

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Biochemii Farmaceutycznej



Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk

Autoreferat

Kraków 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych ..	3
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.)	4
4.1 Osiągnięcie naukowe stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art.219ust.1.pkt 2b ustawy	4
4.1.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:	4
4.1.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4.1.3 Wprowadzenie	6
4.1.4 Założenia i cel pracy	14
4.1.5 Wyniki badań i dyskusja	15
4.1.5 Podsumowanie osiągnięcia naukowego	27
4.2 Inne osiągnięcia naukowe	28
4.2.1 Badanie właściwości przeciwnowotworowych saponin triterpenowych	28
4.2.2 Badanie wykorzystania warstw polimerowych do zastosowań biomedycznych	31
4.2.3 Opracowanie modelu do badania aktywności cytoprotekcyjnej <i>in vitro</i>	32
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	34
5.1 Instytut Medycyny Diagnostycznej i Laboratoryjnej, Chemii Klinicznej i Patobiochemii, Uniwersytet Charité w Berlinie, Niemcy	34
5.2 Laboratorium Fotochemii i Spektroskopii, Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki, Kraków	35
5.3 Insiges Labs – start up biotechnologiczny	37
5.4 Zakład Biologii Molekularnej Instytut Biochemii i Biofizyki, Państwowej Akademii Nauk, Warszawa ..	37
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	38
6.1 Osiągnięcia dydaktyczne	38
6.1.1 Staże dydaktyczne	38
6.1.2 Nagroda	40
6.1.3 Działania na rzecz środowiska studenckiego	40
6.1.4 Opieka naukowa	41
6.1.5 Zajęcia dydaktyczne	42

6.1.6 Doskonalenie warsztatu dydaktycznego i kompetencji zawodowych w ramach szkoleń	43
6.2 Osiągnięcia organizacyjne	44
6.2.1 Organizacja wydarzeń	44
6.2.3 Inne osiągnięcia popularyzatorskie	45
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej	46
7.1 Inne (w tym międzynarodowe) współprace naukowe, nie uwzględnione w autoreferacie:	46
7.1.1 Współpraca naukowa z dr Pavel Štarha z Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University w Olomouc, Czechy	46
7.1.2 Współpraca w ramach badania bezpieczeństwa związków aktywnych	47
7.1.3 Współpraca w ramach projektu oceniającego patomechanizmy astmy oskrzelowej oraz poszukiwanie nowych potencjalnych terapeutyków	50
7.1.4 Współpraca naukowa z prof. Sławomirem Wybrańcem z Politechniki Krakowskiej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Katedra Technologii Chemicznej i Analityki Środowiskowej	51
7.1.5 Współpraca z sektorem gospodarczym	51
7.2 Stypendia wyjazdowe na szkolenia i kongresy międzynarodowe	51
7.3 Udział w wybranych szkoleniach i kursach branżowych	52
7.4 Wyróżnienia i nagrody	52
8. Piśmiennictwo	54

1. Imię i nazwisko Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk

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

- 2015 **doktor nauk farmaceutycznych**, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie.
Tytuł rozprawy: *„Wpływ wybranych saponin triterpenowych na komórki nowotworów prostaty w badaniach in vitro”*.
Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Janeczko
Promotor pomocniczy: dr hab. Marta Michalik
- 2009-2013 studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, Katedra Farmakognozi.
- 2004-2009 **magister biologii** (specjalizacja: biologia komórki), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Jagielloński oraz Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.
Tytuł pracy: *„Aktywność biologiczna kwasu usninowego”*.
Promotor: dr hab. Marta Michalik

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- 2016 do chwili obecnej **adiunkt**, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
- 2013-2016 **asystent**, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
- 2016-2018 **wykładowca** - „Podstawy genetyki” dla studentów I stopnia kierunku Biotechnologia, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie

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.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1 Osiągnięcie naukowe stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art.219ust.1.pkt 2b ustawy

4.1.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Badania nad terapiami skojarzonymi poprawiającymi efektywność i bezpieczeństwo leczenia przeciwnowotworowego”

4.1.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

L.p	Autorzy/Tytuł	Czasopismo	IF	pkt. MNiE
H1	Koczurkiewicz P (*), Kowolik E, Podolak I, Wnuk D, Piska K, Łabędź-Masłowska A, Wójcik-Pszczola K, Pękala E, Czyż J, Michalik M. <i>Synergistic Cytotoxic and Anti-invasive Effects of Mitoxantrone and Triterpene Saponins from Lysimachia ciliata on Human Prostate Cancer Cells.</i>	Planta Medica. 2016, 82(18):1546-1552.	2.342	25
H2	Koczurkiewicz P (*), Kłaś K, Grabowska K, Piska K, Rogowska K, Wójcik-Pszczola K, Podolak I, Galanty A, Michalik M, Pękala E. <i>Saponins as chemosensitizing substances that improve effectiveness and selectivity of anticancer drug-Minireview of in vitro studies.</i>	Phytotherapy Reseach. 2019, 33(9):2141-2151.	4.087	100
H3	Koczurkiewicz-Adamczyk P (*), Grabowska K, Karnas E, Piska K, Wnuk D, Kłaś K, Galanty A, Wójcik-Pszczola K, Michalik M, Pękala E, Fuchs H, Podolak I. <i>Saponin fraction CIL1 from Lysimachia ciliata L. enhances the effect of a targeted toxin on cancer cells.</i>	Pharmaceutics. 2023, 15(5):1350.	6.525	100

H4	Koczurkiewicz-Adamczyk P (*) , Piska K, Gunia-Krzyżak A, Bucki A, Jamrozik M, Lorenc E, Ryszawy D, Wójcik-Pszczola K, Michalik M, Marona H, Kołaczkowski M, Pękala E. <i>Cinnamic acid derivatives as chemosensitising agents against DOX-treated lung cancer cells - Involvement of carbonyl reductase 1.</i>	European Journal of Pharmaceutical Science. 2020, 154:105511.	4.384	100
H5	Koczurkiewicz-Adamczyk P (*) , Kłaś K, Gunia-Krzyżak A, Piska K, Andrysiak K, Stępniewski J, Lasota S, Wójcik-Pszczola K, Dulak J, Madeja Z, Pękala E. <i>Cinnamic acid derivatives as cardioprotective agents against oxidative and structural damage induced by doxorubicin.</i>	International Journal of Molecular Science. 2021, 22(12):6217.	6.208	140
H6	Koczurkiewicz-Adamczyk P (*) , Gąsioriewicz B, Piska K, Gunia-Krzyżak A, Jamrozik M, Bucki A, Słoczyńska K, Bojdo P, Wójcik-Pszczola K, Władyka B, Kołaczkowski M, Pękala E. <i>Cinnamamide derivatives with 4-hydroxypiperidine moiety enhance effect of doxorubicin to cancer cells and protect cardiomyocytes against drug-induced toxicity through CBR1 inhibition mechanism.</i>	Life Science. 2022, 305:120777.	6.780	70

(*) autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) publikacji stanowiących podstawę habilitacji wynosi 30.326, odpowiadająca mu suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) to 535 punkty. Publikacje wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego zostały opublikowane w latach 2016-2023.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład dzieła (**H1-H6**) jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Opisane w pracy **H1** badania zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM oraz częściowo we współpracy z Katedrą Farmakognozji UJ CM oraz Zakładem Biologii Komórki Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii (WBBiB) UJ.

Opisane w pracy **H3** badania zostały wykonane w Zakładzie Medycyny Diagnostycznej i Laboratoryjnej, Chemii Klinicznej i Patobiochemii w Uniwersytecie Charité w Berlinie oraz częściowo w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ oraz w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM.

Opisane w pracy **H4** badania zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM we współpracy z Zakładem Biologii Komórki WBBiB UJ, Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM oraz Katedrą Chemii Leków UJ CM.

Opisane w pracy **H5** badania zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM we współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, Zakładem Biologii Komórki WBBiB UJ oraz Zakładem Biotechnologii Medycznej WBBiB UJ.

Opisane w pracy **H6** badania zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM we współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, Katedrą Chemii Leków UJ CM oraz Zakładem Biochemii Analitycznej WBBiB UJ.

Badania finansowane były z następujących źródeł:

1. Projekt pt.: *„Nowe amidowe pochodne kwasu cynamonowego jako inhibitory reduktaz karbonylowych, modulujące aktywność doksorubicyny - nowa perspektywa w terapii nowotworów”* nr 2016/21/D/NZ7/01546, finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant Sonata. Kierownik: Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk.
2. Projekt pt.: *„Wpływ wybranych saponozydów triterpenowych stosowanych łącznie z chemioterapeutyką na komórki nowotworów prostaty w badaniach in vitro”* nr K/DSC/001434, projekt statutowy, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk.
3. Projekt pt.: *„Modele komórkowe w ocenie wybranych parametrów ADMETox nowych związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej”*, nr K/ZDS/005488, projekt statutowy finansowany przez UJ CM. Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Pękała.
4. Projekt pt.: *„Badania biologiczne in vitro nowych związków aktywnych o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym”*, nr K/ZDS/007826, projekt statutowy finansowany przez UJ CM. Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Pękała.

4.1.3 Wprowadzenie

Stan wiedzy z zakresu onkologii - genów, białek sygnałowych, czynników wzrostu, ścieżek sygnalizacyjnych zaangażowanych w promocję i progresję nowotworów z roku

na rok jest coraz większy, Leczenie wielu typów nowotworów w dalszym ciągu pozostaje jednak wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Mało optymistyczne są również statystyki *World Health Organisation (International Agency for Research on Cancer)* prognozujące znaczący wzrost zapadalności na choroby nowotworowe w ciągu najbliższych dwudziestu lat w Europie i na świecie.

Obecnie dysponujemy wieloma zarejestrowanymi lekami stosowanymi w chemioterapii nowotworów, które często są elementem podstawowej strategii terapeutycznej, w leczeniu pierwszego rzutu. Leki te, niestety nie działają na konkretne komórki, ich działanie jest systemowe, dlatego terapia z ich udziałem odbywa się z zastosowaniem dużych dawek leku i niesie liczne działania niepożądane. Pomimo dużej skuteczności, przy stosunkowo niskiej selektywności działania chemioterapeutyki wykazują znaczną toksyczność powodując w ten sposób pojawienie się wielu skutków ubocznych już w trakcie leczenia, albo takich, które pacjent rozwija po zakończonej terapii onkologicznej [1]. Konsekwencje toksyczności powodowanej chemioterapią są bardzo poważne, od konieczności przerwania skutecznego leczenia po dysfunkcje organów, z którymi pacjent boryka się przez lata, a nawet takimi które prowadzą do przedwczesnej śmierci pacjenta [2]. Kolejnym ograniczeniem stosowania chemioterapii jest oporność komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe ekspozowane na lek w pewnym momencie, na skutek rozwinięcia swoistych mechanizmów (regulacja wyrzutu leków przez rodzinę białek transporterów ABC, hamowanie apoptozy, zmiany w metabolizmie) przestają na niego odpowiadać rozwijając oporność, co skutkuje brakiem skuteczności terapii [3]. Istnieje wyraźna potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, które poprawią bezpieczeństwo i skuteczność terapii onkologicznych.

4.1.3.1 Chemiowrażliwienie

Jedną ze strategii prowadzących do przełamania oporności komórek nowotworowych, a tym samym uwrażliwienia ich na lek jest działanie chemiowrażliwiające. W taką koncepcję wpisuje się połączenie istniejących chemioterapeutyków ze związkami o uznanym profilu bezpieczeństwa np. związkami pochodzenia naturalnego [4]. Podanie skojarzone może skutkować korzystnym działaniem przeciwnowotworowym. Synergistyczne działanie indukowane jest poprzez supresję genów, białek i szlaków zaangażowanych w rozwój chemiooporności

i jednoczesną modulację różnych celów molekularnych, które są zaangażowane w progresję nowotworową, a tym samym powodują uwrażliwienie komórek nowotworowych i prowadzą do wzmacniania działania chemioterapeutyku przy zastosowaniu jego minimalnych dawek.

Do dobrze opisanych substancji pochodzenia naturalnego, skutecznie uwrażliwiających komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków należą m.in.: kurkumina, berberyna, piperlongumina, resweratrol, apigenina, sulforafan, kwercetyna, genisteina i wiele innych [5-7]. Skuteczność niektórych z nich została potwierdzona w badaniach klinicznych [8-9]. Związki pochodzenia roślinnego są cennym elementem terapii chemiowrażliwiających ze względu na szereg korzystnych właściwości, m.in. mogą ograniczać stres oksydacyjny i stan zapalny indukowany w procesie nowotworzenia, uruchamiają w komórkach mechanizmy cytoprotekcyjne. Takie właściwości pozwalają na łagodzenie skutków ubocznych, takich jak kardiotoxyczność, nefrotoksyczność czy neurotoksyczność wywołanych chemioterapeutykami [10]. Związki chemiowrażliwiające znane są również ze zwiększania efektu cytotoxycznego leków przeciwnowotworowych poprzez indukowanie śmierci komórek nowotworowych. Substancje pochodzenia naturalnego wpływają na wydłużenie czasu ekspozycji komórek docelowych na chemioterapeutyk, promując uszkodzenie DNA lub regulując ekspresję celów lekowych, wywołując w ten sposób efekt synergistyczny w komórkach opornych [11]. Mimo, że wiele danych eksperymentalnych wskazuje na wyraźne działanie chemiowrażliwiające związków pochodzenia naturalnego, potrzebne są dodatkowo zarówno badania przedkliniczne, jak i kliniczne, aby dokładnie określić ich charakter (agonizm, synergizm lub antagonizm). W przypadku projektowania terapii należy również zwrócić uwagę na to, czy podanie skojarzone jest bezpieczne. Biorąc pod uwagę aktualnie dostępne dane literaturowe można wnioskować, że rośliny to przyszłościowe źródło związków leczniczych w terapiach onkologicznych.

4.1.3.2 Działanie chemiowrażliwiające saponin triterpenowych

Saponiny triterpenowe to grupa wyspecjalizowanych metabolitów roślinnych (dawniej nazywanych metabolitami wtórnymi) o szerokim spektrum aktywności biologicznej i farmakologicznej. Jako związki glikozydowe zbudowane są z części cukrowej (glikonu), w skład którego wchodzi łańcuchy cukrowe (1-3) rozgałęzione lub

proste oraz części nie cukrowej, tj. aglikonu zwanego sapogeniną, który jest triterpenem, z reguły pentacyklicznym, rzadziej tetracyklicznym.

Do najważniejszych aktywności farmakologicznych saponin triterpenowych należą właściwości wykrztuśne, przeciwzapalne, immunomodulujące, spazmolityczne czy przeciwdrobnoustrojowe. Wiele związków z tej grupy jest stosowana w leczeniu, czego przykładem może być escyna stosowana w leczeniu przewlekłej niewydolności żylnej, ginsenozydy stosowane jako środki o działaniu adaptogennym, czy glicyryzyna-lek wykrztuśny, który ma również aktywność gastroprotekcijną. Za właściwości biologiczne saponin triterpenowych odpowiada ich zdolności do oddziaływań z błonami biologicznymi, a w szczególności z cholesterolem obecnym w błonach. Poprzez zdolność do zmian integralności błony komórkowej (tworzenie porów) saponiny mogą zaburzać gospodarkę jonową komórek, w efekcie końcowym doprowadzając do ich lizy i śmierci. Jest to mechanizm odpowiedzialny za dobrze opisaną w literaturze aktywność hemolityczną tych związków [12].

Do dobrze poznanych właściwości biologicznych saponin triterpenowych należy również aktywność przeciwnowotworowa oraz chemiowrażliwiająca. Najważniejsze mechanizmy związane z aktywnością przeciwnowotworową tych związków zawarłam w pracy przeglądowej, opublikowanej w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* w 2013 roku [13]. Saponiny same w sobie posiadają aktywność: cytotoksyczną, cytostatyczną oraz proapoptotyczną względem komórek nowotworowych. Mechanizm molekularny działania tych saponin zależy zarówno od struktury chemicznej saponiny, jak i rodzaju komórek docelowych. Saponiny hamują proliferację komórek nowotworowych, prowadząc do zatrzymania komórek w jednej z faz cyklu komórkowego (najczęściej S lub G2), obniżają żywotność komórek nowotworowych różnych typów najczęściej na drodze zależnej od czasu ekspozycji i stężenia. Uruchamiają w komórkach nowotworowych ścieżkę apoptozy - zarówno szlak wewnętrzny, zależny od kaspaz (częściej), jak i zewnętrzny, zależny od receptorów śmierci. Ponadto saponiny są zaangażowane w uruchamianie mechanizmów hamujących inwazyjność komórek nowotworowych, wpływają nie tylko na podstawowe parametry ruchu komórek takie jak długość drogi, prędkość migracji, ale również zmieniają poziom metaloproteinaz 2 oraz 9 w komórkach nowotworowych, hamują fosforylację kinazy ERK oraz białka p38, AP-1, hamują aktywację TNF α i NF κ B, co finalnie prowadzi do obniżenia poziomu MMP-9. Dodatkowo, saponiny mają zdolność do zmian poziomu białek Rac oraz Cdc42, które

są odpowiedzialne za organizację cytoszkieletu i koordynowaniu migracji komórkowej oraz E-kadheryny, co jest związane z utratą funkcji adhezyjnych komórki [14].

Jednym z ciekawych i obiecujących kierunków badawczych związanych z potencjalnym zastosowaniem saponin triterpenowych w onkologii jest łączenie ich z chemioterapeutykami. Wyniki licznych prac prowadzonych z wykorzystaniem modeli *in vitro* oraz *in vivo* udowadniają, że saponiny te mają zdolność do chemiowrażliwienia komórek nowotworowych różnego typu na chemioterapeutyki. Z powodzeniem łączono saponiny z takimi chemioterapeutykami jak: doksorubicyna, cyklofosfamid, 5-fluorouracyl, mitoksantron, paklitaksel, docetaksel oraz cisplatyna [15][16]. Saponiny triterpenowe zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę, indukując kaskadę kaspaz w subtoksycznych stężeniach podanego chemioterapeutyku. Hamują namnażanie komórek nowotworowych zatrzymując komórki w fazach cyklu komórkowego oddziałując na kinazy cyklino zależne kontrolujące przebieg cyklu oraz hamują aktywację ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/Akt. Hamują inwazyjność komórek nowotworowych przez reorganizację cytoszkieletu, a także obniżanie poziomu MMP-9. Co ciekawe, wiele prac udowadnia, że zastosowanie saponin triterpenowych wraz z chemioterapeutykiem niweluje efekty toksyczne chemioterapii, opisano redukcję nefrotoksycznego efektu cisplatyny podanej wspólnie z plakotydyną D w modelu mysim [17]. Dodatkowo udowodniono ograniczenie kardiotoxyczności indukowanej doksorubicyną w podaniu skojarzonym z ginsenozydem Rg3 lub astragalozydem IV w modelu *in vitro* oraz *in vivo*. Interesujące są również badania dotyczące przełamania oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki w podaniu skojarzonym z saponinami. Wykazano, że ginsenozyd RH2 zwiększa efektywność doksorubicyny w komórkach raka sutka opornych na terapię obniżając aktywność pompy P-gp, podobnie radeanina A aktywuje w komórkach opornych na cisplatynę - apoptozę i prowadzi do zatrzymania komórek w fazie G0/G1 zwiększając skuteczność leku [18]. Tubeimozyd-I (TBMS1) posiadał aktywność chemiowrażliwiającą komórki glejaka wielopostaciowego opornego na terapię na temozolomidem (TMZ). TBMS1 wykazywał synergistyczny wpływ cytotoksyczny, proapoptotyczny (podwyższony stosunek Bax/Bcl-2, aktywacja kaspazy-3 i kaspazy-9) oraz modulację ścieżki sygnałowej PI3K/Akt/mTOR/NF-κB [19]. α-hederyna indukowała ferroptozę, apoptozę i zwiększała przepuszczalność błony w niedrobnokomórkowym raku płuca NSCLC opornym

na cisplatynę poprzez zmniejszenie poziomu syntetazy i peroksydazy glutationowej, co powodowało zahamowanie syntezy glutationu w komórkach nowotworowych [20].

