrej białaczki szpikowej”, 2022 rok) oraz referatu wygłoszonego na posiedzeniu Komisji Biologicznej Polskiej Akademii Nauk oddział w Krakowie w roku 2022 (tytuł: „CD123 jako biomarker oraz cel terapeutyczny w białaczkach”). Ważnym aspektem tego projektu jest opracowanie i zastosowanie w badaniach hodowli 3D na rusztowaniu oraz kokultury komórek białaczkowych z komórkami podścieliska szpiku kostnego, w celu dogłębnej analizy aktywności

cytotoksycznej badanej terapii oraz wytypowania najlepszego modelu do prowadzenia dalszych badań w tym obszarze.

Ważną częścią mojej pracy naukowo-badawczej jest udział w badaniach prowadzonych obecnie w Pracowni Hematologii Eksperymentalnej UJ pod kierownictwem dr hab. Elżbiety Kołaczkowskiej, prof. UJ. W latach 2019-2022 byłam wykonawcą w projekcie NCN OPUS 15 pt.: Mechanizmy usuwania neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NET) z naczyń krwionośnych: badania z zastosowaniem mikroskopii przeźyciowej” (współautorstwo w publikacji **P14**), a obecnie jestem wykonawcą w projekcie NCN OPUS 22 „Erytrocyty i płytki krwi jako nietypowe elementy regulatorowe odpowiedzi immunologicznej w trakcie sepsy: wpływ na funkcje neutrofilów i monocytów/makrofagów oraz tworzone przez nie sieci zewnątrzkomórkowe”, których kierownikiem jest prof. Kołaczkowska. Moje zadania w w/ projektach to praca z liniami komórkowymi, prowadzenie badań i oznaczeń hematologicznych, molekularnych i biochemicznych, w tym oznaczenia cytometryczne, western blot i testy Elisa, jak również opracowanie graficzne i statystyczne wyników.

7.2. Pozostałe kierunki badawcze i współpraca

W czasie mojej pracy naukowo-badawczej byłam również kilkakrotnie zaangażowana w prace badawcze dr hab. Agnieszki Rak, prof. UJ z Pracowni Fizjologii i Toksykologii Rozrodu UJ dotyczące roli adipokyn w regulacji hormonalnej komórek jajnika i łożyska (**P15**, **P16**) oraz badania prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak z Zakładu Endokrynologii UJ (obecnie Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie) w obszarze badań nad komórkami Leydiga (**P17**, **P21**). Włączyłam się również w badania dr hab. Anny Ptak, prof. UJ z Pracowni Fizjologii i Toksykologii Rozrodu UJ dotyczące roli związków endokrynnie czynnych w komórkach prawidłowych i nowotworowych jajnika (**P13**, kolejna praca zgłoszona do czasopisma *Toxicology in vitro*).

W ostatnim czasie brałam również udział w badaniach kierowanych przez dr hab. Ewę Pocheć, prof. UJ z Zakładu Biochemii Glikokonjugatów UJ w ramach projektu programu Strategicznego Inicjatywa Doskonałości w Uniwersytecie Jagiellońskim POB BioS, w których odpowiedzialna byłam za analizę procesu apoptozy w komórkach czerniaka w efekcie działania ekstraktu z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum L.*) (**P12**).

W ramach badań prowadzonych przez prof. dr hab. Krzysztofa Szczubiałkę z Wydziału Chemii UJ nad właściwościami biologicznymi modyfikowanej heparyny wykonałam oznaczenia czasu krzepnięcia testem aPTT na dwóch rodzajach materiału- osoczu mysim oraz ludzkim osoczu liofilizowanym. Wyniki tych badań zostały opublikowane prestiżowym czasopiśmie *Journal of Medicinal Chemistry* (IF=7.3, pkt MEiN=200) (**P11**).

7.3. Plany badawcze

Moje najbliższe plany badawcze związane są głównie z kontynuacją realizowanego obecnie projektu Naukowej Fundacji Polpharmy oraz badań w ramach grantu OPUS, kierowanego przez dr hab. Elżbietę Kołaczkowską, prof. UJ, w którym jestem wykonawcą. W dalszych etapach mojej pracy naukowo-badawczej będę kontynuować nawiązane wcześniej współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz z innych ośrodków naukowych, jak również nawiązywać nowe współpracy oraz występować o finansowanie moich badań (NCN).

W zakresie tematyki, która obejmuje osiągnięcie naukowe i realizowany obecnie projekt, planuję również rozszerzyć swoje badania w celu poznania efektów działania mimetyków BH3 oraz koniugatów lek-przeciwciężar nie tylko na komórki białaczkowe, ale również na komórki podścieliska szpiku kostnego oraz na wzajemne oddziaływanie między tymi dwoma grupami komórek. Podścielisko szpiku kostnego ma istotną funkcję w procesie hematopoezy, wspierając proliferację, różnicowanie i dojrzewanie komórek krwiotwórczych. Badania pokazują, że podścielisko szpiku może również tworzyć nisze dla komórek białaczkowych, zwiększając ich przeżycie oraz oporność na terapię. Dlatego dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych niezwykle istotne jest zbadanie, jak dany lek/terapia wpływają na komórki tworzące mikrośrodowisko szpiku. Istotne będzie dla mnie poszerzenie mojego warsztatu badawczego o model hodowli pierwotnej komórek białaczki oraz model *in vivo* (m.in. ksenograficzny model myszy). Ważne w kontekście badania oddziaływań między komórkami białaczkowymi a komórkami podścieliska szpiku będzie nauka technik stosowanych w analizie enzymów na różnych etapach ich aktywacji, stąd planuję ponownie aplikować o staż w ramach programu Erasmus+, który nie mógł być wcześniej zrealizowany. W najbliższym czasie planuję również przygotowanie projektu i zgłoszenie go do konkursu grantowego.