4.1.3.3 Zastosowanie saponin triterpenowych w terapiach z toksynami

Saponiny triterpenowe są powszechnie znane ze swoich właściwości adjuwantowych, wykorzystywanych w szczepionkach. Jednym z przykładów obecnych na rynku szczepionek z adiuwantem saponiny AS01**b** jest zatwierdzona przez FDA w 2017 roku, rekombinowana szczepionka przeciwko półpaścowi (RZV, Shingrix, GlaxoSmithKline). Jest to szczepionka podjednostkowa zawierająca glikoproteinę E wirusa ospy wietrznej i półpaśca. Układ adjuwantowy AS01 składa się z dwóch immunostymulantów, monofosforylu lipidu A (MPL) i saponiny QS-21. Saponina QS-21 jest wysoce oczyszczoną frakcją saponin triterpenowych pochodnych kwasu kwilajowego, różniących się terminalnym cukrem (ksyloza lub apioza). Frakcję QS21 pozyskuje się na skalę przemysłową poprzez izolację z kory *Quillaja saponaria* Molina (mydłodrzew właściwy). Indukuje ona powstanie przeciwciał specyficznych dla antygeny, a także komórkową odpowiedź immunologiczną [21].

Adjuwantową aktywność saponin triterpenowych wykorzystuje się również w opracowywaniu terapii przeciwnowotworowych z zastosowaniem toksyn celowanych [22-23]. Toksyny celowane to toksyny, które posiadają domenę wiążącą specyficzne białka powierzchniowe komórki. Domeny wiążące naturalnych toksyn docelowych zazwyczaj rozpoznają prawidłowe komórki organizmu, a zatem nie są dobrym modelem do zastosowań terapeutycznych, ponieważ działają mało selektywnie. Toksyny typu RIP1, takie jak saporyna czy diantyna posiadają jedynie aktywny enzymatycznie pojedynczy łańcuch A (nie posiadają domeny wiążącej komórkę). To sprawia, że są dobrymi kandydatami terapii celowanych. Niestety ze względu na brak aktywnego mechanizmu wnikania do cytozolu, są degradowane w kompartmentcie lizosomalnym [24]. Biorąc pod uwagę fakt, że działanie toksyn zależy od ilości toksyny, która została uwolniona do cytozolu, konieczne jest zastosowanie strategii umożliwiającej uwolnienie toksyny w miejscu docelowym. Istnieje kilka strategii mających na celu zwiększenie efektywności toksyn celowanych, a jednym z nich jest zastosowanie saponin [25]. Pierwsze doniesienia na temat możliwości zastosowania saponin w terapiach celowanych pojawiły się w 2003 roku, kiedy to autorzy poddali badaniu frakcję saponin z *Gypsophila* sp. wraz z toksyną saporyną [26]. W kolejnych badaniach udowodniono, że saponiny z *Saponaria* sp.

indukują endocytozę toksyny saporiny za pośrednictwem pecherzyków opłaszczonych klatryną. Po wielu latach badań nad zastosowaniem saponin w terapiach celowanych postuluje się, że mechanizm wzmacniania działania toksyny polega na wzmacnianiu endosomalnego uwalniania toksyny w komórce docelowej. Szczególne znaczenie ma spostrzeżenie, że połączenie docelowej toksyny przez fuzję z ligandem, np. EGF (co warunkuje jej specyficzność) nie zmienia zdolności toksyny do oddziaływań synergistycznych z saponinami. Wskazuje to wyraźnie, że efekt wzmocnienia ma miejsce wewnątrz komórki, a tym samym specyficzność komórki docelowej wprowadzona przez ligand jest zachowana [27-28]. Saponiny triterpenowe spełniają kryteria stawiane endosomalnym wzmacniaczom uwalniania toksyn w kompartmentie cytozolowym, zachowują swoją aktywność w stężeniach nietoksycznych, dodatkowo wykazują zadowalającą stabilność chemiczną i nie zakłócają ważnych szlaków metabolicznych w obrębie komórki.

4.1.3.4 Pochodne kwasu cynamonowego jako inhibitory reduktazy karbonylowej (CBR1) w terapii przeciwnowotworowej z udziałem antracyklin

Stosowanie terapii skojarzonej w leczeniu chorób nowotworowych stanowi obiecujący kierunek badań w poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych strategii leczniczych [29]. Ważną grupę leków przeciwnowotworowych są antybiotyki antracyklinowe (doksorubicyna, daunorubicyna oraz epirubicyna). Charakterystycznym działaniem niepożądanym antracyklin, jest kardiotoksyczność [30]. Innym problemem klinicznym, który zmniejsza skuteczność terapii antracyklinami u pacjentów jest rozwój oporności wielolekowej (*multi-drug resistance*, MDR) komórek guza. Głównym mechanizmem, z którym dotychczas wiązano powstanie oporności, była nadekspresja ATP-zależnych błonowych transporterów ABC (*ATP-binding cassette*), np. glikoproteiny-P, zdolnych do aktywnego wypompowywania leków z komórki do przestrzeni międzykomórkowej. Zaproponowane stosowanie inhibitorów transporterów ABC, jako terapii uwrażliwiającej komórki nowotworowe na antracykliny okazało się mało zadowalające [31]. W związku z brakiem klinicznej skuteczności inhibitorów transporterów ABC uwagę skupiono na innych mechanizmach powstawania oporności, które mogą stanowić cel terapeutyczny. Do takich należą m.in. nadekspresja enzymów redukujących ugrupowanie karbonylowe przy węglu C13 antracyklin do pochodnych alkoholi, takich jak doksorubicynol i daunorubicynol [32-34]. Do

enzymów odpowiedzialnych za te przekształcenia zalicza się reduktazę karbonylową (CBR-1) i aldo-keto reduktazę (AKR1C3) [35]. Metabolity antracyklin odznaczają się kilkaset razy mniejszą aktywnością przeciwnowotworową, a dodatkowo, większym powinowactwem do transporterów ABC. Z tego powodu komórki nowotworowe mają zdolność do zmniejszania toksyczności chemioterapeutyku [36]. Pochodne te wpływają również depresyjnie na kurczliwość mięśnia sercowego, zmieniając potencjał błony komórkowej kardiomiocytów i stężenie jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} w ich cytozolu [37]. W związku z niekorzystną aktywnością metabolitów antracyklinowych, (ich wpływem zarówno na oporność komórek nowotworowych, jak i na rozwój uszkodzeń serca), różne inhibitory tych enzymów biorących udział w metabolizmie antracyklin zostały przebadane w modelach *in vitro* i *in vivo*. Wiele nowych inhibitorów to substancje pochodzenia naturalnego. Wykazano, że gallusan epigallokatechiny zwiększa cytotoksyczność daunorubicyny względem linii komórek raka wątroby poprzez zahamowanie enzymu CBR-1. Podanie wspólne gallusanu epigallokatechiny z daunorubicyną zwierzętom z przeszczepionymi ludzkimi nowotworami powodowało zmniejszenie masy guzów, redukcję spadku masy ciała, a także obniżenie poziomu markerów uszkodzenia mięśnia sercowego we krwi. Inne inhibitory CBR-1/AKR do których zalicza się m.in.: kwercetynę, berberynę, kurkuminę, kwas 23-hydroksybetulinowy i resweratrol, wykazywały działanie zwiększające cytotoksyczność antracyklin w stosunku do komórek wielu linii komórkowych, działanie kardioprotekcyjne *in vitro* i *in vivo*, oraz obniżały wydajność powstawania toksycznych metabolitów [38-41]. Do tej pory nie udało się znaleźć substancji, która byłaby skutecznym inhibitorem enzymów, a jednocześnie wykazywała korzystny profil farmakokinetyczny. Wyniki uzyskane w ramach badań wstępnych przeprowadzonych w naszym zespole badawczym dowiodły, że naturalna pochodna amidowa kwasu cynamonowego, piperlongumina (PL) inhibitor CBR-1, zastosowana łącznie z doksorubicyną (**DOX**) wykazuje synergistyczne działanie przeciwnowotworowe względem komórek ludzkiej linii nowotworu prostaty DU-145 [42]. Ze względu na obecność układu 3-fenyloprop-2-enowego, z karbonylowym atomem węgla C1 (charakterystyczny dla wielu inhibitorów CBR-1 i AKR1C3) do badań wytypowano **kwas cynamonowy**. Co więcej, bazując na wynikach badań wielu zespołów stwierdzono, że kwas cynamonowy i jego pochodne są skutecznymi inhibitorami AKR1C3 [43].

4.1.4 Założenia i cel pracy

Pomimo dużej skuteczności chemioterapeutyków, średnie przeżycie pacjentów z niektórymi typami nowotworów (płuca, trzustka, jelito grube) w dalszym ciągu nie przekracza 5 lat. Głównymi przyczynami niepowodzeń terapii są **oporność komórek na leczenie** oraz wysoka **toksyczność niosąca silne działania niepożądane**. W związku z niewystarczającą skutecznością obecnych terapii, a także prognozowaną większą zapadalnością na choroby nowotworowe i śmiertelnością z nich wynikającą w ciągu najbliższych lat, istnieje wyraźna potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych. Przy ich projektowaniu warto brać pod uwagę nie tylko skuteczność leczenia przeciwnowotworowego, ale również bezpieczeństwo terapii.

Terapie skojarzone to szeroka grupa potencjalnych rozwiązań terapeutycznych, które wpisują się w koncepcję zastosowania więcej niż jednej substancji leczniczej w celu wywołania korzystnego efektu terapeutycznego.

W oparciu o przedstawione założenia, celem prowadzonych przeze mnie badań było:

- określenie potencjalnych korzyści **skojarzonego podania uznanego chemioterapeutyku mitoksantronu oraz saponin triterpenowych jako substancji adjuwantowych** w modelu komórek raka prostaty,
- **zbadanie skuteczności saponin triterpenowych w onkologicznej terapii celowanej z wykorzystaniem toksyny -diantyny,**
- **poszukiwanie możliwości poprawy skuteczności terapii antracyklinami z udziałem syntetycznych pochodnych kwasu cynamonowego jako inhibitorów enzymu CBR1** w modelu komórek niedrobnokomórkowego raka płuc.

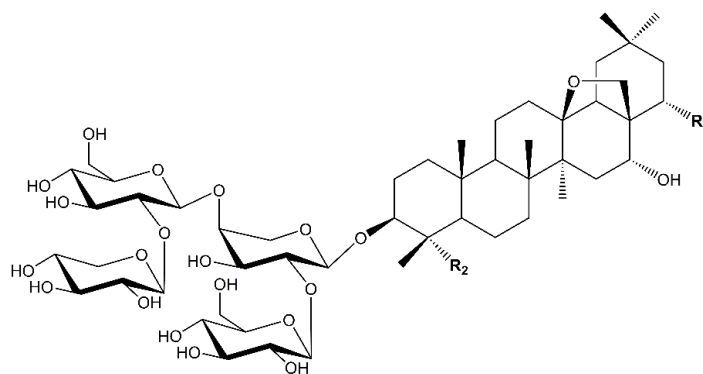
W zakresie badań związanych z saponinami triterpenowymi wykorzystano chemicznie scharakteryzowane frakcje saponin izolowane z części podziemnych gatunku *Lysimachia ciliata* L. (Primulaceae). Saponiny te reprezentują rzadką strukturalnie grupę pochodnych oleananu z mostkiem 13 β ,28-epoksydowym, nowatorską w kontekście omawianych kierunków badań. W pierwszym etapie poddano szczegółowej analizie efekty oraz mechanizm podania skojarzonego tych saponin z mitoksantronem w modelu komórek raka prostaty. W drugim etapie oceniono możliwość wykorzystania frakcji saponin z *L. ciliata* w terapii celowanej z diantyną, toksyną sprzężoną z EGF oraz oszacowano selektywność działania takiego połączenia w komórkach HER14

wykazujących nadekspresję EGFR. W dalszym etapie badań skupiono się na możliwościach poprawy skuteczności antracyklin przez zastosowanie nowych inhibitorów enzymu CBR1 (pochodnych kwasu cynamonowego), odpowiedzialnego za tworzenie niepożądanych metabolitów antracyklin. W tym celu przeprowadzono serię eksperymentów skринingowych mających na celu wyselekcjonowanie związku o dualnej, korzystnej aktywności chemiowrażliwiającej i kardioprotekcyjnej.

4.1.5 Wyniki badań i dyskusja

H1 Koczurkiewicz P (*), Kowolik E, Podolak I, Wnuk D, Piska K, Łabędź-Masłowska A, Wójcik-Pszczółka K, Pękala E, Czyż J, Michalik M. *Synergistic Cytotoxic and Anti-invasive Effects of Mitoxantrone and Triterpene Saponins from *Lysimachia ciliata* on Human Prostate Cancer Cells*. *Planta Med.* 2016, 82(18):1546-1552.

Celem pracy było zbadanie możliwości wykorzystania związków pochodzenia naturalnego w kombinacji z syntetycznym chemioterapeutykiem w terapii raka prostaty. W przedstawionej pracy zbadano wpływ podania skojarzonego frakcji saponin **CIL1/2** izolowanej z rośliny *Lysimachia ciliata* L. (tojeść orzęsiona) z mitoksantronem (**MTX**) na komórki nowotworów prostaty różniących się stopniem metastazy (linie komórek: DU-145 oraz PC3) oraz linię prawidłowych komórek prostaty (PNT2). Frakcja **CIL1/2** została wyizolowana oraz scharakteryzowana przez prof. Irmę Podolak z Katedry Farmakognozji UJCM. Frakcja zawierała dwie saponiny triterpenowe: **CIL1** (dezglukoanagallozyd B) oraz **CIL2** (anaglosaponinę IV), których struktura chemiczna została przedstawiona na **Ryc. 1**. Aktywność przeciwnowotworowa wymienionych saponin triterpenowych została ustalona w pracach opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora (Załącznik 4, P3, P5 oraz P7). W pracy **H1** do analiz została wybrana mieszanina saponin, gdyż dla tej grupy związków opisywano w literaturze wzmocnienie efektu adjuwantowego frakcji w porównaniu do zastosowania czystych wyizolowanych związków. Ideą tej pracy było sprawdzenie czy **CIL1/2** ma zdolność do chemiowrażliwienia komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyku (**MTX**). W tym celu zastosowano badane substancje (zarówno frakcję **CIL1/2** jak i chemioterapeutyk) w nietoksycznych stężeniach.



	R1	R2	
CIL1	H	CH ₂ OH	desglucoanagalloside B
CIL2	OAc	CH ₃	anagallosaponin IV

Ryc.1. Struktury komponentów frakcji saponin badanych w pracach **H1** oraz **H3**.

Wyniki tej pracy udowodniły selektywność działania frakcji **CIL1/2** względem komórek prostaty. Zarówno w przypadku analiz żywotności komórek, jak i aktywności proliferacyjnej zaobserwowano istotny, synergistyczny efekt podania **CIL1/2+MTX** na komórki nowotworowe linii DU-145, przy słabszym efekcie na komórki linii PC3 i niemal znikomym efekcie na komórki prawidłowe prostaty linii PNT2. Takie działanie wskazuje na możliwość osiągnięcia jednego z celów terapii skojarzonej, jakim jest poprawa bezpieczeństwa względem komórek prawidłowych, co w perspektywie może przełożyć się na ograniczenie skutków ubocznych chemioterapii. W dalszych etapach badań zweryfikowano w szczególności jakie szlaki sygnałowe są celem podania skojarzonego. Szlakiem aktywowanym w komórkach nowotworowych w wyniku działania **CIL1/2+MTX** jest apoptoza. Linią komórkową szczególnie wrażliwą na proapoptotyczne działanie **CIL1/2+MTX** były komórki DU145. Podanie skojarzone zwiększało liczbę komórek wyznakowanych aneksyną V, co korelowało ze zmienionym poziomem białek apoptotycznych w komórkach (Cleaved PARP, Bax, kaspazy 3 oraz 7). W przypadku analizy zmian w dystrybucji faz cyklu komórkowego zaobserwowano, że komórki nowotworowe po inkubacji w obecności **CIL1/2+MTX** zostają zatrzymane w fazie SubG1, (potwierdzając tym samym toczący się proces apoptozy), czego nie potwierdzono dla komórek prawidłowych linii PNT2. Zbadano także wpływ frakcji **CIL1/2+MTX** na proces inwazji komórek nowotworowych. W przypadku tych analiz

jednoznacznie potwierdzono selektywny efekt podania skojarzonego na komórki linii DU-145, zaobserwowano spadek migracji komórek, co skutkowało zarówno skróceniem drogi ich ruchu jak również obniżało prędkość i współczynnik efektywności ruchu. Dodatkowo podanie **CIL1/2+MTX** powodowało obniżenie potencjału transmigracyjnego komórek nowotworowych, jednak w tym przypadku silniejszy efekt antyinwazyjny zaobserwowano w przypadku komórek linii PC3. Zmianom w aktywności migracyjnej towarzyszyły zmiany w cytoszkieletcie aktynowym, doprowadzając do jego częściowej dezintegracji. Dodatkowo zbadano bezpieczeństwo frakcji **CIL1/2** wykluczając jej działanie mutagenne w teście *Vibrio harveyi*.

Badania opisane w pracy **H1** po raz pierwszy zwróciły uwagę na istotne znaczenie potencjalnego wykorzystania strukturalnie nietypowych saponin triterpenowych obecnych w z gatunku *Lysimachia ciliata* L. w terapiach skojarzonych. W stężeniach nietoksycznych, w których żaden ze związków nie wykazuje istotnej aktywności biologicznej, po podaniu skojarzonym następuje uruchomienie w komórce kaskad sygnałowych związanych z zahamowaniem procesów promocji i progresji nowotworowej, dodatkowo działanie to jest selektywne, komórki prawidłowe są mniej wrażliwe na ten efekt. Otwiera to szeroką perspektywę badawczą nad możliwościami wykorzystania tych saponin w terapii i ustalenia ich właściwości farmakokinetycznych, a także rozszerzenia panelu bezpieczeństwa.

H2 Koczurkiewicz P (*), Kłaś K, Grabowska K, Piska K, Rogowska K, Wójcik-Pszczółka K, Podolak I, Galanty A, Michalik M, Pękala E. *Saponins as chemosensitizing substances that improve effectiveness and selectivity of anticancer drug-Minireview of in vitro studies*. *Phytother Res.* 2019, 33(9):2141-2151.

Realizując badania dotyczące saponin triterpenowych i ich zastosowań adjuwantowych dokonałam przeglądu literaturowego celem usystematyzowania wiedzy w tym zakresie, a także poszukiwania nowych mechanizmów działania tych substancji. W wyniku tego powstała praca przeglądowa, szczegółowo omawiająca mechanizmy molekularne leżące u podstaw podania skojarzonego chemioterapeutyków (cisplatyny, doksorubicyny, cyklofosfamidu, mitoksantronu, paklitakselu oraz docetakselu) wraz z różnymi typami saponin. W pracy poddano dyskusji potencjalne ograniczenia, jakie niesie wykorzystanie saponin w terapii, a także dokonano próby ustalenia zależności struktura saponiny, a jej aktywność chemiowrażliwiająca.

Zastosowanie saponin w terapiach skojarzonych badane jest w kontekście zarówno chemiowrażliwienia komórek nowotworowych, co ma na celu ograniczenie dawki stosowanego chemioterapeutyku przy zachowanej jego skuteczności, przełamaniu oporności komórek na dany chemioterapeutyk jak również działania ochronnego saponin i ograniczającego skutki działania leków chemioterapeutycznych. Mechanizm chemiowrażliwienia komórek nowotworowych przez saponiny najczęściej wiąże się z stymulacją apoptozy, indukcją wolnych rodników tlenowych, zmianami w dystrybucji cyklu komórkowego komórek nowotworowych (zatrzymanie w fazie S lub G0), obniżeniu tempa proliferacji komórek nowotworowych czy zahamowaniu potencjału inwazyjnego. Na podstawie zebranych danych literaturowych wysnuto wnioski, że efekt końcowy silnie uzależniony jest od zarówno struktury chemicznej saponiny jak również od rodzaju komórek docelowych (typu nowotworu).

Wykorzystanie saponin w terapii ma również pewne ograniczenia, które muszą być brane pod uwagę przez badaczy. Jednym z najpoważniejszych ograniczeń stosowania saponin jest ich aktywność hemolityczna, która związana jest z łąčeniem saponin z cholesterolem obecnym w błonach biologicznych. W badaniach wykazano, że potencjał hemolityczny saponin jest ściśle związany z komponentą cukrową tych związków. Związkami, które wykazują najsilniejszą aktywność hemolityczną są monodesmozydy, mniejszą bidesmozydy, natomiast tridesmozydy uchodzą za bezpieczne w opisywanym kontekście. Jednak budowa aglikonu również ma znaczenie, saponiny typu oleananu najczęściej wykazują silniejszą aktywność hemolityczną niż ursanu czy dammaranu. Niestety trudno jednoznacznie przewidzieć kierunek tej aktywności biorąc pod uwagę strukturę, bowiem czasem obecność jednego podstawnika w aglikonie znosi działanie hemolizujące i na odwrót. Niemniej jednak aktywność hemolityczna znacząco ogranicza wykorzystanie saponin w terapii (niemożliwe jest podanie związku drogą dożylną). Jednak najnowsze technologie podania leku (liposomy, nanorurki) otwierają perspektywę dla tego rodzaju saponin. Warto zaznaczyć, że saponiny triterpenowe o aktywności hemolizującej są stosowane z powodzeniem, jako komponenty szczepionek. Kolejnym ograniczeniem w stosowaniu saponin jest niska biodostępność. Saponiny triterpenowe ze względu na relatywnie dużą masę cząsteczkową słabo przenikają przez błony biologiczne, co w praktyce wpływa na ich wchłanianie w jelicie oraz ich dystrybucję w tkance docelowej. To ograniczenie również można zmniejszyć poprzez zastosowanie nośników leku i najnowsze technologie w dostarczaniu leku do właściwego

kompartментu. Inną ważną cechą ograniczającą zastosowanie saponin jest ich toksyczność, spośród najpoważniejszych aktywności należy wziąć pod uwagę genotoksyczność, kardiotoxyczność oraz kumulację w organach. Te właściwości muszą zostać dokładnie zweryfikowane przed rozpatrywaniem saponiny w kontekście potencjalnego wykorzystania w klinice.

Reasumując, zainteresowanie saponinami triterpenowymi w kontekście zastosowania ich w terapiach skojarzonych jest duże, ich skuteczność jest udowodniona w badaniach *in vitro* i *in vivo*, a liczba prac w tym zakresie z roku na rok rośnie. Biorąc pod uwagę powyższe zasadne jest poszukiwanie nowych rozwiązań dla stosowania saponin triterpenowych w terapiach przeciwnowotworowych z uwzględnieniem wszystkich ograniczeń jakie ze sobą niosą.

H3 Koczurkiewicz-Adamczyk P (*), Grabowska K, Karnas E, Piska K, Wnuk D, Kłaś K, Galanty A, Wójcik-Pszczółka K, Michalik M, Pękala E, Fuchs H, Podolak I. *Saponin fraction CIL1 from Lysimachia ciliata L. enhances the effect of a targeted toxin on cancer cells*. *Pharmaceutics*. 2023, 15(5)1350. doi.org/10.3390/pharmaceutics15051350.

Praca **H3** jest kontynuacją tematyki badawczej zawartej w pracy **H1**. W trakcie poszukiwania alternatywnych sposobów wykorzystania saponin triterpenowych izolowanych z *Lysimachia ciliata* L. w kontekście terapii przeciwnowotworowej, wykonano serię eksperymentów mających na celu ocenę możliwości wykorzystania frakcji **CIL1** w terapii celowanej z zastosowaniem diantyny, toksyny celowanej sprzężonej z EGFR (DE). Do tej pory nie ma w literaturze danych dotyczących działania saponin zbliżonych strukturalnie do związków występujących w *Lysimachia* sp. w połączeniach z toksynami. Znacząca część eksperymentów wchodzących w skład tej pracy została przeprowadzona przeze mnie w trakcie stażu naukowego, który odbyłam w Instytucie Medycyny Laboratoryjnej, Chemii i Patobiochemii, Charité (Berlin, Niemcy) pod opieką prof. Hendrika Fuchsa. Będąc na stażu wykonałam zarówno eksperymenty mające na celu pozyskanie toksyny targetowej (ekspresję, oczyszczanie, zbadanie jej aktywności enzymatycznej), jak i eksperymenty skринingowe mające na celu oszacowanie aktywności adjuwantowej saponiny. Pozostała część badań została wykonana już w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM.

W pracy **H3** w odpowiednio dobranym modelu komórkowym, który stanowiły linie komórkowe: HER14 (wykazujące stabilną nadekspresję receptora EGFR) oraz NIH3T3 (nie wykazujące ekspresji EGFR, stosowane jako kontrola) zbadano wpływ

frakcji saponin **CIL1** na zwiększenie efektywności działania toksyny **DE**. Oba typy komórek (HER14 oraz NIH3T3) poddano 72 godzinnej inkubacji w obecności samej toksyny oraz w podaniu skojarzonym toksyny z **CIL1** (**DE+CIL1**). Wykonano analizy cytotoksyczności oraz proliferacji. Uzyskane wyniki wskazały, że **CIL1** znacząco zwiększa aktywność przeciwnowotworową **DE**, a efekt ten jest komórkowo specyficzny. Linia komórkową bardziej wrażliwą na działanie **DE+CIL1** była linia wykazująca stabilną ekspresję EGFR- HER14. W przypadku działania cytotoksycznego zaobserwowano zwiększoną ponad 2200 krotnie aktywność **DE+CIL1** w porównaniu do samej **DE**, co ciekawe w komórkach kontrolnych (NIH3T3) efekt ten nie był istotny, zaobserwowano jedynie siedmiokrotnie większą aktywność **DE+CIL1** w porównaniu do samej **DE**. Podobne obserwacje odnotowano dla procesu apoptozy. Celem tych eksperymentów było sprawdzenie czy nietoksyczne stężenia **DE** w połączeniu z nietoksycznym stężeniem **CIL1** będą indukowały proces apoptozy w komórkach.

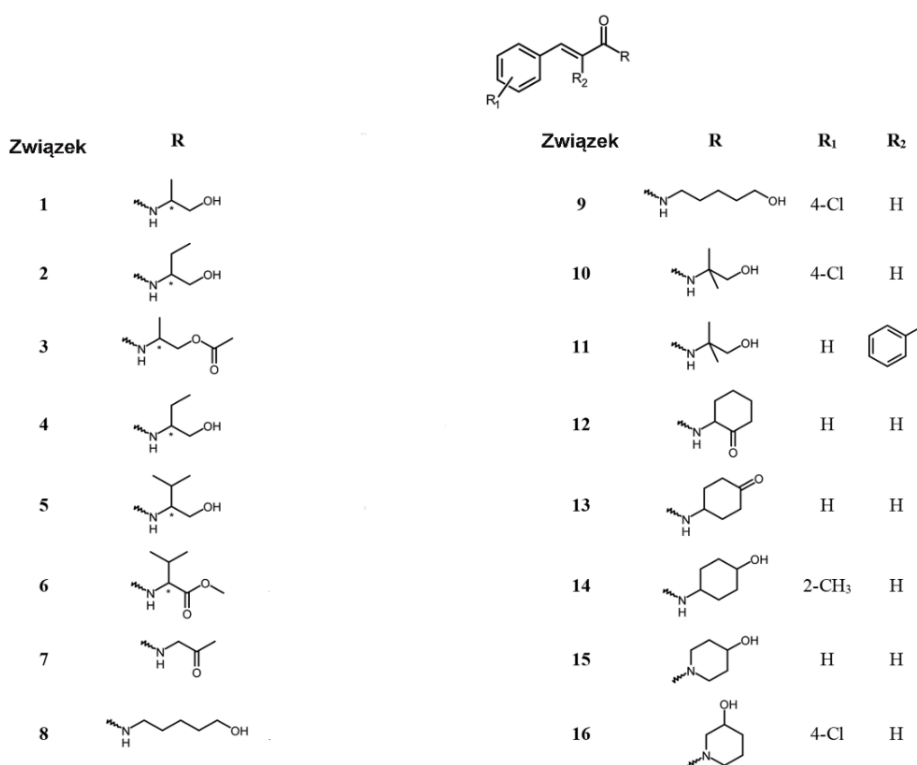
Wyniki uzyskanych badań jednoznacznie wskazują, że działanie **CIL1** jest selektywne i kierunkowe (receptorowo specyficzne), komórki linii HER14 zostały wprowadzone w apoptozę w 50% przy stężeniu toksyny równym 0.001nM. Podążając za otrzymanymi wynikami można wnioskować, że dodanie frakcji **CIL1** umożliwia obniżenie efektywnej dawki toksyny do jej stężeń całkowicie bezpiecznych. Te obserwacje jednoznacznie potwierdzają, że frakcja **CIL1** zwiększa efektywność terapii z zastosowaniem toksyny celowanej, jednak dalsze badania oparte o model *in vivo* powinny zostać wykonane, aby jednoznacznie określić zarówno kierunek, jak i dokładny mechanizm tego działania. Dodatkowo, w pracy **H3** wykluczono zarówno działanie mutagenne frakcji **CIL1**, jak i ewentualną cytotoksyczność z wykorzystaniem modeli komórkowych linii: H9c2, SHSY-5Y oraz HepG2.

Uzyskane wyniki badań rzucają zupełnie nowe światło na wykorzystanie badanych saponin triterpenowych pochodnych 13 β ,28-epoksy-oleananau w terapii adjuwantowej z zastosowaniem toksyn celowanych. Tematyka ta jest niezwykle rozwojowa, ponieważ zarówno modyfikacje toksyn (fuzja z receptorami, przeciwciałami monoklonalnymi), jak i możliwości podania związku adjuwantowego ewoluują na przestrzeni lat czyniąc ten rodzaj terapii niezwykle innowacyjnym.

H4 Koczurkiewicz-Adamczyk P (*), Piska K, Gunia-Krzyżak A, Bucki A, Jamrozik M, Lorenc E, Ryszawy D, Wójcik-Pszczółka K, Michalik M, Marona H, Kołaczkowski M, Pękala E. Cinnamic acid derivatives as chemosensitising agents against **DOX**-treated lung cancer

cells - Involvement of carbonyl reductase 1. European Journal of Pharmaceutical Science, 2020, 1;154:105511

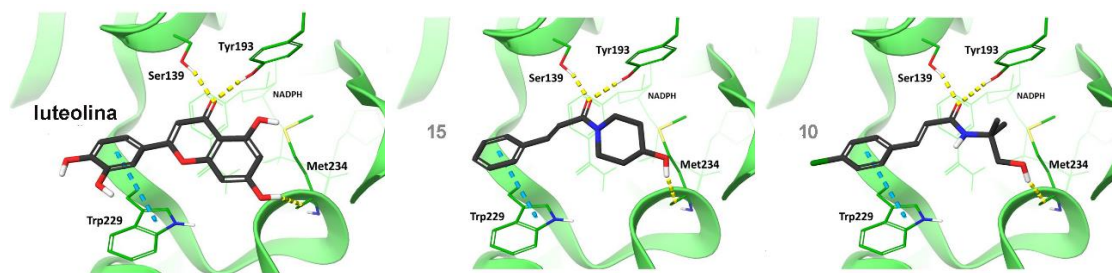
Na podstawie wstępnych wyników, uzyskanych w naszym zespole, będących punktem wyjściowym badań w pracy **H4** wykazano, że naturalna pochodna amidowa kwasu cynamonowego, piperlongumina (PL) inhibitor CBR1, zastosowana łącznie z doksorubicyną (**DOX**) wykazuje synergistyczne działanie przeciwnowotworowe [42]. W pracy **H4** zdecydowano się na poszukiwanie nowych substancji, których aktywność będzie bardziej zadowalająca niż PL. Ze względu na obecność układu 3-fenylprop-2-enowego, z karbonylowym atomem węgla C1 (charakterystyczny dla wielu inhibitorów reduktazy karbonylowej 1 i aldoketoreduktazy) do badań wybrano pochodną syntetyczną **kwas cynamonowy i jego analogi (Ryc.2.)**.



Ryc.2. Struktury badanych pochodnych kwasu cynamonowego CA (1-16)

W ramach badań zsyntetyzowano łącznie **16** pochodnych amidowych kwasu cynamonowego (**CA 1-16**) wykazujących powinowactwo do centrum aktywnego enzymu reduktazy karbonylowej 1 (CBR1). Nowe związki zostały zaprojektowane na podstawie modelowania molekularnego w oparciu o analizę struktur znanych inhibitorów i wiedzę o ich oddziaływaniu z enzymami (**Ryc.3.**). Związki zostały zsyntetyzowane przez

dr hab. Agnieszkę Gunię-Krzyżak w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM.



Ryc.3. Sposób wiązania znanego inhibitora (luteoliny) oraz pochodnych kwasu cynamonowego (15 i 10) do centrum aktywnego CBR1.

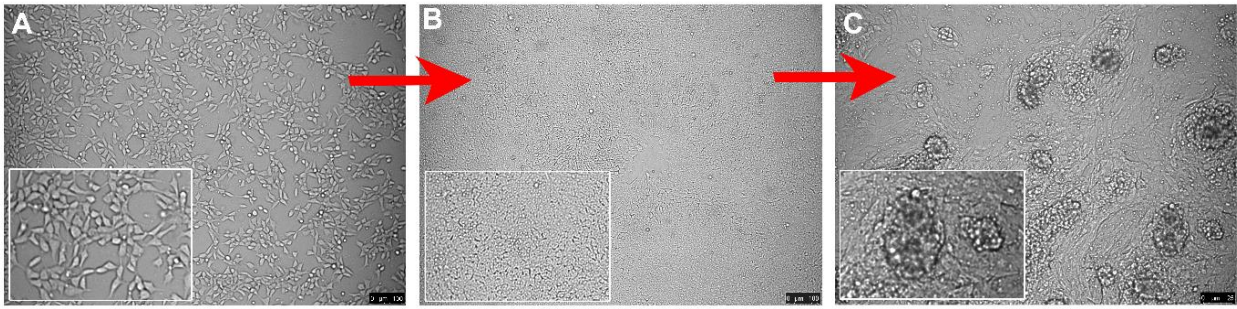
Jako właściwy model komórkowy do analiz aktywności chemiowrażliwiającej wybrano linię komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (A549), która wykazała największą wrażliwość na podanie skojarzone **DOX**+ badane związki w testach skринingowych (dane nieopublikowane), oraz w której poziom białka enzymatycznego był odpowiednio wysoki. W pierwszym etapie badań wszystkie związki zostały poddane badaniom przesiewowym aktywności cytotoksycznej w połączeniu z doksorubicyną (**DOX**). Spośród szesnastu związków zadowolające działanie chemiowrażliwiające komórki nowotworowe niedrobnokomórkowego raka płuc linii A549 na działanie **DOX** uzyskano dla siedmiu pochodnych (**4-5**, **9-10** oraz **14-16**). Wszystkie aktywne związki w połączeniu z **DOX** istotnie statystycznie obniżały IC_{50} w porównaniu do samej **DOX**. Dodatkowo przeprowadzono analizę stabilności **DOX** w modelu cytozolu ludzkiego z dodatkiem aktywnych pochodnych kwasu cynamonowego oraz jednego związku, który nie posiadał właściwości chemiowrażliwiających. Wyniki wskazywały, że wszystkie aktywne pochodne poprawiały stabilność **DOX**, ograniczając powstawanie metabolitu doksorubicynolu (**DOXol**), natomiast związek **11**, który aktywności chemiowrażliwiającej nie posiadał, nie poprawiał również stabilności **DOX**. Podanie skojarzone **DOX** wraz z aktywnymi pochodnymi kwasu cynamonowego skutkowało zmniejszeniem potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych, intensyfikacją procesu apoptozy przez wzrost poziomu kaspaz wykonawczych w komórkach linii A549 oraz reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz mikrotubul. Efekt chemiowrażliwiający pochodnych (**4-5**, **9-10** oraz **14-16**) był wielokierunkowy. Co więcej, komórki prawidłowe fibroblasty płucne linii MRC nie wykazywały tak silnej odpowiedzi chemiowrażliwiającej jak komórki nowotworowe po podaniu pochodnych

kwasu cynamonowego z **DOX**, co było niezwykle obiecującym odkryciem, ponieważ może świadczyć o selektywności podania skojarzonego oraz jego mniejszej toksyczności względem komórek prawidłowych. Ponadto w pracy zbadano podstawowe parametry z zakresu ADMETox, takie jak stabilność metaboliczna w modelu ludzkich mikrosomów oraz zdolność związków do pokonywania bariery krew-mózg w teście PAMPA. Wszystkie aktywne związki wykazały korzystny profil farmakokinetyczny *in vitro*.