7.4. Podsumowanie

- Efekty mojej dotychczasowej pracy naukowo-badawczej obejmują współautorstwo w 37 publikacjach naukowych (29 oryginalnych artykułach naukowych, 5 artykułach przeglądowych, 2 rozdziałów w książce oraz pracy popularno-naukowej), z których 28 (w tym 5 wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego) ukazało się w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR). Spośród tych prac, 35 ukazało się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Ponadto, jestem współautorem 106 doniesień konferencyjnych, z których 45 (7 prezentacji ustnych i 38 prezentacji posterowych) prezentowałam osobiście na 28 konferencjach międzynarodowych i 13 konferencjach krajowych.
- Sumaryczny współczynnik wpływu impact factor wszystkich moich publikacji zgodnie z rokiem opublikowania pracy wynosi 78.21, a łączna punktacja według wykazu czasopism MEiN z roku 2023 to 2960. Według bazy Web of Science prace te były do tej pory cytowane 278 razy (w tym 239 razy bez autocytacji), według bazy Scopus 286 razy (w tym 251 razy

bez autocytacji), a według bazy Google Scholar 401 razy. Współczynnik Hirscha według bazy Web of Science wynosi 10, według bazy Scopus – 10, a według Google Scholar – 12.

- Moja dotychczasowa praca naukowa była realizowana w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN (Miniatura 1, 2018-2019), Naukową Fundację Polpharmy (2020-2024) oraz ze środków wewnętrznych Wydziału Biologii UJ finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW. W projektach tych byłam lub jestem kierownikiem. Ponadto byłam wykonawcą w projekcie NCN OPUS 15 (2019-2022), a obecnie jestem także wykonawcą grantu NCN OPUS 22 (2022-2025) (PI: dr hab. Elżbieta Kołaczowska, prof. UJ).
- Byłam laureatką programu europejskiego *SET – Society-Environment-Technology* (wsparcie finansowe na realizację stażu) oraz beneficjentką programu Komisji Europejskiej Marie Skłodowska-Curie Actions (wsparcie finansowe udziału w konferencji).
- Odbyłam 2 staże zagraniczne (Uniwersytet w Saragossie, Hiszpania i Uniwersytet w Koszycach, Słowacja) oraz jeden staż krajowy (Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach).
- Od 2007 roku jestem recenzentem artykułów nadsyłanych do polskich i międzynarodowych czasopism naukowych. Do tej pory zrecenzowałam 31 artykułów dla 19 czasopism (m.in. *Biochemical Pharmacology, Cancer Management and Research, Chemico-Biological Interactions, Future Oncology, Marine Drugs, Molecular Medicine, Scientific Reports, Toxicology in vitro*).
- Za swoją pracę naukową zostałam dwukrotnie nagrodzona nagrodą J.M. Rektora UJ za działalność naukową (nagroda zespołowa w 2014 i 2018 roku).
- Jestem sekretarzem Komisji Biologicznej Oddziału Krakowskiego Polskiej Akademii Nauk. (kadencja I: 2019-2022; kadencja II: 2023-2026) oraz członkiem Zarządu Oddziału Krakowskiego Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, obecnie drugą kadencję (kadencja I: 2018-2020; kadencja II: 2021-2023).
- Trzykrotnie byłam sekretarzem oraz członkiem Komitetu Organizacyjnego konferencji: International Symposium “Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Ponadto, byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego XXXII Ogólnopolskiego Seminarium: „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych” oraz Komitetu Naukowego konferencji: -4th, 5th, 6th International Conference of Cell Biology; - Ogólnopolska Konferencja Naukowa „POLIFENOLE”.
- Brałam udział w pracy zespołów projektów stażowych w ramach programów operacyjnych NCBR: „Studiujesz? Praktykuj!” oraz „Wiedza Edukacja Rozwój” (funkcja: członek Komisji Rekrutacyjnej, koordynator ds. programów stażowych dla kierunku biologia)

- Od 2012 roku jestem przedstawicielem niesamodzielnych pracowników naukowych w Radzie Naukowej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, a od 2014 roku w Radzie Naukowej Wydziału Biologii UJ.
- Prowadzę zajęcia dydaktyczne (ćwiczenia, seminaria i konwersatoria) dla studentów kierunku biologia, w ramach 9 kursów. Dotychczas wypromowałam 10 licencjatów i 13 magistrów biologii. Ponadto, wykonałam recenzję 22 prac licencjackich i 13 prac magisterskich studentów kierunku biologia. Od 2008 roku pełnię funkcję koordynatora obowiązkowych, zawodowych praktyk studenckich dla studentów II roku I stopnia na kierunku biologia. W latach 2013 – 2016 byłam członkiem Zespołu ds. Ewaluacji Efektów Kształcenia na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. W 2006 i 2007 roku byłam sekretarzem komisji rekrutacyjnej na kierunku biologia studia niestacjonarne, prowadzonym na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ.
- Angażuję się w popularyzację nauki. Prowadziłam warsztaty w trakcie wydarzeń takich jak Festiwal Nauki (2009), Małopolska Noc Naukowców (2013 i 2015 rok), oraz Noc Biologów (2014). Ponadto, prowadziłam warsztaty w ramach projektu "Małopolska Chmura Edukacyjna - nowy model nauczania" (2018 i 2019 rok), w ramach programu Wydziału Biologii UJ „Rozwiń skrzydła – nieograniczone możliwości” (2018 rok), jak również liczne zajęcia dla uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych.

Kraków, 10.08.2023

Małgorzata Opydo

(podpis wnioskodawcy)