Zaprezentowana praca przedstawia propozycję nowego zastosowania potencjalnych inhibitorów enzymu CBR1, jako związków chemiowrażliwiających komórki nowotworowe na antybiotyki antracyklinowe oraz poprawę bezpieczeństwa terapii z zastosowaniem antracyklin.

H5 Koczurkiewicz-Adamczyk P (*), Kłaś K, Gunia-Krzyżak A, Piska K, Andrysiak K, Stępniewski J, Lasota S, Wójcik-Pszczola K, Dulak J, Madeja Z, Pękala E. *Cinnamic Acid Derivatives as Cardioprotective Agents against Oxidative and Structural Damage Induced by DOXorubicin*. International Journal of Molecular Science, 2021, 9;22(12):6217.

Kontynuując tematykę badawczą pracy **H4** postanowiono wyłonić związki, które oprócz aktywności chemiowrażliwiającej posiadają dodatkowo aktywność kardioprotekcyjną. Ma to szczególne znaczenie w projektowaniu terapii skojarzonej, gdyż jednym z najpoważniejszych skutków ubocznych terapii antracyklinami jest uszkodzenie mięśnia sercowego. W toku badań przesiewowych, spośród związków (**1-16**) wykazujących aktywność chemiowrażliwiającą wyłoniono trzy związki (**5**, **10** oraz **15**), które wykazują zadowalającą aktywność kardioprotekcyjną. Skrining odbywał się z wykorzystaniem linii komórkowej kardiomiocytów szczurzych uszkodzanych **DOX** (dane własne, nieopublikowane). W dalszych etapach badań, w ramach pracy **H5** zdecydowano się na wielokierunkowe zbadanie potencjału kardioprotekcyjnego wybranych związków. Badania właściwe prowadzono już w dwóch modelach eksperymentalnych: w komórkach kardiomiocytów linii H9c2 oraz dodatkowo, w komórkach kardiomiocytów różnicowanych z ludzkich indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych hiPSC-CMs – cennego modelu, fizjologicznie bardziej zbliżonego do warunków *in vivo* (zdolność komórek do spontanicznej kurczliwości). Wprowadzenie modelu komórek hiPSC-CMs było możliwe dzięki nawiązanej współpracy z prof. Józefem Dulakiem z Zakładu Biotechnologii Medycznej, WBBiB UJ (**Ryc.4.**).



Ryc.4. Proces różnicowania komórek hiPSC w kardiomiocyty (hiPSC-CMs) przedstawiający zmiany morfologiczne komórek w trakcie doświadczenia: A - hiPSCs, B - Dzień 0, C - dzień 10 (hiPSC-CM)

Związkiem referencyjnym w przeprowadzonych badaniach była kwercetyna – flawonoid o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej i kardioprotekcyjnej. Każdy z trzech aktywnych związków wyłoniony w toku skriningu wykazywał aktywność kardioprotekcyjną w stosunku do komórek kardiomiocytów linii H9c2 oraz hiPSC-CMs uszkodzanych **DOX**. Związki chroniły komórki zarówno przed stresem oksydacyjnym indukowanym **DOX**, jak również wykazywały działanie ochronne w stosunku do mitochondriów polegające na zachowaniu właściwego potencjału błony mitochondrialnej, a także ich prawidłowej morfologii. Dodatkowo, dowiedziono, że te pochodne chronią komórki kardiomiocytów przed apoptozą indukowaną **DOX**. W eksperymencie analizującym aktywność migracyjną komórek kardiomiocytów w modelu rany wykazano, że związek **15** chronił komórki kardiomiocytów przed utratą zdolności do migracji indukowanej przez **DOX** oraz dodatkowo chronił cytoszkielet komórki przed uszkodzeniem. Działanie kardioprotekcyjne związków było wielokierunkowe, a w większości eksperymentów związek **15** posiadał najlepszą aktywność. Co ciekawe, związek ten posiadał również najsilniejszą aktywność chemiowrażliwiającą potwierdzoną w pracy **H4**. W ostatnim etapie badań skupiono się na potwierdzeniu bezpieczeństwa działania związków z wykorzystaniem testów będących złotym standardem w badaniach przedklinicznych. Wykluczono działanie cytotoksyczne w teście badającym zmiany w integralności błony komórkowej w modelu komórek linii HepG2, genotoksyczność w teście mikrojądrowym z wykorzystaniem linii komórek chomika chińskiego, potencjał mutageny - w teście Ames wykorzystującego zmodyfikowane szczepy bakterii *Salmonella typhimurium*, oraz wykluczono potencjał proarytmiczny poprzez zbadanie interakcji z kanałem hERG techniką patch clamp_CHO.

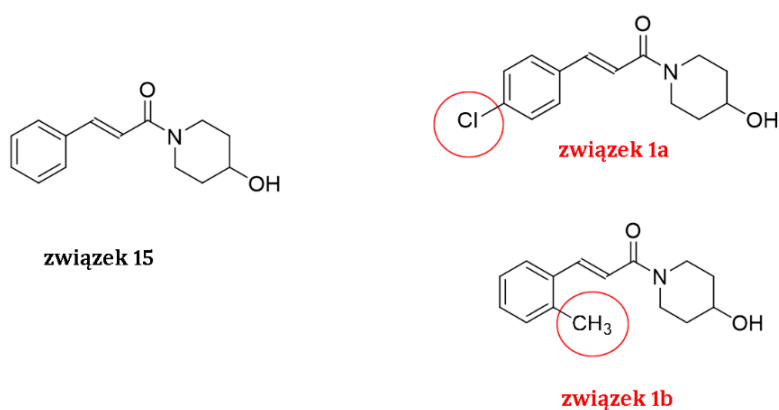
Dzięki uzyskanym wynikom udało się wytypować cząsteczkę **15 (E)-1-(4-hydroksypiperydyn-1-ylo)-3-fenyloprop-2-en-1on** posiadającą dualną aktywność chemiowrażliwiającą oraz kardioprotekcyjną, a także poznać podstawowe mechanizmy jej działania.

H6 Koczurkiewicz-Adamczyk P (*), Gąsioriewicz B, Piska K, Gunia-Krzyżak A, Jamrozik M, Bucki A, Słoczyńska K, Bojdo P, Wójcik-Pszczółka K, Władyka B, Kołaczkowski M, Pękala E. *Cinnamamide derivatives with 4-hydroxypiperidine moiety enhance effect of DOXorubicin to cancer cells and protect cardiomyocytes against drug-induced toxicity through CBR1 inhibition mechanism*

Równolegle do badań opisanych w pracy **H5** przeprowadzono eksperyment dzięki któremu pozyskano białko rekombinowane – reduktazę karbonylową 1, a następnie oceniono czy związek **15**, wyselekcjonowany w toku badań biologicznych i biochemicznych posiada zdolności inhibicyjne wobec CBR1. Testy ekspresji prowadzono z użyciem komórek szczepów ekspresyjnych *Escherichia coli* BL21(DE3) oraz Rosetta (DE3) po uprzednim wprowadzeniu do komórek na drodze transformacji chemicznej plazmidu rekombinowanego niosącego gen *hCBR1*. Gen kodujący białko znajdował się pod kontrolą promotora dla polimerazy RNA faga T7 (pET28a(+)). Białko oczyszczano metodą filtracji żelowej oraz chromatografii metalopowinowactwa. Jako referencji w badaniach kinetycznych użyto związków o udowodnionej aktywności hamującej enzym.

W dalszym etapie badań, który stanowi ostatnia praca z cyklu **H6** zsyntetyzowano dodatkowo dwa analogi strukturalne związku **15**, oznaczone w pracy symbolami **1a** oraz **1b** i poddano jej wnikliwej analizie aktywności biologicznej (**Ryc.5.**). Badania aktywności chemiowrażliwiającej rozszerzono do czterech modeli komórkowych. Podanie skojarzone **1a+DOX**, **1b+DOX** badano w modelu komórek raka sutka linii MCF-7, raka wątroby HepG2 oraz jak w **H5** komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 oraz prawidłowych fibroblastów płucnych linii MRC.

W przypadku wszystkich linii komórek nowotworowych inkubowanych w obecności **1a+DOX** lub **1b+DOX** zaobserwowano istotny statystycznie spadek żywotności oraz proliferacji w porównaniu do komórek inkubowanych w obecności samej **DOX**. Podobnie było w przypadku indukcji procesu apoptozy, jednak efekt chemiowrażliwiający związku **1a** był zdecydowanie silniejszy w porównaniu do związku **1b**.



Ryc.5. Modyfikacje struktury związku **15** (*(E)*-1-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-3-fenyloprop-2-en-1onu)

Linia komórek prawidłowych pozostawała niewrażliwa na podanie skojarzone **1a+DOX** lub **1b+DOX**. Związek **1a** prowadził w podaniu wspólnym z **DOX** do znaczącego zahamowania migracji komórek linii A549, co korelowało z obniżonym poziomem metaloproteiny 9 oraz 2. Dodatkowo udowodniono działanie przeciwzapalne obu badanych związków w modelu komórek makrofagów indukowanych LPS, a także aktywność kardioprotekcyjną w modelu komórek kardiomioblastów linii H9c2 uszkodzonych **DOX**. Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za ochronę komórek kardiomioblastów przed uszkodzeniem spowodowanym **DOX** była ochrona antyoksydacyjna oraz zachowanie poziomu glutationu w komórce. Dodatkowo przeprowadzone eksperymenty udowodniły, że związek **1a** w skojarzeniu z **DOX** hamuje proces autofagii w komórkach, co ciekawe ani sama **DOX** ani sam związek **1a** nie posiadają takiej aktywności. Badanie procesu autofagii odbywało się zarówno poprzez obserwację kompartmentu lizosomalnego komórek, pomiar intensywności fluorescencji pochodzących z formowanych autofagosomów jak również poprzez badanie poziomu białek związanych z procesem autofagii (Atg7, Atg3, Atg5, Atg12, beklina).

W ostatnim etapie badań oceniono oddziaływanie związków **1a** oraz **1b** z centrum aktywnym enzymu CBR1. Silniejszą aktywność inhibicyjną posiadał związek **1a** dla którego odnotowano silniejszą aktywność chemiowrażliwiającą. Tym samym potwierdzono, że działanie chemiowrażliwiające może być związane z hamowaniem enzymu CBR1, jednak aktywność kardioprotekcyjna niekoniecznie. Jej mechanizm musi zostać poddany szczegółowym analizom molekularnym w celu ustalenia dokładnych

zależności. Jednak wstępnie można wnioskować, że zdolność antyoksydacyjna związków może mieć istotne znaczenie.

4.1.5 Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Podsumowując, w ramach osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego w przeprowadzonych badaniach:

- I. **Potwierdzono aktywność chemiouwrażliwiającą frakcji saponin triterpenowych izolowanych z rośliny *Lysimachia ciliata* L.** o rzadkiej strukturze chemicznej wywodzącej się z oleananu typu 13 β ,28 epoksy z rozgałęzionym łańcuchem cukrowym zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy, ksylozy i arabinozy.

Badana frakcja w podaniu skojarzonym z mitoksantronem w stężeniach nietoksycznych:

- synergistycznie wpływała na zmniejszenie żywotności, proliferacji oraz potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych,
- wykazywała synergistyczne działanie proapoptotyczne,
- działa selektywnie, nie wpływając synergistycznie na prawidłowe komórki.

- II. **Opracowano i zoptymalizowano proces otrzymywania i oczyszczania diantyny.**

- III. **Udowodniono po raz pierwszy możliwość wykorzystania saponin triterpenowych o strukturze 13 β ,28 epoksy- oleananu izolowanych z *Lysimachia ciliata* w terapii z wykorzystaniem toksyny DE.**

Potwierdzono bezpieczeństwo stosowania badanej frakcji saponin triterpenowych w modelu *in vitro* i dowiedziono, że frakcja saponin zastosowana w stężeniach nietoksycznych:

- zwiększała ponad 2200 krotnie cytotoksyczność diantyny w modelu komórek wykazujących nadekspresję EGFR, przy znikomym efekcie na komórki kontrolne (bez EGF) – co w perspektywie umożliwia zmniejszenie dawki toksyny i zniwelowanie efektów ubocznych terapii z zastosowaniem toksyn targetowych,
- wywoływała apoptozę w komórkach docelowych w stężeniach diantyny, które są całkowicie bezpieczne,

- posiadała zadowalający poziom bezpieczeństwa: nie wywoływała działania cytotoksycznego, a także nie wykazywała potencjału mutagennego.

Uzyskane wyniki dowiodły unikalnych, chemiourważliwiających i adjuntowych właściwości badanych saponin triterpenowych, co otwiera zupełnie nową perspektywę dla wykorzystania tych związków w potencjalnej terapii.

IV. **Udowodniono możliwość zastosowania pochodnych kwasu cynamonowego jako związków o działaniu chemiourważliwiającym, poprawiającym bezpieczeństwo terapii antracyklinami, w szczególności:**

- zoptymalizowano struktury pochodnych kwasu cynamonowego pod kątem oddziaływań z centrum aktywnym CBR1- opisano zależność struktura związku-aktywność inhibicyjna,
- opracowano i zoptymalizowano technikę pozyskiwania białka rekombinowanego CBR1 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym,
- wyselekcjonowano najbardziej obiecującą strukturę pod kątem dualnej aktywności chemiourważliwiającej i kardioprotekcyjnej,
- zoptymalizowano model zapewniający skrining związków pod kątem aktywności kardioprotekcyjnej w modelu kardiomiocytów indukowanych z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych,
- wytypowano strukturę wiodącą (**15**), której przyszłościowe modyfikacje mogą poprawić skuteczność i bezpieczeństwo terapii **DOX**.

Uzyskane wyniki rzucają nowe światło na grupę syntetycznych pochodnych kwasu cynamonowego, które posiadają dualną aktywność, dają nadzieję w leczeniu chorób nowotworowych. Z jednej strony uwrażliwiają komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyku, a z drugiej wykazują działanie ochronne względem kardiomiocytów. Taka selektywność w działaniu badanych związków otwiera przed nimi możliwość poprawy skuteczności i ograniczenia skutków ubocznych leczenia doksorubicyną.

4.2 Inne osiągnięcia naukowe

4.2.1 *Badanie właściwości przeciwnowotworowych saponin triterpenowych*

Drugim moim najważniejszym osiągnięciem naukowym jest **udowodnienie po raz pierwszy wielokierunkowej aktywności biologicznej saponin triterpenowych**

izolowanych z różnych gatunków rodzaju *Lysimachia* L. (tojeść). wobec linii komórek nowotworowych. Badania realizowałam w ramach interdyscyplinarnego projektu doktorskiego w dwóch jednostkach naukowych w **Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ oraz w Katedrze Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.**

Na wstępnym etapie badań, aktywność analizowanych saponin była oceniana w szerokim panelu linii komórkowych pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego. Wyniki przeprowadzonych analiz cytotoksyczności opublikowano w pracach:

- Podolak I, **Koczurkiewicz P**, Michalik M, Galanty A, Zajdel P, Janeczko Z. *A new cytotoxic triterpene saponin from Lysimachia nummularia L.* Carbohydrate Research. 2013, 375:16-20. (IF:1.97; MNISW:25)
- Podolak I, **Koczurkiewicz P**, Galanty A, Michalik M. *Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six Lysimachia L. species.* Biochemical Systematics and Ecology. 2013, 47:116-120. (IF:1.17; MNISW:15)
- Podolak I, Żmudzki P, **Koczurkiewicz P**, Michalik M, Zajdel P, Galanty A. *Minor Triterpene Saponins from Underground Parts of Lysimachia thyrsoflora: Structure elucidation, LC-ESI-MS/MS Quantification, and Biological Activity.* Natural Product Communications. 2013, 8(12):1691-1696. (IF:0.92; MNISW:20)

W dalszej kolejności, najbardziej obiecujące związki zostały poddane szczegółowym analizom mechanizmu działania. Moje badania wykazały, że związki **CIL1** oraz **CIL2** izolowane z rośliny *Lysimachia ciliata* wykazują aktywność cytotoksyczną oraz cytostatyczną względem komórek nowotworu prostaty linii DU-145 oraz PC-3, różniących się stopniem metastazy. Saponiny uruchamiają ścieżki sygnałowe związane z apoptotyczną śmiercią komórkową (translokacja cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy, wzrost poziomu kaspaz, zwiększenie ilości komórek wyznakowanych aneksyną V), wywołują efekt cytostatyczny (hamują proliferację komórek nowotworowych oraz zmieniają dystrybucję faz cyklu komórkowego), a także wpływają na procesy związane z inwazją komórek nowotworowych.

W swoich badaniach wykazałam po raz pierwszy, że w aktywność antyinwazyjną saponin triterpenowych zaangażowane są nie tylko podstawowe ścieżki sygnałowe typowe dla aktywności ruchowej komórek, ale niezwykle ważny jest wpływ tych związków na właściwości nanomechaniczne komórek. Nawiązanie współpracy z grupą badawczą pani prof. Kvetoslavy Burdy z Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie umożliwiło zastosowanie w badaniach biologicznych metodyki

mikroskopii sił atomowych (AFM) dzięki, której możliwe były analizy zmian nanomechanicznych komórek nowotworowych i wyznaczenie parametrów opisujących to zjawisko, co rzuca nowe światło na aktywność tych struktur, wyniki analiz zawarto w pracy:

- **Koczurkiewicz P**, Podolak I, Skrzeczyńska-Moncznik J, Sarna M, Wójcik-Pszczola K, Ryszawy D, Galanty A, Lasota S, Madeja Z, Czyż J, Michalik M. Triterpene saponosides from *Lysimachia ciliata* differentially attenuate invasive potential of prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2013, 206(1):6-17. (IF:2.98; MNISW:30).

Dodatkowo w ramach wytyczania nowych kierunków badawczych nad saponinami triterpenowymi napisałam pracę przeglądową, która podsumowuje i systematyzuje wiadomości na temat ich aktywności przeciwnowotworowej, praca była 36 razy cytowana, co świadczy o aktualności badanego tematu:

- **Koczurkiewicz P** (*), Czyż J, Podolak I, Wójcik K, Galanty A, Janeczko Z, Michalik M. *Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells - mini-review of in vitro studies*. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):383-93.

W swoich badaniach udowodniłam, że działanie saponin triterpenowych jest zdecydowanie silniejsze względem komórek nowotworowych, komórki prawidłowe prostaty (linia PNT2) pozostają niewrażliwe na działanie badanych związków. Selektywność działania saponin triterpenowych, szczególnie zwróciła moją uwagę. W ramach badań wstępnych, dowiodłam, że jedna z analizowanych saponin triterpenowych izolowana z gatunku *Lysimachia clethroides* (**Lclet4**) uwrażliwia komórki nowotworu prostaty na działanie chemioterapeutyku, mitoksantronu (**MTX**). Zaobserwowano, że w stężeniach nietoksycznych, w których związki podane osobno nie działają, połączenie **Lclet4+MTX** indukuje silne synergistyczne działanie cytostatyczne, proapoptotyczne (wzrost poziomu kaspaz: 3 oraz 7) oraz przeciwinwazyjne (hamowanie migracji komórek nowotworowych z towarzyszącą dezintegracją cytoszkieletu, obniżenie poziomu metaloproteinaz -2 oraz-9). Wyniki tych badań opublikowano w pracy:

- **Koczurkiewicz P**, Podolak I, Wójcik-Pszczola K, Galanty A, Madeja Z, Michalik M, Czyż J. Lclet 4 enhances pro-apoptotic and anti-invasive effects of mitoxantrone on human prostate cancer cells - *in vitro* study. *Acta Biochimica Polonica*. 2013, 60(3):331-338. (IF:1.39; MNISW:15).

Te obserwacje, stanowiły podstawę dalszych analiz, nad wykorzystaniem saponin triterpenowych w terapiach skojarzonych, będących przedmiotem prac zawartych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne.

Moje badania dotyczące aktywności przeciwnowotworowej saponin triterpenowych zostały wielokrotnie nagradzane na licznych konferencjach naukowych, a także przez kapitułę przyznającą prestiżowe stypendium dla doktorantów realizujących innowacyjne projekty „Doctus - małopolski fundusz stypendialny”, ponadto zostałam laureatką Stypendium Prezydenta Miasta Krakowa dla najzdolniejszych doktorantów krakowskich uczelni wyższych.

4.2.2 Badanie wykorzystania warstw polimerowych do zastosowań biomedycznych

Kolejnym moim osiągnięciem są badania, które prowadziłam we współpracy z Zespołem Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów, Wydziału Chemii UJ. Badałam możliwość **wykorzystania substancji polimerowych jako podłoży dla zastosowań biomedycznych** w modelu komórek fibroblastów skóry ludzkiej (HSF). Chlorowodorek poli(alliloaminy) (PAH) jest kationowym, syntetycznym polimerem. Jego wykorzystanie biomedyczne jest ograniczone ze względu na obecność amin pierwszorzędowych wzdłuż szkieletu polimeru co sprawia, że PAH może wykazywać cytotoksyczność. Jednym z celów projektu była modyfikacja PAH, w którym zastąpiono grupy pierwszorzędowe-czwartorzędowymi. W badaniach sprawdzałam, czy modyfikacje polimeru wyjściowego wpływają na ograniczenie toksyczności oraz poprawiają aktywność migracyjną komórek fibroblastów. **Udowodniłam, że wszystkie modyfikacje chemiczne przedstawione w pracy wpływają korzystnie na poprawę bezpieczeństwa materiału względem komórek prawidłowych oraz usprawniają ich funkcje motoryczne**, co jest niewątpliwie korzystne z punktu widzenia wykorzystania aplikacyjnego uzyskanych wyników.

W dalszych etapach współpracy badałam wpływ powierzchni zmodyfikowanych polielektrolitów (*polyelectrolyte multilayers*, ang. PEMs) na bazie wcześniej badanego, PAH na żywotność, proliferację, morfologię i migrację komórek fibroblastów do modelowej rany w monowarstwie. Wielowarstwowe polielektrolity są materiałami, które znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach nauki (nanotechnologia, medycyna). W związku z tym, że zmieniają właściwości adhezyjne komórek szczególnie ważne może być ich wykorzystanie w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. W badaniach analizowałam dwa typy powierzchni multiwarstw, różniące się hydrofobowością oraz grubością. Udowodniłam, że kluczowymi warunkami z punktu widzenia poprawy adhezji

i migracji komórek fibroblastów były zarówno wybrana grubość materiału (ilość warstw) oraz właściwości chemiczne ostatniej warstwy użytej do tworzenia wielowarstwy. **Po raz pierwszy pokazałam, że już pojedyncza dwuwarstwa silnych polielektrolitów osadzonych na podłożu jest wystarczająca, aby usprawnić migrację do rany komórek fibroblastów.** Obiecujące wyniki uzyskane dla zmodyfikowanych polimerów podczas badania proliferacji i aktywności migracyjnej fibroblastów skóry można uznać za dobry punkt wyjścia do przyszłych, bardziej szczegółowych badań nad praktycznym zastosowaniem tych polimerów w zastosowaniach klinicznych. W ramach tej współpracy zostały opublikowane dwie prace eksperymentalne:

- Wytrwał M, **Koczurkiewicz P**, Wójcik K, Michalik M, Kozik B, Żylewski M, Nowakowska M, Kepczynski M. Synthesis of strong polycations with improved biological properties. Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 2014, 102 (3):721-731. (IF:3.37; MNISW:35)
- Wytrwał M, **Koczurkiewicz P**, Zrubek K, Niemiec W, Michalik M, Kozik B, Szneler E, Bernasik A, Madeja Z, Nowakowska M, Kepczynski M. Growth and motility of human skin fibroblasts on multilayer strong polyelectrolyte films. Journal of Colloid and Interface Science. 2016, 461:305-316. (IF:4.23; MNISW:30)

Przeprowadzone analizy umożliwiają wyselekcjonowanie najbardziej obiecujących modyfikacji w celu zastosowań biomedycznych. W wymienionych pracach byłam odpowiedzialna za dobór warunków eksperymentalnych doświadczeń biologicznych z zastosowaniem linii komórkowych, przeprowadzenie eksperymentów migracji, a także za interpretację wyników badań i ich opracowanie statystyczne uzyskanych wyników.

4.2.3 Opracowanie modelu do badania aktywności cytoprotekcyjnej in vitro

Potrzeba opracowania modeli badań aktywności cytoprotekcyjnej została sformułowana w trakcie współpracy z prof. dr hab. Pawłem Zajdlem z Katedry Chemii Organicznej UJ CM oraz w trakcie realizacji projektów grantowych, których byłam wykonawcą:

- Synteza, ewaluacja aktywności przeciwdrgawkowej oraz analiza wpływu na ludzkie astrocyty w grupie pochodnych piperazyny i/lub aminoalkanoli w kontekście badania mechanizmów działania aktywnych przeciwdrgawkowo związków. Preludium/2015/17/N/NZ7/00966 (kierownik dr Katarzyna Pańczyk-Straszak)
- Właściwości neuroprotektoryjne ligandów receptora 5-HT₆ w grupie pochodnych 2-arylopirolu - nowy wgląd w strategię leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Preludium (kierownik dr Marcin Drop)

- Funkcjonalnie selektywni odwrotni agoniści receptora 5-HT₆ oraz podwójne inhibitory 5-HT₆/MAO-B - w poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych do leczenia choroby Alzheimera. *Opus/2016/21/B/NZ7/01742* (prof. dr hab. Paweł Zajdel)
- Podwójni antagoniści receptora 5-HT₃ i 5-HT₆ w chorobach neuropsychiatrycznych i neurologicznych. *Opus/2021/43/B/NZ7/02855* (prof. dr hab. Paweł Zajdel)

W moich badaniach koncentrowałam się na zoptymalizowaniu modelu komórkowego do badań gliocytoprotekcji oraz neurocytoprotekcji. W tym celu linie komórkowe (astrocyty mysie, ludzka neuroblastoma, komórki chromochłonne szczurze) zostały poddane uszkodzeniom z wykorzystaniem referencyjnych związków, o uznanym działaniu cytotoksycznym lub neurotoksyn: doksorubicyny, 6-hydroksydopaminy, rotenonu oraz β -amyloidu. W ramach prac badano czy nowe pochodne, o potencjalnej aktywności neurocytoprotekcyjnej są w stanie odwracać uszkodzenia powstałe w komórkach na skutek działania neurotoksyn, testami oceniającymi różne mechanizmy działania. Dużym osiągnięciem w ramach prowadzonych badań było opracowanie modelu astrocytów ludzkich z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, a także eksperymenty prowadzone z pierwotnymi astrocytami ludzkimi. Na przestrzeni lat udało się zoptymalizować kilka układów eksperymentalnych, które umożliwiły otrzymanie powtarzalnych wyników. Wiele z danych otrzymanych w eksperymentach *in vitro* znalazła potwierdzenie w badaniach *in vivo*, co dodatkowo podnosi wagę wprowadzonej metodyki jako uniwersalnego modelu skringowego. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w następujących pracach:

- Canale V, Trybała W, Chaumont-Dubel S, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Satała G, Bento O, Blicharz-Futera K, Bantreil X, Pękala E, Bojarski A, Lamaty F, Marin P, Zajdel Paweł. 1-(Arylsulfonyl-isoindol-2-yl)piperazines as 5-HT₆R Antagonists: Mechanochemical Synthesis, In Vitro Pharmacological Properties and Glioprotective Activity. *Biomolecules*. 2023, (13)1:12. (IF:6.064; MNISW:100)
- Grychowska K, Olejarz-Maciej A, Blicharz-Futera K, Pietruś W, Karcz T, Kurczab R, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Doroz-Płonka A, Latacz G, Keeri A R, Piska K, Satała G, Pęgiel J, Trybała W, Jastrzębska-Więsek M, Bojarski A.J, Lamaty F, Partyka A, Walczak M, Krawczyk M, Malikowska-Racia N, Popik P, Zajdel P. Overcoming undesirable hERG affinity by incorporating fluorine atoms: a case of MAO-B inhibitors derived from 1 H-pyrrolo-[3,2-c]quinolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022,(236):114329. (IF: 7.08; MNISW: 140)
- Vanda D, Canale V, Chaumont-Dubel S, Kurczab R, Satała G, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Krawczyk M, Pietruś W, Blicharz-Futera K, Pękala E, Bojarski A.J, Popik P, Marin P, Soural M, Zajdel P. Imidazopyridine-Based 5-HT₆ Receptor Neutral Antagonists: Impact of *N*¹-Benzyl and *N*¹-

Phenylsulfonyl Fragments on Different Receptor Conformational States. Journal of Medicinal Chemistry. 2021, 64(2):1180-1196. (IF: 8.04; MNISW: 200)

- Canale V, Grychowska K, Kurczab R, Ryng M, Keeri A.R, Satała G, Olejarsz-Maciej A, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Drop M, Blicharz-Futera K, Piska K, Pękala E, Janiszewska P, Krawczyk M, Walczak M, Chaumont-Dubel S, Bojarski A.J, Marin P, Popik P, Zajdel P. A dual-acting 5-HT₆ receptor inverse agonist/MAO-B inhibitor displays glioprotective and pro-cognitive properties. European Journal of Medicinal Chemistry. 2020, 208:112765. (IF:6.51; MNISW:140)
- Pańczyk-Straszak K, Rapacz A, Furgała-Wojas A, Sałat K, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Łucjanek M, Skiba-Kurek I, Karczewska E, Sowa A, Żelaszczyk D, Siwek A, Popiół J, Pękala E, Marona H, Waszkielewicz A. Anticonvulsant and analgesic in neuropathic pain activity in a group of new aminoalkanol derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2020, 30(16);127325. (IF:2.82; MNISW:70)

Dodatkowo, były prezentowane w ramach konferencji międzynarodowych:

- Drop M, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Chaumont-Dubel S, Bantreil X, Bento O, Canale V, Bojarski A, Marin P. *Targeting agonist-activated state of 5-HT₆ receptor by 2-arylpyrrole derivatives: potential application for the treatment of neurodegenerative disorders*. Interdisciplinary Conference on Drug Sciences. 26-28.05. 2022, Warszawa
- Drop M, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Satała G, Pietruś W, Bento O, Chaumont-Dubel S, Bantreil X, Blicharz K, Pękala E, Bojarski A, Marin P, Lamaty F, Zajdel P. *Novel 5-HT₆R neutral antagonists derived from 2-arylpyrrole: contribution of agonist-activated states of the receptor to neurotoxicity*. 4-8.09.2022. The XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Nicea, Francja.

Moim dużym osiągnięciem w ramach prowadzonych badań jest udowodnienie po raz pierwszy aktywności gliocytoprotekcyjnej nowych, neutralnych antagonistów receptora 5-HT₆R w grupie pochodnych 2-arylopirolu.

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

5.1 Instytut Medycyny Diagnostycznej i Laboratoryjnej, Chemii Klinicznej i Patobiochemii, Uniwersytet Charité w Berlinie, Niemcy

W lipcu 2016 roku odbyłam czterotygodniowy staż naukowy w Uniwersytecie Charité w Berlinie (Instytut Medycyny Diagnostycznej i Laboratoryjnej, Chemii Klinicznej i Patobiochemii) pod kierunkiem naukowym prof. Hendrika Fuchsa, który zapoczątkował moją współpracę naukową, kontynuowaną do dzisiaj.

Celem stażu było zapoznanie się z procesem produkcji toksyn celowanych, nabycie umiejętności związanych z procesem ekspresji, oczyszczenia toksyny oraz potwierdzenia jej czystości i aktywności enzymatycznej. Dzięki współpracy prowadzonej w laboratorium prof. Fuchsa nabyłam doświadczenie w produkcji immunotoksyn, toksyn celowanych. W trakcie stażu oprócz poznawania technik z wykorzystaniem toksyn prowadziłam pod okiem Profesora badania przesiewowe licznych frakcji saponin izolowanych z roślin z rodzaju *Lysimachia*, *Chaenopodium* celem wytypowania frakcji aktywnych. ***W trakcie pobytu udało się wytypować jedną frakcję, która posiadała wyróżniające się zdolności do zwiększania efektywności toksyny targetowej.*** Prowadzona współpraca zaowocowała poszerzeniem horyzontu naukowego, a przede wszystkim poznaniem nowych, nieodkrytych wcześniej właściwości adjuwantowych frakcji saponin izolowanej z rośliny z rodzaju *Lysimachia* sp. Owocem tego stażu jest publikacja:

- **Koczurkiewicz-Adamczyk P** (*), Grabowska K, Karnas E, Piska K, Wnuk D, Kłaś K, Galanty A, Wójcik-Pszczółka K, Michalik M, Pękala E, Fuchs H, Podolak I. Saponin fraction CIL1 from *Lysimachia ciliata* L. enhances the effect of a targeted toxin on cancer cells". *Pharmaceutics* (MDPI, IF:6.52, MNSIW:140)

oraz doniesienia zjazdowe. W trakcie stażu brałam udział w zebraniach zespołu, seminariach naukowych na których miałam możliwość poszerzenia horyzontów naukowych w tematyce toksyn celowanych, poznałam korzyści oraz ograniczenia płynące z zastosowania toksyn w onkologii, a także miałam okazję brać udział w spotkaniach firm farmaceutycznych zainteresowanych komercjalizacją rozwiązań z zastosowaniem terapii targetowych. Obecnie współpraca jest kontynuowana, wraz z prof. Hendrikiem Fuchsem przygotowuję wspólny projekt na poszukiwanie nowych związków, poprawiających bezpieczeństwo terapii z zastosowaniem toksyn celowanych sprzężonych z przeciwciałami monoklonalnymi.

5.2 Laboratorium Fotochemii i Spektroskopii, Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki, Kraków

Dodatkowo w latach 2017-2019 prowadziłam współpracę w Laboratorium Fotochemii i Spektroskopii, Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie w ramach programu POWROTY przyznawanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej pt. „*Synteza i badania fotochemiczne/fotofizyczne inteligentnych*

luminescencyjnych czujników molekularnych do selektywnej detekcji w biochemii i chemii", którego kierownikiem była prof. Joanna Ortyl. W ramach współpracy oceniałam bezpieczeństwo nowo zsyntetyzowanych pochodnych 2-amino-4,6-difenylo-pirydino-3-karbonitrylu (APC) oraz sprawdzałam zdolność związków do penetracji błon biologicznych i gromadzenia się w określonych kompartmentach komórkowych z zastosowaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej. ***W ramach tej współpracy udało się wyselekcjonować związki cechujące się zadowalającym profilem bezpieczeństwa in vitro oraz zdolnościami do penetracji błon biologicznych i wykazujących stabilną fluorescencję w kompartmentcie komórkowym.*** Na tej podstawie wytypowano związki, które w przyszłości mogą być wykorzystane jako biosensory do wizualizacji komórkowych. Dodatkowo, w trakcie prowadzonych eksperymentów zauważono, że intensywność emitowanej przez sensory fluorescencji zależy od obecności jonów: rtęci, bizmutu, antymonu, a także żelaza, co czyni je atrakcyjnymi związkami z punktu widzenia możliwości środowiskowej detekcji tych jonów. W wyniku prowadzonej współpracy została opublikowana praca eksperymentalna:

- Topa-Skwarczyńska M, Szymaszek P, Fiedor P, Chachaj-Brekiesz A, Galek M, Kasprzyk W, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Petko F, Pękala E, Tyszką-Czochara M, Bogdał D, Świergosz T, Popielarz R, Ortyl J. *Pyridine derivatives as candidates for selective and sensitive fluorescent biosensors for lung cancer cell imaging and iron ions detection*. Dyes and Pigments. 2022, (200):110171. (IF: 5.12; MNISW: 100)

W niniejszej pracy byłam odpowiedzialna za prowadzenie hodowli komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549, zweryfikowanie bezpieczeństwa pochodnych A-44A-PC, A-46bisA-PC oraz A-64A-44CN-PC oraz obserwacje mikroskopowe i wykonanie mikrografii komórek inkubowanych w obecności sensorów, a także ocenę stabilności sygnału fluorescencyjnego w układzie *in vitro*.

Prowadzone badania zostały nagrodzone w ramach spotkań: International Women's Invention Exposition w Korei (2021) oraz dwukrotnie w ramach wydarzenia PRO INVENT Salonul International Al Cercetarii Stiintifice, Inovarii Si Inventicii, które odbywało się w Rumunii (2020). W ramach opisanej aktywności realizowanej na Politechnice Krakowskiej miałam możliwość uczestniczenia w seminariach naukowych dotyczących wykorzystania biosensorów w naukach biotechnologicznych i farmaceutycznych oraz konferencjach interdyscyplinarnych czego przykładem może być

udział w spotkaniach INNOCHEM poświęconych innowacyjnym metodom nauczania w naukach technicznych według standardów Bolońskich. Pod moja opieką studenci Politechniki Krakowskiej kierunku Biotechnologia realizowali praktyki studenckie. Dodatkowo w latach 2016-2018 byłam zatrudniona na Politechnice Krakowskiej jako wykładowca, prowadziłam przedmiot Podstawy genetyki dla I roku kierunku Biotechnologia.

5.3 Insignes Labs – start up biotechnologiczny

W czasie 04.2019-02.2021 r. byłam zatrudniona na umowę o dzieło w firmie Insignes Labs, byłam zaangażowana w tworzenie, a na dalszych etapach w realizację projektu Szybka Ścieżka pt. *Opracowanie i zweryfikowanie w warunkach rzeczywistych nowych formacji ochrony roślin gwarantujących ich zwiększoną skuteczność.*

W ramach współpracy opracowywałam w laboratorium Insignes model badania bezpieczeństwa produktu z zakresu prac przedwdrożeniowych. Do moich kompetencji należało dostosowanie powszechnie wykorzystywanych modeli w oparciu o normy OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) oraz analiza 15 formacji, będących potencjalnymi środkami ochrony roślin pod kątem wykluczenia działania genotoksycznego, mutagennego, drażniącego oraz cytotoksycznego.

Dodatkowo, brałam udział w spotkaniach naukowych organizowanych w firmie, byłam doradcą naukowym ds. bezpieczeństwa *in vitro* oraz brałam udział w panelach eksperckich w siedzibie NCBiR w Warszawie jako ekspert kadry B+R.

5.4 Zakład Biologii Molekularnej Instytut Biochemii i Biofizyki, Państwowej Akademii Nauk, Warszawa

W lipcu 2010 roku odbyłam staż naukowy w Zakładzie Biologii Molekularnej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem prof. Barbary Tudek gdzie uczestniczyłam w realizacji projektu związanego z rolą endonukleazy miejsc apurynowych w naprawie etenoadduktów DNA. Dzięki stażowi przybliżyłam metodykę badawczą dotyczącą systemów naprawy DNA w organizmach prokariotycznych, miałam możliwość prowadzenia hodowli bakteryjnych różnych szczepów, izolacji materiału genetycznego oraz jego analizy po uprzednim

narażeniu hodowli na czynniki szkodliwe. Dodatkowo poznałam testy umożliwiające analizę potencjału mutagennego oraz oceniającego siłę tego potencjału. Dzięki stażowi nabyłam nowych umiejętności związanych z pracą z organizmami prokariotycznymi i mogłam wykorzystać część tych umiejętności w warsztacie Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM gdzie jednym z nurtów badawczych jest ocena potencjału mutagennego nowych pochodnych. Wyniki badań z zakresu analiz mutagenności zostały opublikowane w kilku pracach w całym dorobku naukowym, m.in.:

- Gunia-Krzyżak A, Żesławska E, Słoczyńska K, **Koczurkiewicz P**, Nitek W, Żelaszczyk D, Szkaradek N, Waszkielewicz A, Pękala E, Marona H. Anticonvulsant activity, crystal structures, and preliminary safety evaluation of N-trans-cinnamoyl derivatives of selected (un)modified aminoalkanols. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, 107:26-37. (IF: 4.52; MNISW:40),
- Grabowska K, Podolak I, Galanty A, Żmudzki P, **Koczurkiewicz P**, Piska K, Pękala E, Janeczko Z. Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Impatiens parviflora* DC. and their cytotoxic activity. *Industrial Crops and Products*. 2017, 96:71-79. (IF:3.85; MNISW:40)
- **Koczurkiewicz P**, Łojewski M, Piska K, Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Szewczyk A, Hałaszuk P, Pękala E, Muszyńska B. Chemopreventive and anticancer activities of *Bacopa monnieri* extracted from artificial digestive juices. *Natural Product Communications*. 2017,(12)3:337-342.(IF: 0.8; MNISW:20)

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

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne

6.1.1 Staże dydaktyczne

W latach 2016, 2017 oraz 2019 odbyłam staże dydaktyczne w ramach programu ERASMUS+ Mobility Teaching dzięki którym mogłam wzbogacić swoją wiedzę o organizacji zajęć dydaktycznych w innych jednostkach w Europie, przyjrzeć się pracy naukowców na innych Uniwersytetach, a także odbyć zajęcia ze studentami zagranicznymi i przedstawić wyniki swoich badań naukowych w gremium międzynarodowych zespołów badawczych.

Uniwersytet Islandzki, Islandia

W 2016 roku podczas tygodniowego stażu (opiekun: Prof. Elín Soffía Ólafsdóttir), wygłosiłam w Uniwersytecie Islandzkim (Faculty of Pharmaceutical Sciences, School of

Health Sciences, University of Iceland, Reykjavik) cykl wykładów naukowych poświęconych realizowanym przeze mnie zagadnieniom naukowo – badawczym, a także jeden wykład tematyczny. Tematyka wykładów obejmowała: „Investigation of cytotoxic, cytostatic and invasive activity of natural compounds on cancer cells (*in vitro* methods, assays)” (3 godziny), “The use of substances of plant origin in the fight against cancer (taxol, vincristine, etoposide) and their molecular mechanism of action” (3 godziny) oraz “*In vitro* models in drug candidate screening procedure” (2 godziny). Dodatkowo, w ramach stażu uczestniczyłam w spotkaniach dotyczących jakości kształcenia oraz wykorzystania metod aktywizujących w ramach zajęć seminaryjnych, miałam okazję na wymianę doświadczeń dydaktycznych oraz zapoznanie się z systemem edukacji panującym w Islandii.

Uniwersytet w Ljubljanie, Słowenia

W 2017 roku podczas tygodniowego stażu naukowo-dydaktycznego (opiekun: Prof. Janko Kos), wygłosiłam w (Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana) cykl wykładów naukowych poświęconych realizowanym przeze mnie zagadnieniom naukowo - badawczym. Tematyka wykładów obejmowała: „Investigation of cytotoxic, cytostatic and invasive activity of potential drug candidates in oncology- *in vitro* studies” (3 godziny), „Adjuvant therapy with plant derived substances- future perspectives” (3 godziny) oraz „*In vitro* models in drug candidate screening procedure” (2 godziny). Dodatkowo, w ramach stażu brałam udział w seminariach naukowych Regional BioCamp 2017, gdzie miałam możliwość zapoznania się z nowymi trendami w onkologii klinicznej oraz kierunkami badań wdrożeniowych z zakresu onkologii molekularnej.

Uniwersytet Maltański, Malta

W 2019 roku podczas tygodniowego stażu dydaktycznego (opiekun: Prof. Lilian Azzopardi), wygłosiłam w Uniwersytecie Maltańskim (Department of Pharmacy, Msida, Malta) cykl wykładów naukowych poświęconych realizowanym przeze mnie zagadnieniom naukowo-badawczym. Tematyka wykładów obejmowała: „Targeted toxins in cancer therapy” (3 godziny), „Insight into anthracycline metabolism - can we reduce the side effects of chemotherapy?” (3 godziny) oraz „*Organ on a chip- a new perspective in new drugs screening testing*” (2 godziny). Dodatkowo miałam możliwość uczestniczenia w seminariach dla studentów z przedmiotu Pharmacognosy oraz dyskusji programu

nauczania, omawianiu sylabusu oraz metod nauczania stosowanych przez nauczycieli w Uniwersytecie Maltańskim na kierunkach medycznych.

6.1.2 Nagroda

Nagroda prorektora UJ ds. dydaktyki za wyróżniające wyniki ankietowej oceny studentów za zajęcia prowadzone w okresie 2019/2020, Uczelniany System Jakości Kształcenia Uniwersytetu Jagiellońskiego – styczeń 2021

6.1.3 Działania na rzecz środowiska studenckiego

Opiekun Koła Naukowego Cytogenom w latach 2015-2019 oraz 2021-obecnie studenci Koła Naukowego brali udział w seminariach organizowanych przeze mnie mających na celu merytoryczne przygotowanie do pracy w laboratorium. Uczestniczyli pod moją opieką w przygotowywaniu warsztatów dla najmłodszych w kilku edycjach Małopolskiej Nocy Naukowców (lata 2016-2019), współtworzyli warsztaty dla uczestników konferencji:

- Warsztaty podczas 26th International Medical Students Conference odbywające się w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej pod moją opieką pt.: „*The application of in vitro models in drug development research*”.

Studenci Koła Naukowego brali udział pod moją opieką merytoryczną w licznych konferencjach naukowych, prezentując wyniki badań prac eksperymentalnych:

1. Piska K, Koczurkiewicz P, Pękala E. *Synergistic anticancer interaction between anthracyclines and cinnamic acid and its possible mechanism*. International Medical Students Conference, Kraków 2016 - praca uzyskała III nagrodę w sesji farmaceutycznej
2. Kłaś K, Rogowska K, Piska K, Koczurkiewicz P. *New triterpene saponins from *Lysimachia ciliata* increase cytotoxic and cytostatic activity of mitoxantrone in the model of prostate cancer resistant to chemotherapy*. International Medical Students Conference, Kraków 2016
3. Piska K, Galanty A, Koczurkiewicz P, Pękala E. *Novel derivatives of (+)-usnic acid yielded from *Cunninghamella* sp. Biotransformation*. VIII Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin 2016
4. Koczurkiewicz P, Kłaś K, Bhargava Ch, Wnuk D, Kamycka E, Grabowska K, Wójcik-Pszczółka K, Pękala E, Michalik M, Podolak I, Fuchs H. *Wpływ saponiny triterpenowej CIL-1 na skuteczność rekombinowanej immunotoksyny DE-EGFR względem komórek nowotworowych*. II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa Farmacja w przemyśle, Poznań 2017 – praca uzyskała I miejsce w Studenckim Konkursie Prac Naukowych

5. Zdebski M, Furgał D, Dubicka M, Kłaś K. *Evaluation of ability of cell membranes penetration by new fluorophores and their toxicity – in vitro study*. 26th International Medical Students' Conference Kraków 2018
6. Górna A, Kłaś K, Guzy P, Zdebski M. *Elaboration of neuroprotective cellular model using neuroblastoma and astrocyte - in vitro study*. 26th International Medical Students' Conference. Kraków 2018 – praca uzyskała wyróżnienie
7. Kłaś K, Bialik J, Piska K, Koczurkiewicz P. *Taxanes as activators of amrubicin conversion to its active metabolite in cancer*. 4th International Conference of Cell Biology, Kraków 2018
8. Górna A, Kłaś K, Vittorio C, Zajdel P, Pękala E, Koczurkiewicz P. *Astrocytes and neuroblastoma cellular models in neuroprotective drugs screening procedure*. 15th Warsaw International Medical Congress for Youth Scientist. Warszawa 2019
9. Łapa A, Sikorski J, Ziajka A, Nosavich U. *Protective properties of cinnamic acid derivative on DOX-injured cardiomyocytes model*. 31th International Medical Students' Conference, Kraków 2023 – praca uzyskała III miejsce w sesji nauki podstawowe i farmaceutyczne

Studenci uzyskali dofinansowanie i realizowali pod moją opieką granty w ramach swoich badań w kilku edycjach Grantów Studenckich przyznawanych przez Studenckie Towarzystwo Naukowe UJ CM:

- | | |
|-----------|---|
| 2015/2016 | Kamil Piska, „Badania nad wyjaśnieniem mechanizmu synergistycznego działania piperlonguminy i doksorubicyny na komórki nowotworowe prostaty” |
| | Katarzyna Kłaś, „Badanie nowych saponin triterpenowych w modelu nowotworu prostaty opornego na chemioterapię” |
| 2016/2017 | Katarzyna Kłaś, „Wpływ saponiny triterpenowej CIL-1 na skuteczność rekombinowanej immunotoksyny DE-EGFR względem komórek nowotworowych” |
| 2017/2018 | Katarzyna Kłaś, „Paklitaksel jako aktywator allosteryczny enzymu CBR1 katalizującego reakcję powstania aktywnego metabolitu amrubicyny w komórkach nowotworowych” |

6.1.4 Opieka naukowa

Opieka nad studentami innych uczelni:

1. Karolina Dzieciołowska – praktyka od 2.07-30.07.2019 studentka Biotechnologii Przemysłowej i w Ochronie Środowiska Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie

2. Lek. med. Bartosz Gąsiorkiewicz – 2020-2022 r.

Opieka nad studentami zagranicznymi:

1. Birte Nieman – opieka nad studentką odbywającą praktyki w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM w ramach programu Erasmus trwające 06-08.2014 r.
2. Ochirosi Diana – opieka nad studentką odbywającą praktyki w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM w ramach SEP (*Students Exchange Programme*) trwające od 8.07-8.08.2019 r.

Promotor pomocniczy w przewodach doktorskich:

1. Dr Magdalena Wyszowska-Kolatko, 2014-2018, tytuł rozprawy: „*Ocena aktywności biologicznej in vitro wyciągów z wąkroty azjatyckiej*” - nadanie z wyróżnieniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych.
2. mgr Kamil Piska, 2016-2023, tytuł rozprawy: „*Wpływ reduktazy karbonylowej 1 na oporność komórek nowotworowych wobec antracyklin*” - otwarty przewód doktorski.

Promotor prac magisterskich:

- na kierunku Farmacja – 6
- na kierunku Kosmetologia- 3

Recenzent prac magisterskich:

- na kierunku Farmacja -6
- na kierunku Kosmetologia -5

6.1.5 Zajęcia dydaktyczne

Realizowane zajęcia dydaktyczne:

1. Biochemia (kierunek farmacja) - seminaria i ćwiczenia, 2014 – obecnie
2. Biotechnologia w kosmetologii (kierunek kosmetologia) – ćwiczenia, 2014 – obecnie
3. Biochemia ogólna i medyczna (Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego) – wykłady, 2019 – obecnie

4. Biology in Pharmaceutical Sciences (kierunek Drug Discovery and Development) - wykłady i ćwiczenia, 2018 – obecnie
5. Nowoczesne technologie komórkowe w badaniach nad lekiem (fakultet dla kierunku farmacja), 2016-obecnie
6. Biomedycyna i inżynieria tkankowa w kosmetologii (fakultet dla kierunku kosmetologia, 2016)
7. Podstawy genetyki (zajęcia realizowane na Politechnice Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki w latach 2016-2019)

Przygotowanie instrukcji do ćwiczeń oraz protokołów z przedmiotów: Biochemia (2) (kierunek farmacja) oraz Biotechnologii w kosmetologii (2)(kierunek kosmetologia)

Przygotowanie instrukcji do ćwiczeń oraz protokołu (2) dla kierunku DDD w ramach ćwiczeń Biology in Pharmaceutical Science -Basic of Biochemistry

Przygotowanie materiałów audiowizualnych na potrzeby nauki zdalnej w czasie pandemii dla kierunku Farmacja.

6.1.6 Doskonalenie warsztatu dydaktycznego i kompetencji zawodowych w ramach szkoleń

1. Udział w warsztatach dydaktycznych: Ars Docendi pt.: „Różne role nauczyciela i różne metody nauczania”. 12.2011 r.
2. Udział w warsztatach dydaktycznych: Ars Docendi pt.: „Metody aktywizujące.” 12.2011 r.
3. Udział w warsztatach dydaktycznych: Ars Docendi pt.: „Sztuka prezentacji.” 02.2012 r.
4. Udział w warsztatach dydaktycznych: Ars Docendi pt.: „Jak dobrze zaprojektować kurs?” w wymiarze 15 godzin dydaktycznych. 02-04. 2017 r.
5. Udział w kursie: „Statystyka dla medyka” w wymiarze 20 godzin dydaktycznych, projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój Oś Priorytetowa III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju Działanie 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych. 03-04. 2021 r.

6. Udział w wykładzie z elementami warsztatu dla osób zainteresowanych rozwojem kompetencji dydaktycznych prowadzonym przez prof. Barbarę Oakley pt.: *"Teaching & Learning means getting in mental synchrony"*. 05.2023 r.

6.2 Osiągnięcia organizacyjne

6.2.1 Organizacja wydarzeń

W latach 2016-2019 byłam czterokrotnie organizatorem oraz Koordynatorem Małopolskiej Nocy Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM, wraz z dr Katarzyną Wójcik-Pszczolą. W ramach tego przedsięwzięcia do moich obowiązków należało:

- zgłoszenie propozycji warsztatów i pokazów dla Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, prezentowanie planu i jego dyskusje,
- branie udziału w pozyskaniu środków finansowych na organizację wydarzenia,
- współorganizacja bezpieczeństwa (BHP) w trakcie wydarzenia na Wydziale (konsultacje z Inspektorami BHP, ratownikami medycznymi),
- koordynowanie zapisów na wydarzenie,
- koordynowanie wszystkich warsztatów odbywających się na Wydziale (w tym: zapotrzebowanie odczynnikowe, wydatki, faktury).

W roku 2018 brałam udział w organizacji warsztatów pt.: *„The application of in vitro models in drug development”* w ramach konferencji 26th International Medical Students' Conference, Kraków. W trakcie tego przedsięwzięcia do moich obowiązków należało:

- zaprojektowanie warsztatów od strony merytorycznej,
- przeprowadzenie warsztatów dotyczących hodowli komórkowych (pokaz laboratorium, pokaz procedur, pokaz sprzętu laboratoryjnego),
- koordynowanie warsztatów prowadzonych przez studentów.

6.2.2. Organizacja konferencji

W latach 2012, 2013 oraz 2014 byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego Konferencji Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego. Do moich obowiązków należało:

- udział w spotkaniach z Komitetem Naukowym i współtworzenie tematyki wydarzenia,
- koordynowanie spójności nadsyłanych abstraktów,
- koordynowanie sesji tematycznych,
- przygotowywanie certyfikatów uczestnictwa.

W roku 2016 byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego Konferencji Nowoczesna Kosmetologia - od Nauki do Biznesu na Wydziale Farmaceutycznym UJCM. Do moich obowiązków należało:

- udział w poszukiwaniu firm obejmujących patronat wydarzenia,
- udział w przygotowaniu materiałów konferencyjnych,
- koordynowanie zapisów uczestników,
- przygotowywanie certyfikatów uczestnictwa.

6.2.3 Inne osiągnięcia popularyzatorskie

Artykuły o charakterze popularnonaukowym:

1. Kubowicz P, **Koczurkiewicz P**, Wójcik K, Pękala E, Rok M, Ślipek P. *Zastosowanie ciekłego azotu w biotechnologii, farmacji i medycynie*. Świat Przemysłu Farmaceutycznego. 1;22-25, 2014.
2. Kłaś K, Guzy P, Piska K, Wójcik-Pszczółka K, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E. *Zastosowanie modeli in vitro w przedklinicznych badaniach bezpieczeństwa nowych kandydatów na leki*. The application of in vitro models in a preclinical safety evaluation of new drug candidates. Farmacja Polska. 2018, (70)1:45-51. (MNISW:8)
3. Wójcik-Pszczółka K, **Koczurkiewicz P**, Pękala E. *Hodowle komórkowe - wybrane zastosowania w kosmetologii*. Cell cultures - selected applications in cosmetology. Dermatologia Estetyczna. 2017: Vol. 19, nr 1, s. 22-32.

Artykuł popularnonaukowy promujący własną tematykę badawczą:

1. **Koczurkiewicz-Adamczyk P**. „Terapie skojarzone przyszłością medycyny”, opublikowany w portalu internetowym *Rzecz o innowacjach*, 27 sierpnia 2020.

Wydarzenia o charakterze popularyzującym naukę:

1. Udział w prowadzeniu zajęć w ramach warsztatów organizowanych dla licealistów „Lifescience edycja 1” 2011 r. Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.
2. Udział w tworzeniu warsztatów w ramach Dni otwartych UJ (lata 2012, 2013).

3. Udział w tworzeniu oraz prowadzeniu warsztatów dla najmłodszych (6-9 lat) (pt.: „*Kącik małego naukowca*”) w ramach Małopolskiej Nocy Naukowców w Zakładzie Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ-wrzesień 2014 oraz wrzesień 2015
4. Udział w organizacji stoiska naukowego oraz prezentacja (pt.: „*Nieźle Ziółka*”) w ramach Festiwalu Nauki w Krakowie w Zakładzie Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ-maj 2014
5. Przygotowanie wykładu w ramach spotkania z licealistami (Uniwersytet bliżej Was) pt.: „*Skąd się biorą leki?*”. Wydział Farmaceutyczny UJ CM 2018 r
6. Przygotowanie prelekcji pt.: „*Drug screening procedure using in vitro models*” w ramach odwiedzin Wydziału Farmaceutycznego przez studentów Farmacji z Kopenhagi - 2014 r.
7. Tworzenie wydarzenia popularyzującego badania naukowe w ramach relacji w mediach społecznościowych przygotowanej przez Uniwersytet Jagielloński pt.: „*Dzień z mgr Pauliną Koczurkiewicz*” w ramach którego powstał reportaż o pracy w laboratorium hodowli komórkowych- maj 2015 r.
8. Czterokrotna organizacja warsztatów „*Magiczny Świat Małego Biochemika*” w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM w ramach Małopolskiej Nocy Naukowców w latach 2016, 2017, 2018 oraz 2019 r.
9. Udział w debacie naukowej poświęconej niedoborom witamin w diecie w ramach konferencji VegeDay-2018 r.
10. Przygotowanie i wygłoszenie wykładu na zaproszenie w ramach konferencji studenckiej Zimowa Szkoła STN 2018. *Jak dobrze zaplanować eksperyment naukowy?* Kraków 2018 r.

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

7.1 Inne (w tym międzynarodowe) współprace naukowe, nie uwzględnione w autoreferacie:

7.1.1 Współpraca naukowa z dr Pavel Štarha z Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University w Olomouc, Czechy

W ramach współpracy zrealizowane zostały prace dotyczące m.in. oceny aktywności przeciwnowotworowej nowych metalokompleksów zawierających iryd oraz platynę. We wszystkich pracach byłam odpowiedzialna za analizy cytotoksyczności metalokompleksów:

- Masaryk L, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Milde D, Nemec I, Słoczyńska K, Pękala E, Štarha P. Dinuclear half-sandwich Ir(III) complexes containing 4,4'-methylenedianiline-based ligands: synthesis, characterization, cytotoxicity. *Journal of Organometallic Chemistry* 2021, 938:121748.

- Masaryk L, Zoufaly P, Słoczyńska K, Zahradnikova E, Milde D, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Štarha P. New Pt(II) diiodido complexes containing bidentate 1,3,4 -thiadiazole -based ligands: Synthesis, characterization, cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta* 2022, 536:120891.
- Masaryk L, Orvoš J, Słoczyńska K, Herchel R, Moncol J, Milde D, Halaš P, Krikavova R, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E, Fischer R, Nemec I, Štarha P. Anticancer half-sandwich Ir(III) complex and its interaction with various biomolecules and their mixtures - a case study with ascorbic acid. *Inorganic Chemistry Frontiers* 2022, 9:3758-3770.

7.1.2 Współpraca w ramach badania bezpieczeństwa związków aktywnych

Moją kolejną współpracą naukową są badania nad *udowodnieniem bezpieczeństwa i stabilności metabolicznej nowych substancji farmakologicznie aktywnych, potencjalnych leków jak również substancji o zastosowaniach kosmetycznych*, co przyczyniło się do dalszego rozwoju tych struktur.

Toksyczność substancji, mutagenność czy też brak stabilności metabolicznej to podstawowe a zarazem kluczowe parametry, wykluczające potencjalne leki z dalszych badań. Każdą z tych aktywności można ocenić z użyciem modeli *in vitro*. Wykorzystanie modeli komórkowych wpisuje się w zasadę 3R (*replacement, reduction, refinement*), która ma na celu ograniczenie liczby wykorzystywanych zwierząt w początkowych fazach testowania leków, na etapach, gdzie jest to możliwe (np. analizy cytotoksyczności), zastąpienie metod *in vivo* przez ich odpowiedniki *in vitro*, oraz udoskonalenie obecnych modeli *in vitro*. Takie podejście umożliwia również zredukowanie kosztów skryningów związków aktywnych.

Swoje badania prowadzę z zastosowaniem linii komórkowych, stanowiących złoty standard w ocenie bezpieczeństwa. W zakres moich analiz wchodzi: badania aktywności hepatocytotoksycznej, neurotoksycznej oraz kardiocytotoksycznej, które oceniam z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów cytotoksyczności, z autorskimi modyfikacjami. Dodatkowo oceniam stabilność metaboliczną substancji z wykorzystaniem modelu *in vitro* stanowiącego mikrosomy wątrobowe (ludzkie, szczurze oraz mysie). Takie kompleksowe podejście – oceny wstępnego bezpieczeństwa i stabilności metabolicznej nowych pochodnych jest niezwykle ważne, gdyż już na wstępnym etapie badań, daje ważną informację zwrotną o podstawowych parametrach aktywnego związku.

Badania bezpieczeństwa i wstępnej stabilności metabolicznej prowadziłam dla wielu grup związków, których aktywność koncentruje się w obrębie ośrodkowego układu

nerwowego (działanie przeciwlękowe, przeciwdepresyjne, ból neuropatyczny).

W związku z prowadzoną aktywnością naukową powstały m.in. następujące prace:

- Góra M, Czopek A, Rapacz A, Giza A, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E, Obniska J, Kamiński K. Design, Synthesis and Biological Activity of New Amides Derived from 3-Benzhydryl and 3-sec-Butyl-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-acetic Acid. *ChemMedChem*. 2021, 16(10):1619-1630. (IF: 3.54; MNISW: 100)
- Rapacz A, Rybka S, Obniska J, Jodłowska A, Góra M, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E, Siwek A, Filipek B. Analgesic and Antiallodynic Activity of Novel Anticonvulsant Agents Derived From 3-benzhydryl-pyrrolidine-2,5-dione in Mouse Models of Nociceptive and Neuropathic Pain. *European Journal of Pharmacology*. 2020, 869: 172890. (IF:4.43; MNISW:100)
- Czopek A, Partyka A, Bucki A, Pawłowski M, Kołaczkowski M, Siwek A, Głuch-Lutwin M, **Koczurkiewicz P**, Pękala E, Jaromin A, Tyliszczak B, Wesołowska A, Zagórska A. Impact of N-Alkylamino Substituents on Serotonin Receptor (5-HT_{1A}) Affinity and Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibition of Isoindole-1,3-dione Derivatives. *Molecules*. 2020, 25(17):3868. (IF:4.41; MNISW:140)
- Zagórska A, Partyka A, Bucki A, Kołaczkowski M, Jastrzębska-Więsek M, Czopek A, Siwek A, Głuch-Lutwin M, Bednarski M, Bajda M, Jończyk J, Piska K, **Koczurkiewicz P**, Wesołowska A, Pawłowski M. Characteristics of metabolic stability and the cell permeability of 2-pyrimidinyl-piperazinyl-alkyl derivatives of 1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione with antidepressant- and anxiolytic-like activity. *Chemical Biology & Drug Design*. 2019, 93(4):511-521.(IF: 2.55; MNISW:70)

Oprócz badania bezpieczeństwa potencjalnych kandydatów na lek, prowadziłam również prace nad potencjalnymi substancjami promieniochronnymi, w grupie pochodnych aryliidenohydantoiny, ksantonów oraz kwasu cyamonomowego o ustalonym wcześniej, korzystnym profilu spektralnym (ochrona UVA/UVB). Swoje badania prowadziłam w ramach projektu:

- OPUS, *Nowoczesna fotoprotekcja - opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach pochodnych aryliidenohydantoiny i kwasu cyamonomowego*. nr 2016/21/B/NZ7/01756 (kierownik: prof. Elżbieta Pękala)

Istotne w tym zakresie było wykluczenie toksyczności, działania drażniącego czy aktywności estrogenowej związków chemicznych, będących podstawą formułacji produktów kosmetycznych z przeznaczeniem do stosowania zewnętrznego. Co jest niezwykle ważne, ze względu na udowodnioną możliwość kumulacji takich substancji w organach, a także ich wpływie na gospodarkę hormonalną człowieka. Wyniki moich badań zostały opublikowane w następujących pracach:

- Słoczyńska K, Popiół J, Gunia-Krzyżak A, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Żmudzki P, Pękala E. Evaluation of two novel hydantoin derivatives using reconstructed human skin model episkinTM:

perspectives for application as potential sunscreen agents. *Molecules*. 2022, 27(6):1850. (IF: 4.93; MNISW:140)

- Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Słoczyńska K, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Piska K, Wójcik-Pszczółka K, Żelaszczyk D, Krupa A, Żmudzki P, Marona H, Pękala E. The Involvement of Xanthone and (E)-Cinnamoyl Chromophores for the Design and Synthesis of Novel Sunscreening Agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(1):34. (IF: 6.21; MNISW:140)
- Popiół J, Piska K, Słoczyńska K, Bień A, Żelaszczyk D, Gunia-Krzyżak A, **Kocurkiewicz P**, Wójcik-Pszczółka K, Marona H, Pękala E. Microbial biotransformation of some novel hydantoin derivatives: Perspectives for bioremediation of potential sunscreen agents. *Chemosphere*. 2019, 234:108-115. (IF:5.78; MNISW:140)

Badania bezpieczeństwa prowadziłam również w ramach projektu:

- LIDER/26/0094/L-11/19/NCBR/2020: *Innowacyjny produkt kosmetyczny wspomagający terapię przebarwień u ludzi*.

Potencjalne inhibitory procesu melanogenezy zostały przeze mnie poddane wielokierunkowej analizie bezpieczeństwa względem szerokiego panelu komórek prawidłowych pochodzenia ludzkiego, w tym szerokiego panelu komórek skóry. W ramach tego projektu opracowałam i zoptymalizowałam hodowle pierwotnych komórek ludzkich melanocytów oraz dostosowałam warunki metodyczne. Wykonałam szereg oznaczeń opartych o testy cytotoksyczności oraz proliferacji, *na tej podstawie toksyczne związki zostały wykluczone z badań, a bezpieczne - wyselekcjonowane do dalszych analiz*. Wyniki projektu zostały opublikowane w zgłoszeniu patentowym:

- „(E)-N-cynamoiloaminoalkanoole o aktywności hamującej melanogenezę”. Numer zgłoszenia: P.442046. Twórcy: Gunia-Krzyżak A, Popiół J, Słoczyńska K, Żelaszczyk, Wójcik-Pszczółka K, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E, Marona H, Borczuch-Kostańska M. Data zgłoszenia 19.08.2022 r.

a także częściowo zostały opublikowane w formie doniesień konferencyjnych:

- Gunia-Krzyżak A, Popiół J, Borczuch-Kostańska M, Wójcik-Pszczółka K, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Kasza P, Szafrąński P, Żelaszczyk D, Pękala E. *Compound A-111 – a novel small molecule candidate for the topical treatment of hyperpigmentation*. ESTIV Congress, Sitges, 21-25 listopada 2022.
- Popiół J, Słoczyńska K, **Kocurkiewicz-Adamczyk P**, Żelaszczyk D, Orzeł K, Wójcik-Pszczółka K, Szafrąński P, Kasza P, Pękala E, Gunia-Krzyżak A. *In vitro evaluation of safety profile of a cosmetic ingredient - 4-methoxychalcone*. ESTIV Congress, Sitges, 21-25 listopada 2022.

7.1.3 Współpraca w ramach projektu oceniającego patomechanizmy astmy oskrzelowej oraz poszukiwanie nowych potencjalnych terapeutyków

W ramach tej współpracy byłam wykonawcą grantu:

- 7,8-dipodstawione pochodne teofiliny będące silnymi inhibitorami wybranych izoenzymów PDE, jako nowe związki o potencjale ograniczającym przebudowę drzewa oskrzelowego w astmie - badania w modelach *in vitro* i *in vivo*. Opus/2017/27/B/NZ7/01633 (kierownik dr Katarzyna Wójcik-Pszczółka)

Do moich zadań należało: przygotowanie komórek do eksperymentów, brałam udział w ocenie żywotności komórek, proliferacji oraz aktywności przeciwzapalnej. Dodatkowo brałam udział w analizie popłuczyn płucnych z modelu *in vivo*.

Brałam udział w badaniach naukowych opublikowanych w pracach:

- Wójcik-Pszczółka K, Jakieła B, Plutecka H, **Koczurkiewicz P**, Madeja Z, Michalik M, Sanak M. Connective tissue growth factor regulates transition of primary bronchial fibroblasts to myofibroblasts in asthmatic subjects. *Cytokine*. 2018, 102:187-190. (IF:3.07; MNISW:25)
- Wójcik-Pszczółka K, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Eugenie E, Świerczek A, Pocięcha K, **Koczurkiewicz P**, Piska K, Gawędzka A, Wyska E, Knapik-Czajka M, Pękala E, Gosens R. Novel phosphodiesterases inhibitors from the group of purine-2,6-dione derivatives as potent modulators of airway smooth muscle cell remodelling. *European Journal of Pharmacology*. 2019, 865:172779. (IF:3.26; MNISW:100)
- Wójcik-Pszczółka K, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ślusarczyk M, Ferdek P.E, Kusiak A, Świerczek Artur, Pocięcha Krzysztof, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Wyska E, Pękala E, Gosens R. A Novel, Pan-PDE Inhibitor Exerts Anti-Fibrotic Effects in Human Lung Fibroblasts via Inhibition of TGF- β Signaling and Activation of cAMP/PKA Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020,21(11):4008. (IF:5.92; MNISW:140)
- Wójcik-Pszczółka K, Jankowska A, Ślusarczyk M, Jakieła B, Plutecka H, Pocięcha K, Świerczek A, Popiół J, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Wyska E, Pękala E, Gosens R, Chłoń-Rzepa G. Synthesis and *in vitro* evaluation of anti-inflammatory, antioxidant, and anti-fibrotic effects of new 8-aminopurine-2,6-dione-based phosphodiesterase inhibitors as promising anti-asthmatic agents. *Bioorganic Chemistry*. 2021, 117:105409. (IF:5.3; MNISW:100)
- Wójcik-Pszczółka K, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ferreira B, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Pękala E, Wyska E, Pocięcha K, Gosens R. Pan-phosphodiesterase inhibitors attenuate TGF- β -induced pro-fibrotic phenotype in alveolar epithelial type II cells by downregulating smad-2 phosphorylation. *Pharmaceuticals*. 2022, 15(4):423. (IF: 5.21; MNISW: 100)
- Wójcik-Pszczółka K, Szafarz M, Pocięcha K, Słoczyńska K, Piska K, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Kocot N, Chłoń-Rzepa G, Pękala E, Wyska E. *In silico* and *in vitro* ADME-Tox analysis and *in vivo* pharmacokinetic study of representative pan-PDE inhibitors from the group of 7,8-disubstituted derivatives of 1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2022, (457):116318.(IF: 4.46; MNISW: 140)

7.1.4 Współpraca naukowa z prof. Sławomirem Wybrańcem z Politechniki Krakowskiej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Katedra Technologii Chemicznej i Analityki Środowiskowej

W ramach tej współpracy byłam wykonawcą grantu:

- *Badania aktywności i stabilności barwników gomfreninowych z ekstraktów Basella alba L.* Opus/2017/27/B/NZ9/02831 (Kierownik: prof. Sławomir Wybrańiec).

Do moich zadań badawczych należała analiza aktywności przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej oraz kardioprotekcyjnej barwników gomfreninowych (1-14).

7.1.5 Współpraca z sektorem gospodarczym

W trakcie pracy naukowej nawiązałam współpracę z firmami (Areo BW oraz Insignes Labs) dzięki której byłam zaangażowana w realizację 4 projektów naukowych, z czego jednego jako kierownik (Załącznik 4. III.2, podpunkt A oraz B) W trakcie współpracy byłam zaangażowana w doradztwo naukowe wymienionym firmom, ustalanie kierunków rozwoju i wdrażanie nowych technologii. Uczestniczyłam w licznych spotkaniach, dyskusjach panelowych i brałam udział w pisaniu każdego z wymienionych projektów naukowych.

7.2 Stypendia wyjazdowe na szkolenia i kongresy międzynarodowe

W trakcie mojej pracy naukowej zdobyłam stypendium przyznawane przez FEBS (European Federation of Biochemistry Society) - Youth Travel Fund (YTF) finansujące pobyt i udział w warsztatach praktycznych FEBS Advanced Lecture Course „Analysis and Engineering of Biomolecular Systems”, które odbywały się w Grecji (wyspa Spetses) w dniach 11-17 września 2010 r. W czasie tych warsztatów miałam okazję nabyć umiejętności z zakresu podstaw wykorzystania narzędzi modelowania molekularnego w projektowaniu leków, nauki nowych programów do opracowań statystycznych wyników badań. Oprócz udziału w warsztatach miałam okazję brać udział w seminariach na których uczestnicy prezentowali swoje wyniki badań, a także w panelach dyskusyjnych prowadzonych przez doświadczonych naukowców. Wyjazd ten stanowił cenną lekcję i umożliwił nawiązanie kontaktów, które otwierały nowe możliwości badawcze. W kolejnych latach czterokrotnie udało mi się zdobyć stypendia finansujące

wyjazdy na kongresy organizowane przez FEBS, odpowiednio: 22 IUBMB 37th FEBS Congress Sewilla, Hiszpania (2012), 38 th FEBS Congress, Petersburg, Rosja (2013), 44th FEBS Congress Kraków, Polska (2019) oraz 25th IUBMB 46th FEBS 15th PABMB Congress Lizbona, Portugalia (2022).

7.3 Udział w wybranych szkoleniach i kursach branżowych

1. Seminarium pt. *"Testy komórkowe: metody i narzędzia do badania odpowiedzi komórkowej"* 15.10.2012, Kraków (Promega)
2. Seminarium pt. *"Bioluminescencyjne systemy genów reporterowych - Niezawodne narzędzia do badania regulacji genów i szlaków sygnałowych w komórkach"* 23.04.2013, Kraków (Promega)
3. Seminarium *„Optymalizacja wybranych technik analizy białek”*. 10.06.2013, Kraków (ALAB)
4. Szkolenie pt. *"Naukowiec w biznesie"* - cykl szkoleniowo-warsztatowy dla pracowników sektora B+R" jest współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego Człowiek – najlepsza inwestycja. 01-02.2013, Kraków (INVESTIN)
5. Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie oraz wykonujących procedury na zwierzętach, pracujących ze zwierzętami. 25.09.2015, Kraków (POLSASA)
6. *Kurs dobrej praktyki klinicznej (ICH GCP) dla badaczy i zespołów badawczych*, 19.09.2015, Małopolski Ośrodek Medycyny Translacyjnej Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
7. *„Sztuka prezentacji – aspekty metodyki prezentacji multimedialnej i wystąpień publicznych"* Towarzystwo Doktorantów CM UJ, 26 -27.11. 2016, Kraków
8. Szkolenie: *Skuteczne Zarządzanie Projektem*. Organizowane przez Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący 2012-2017, realizowanego na Wydziale Lekarskim UJ CM.10-11.03.2016, Kraków
9. Seminarium – *„Przebieg analizy RNA metodą RT-Qpcr"*, 14.05.2018 Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o. (Genomic Essentials), Kraków
10. Szkolenie: *"Good Plastics - Bad plastics. Jak materiały eksploatacyjne mogą wpływać na wyniki badań"*, zorganizowanym przez firmę Eppendorf Poland Sp. z o.o. 19.12.2022, Kraków

7.4 Wyróżnienia i nagrody

Wyróżnienia uzyskane przed otrzymaniem stopnia doktora

- wyróżnienie najlepszego wystąpienia ustnego: **Koczurkiewicz P**, Podolak I, Galanty A, Michalik M, Janeczko Z. *Perspektywa wykorzystania saponin triterpenowych w terapii przeciwnowotworowej*. V Seminarium Kopernikańskie. 16-18.06.2011, Toruń.
- wyróżnienie za najlepszą prezentację posterową: **Koczurkiewicz P**, Podolak I, Wojcik K, Czyż J, Michalik M: *Synergistyczny efekt saponiny triterpenowej Lclet 4 stosowanej łącznie z mitoksantronem na ludzkie komórki nowotworu prostaty*. Konferencja Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego UJ CM, 2013, Kraków

Wyróżnienia uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora

- Wyróżnienie przez Radę Wydziału Farmaceutycznego UJ CM rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ wybranych saponin triterpenowych na komórki nowotworu prostaty w badaniach in vitro” – 05.2015.
- Wyróżnienie certyfikatem Wiley publikacji: Gunia-Krzyżak A, Słoczyńska K, Popiół J, Koczurkiewicz P, Marona H, Pękala E. *Cinnamic acid derivatives in cosmetics - current use and future prospects*. Int. J. Cosmet. Sci. 40(4):356-366, 2018 - jako “top downloaded article 2017 – 2018, top 20 most read paper” International Journal of Cosmetic Science.
- Wyróżnienie prezentacji posterowej: Koczurkiewicz P, Piska K, Gunia-Krzyżak A, Andrysiak K, Bucki A, Stępniewski J, Jamrozik M, Kłaś K, Wójcik-Pszczola K, Kołaczkowski M, Dulak J, Pękala E: *Cytoprotective effect of cinnamic acid derivatives on DOX-induced cardiotoxicity, a correlation with the inhibition of carbonyl reductase mediated metabolism*. XI Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 14-16.11.2018, Warszawa.
- Złoty medal za prezentację wyników w ramach wynalazku: J. Ortyl; M. Topa; A. Chachaj-Brekiesz, P. Środa; P. Szymaszek; W. Kasprzyk; T. Świergosz; D. Krok; M. Jankowska; F. Petko; K. Dzieciołowska; M. Zdebski; **P. Koczurkiewicz-Adamczyk**. *An Ultrasensitive Fluorescence Sensors for the Rapid and Selective Detection of Heavy Metal Ions in Drinking*. PRO INVENT Salonul International Al Cercetarii Stiintifice, Inovarii Si Inventicii, 18.11.2020-20.11.2020 Cluj-Napoca, Rumunia
- Złoty medal za prezentację wyników w ramach wynalazku: J. Ortyl; M. Topa; A. Chachaj-Brekiesz, P. Środa; P. Szymaszek; W. Kasprzyk; T. Świergosz; D. Krok; M. Jankowska; F. Petko; K. Dzieciołowska; M. Zdebski; **P. Koczurkiewicz-Adamczyk**. *Fast-Responsive and Highly Sensitive Molecular Fluorescent Markers for Imaging of Structure in Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level*. PRO INVENT Salonul International Al Cercetarii Stiintifice, Inovarii Si Inventicii, 18.11.2020-20.11.2020 Cluj-Napoca, Rumunia
- Srebrny medal za prezentację wyników w ramach wynalazku: Ortyl J, Starzak K, Niezgoda P, Chachaj-Brekiesz A, Szymaszek P, Fiedor P, Kasprzyk W, Świergosz T, **Koczurkiewicz-Adamczyk P**, Galek M. *Fluorescent Sensors for the Detection of Heavy Metal Ions in Aqueous Media fluorescence imaging*. Korea International Women’s Invention Exposition, 10.09.2021, Korea

Nagrody otrzymane przed uzyskaniem stopnia doktora

- ✓ Nagroda Prezydenta Miasta Krakowa dla najzdolniejszych doktorantów realizujących innowacyjne projekty naukowe, Kraków 2011
- ✓ Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe i organizacyjne za 2014 rok

Nagrody otrzymane po uzyskaniu stopnia doktora

- ✓ Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe i organizacyjne za 2016 rok
- ✓ Nagroda Rektora UJ Zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2018/2019
- ✓ Nagroda Rektora UJ Zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2019/2020
- ✓ Nagroda Prorektora ds. dydaktyki - wyróżniający się wynik w ankietowej ocenie zajęć prowadzonych w roku akademickim 2019/2020.
- ✓ Nagroda Rektora UJ Zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2020/2021
- ✓ Nagroda Rektora UJ Zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2021/2022

8. Piśmiennictwo

- [1] Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Sailo BL, Roy NK, Thakur KK, Banik K, Shakibaei M, Gupta .C, Aggarwal BB. *Cancer drug development: the missing links*, Exp. Biol. Med. (Maywood) 244 (2019) 663–689.
- [2] Krol M, Pawłowski K.M, Majchrzak K, Szyszko K, Motyl T. *Why chemotherapy can fail*. Pol. J. Vet. Sci. 13 (2010) 399–406. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20731201>.
- [3] Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. *Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them*. Int J Mol Sci. 2021 Aug 31;22(17):9451. doi: 10.3390/ijms22179451.
- [4] Khatoon E, Banik K, Harsha C, Sailo BL, Thakur KK, Khwairakpam AD, Vikkurthi R, Devi TB, Gupta SC, Kunnumakkara AB. *Phytochemicals in cancer cell chemosensitization: Current knowledge and future perspectives*. Semin Cancer Biol. 2022 May;80:306-339. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.06.014.
- [5] Vinod BS, Maliekal TT, Anto RT. *Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance*, Antioxid. Redox Signal. 18 (2013) 1307–1348, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4573>.

- [6] Stepanic V, Gasparovic AC, Troselj KG, Amic D, Zarkovic N. *Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer*. Curr Top Med Chem. 2015;15(5):496-509. doi: 10.2174/1568026615666150209123100.
- [7] Hu Y, Li R, Jin J, Wang Y, Ma R. *Quercetin improves pancreatic cancer chemo-sensitivity by regulating oxidative-inflammatory networks*. J Food Biochem. 2022 Dec;46(12):e14453. doi: 10.1111/jfbc.14453.
- [8] Bayet-Robert M, Kwiatkowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, Mouret-Reynier M-A, Durando X, Barthomeuf C, Chollet P. *Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer*, Cancer Biol. Ther. 9 (2010) 8–14, <https://doi.org/10.4161/cbt.9.1.10392>.
- [9] Tuyraerts S, Van Nuffel AMT, Naert E, Van Dam PA, Vuylsteke P, De Caluw'e A, Aspeslagh S, Dirix P, Lippens L, De Jaeghere E, Amant F, Vandecasteele., Denys., *PRIMMO study protocol: a phase II study combining PD-1 blockade, radiation and immunomodulation to tackle cervical and uterine cancer*, BMC Cancer 19 (2019) 506, <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5676-3>
- [10] Abbasi BA, Iqbal J, Ahmad R, Bibi S, Mahmood T, Kanwal S, Bashir S, Gul F, Hameed S. *Potential phytochemicals in the prevention and treatment of esophagus cancer: A green therapeutic approach*. Pharmacol Rep. 2019 Aug;71(4):644-652. doi: 10.1016/j.pharep.2019.03.001.
- [11] Zheng Z, Zhang L, Hou X. *Potential roles and molecular mechanisms of phytochemicals against cancer*. Food Funct. 2022 Sep 22;13(18):9208-9225. doi: 10.1039/d2fo01663j.
- [12] de Groot C, Müller-Goymann CC. *Saponin Interactions with Model Membrane Systems - Langmuir Monolayer Studies, Hemolysis and Formation of ISCOMs*. Planta Med. 2016 Dec;82(18):1496-1512. doi: 10.1055/s-0042-118387
- [13] Koczurkiewicz P, Czyż J, Podolak I, Wójcik K, Galanty A, Janeczko Z, Michalik M. *Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells - mini-review of in vitro studies*. Acta Biochim Pol. 2015;62(3):383-93.
- [14] Elekofehinti OO, Iwaloye O, Olawale F, Ariyo EO. *Saponins in Cancer Treatment: Current Progress and Future Prospects*. Pathophysiology. 2021 Jun 5;28(2):250-272. doi: 10.3390/pathophysiology28020017.
- [15] Qu PR, Jiang ZL, Song PP, Liu LC, Xiang M, Wang J. *Saponins and their derivatives: Potential candidates to alleviate anthracycline-induced cardiotoxicity and multidrug resistance*. Pharmacol Res. 2022 Aug;182:106352. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106352.
- [16] Fang CY, Lou DY, Zhou LQ, Wang JC, Yang B, He QJ, Wang JJ, Weng QJ. *Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity*. Acta Pharmacol Sin. 2021 Dec;42(12):1951-1969. doi: 10.1038/s41401-021-00620-9
- [17] Kim, TW, Song IB, Lee HK, Lim JH, Cho ES, Son HY, Yun HI. (2012). *Platycodin D, a triterpenoid saponin from Platycodon grandiflorum, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice*. Food and Chemical Toxicology, 50(12), 4254–4259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.022>
- [18] Zhou B, Xiao X, Xu L, Zhu L, Tan L, Tang H, Yao S. (2012). *A dynamic study on reversal of multidrug resistance by ginsenoside Rh₂ in adriamycin-resistant human breast cancer MCF-7 cells*. Talanta, 88, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.051>
- [19] Tang Q, Cao H, Tong N, Liu Y, Wang W, Zou Y, Xu L, Zeng Z, Xu W, Yin Z, Ma W, Wang Q. *Tubeimoside-I sensitizes temozolomide-resistant glioblastoma cells to chemotherapy by reducing MGMT expression and suppressing EGFR induced PI3K/Akt/mTOR/NF-κB-mediated signaling pathway*. Phytomedicine. 2022 Feb 27;99:154016. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154016.
- [20] Wu Y, Wang D, Lou Y, Liu X, Huang P, Jin M, Huang G. *Regulatory mechanism of α-hederin upon cisplatin sensibility in NSCLC at safe dose by destroying GSS/GSH/GPX2 axis-mediated glutathione oxidation-reduction system*. Biomed Pharmacother. 2022 Jun;150:112927. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112927.
- [21] Syed YY. Recombinant Zoster Vaccine (Shingrix®): A Review in Herpes Zoster. Drugs Aging. 2018 Dec;35(12):1031-1040. doi: 10.1007/s40266-018-0603-x. PMID: 30370455.
- [22] Fuchs H, Bachran D, Panjideh H, Schellmann N, Weng A, Melzig MF, Sutherland M, Bachran C. *Saponins as tool for improved targeted tumor therapies*. Curr Drug Targets. 2009 Feb;10(2):140-51. doi: 10.2174/138945009787354584.
- [23] Dashtiahangar M, Rahbarnia L, Farajnia S, Salmaninejad A, Shabgah AG, Ghasemali S. *Anti-cancer Immunotoxins, Challenges, and Approaches*. Curr Pharm Des. 2021;27(7):932-941. doi: 10.2174/1381612826666201006155346.
- [24] Flavell DJ, Flavel SU. *Plant-Derived Type I Ribosome Inactivating Protein-Based Targeted Toxins: A Review of the Clinical Experience*. Toxins. 14(8):563.

- [25] Fuchs H, Weng A, Gilibert-Oriol R. *Augmenting the Efficacy of Immunotoxins and Other Targeted Protein Toxins by Endosomal Escape Enhancers*. Toxins (Basel). 2016 Jul 1;8(7):200. doi: 10.3390/toxins8070200.
- [26] Hebestreit P, Melzig MF. *Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var. *githago**. Planta Med. 2003, 69, 921–925.
- [27] Weng A, Thakur M, Beceren-Braun F, Bachran D, Bachran C, Riese SB, Jenett-Siems K, Gilibert-Oriol R, Melzig MF, Fuchs H. *The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins*. Mol. Oncol. 2012, 6, 323–332.
- [28] Bhargava C, Dürkop H, Zhao X, Weng A, Melzig MF, Fuchs H. *Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene S01861*. Mol Oncol. 2017 Nov;11(11):1527-1543. doi: 10.1002/1878-0261.12115.
- [29] Li F, Zhao C, Wang L. *Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials*. Int J Cancer. 2014 Mar 15;134(6):1257-69. doi: 10.1002/ijc.28261.
- [30] Chen Y, Shi S, Dai Y. *Research progress of therapeutic drugs for doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Biomed Pharmacother. 2022 Dec;156:113903. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113903.
- [31] Methaneethorn J, Tengcharoen K, Leelakanok N, AlEjjeilat R. *Population pharmacokinetics of doxorubicin: A systematic review*. Asia Pac J Clin Oncol. 2023 Feb;19(1):9-26. doi: 10.1111/ajco.13776.
- [32] Matsunaga T, Kezuka C, Morikawa Y, Suzuki A, Endo S, Iguchi K, Miura T, Nishinaka T, Terada T, El-Kabbani O, Hara A, Ikari A. *Up-Regulation of Carbonyl Reductase 1 Renders Development of doxorubicin Resistance in Human Gastrointestinal Cancers*. Biol Pharm Bull. 2015;38(9):1309-19. doi: 10.1248/bpb.b15-00176.
- [33] Zhong T, Xu F, Xu J, Liu L, Chen Y. *Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss*. Biomed Pharmacother. 2015 Feb;69:317-25. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.022.
- [34] Bains OS, Szeitz A, Lubieniecka JM, Cragg GE, Grigliatti TA, Riggs KW, Reid RE. *A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin*. J Pharmacol Exp Ther. 2013 Nov;347(2):375-87. doi: 10.1124/jpet.113.206805.
- [35] Kuffel MJ, Ames MM. *Comparative resistance of idarubicin, doxorubicin and their C-13 alcohol metabolites in human MDR1 transfected NIH-3T3 cells*. Cancer Chemother Pharmacol. 1995;36(3):223-6. doi: 10.1007/BF00685850.
- [36] Mordente A, Minotti G, Martorana GE, Silvestrini A, Giardina B, Meucci E. *Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications*. Biochem Pharmacol. 2003 Sep 15;66(6):989-98. doi: 10.1016/s0006-2952(03)00442-8.
- [37] Hanna AD, Lam A, Thekkedam C, Willemse H, Dulhunty AF, Beard NA. *The Anthracycline Metabolite doxorubicinol Abolishes RyR2 Sensitivity to Physiological Changes in Luminal Ca²⁺ through an Interaction with Calsequestrin*. Mol Pharmacol. 2017 Nov;92(5):576-587. doi: 10.1124/mol.117.108183.
- [38] Lu G, Liu Q, Gao T, Li J, Zhang J, Chen O, Cao C, Mao M, Xiao M, Zhang X, Wang J, Guo Y, Tang Y, Gu J. *Resveratrol and FGF1 Synergistically Ameliorates doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Activation of SIRT1-NRF2 Pathway*. Nutrients. 2022 Sep 27;14(19):4017. doi: 10.3390/nu14194017.
- [39] Wu YZ, Zhang L, Wu ZX, Shan TT, Xiong C. *Berberine Ameliorates doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via a SIRT1/p66Shc-Mediated Pathway*. Oxid Med Cell Longev. 2019 Dec 6;2019:2150394. doi: 10.1155/2019/2150394. PMID: 31885776; PMCID: PMC6918936.
- [40] Yu W, Qin X, Zhang Y, Qiu P, Wang L, Zha W, Ren J. *Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via a PI3K/Akt/mTOR-dependent manner*. Cardiovasc Diagn Ther. 2020 Aug;10(4):752-769. doi: 10.21037/cdt-19-707.
- [41] Yang L, Li D, Tang P, Zuo Y. *Curcumin increases the sensitivity of K562/dox cells to doxorubicin by targeting S100 calcium-binding protein A8 and P-glycoprotein*. Oncol Lett. 2020 Jan;19(1):83-92. doi: 10.3892/ol.2019.11083.
- [42] Piska K, Koczurkiewicz P, Wnuk D, Karnas E, Bucki A, Wójcik-Pszczółka K, Jamrozik M, Michalik M, Kołaczowski M, Pękala E. *Synergistic anticancer activity of doxorubicin and piperlongumine on DU-145 prostate cancer cells The involvement of carbonyl reductase 1 inhibition*. Chemico-Biological Interactions. 2019, 300:40-48.

- [43] Brozic P, Golob B, Gomboc N, Rizner TL, Gobec S. Cinnamic acids as new inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). Mol Cell Endocrinol. 2006 Mar 27;248(1-2):233-5. doi: 10.1016/j.mce.2005.10.020.

Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk