



**UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum**

Autoreferat

Katarzyna Wójcik-Pszczola

Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biochemii Farmaceutycznej

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. 219 ust. 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 do tematyki osiągnięcia naukowego.....	8
4.1.4. Założenia i cel pracy	14
4.1.5. Omówienie wyników własnych badań	16
4.1.6. Podsumowanie osiągnięcia naukowego.....	30
4.2. Pozostałe osiągnięcia naukowe	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.	38
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	43
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	43
6.2. Osiągnięcia organizacyjne	47
6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę	48
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	49
8. Piśmiennictwo	55

1. Imię i nazwisko.

Katarzyna Wójcik-Pszczola (nazwisko rodowe Wójcik)

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

- 16.04.2015** Uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
Tytuł pracy: *„Czynniki regulujące transformację fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty u chorych na astmę”*.
Promotor pracy: prof. dr hab. Marek Sanak
Promotor pomocniczy pracy: dr hab. Marta Michalik
- 2009 – 2013** Studia doktoranckie
specjalność: biologia medyczna
Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
- 18.06.2009** Uzyskanie tytułu zawodowego magistra biologii, specjalność biologia komórki
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, praca realizowana w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński, Kraków
Tytuł pracy: *„Wpływ transformującego czynnika wzrostowego typu β i chlorku litu na różnicowanie w miofibroblasty ludzkich fibroblastów oskrzelowych izolowanych od pacjentów zdrowych oraz chorych na astmę”*
Promotor pracy: dr Marta Michalik
- 2004 – 2009** Studia magisterskie
Kierunek: biologia
Specjalność: biologia komórki
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

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

2016 – obecnie **Adiunkt**

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

2013 – 2016 Asystent

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

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. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy.

4.1.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Aktywność przeciwzapalna i przeciwzwłóknieniowa nowych inhibitorów fosfodiesteraz z grupy pochodnych puryno-2,6-dionu o potencjalnym zastosowaniu w terapii astmy oskrzelowej

4.1.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy zostało udokumentowane 6 oryginalnymi pracami opublikowanymi w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Dla każdej pracy zostały podane współczynnik wpływu czasopisma (IF) w roku publikacji oraz odpowiadające czasopismu punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN).

Zgodnie z załączoną analizą bibliometryczną (Załącznik 7), sumaryczny współczynnik IF prezentowanego cyklu wynosi 29.883, a łączna punktacja MEiN to 650. We wszystkich pracach stanowiących cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

H1 Wójcik-Pszczola K*, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ellen E, Świerczek A, Pociecha 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*. Eur J Pharmacol. 2019, 865: 172779. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172779.

IF₂₀₁₉ = 3.263, 100 pkt MEiN

- H2. Wójcik-Pszczola K***, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ślusarczyk M, Ferdek PE, Kusiak AA, Świerczek A, Pocięcha K, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Wyska E, Pękała 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*. Int J Mol Sci. 2020, 21(11): 4008. doi: 10.3390/ijms21114008.
IF₂₀₂₀ = 5.924, 140 pkt MEiN
- H3. Wójcik-Pszczola K***, Jankowska A, Ślusarczyk M, Jakięła B, Plutecka H, Pocięcha K, Świerczek A, Popiół J, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Wyska E, Pękała 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*. Bioorg Chem. 2021, 117: 105409. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105409.
IF₂₀₂₁ = 5.307, 100 pkt MEiN
- H4. Wójcik-Pszczola K***, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ferreira B, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Pękała 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 (Basel). 2022, 15(4): 423. doi: 10.3390/ph15040423.
IF₂₀₂₂ = 5.215, 100 pkt MEiN
- H5. Wójcik-Pszczola K***, Szafarz M, Pocięcha K, Słoczyńska K, Piska K, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Kocot N, Chłoń-Rzepa G, Pękała 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*. Toxicol Appl Pharmacol. 2022, 457:116318. doi:10.1016/j.taap.2022.116318.
IF₂₀₂₂ = 4.460, 140 pkt MEiN
- H6. Wójcik-Pszczola K***, Pocięcha K, Chłoń-Rzepa G, Zadrożna M, Nowak B, Plutecka H, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Przejczowska-Pomięny K, Pękała E, Gosens R, Wyska E. *Inhaled pan-phosphodiesterase inhibitors ameliorate ovalbumin-induced airway inflammation and remodeling in murine model of allergic asthma*. Int Immunopharmacol. 2023, 119: 110264. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110264.
IF₂₀₂₃ = 5.714, 70 pkt MEiN

* autor korespondencyjny

Badania opisane w pracach stanowiących cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy (**H1-H6**), zostały wykonane w następujących ośrodkach:

- A. Wszystkie badania biologiczne/biochemiczne zaprezentowane w pracach **H1-H6** (poza wymienionymi w punktach C-J) zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie, w trakcie mojego zatrudnienia w tej Jednostce. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Elżbieta Pękała.
- B. Wszystkie badane związki (prace **H1-H6**) zostały zsyntetyzowane w zespole dr hab. Grażyny Chłoń-Rzepy, prof. UJ, w Zakładzie Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Kierownik Katedry: prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski.
- C. Wartości IC_{50} dla badanych związków (prace **H1-H6**) zostały wyznaczone w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Elżbieta Wyska.
- D. Badania z udziałem komórek ASMC zaprezentowane w pracy **H1** zostały przeze mnie częściowo wykonane w Department of Molecular Pharmacology, Uniwersytetu w Groningen, w ramach stażu naukowo-szkoleniowego (ST5). Kierownik Zakładu: prof. dr. Martina Schmidt.
- E. Badania wykonane metodą Western blot i zaprezentowane w pracy **H1** zostały przeprowadzone w Zakładzie Analityki Biochemicznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Kierownik Zakładu: dr hab. Małgorzata Kanpik-Czajka.
- F. Oznaczenia wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia zaprezentowane w pracy **H2** zostały wykonane w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Zbigniew Madeja.
- G. Oznaczenia wykonane techniką Luminex i zaprezentowane w pracach **H3** i **H6** zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, II Katedry Chorób Wewnętrznych, Wydziału Lekarskiego UJCM w Krakowie. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Marek Sanak.
- H. Badania farmakokinetyczne (praca **H5**) i badania wykonane na zwierzętach w modelu przewlekłej astmy alergicznej (praca **H6**) zostały wykonane w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Elżbieta Wyska. Badania zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie (uchwała nr 426/2020).

- I. Badania histologiczne zaprezentowane w pracy **H6** zostały wykonane w Zakładzie Cytophologii, Katedry Farmakobiologii, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Kierownik Katedry: prof. dr hab. Gabriel Nowak.
- J. Badania funkcjonalnego oddziaływania związków w kanałem TRPA1 (praca **H2**) zostały wykonane komercyjnie w laboratoriach Eurofins Panlabs, Inc. w Stanach Zjednoczonych.
- K. Badania receptorowe (praca **H5**) zostały wykonane komercyjnie w laboratoriach Eurofins Cerep we Francji.
- L. W badaniach zaprezentowanych w pracy **H4** wykorzystano pobrane w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJCM w Krakowie, podczas wcześniejszego projektu, ludzkie komórki nabłonka oskrzeli wyizolowane z wycinków bronchoskopowych pochodzących od pacjentów z astmą. Procedura pobierania komórek została zatwierdzona przez Komisję Bioetyczną UJ (KBET/68/B/2008), uzyskano również świadomą pisemną zgodę od każdego uczestnika.

Badania opisane w pracach **H1-H6**, stanowiących cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy, były finansowane z dwóch kierowanych przeze mnie projektów:

- „Określenie wpływu inhibitora fosfodiesterazy 4, roflumilastu, na indukowane TGF- β i zależne od kinazy białkowej A różnicowanie fibroblastów płucnych w miofibroblasty”, nr K/MNT/000034, projekt finansowany ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu MINIATURA 1, realizowany od 07.12.2017 do 06.12.2018 (PR2)
- „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*”, nr 2017/27/B/NZ7/01633, projekt finansowany ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS 14, realizowany od 27.06.2018 do 26.12.2022 (PR3)

Badania zaprezentowane w pracy **H1** były również częściowo finansowane z projektu pt. „Nowe dualne inhibitory PDE4 i PDE7 w grupie pochodnych puryny i deazapuryny - perspektywa dla terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym”, nr 2014/15/B/NZ7/00885, finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS 8, oraz

przy wsparciu stypendium Short-Term Research Fellowship finansowanego przez European Respiratory Society (projekt pt. „The effect of newly synthesized PDE3/4 inhibitors on airway smooth muscle cells function in asthma”).

Badania zaprezentowane w pracy **H2** były częściowo finansowane ze środków projektu pt. „Wielofunkcyjne ligandy - antagoniści kanału TRPA1 i inhibitory fosfodiesteraz jako nowe podejście w terapii bólu i przewlekłych chorób układu oddechowego”, nr 2018/29/B/NZ7/00285, finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS 15, którego jestem Wykonawcą (PR7).

Aparatura wykorzystana do pozyskania wyników zaprezentowanych w pracy **H3** została doposażona ze środków Priorytetowego Obszaru Badawczego qLife w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w Uniwersytecie Jagiellońskim”.

Oprogramowanie wykorzystane do badań *in silico* zaprezentowanych w pracy **H5** zostało zakupione w ramach projektu pt. „Bioremediacja zanieczyszczeń wody wywołanych lekami i kosmetykami przez grzyby *Cunninghamella* - biotechnologiczna strategia oczyszczania środowiska”, nr 2020/37/B/NZ7/02546, finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS 19, którego jestem Wykonawcą (PR8).

4.1.3. Wprowadzenie do tematyki osiągnięcia naukowego

4.1.3.1. Ogólna charakterystyka i patogenezę astmy oskrzelowej

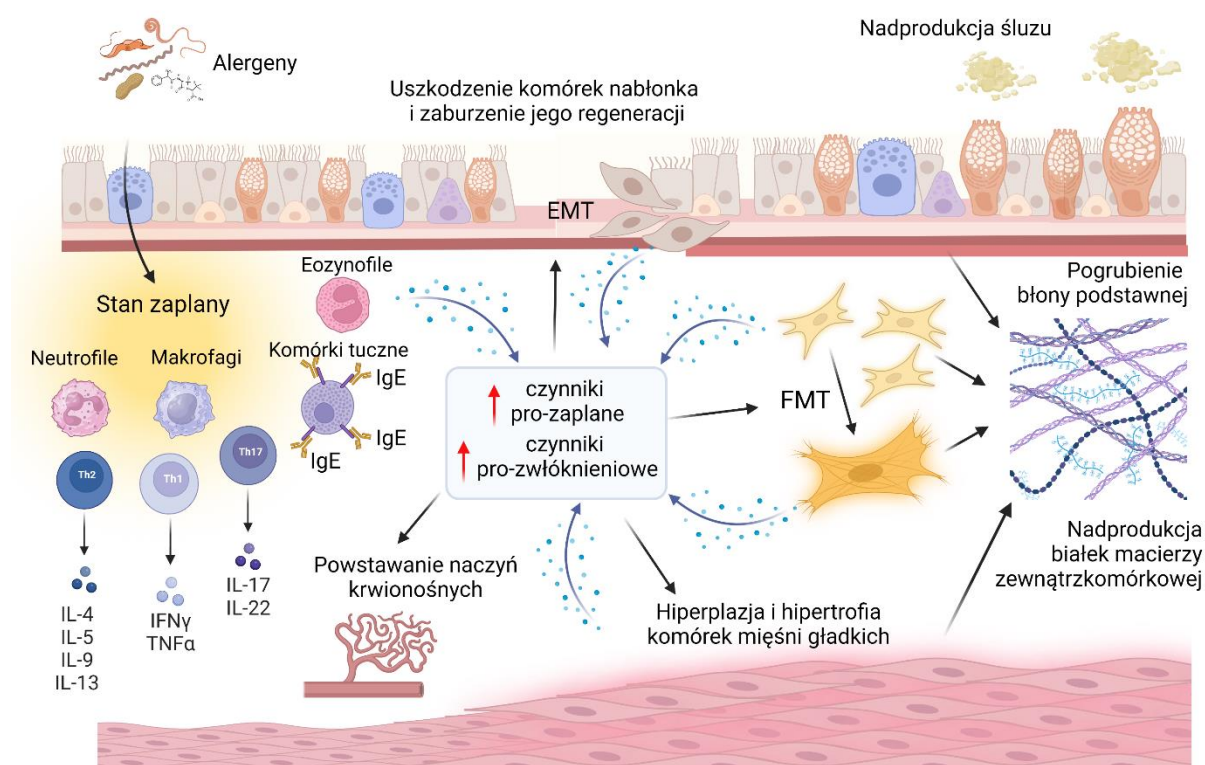
Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych. Główne objawy astmy oskrzelowej to niekontrolowany skurcz oskrzeli, napadowa duszność, świszczący i spłycony oddech, ucisk w klatce piersiowej oraz uporczywy kaszel. W ostatnich latach notuje się coraz więcej przypadków tej choroby, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. W oparciu o najnowszy raport Global Initiative for Asthma (GINA 2023) szacuje się, że na astmę oskrzelową w zależności od kraju choruje od 1-29% populacji, a wśród dzieci jest ona najczęstszą chorobą przewlekłą [1]. Z kolei raport Światowej Organizacji Zdrowia (ang. WHO) wskazuje że w 2019 roku choroba ta dotknęła ponad 260 milionów ludzi i doprowadziła do prawie pół miliona zgonów na świecie [2]. Astma towarzyszy choremu przez całe jego życie, a nieleczona i źle kontrolowana w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. Za główne czynniki ryzyka, sprzyjające wystąpieniu tej choroby uznaje się: występowanie astmy u bliskich krewnych, alergie i nieżyt nosa, zanieczyszczenia środowiska i inne czynniki drażniące, alergenów środowiskowe

i urbanizacja, wcześniactwo, niska masa urodzeniowa i częste infekcje wirusowe układu oddechowego, inne towarzyszące choroby układu oddechowego (np. przewlekła obturacyjna choroba płuc, POChP), dieta i niektóre leki (np. aspiryna), niska aktywność fizyczna, a także nadwaga i otyłość [1].

W patogenezę astmy oskrzelowej zaangażowane są różne komórki układu odpornościowego m.in. mastocyty, eozynofile, limfocyty T, komórki dendrytyczne, makrofagi i neutrofile oraz wydzielane przez nie liczne czynniki nasilające proces zapalny i prowadzące do nadreaktywności dróg oddechowych, a w konsekwencji także do ich przebudowy (*ang. remodeling*) [3–5]. Za nasilenie przebudowy ściany dróg oddechowych odpowiada wiele różnych czynników należących do cytokin i chemokin prozapalnych, mediatorów lipidowych, czynników wzrostu, czynników mechanicznych, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, i in. [5–7]. Jednym z ważniejszych czynników wzrostu odpowiedzialnym za remodeling dróg oddechowych w astmie jest transformujący czynnik wzrostu typu β (TGF- β) [8]. W wyniku zmian spowodowanych przebudową dochodzi do pogrubienia ściany/zwężenia światła dróg oddechowych, a co za tym idzie zmniejszenia ich drożności, utrudnienia przepływu powietrza i zaburzeń oddychania. Przebudowa dróg oddechowych jest procesem wieloetapowym, obejmującym m.in. nieprawidłowości w obrębie nabłonka oddechowego, nadmierną produkcję śluzu, hiperplazję i hipertrofię komórek mięśni gładkich, pogrubienie błony podstawnej, zwłóknienie podnabłonkowe, angiogenezę, czy różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty (*ang. fibroblast to myofibroblast transition*, FMT) (Ryc. 1).

W remodelingu uczestniczą zarówno komórki odpornościowe jak i komórki strukturalne dróg oddechowych [5]. Pod wpływem czynników prozapalnych obecnych w drzewie oskrzelowym w trakcie przebiegu choroby dochodzi do uszkodzenia warstwy komórek nabłonkowych. Aktywowane komórki nabłonkowe wydzielają bardzo duże ilości czynników prozapalnych/prozwłóknieniowych, które oddziałują na inne komórki, a także składników macierzy zewnątrzkomórkowej, przez co bezpośrednio przyczyniają się do zwiększenia się grubości warstwy podnabłonkowej [9,10]. Dodatkowo, obserwuje się zaburzenia w procesie regeneracji oraz utratę integralności komórek nabłonkowych. Inną ważną cechą przebudowy związaną z warstwą nabłonka, jest zanik komórek rzęskowych, zwiększenie udziału komórek kubkowych i nadprodukcja śluzu (Ryc. 1). Prozapalne/prozwłóknieniowe czynniki obecne w drogach oddechowych chorego, a wśród nich głównie TGF- β , oddziałują również na warstwę komórek mięśni gładkich. Uważa się, że hiperplazja, hipertrofia oraz migracja komórek mięśni gładkich jest jedną z głównych

przyczyn pogrubienia się ściany i zmniejszenia drożności dróg oddechowych [6,11,12]. Zwiększenie się grubości warstwy komórek mięśni gładkich prowadzi do skurczu oskrzeli, a ich aktywacja do nadmiernego odkładania składników macierzy zewnątrzkomórkowej i nadprodukcji czynników prozapalnych/proz włóknieniowych. Inny bardzo ważny proces mający bezpośredni wpływ na przebudowę dróg oddechowych, to zachodzące w warstwie podnabłonkowej fenotypowe różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty (Ryc. 1) [7,13]. Miofibroblasty są komórkami wykazującymi zdolność do syntezy zarówno składników macierzy zewnątrzkomórkowej (podobnie jak fibroblasty) jak i izoformy α -aktyny komórek mięśni gładkich (ang. α -smooth muscle actin, α -SMA, podobnie jak miocyty). Komórki te dzięki wysokiej aktywności metabolicznej i właściwościom kurczliwym aktywnie uczestniczą w przebudowie dróg oddechowych [5,7,13,14]. Podsumowanie procesów prowadzących do przebudowy drzewa oskrzelowego zachodzących w komórkach nabłonkowych, w warstwie podnabłonkowej oraz komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Patogeneza astmy oskrzelowej z uwzględnieniem procesu zapalnego i przebudowy dróg oddechowych. Utworzono z wykorzystaniem BioRender.com.

4.1.3.2. Aktualne strategie i wyzwania terapeutyczne w leczeniu astmy oskrzelowej

Zgodnie z wytycznymi GINA, farmakoterapia astmy obejmuje przede wszystkim leki przeciwzapalne i rozkurczowe [1]. W podstawowym leczeniu, w zależności od stanu pacjenta stosuje się glikokortykosteroidy wziewne oraz działające ogólnoustrojowo, krótko i długo działające β_2 adrenomimetyki, leki antyleukotrienowe i przeciwcholinergiczne. W terapii astmy o podłożu alergicznym podaje się również leki antyhistaminowe i wdraża się immunoterapię. Głównym zadaniem leczenia stosowanego w astmie oskrzelowej jest kontrola choroby [1,15,16].

Pomimo dostępności szerokiej gamy leków przeciwzapalnych i rozszerzających oskrzela terapia astmy oskrzelowej ciągle przynosi wyzwania naukowe i badawcze. Powszechnie wiadomo, że długotrwałe leczenie dużymi dawkami doustnych glikokortykosteroidów może powodować różne działania niepożądane, w tym infekcje, powikłania żołądkowo-jelitowe, kostno-mięśniowe, sercowo-naczyniowe, metaboliczne i psychiatryczne [17]. Poważnym wyzwaniem terapeutycznym jest łagodzenie skutków choroby u pacjentów opornych na leczenie za pomocą glikokortykosteroidów wziewnych lub też rozwijających na nie oporność w trakcie procesu leczenia [18,19]. Co więcej większość z dostępnych leków przeciwzapalnych i rozkurczowych prawie w ogóle lub tylko w niewielkim stopniu oddziałuje na zmiany strukturalne zachodzące w ścianie dróg oddechowych i ich remodeling [20–24]. Tymczasem istnieją doniesienia sugerujące, że remodeling może rozwijać się niezależnie od zapalenia, co więcej u niektórych pacjentów obserwowano pojawienie się oznak przebudowy dróg oddechowych na długo przed rozwinięciem przewlekłego zapalenia i astmy oskrzelowej [25–27]. Przebudowa dróg oddechowych stanowi poważny problem szczególnie u pacjentów z ciężką postacią astmy oskrzelowej. Między innymi dlatego leczenie np. ciężkiej astmy typu II jest niezwykle trudne i nie zawsze przynosi oczekiwane rezultaty [28]. Badania ostatnich lat wskazują na możliwość zastosowania u pacjentów z ciężką astmą leków celowanych np. przeciwciał skierowanych przeciwko IL-4, IL-5, IL-13, IgE, w tym depilumabu, mebolizumabu, benzalizumabu, reslizumabu i omalizumabu [29–31]. Istnieją również doniesienia o możliwych benefitach płynących ze stosowania w terapii astmy leków z grupy metyloksantyn, głównie teofiliny [32–35].

Najnowsze podejście do poszukiwania nowych leków przeciwastmatycznych zakłada, że proces zapalny i przebudowę należy traktować jako dwa bardzo ważne procesy zaangażowane w patogenezę choroby, a co za tym idzie poszukiwać związków o podwójnym, przeciwzapalnym i przeciwzwłóknieniowym działaniu [3].

4.1.3.3. Inhibitory fosfodiesteraz i próby ich wykorzystania w terapii astmy oskrzelowej

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie badaczy związane jest poszukiwaniem związków o takim dwukierunkowym mechanizmie działania w grupie inhibitorów fosfodiesteraz. Fosfodiesterazy (*ang. phosphodiesterases*, PDEs) to wewnątrzkomórkowe enzymy odpowiedzialne za hydrolizę wiązań fosfodiestrowych w dwóch wtórnych przekaznikach sygnału – cyklicznym adenozylo-3',5'-monofosforanie (cAMP) i cyklicznym guanozylo-3',5'-monofosforanie (cGMP). Ze względu na specyficzność substratową PDE zostały podzielone na 11 podrodzin, w obrębie których wyróżnić możemy PDE specyficzne dla cAMP (PDE4, PDE7 i PDE8), specyficzne dla cGMP (PDE5, PDE6 i PDE9) oraz specyficzne dla obydwu wtórnych przekazników sygnału (PDE1 , PDE2, PDE3, PDE10 i PDE11) [36]. Wykazanie udziału cAMP/cGMP w regulacji funkcji zarówno komórek zapalnych, jak i strukturalnych płuc i oskrzeli w chorobach układu oddechowego, wywołało wzrost zainteresowania inhibitorami PDE, jako potencjalnymi środkami terapeutycznymi, szczególnie o charakterze przeciwzwłóknieniowym [37,38]. Wiadomo np., że podwyższony poziom cAMP sprzyja relaksacji komórek mięśni gładkich dróg oddechowych, zmniejsza proliferację, migrację oraz zdolność do syntezy białek macierzy pozakomórkowej zarówno przez komórki mięśni gładkich dróg oddechowych (*ang. airway smooth muscle cells*, ASMC) jak i fibroblasty płucne, a także ogranicza fenotypowe różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty [38–40].

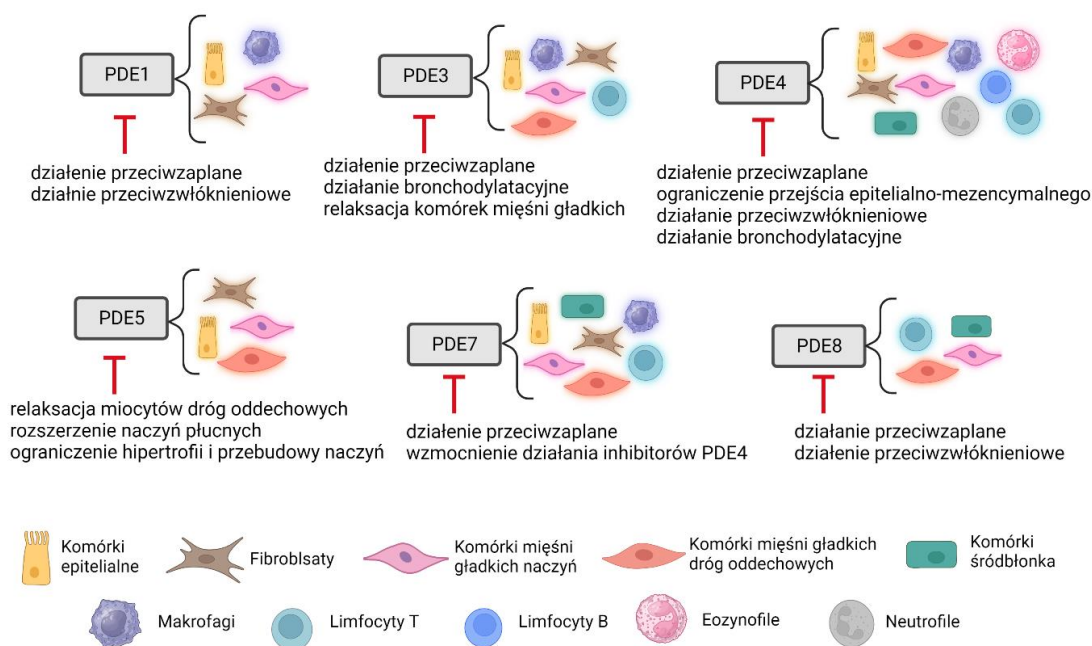
Pierwszym i dotychczas jedynym lekiem z grupy nieselektywnych inhibitorów PDE dopuszczonym do stosowania w leczeniu astmy jest należąca do metyloksantyn występujących naturalnie, teofilina (1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion). Lek ten stosowany jest w terapii ciężkich przypadków astmy, w farmakoterapii astmy u dzieci, jak również w leczeniu innych chorób płuc [33]. Wykazano np., że teofilina może być odpowiedzialna za rozkurcz dróg oddechowych i mięśni gładkich naczyń, a podanie jej doustnie, w formie tabletek o przedłużonym działaniu, jako uzupełnienie do wziewnych glikokortykosteroidów u pacjentów z ciężką astmą, może prowadzić do poprawy stanu chorego [33]. Pomimo możliwych korzyści płynących z zastosowania tego leku, obecnie teofilina nie jest lekiem powszechnie stosowanym w terapii astmy oskrzelowej. Mechanizm jej działania obejmuje nie tylko hamowanie PDE, ale również antagonizowanie receptorów adenozynowych i aktywację deacetylazy histonów [33,41]. Jest nieselektywnym inhibitorem PDE, a dodatkowo jej aktywność inhibicyjna wobec poszczególnych izoform PDE jest stosunkowo niska (Tab. 1).

Tabela 1. Porównanie wartości hamowania IC_{50} wybranych PDE dla teofiliny i selektywnych inhibitorów PDE. Na podstawie danych zawartych w publikacjach H1 i H2.

	PDE - IC_{50} [μ M]									
	1A	1B	3A	3B	4A	4B	4D	5A	7A	8A
Teofilina	na.	>1000	185.96	na.	na.	>1000	>1000	>1000	>1000	na.
Kontrola pozytywna*	27.93	20.66	0.11	0.064	0.18	0.38	7.58	0.32	4.29	8.26

* PDE1 – winpocetyna, PDE3 – milrinon, PDE4 – rolipram, PDE5 – tadalafil, PDE7 – BRL50481, PDE8 – dipirydamol; na – nie aktywny.

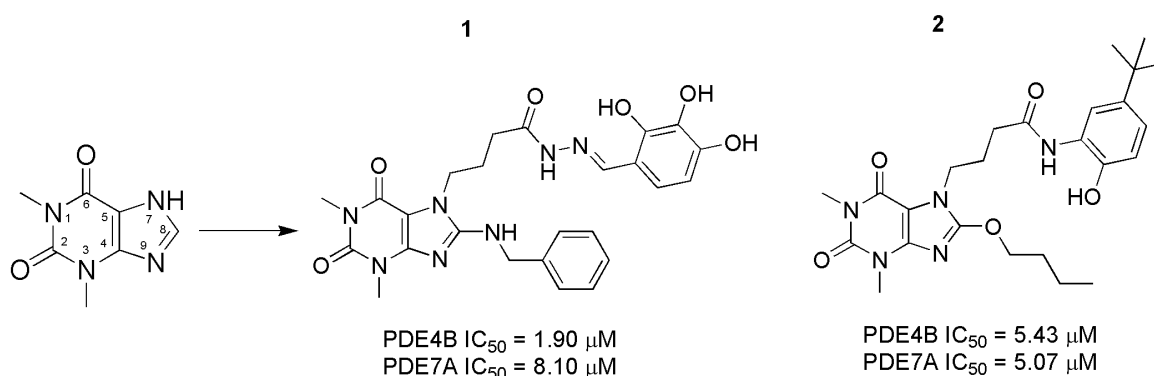
Z uwagi na konieczność aplikowania teofiliny w stosunkowo wysokich stężeniach, jej wąski indeks terapeutyczny i wynikające z tego efekty uboczne, kolejno rozwijano selektywne inhibitory PDE. Badano możliwość hamowania m.in. PDE1, 3, 4 i 7, jako głównych izoform mogących brać udział w patogenezie astmy oskrzelowej [36–38,42]. Zaprojektowano wiele selektywnych inhibitorów o obiecującym profilu działania, a niektóre z nich zostały skierowane do badań klinicznych [42–44]. Niestety obecnie w rutynowym leczeniu astmy nie stosuje się żadnego leku z tej grupy, a nieliczne jak np. inhibitor PDE4 – roflumilast, znalazły zastosowanie jedynie w terapii POChP [45]. Wydaje się że ze względu na możliwy udział różnych izoform w patogenezie astmy oskrzelowej, jak również zróżnicowaną ekspresję izoform w obrębie drzewa oskrzelowego zasadne byłoby zastosowanie związku wykazującego zdolność hamowania kilku izoform PDE jednocześnie (Ryc. 2) i aktywnego na tyle, by możliwa była jego aplikacja w możliwie najniższych stężeniach.



Rycina 2. Ekspresja wybranych izoform PDE w płucach i korzyści płynące z ich hamowania w odniesieniu do astmy oskrzelowej. Utworzono na podstawie [37] z wykorzystaniem BioRender.com.

4.1.4. Założenia i cel pracy

W Katedrze Chemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM od wielu lat prowadzone są poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwzapalnej, przez modyfikację 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu i wprowadzanie w pozycjach 7 i 8 głównego układu różnych podstawników. Badania te pozwoliły na uzyskanie wśród pochodnych z ugrupowaniem hydrazydowym lub amidowym w pozycji 7 układu puryno-2,6-dionu silnych, dualnych inhibitorów PDE4/7, z których dwa (związek **1** i **2**) zaprezentowano na poniższej rycinie (Ryc. 3).



Rycina 3. Budowa chemiczna wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, związków **1** i **2**, oraz ich właściwości jako dualnych inhibitorów PDE4/7.

Badania przesiewowe wykazały, że aktywność związków **1** i **2**, jako inhibitorów PDE4/7, jest o wiele lepsza w porównaniu zarówno z aktywnością nieselektywnego inhibitora PDE – teofiliny, jak i innego nieselektywnego inhibitora – 3-izobutylo-1-metyloksantyny (IBMX) [46,47]. Przeprowadzone w modelach *in vivo* badania farmakologiczne potwierdziły, że związek **1** wykazał właściwości przeciwzapalne, obniżając poziom TNF- α w modelu endotoksemii wywołanej lipopolisacharydem u szczura [46], a związek **2** posiadał silne właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe potwierdzone w zwierzęcych modelach bólu i stanu zapalnego (test formalinowy i obrzęk łapy wywołany karageniną) [47]. Związek **2** wykazywał również istotne właściwości antyallodynamiczne we wczesnej fazie neuropatii obwodowej wywołanej oksaliplatyną u myszy [47].

Równocześnie przeprowadzone we współpracy z Zakładem Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii własne badania wykazały, że zarówno teofilina jak i pochodne teobrominy (pentoksyfilina i lizofilina) mogą hamować jeden z procesów zaangażowanych w przebudowę dróg oddechowych w astmie – FMT,

w komórkach pochodzących od pacjentów z astmą oskrzelową [48]. O ile działanie samej teofiliny było umiarkowane, o tyle pentoksyfilina i jej aktywny metabolit – lizofilina, posiadały silniejszą aktywność, którą można było przypisać ich lepszej aktywności hamowania wybranych izoform PDE [49,50]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Yano i in., również sugerowały, że teofilina może ograniczać ekspresję genów pro-zwłóknieniowych w fibroblastach płuc [51].

Mając na uwadze potrzebę poszukiwania nowych leków przeciwastmatycznych działających zarówno na proces zapalny jak i przebudowę dróg oddechowych (Ryc. 1), zróżnicowaną ekspresję różnych izoform PDE zarówno w samych komórkach biorących udział w patogenezie astmy, jak i w ich wewnątrzkomórkowych przedziałach (Ryc. 2), zaangażowanie różnych izoform w efekty przeciwzapalne i przeciwzwłóknieniowe (Ryc. 2) w ramach prezentowanych badań postanowiono określić wpływ wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, związków wykazujących jednocześnie zdolność do hamowania kilku izoform PDE (inhibitorów pan-PDE), na różne procesy komórkowe, związane z przebudową drzewa oskrzelowego w astmie, a także zweryfikować działanie najaktywniejszych związków w zwierzęcym modelu astmy *in vivo*.

W oparciu o przedstawione powyżej założenia celem przeprowadzonych przeze mnie badań było:

- określenie aktywności przeciwzapalnej i przeciwzwłóknieniowej wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu w różnych modelach komórek budujących drogi oddechowe, w tym w komórkach pochodzących od pacjentów z astmą oskrzelową
- porównanie aktywności przeciwzapalnej i przeciwzwłóknieniowej wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu z aktywnością farmakologiczną selektywnych i nieselektywnych inhibitorów PDE
- podjęcie próby wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu poprzez zidentyfikowanie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych mogących stanowić punkt uchwytu dla inhibitorów pan-PDE

- zbadanie bezpieczeństwa działania oraz wybranych parametrów ADMET w warunkach *in vitro* dla dwóch najaktywniejszych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu
- zweryfikowanie aktywności przeciwzapalnej i przeciwzwłóknieniowej dwóch najaktywniejszych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu w modelu przewlekłej astmy indukowanej alergenem *in vivo*, z uwzględnieniem wziewnej aplikacji badanych inhibitorów pan-PDE, a także porównanie ich aktywności farmakologicznej z deksametazonem, lekiem należącym do grupy glikokortykosteroidów
- określenie oddziaływania dwóch najaktywniejszych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu na wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny TGF- β przez białka Smad w modelu przewlekłej astmy indukowanej alergenem *in vivo*

4.1.5. Omówienie wyników własnych badań

H1. Wójcik-Pszczola K, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ellen E, Świerczek A, Pocięcha K, Koczurkiewicz P, Piska K, Gawędzka A, Wyska E, Knapik-Czajka M, Pękała E, Gosens R. *Novel phosphodiesterases inhibitors from the group of purine-2,6-dione derivatives as potent modulators of airway smooth muscle cell remodelling*. Eur J Pharmacol. 2019, 865: 172779. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172779.

W pracy **H1** omówiono wpływ dwóch wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (**związków 1 i 2**, Ryc. 3) na indukowany TGF- β fenotyp zwłóknieniowy ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych (ASMC). Do badań wybrano pochodne, zawierające w położeniu 7 układu 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu ugrupowanie hydrazydowe (**1**) lub ugrupowanie amidowe (**2**) (Ryc. 3). Obydwa pochodne w przeprowadzonych wcześniej badaniach wykazywały silne właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe [46,47], a ich aktywność połączono m.in. z silnym hamowaniem izoform PDE4B oraz 7A.

W ramach badań wstępnych zaprezentowanych w pracy **H1** potwierdzono, że związki **1 i 2** skutecznie hamują nie tylko PDE4B i 7A, ale również inne izoformy PDE (w tym PDE1B, 2A, 3A, 4D, 5A, 10A), a ich aktywność jest znacznie lepsza w porównaniu do teofiliny oraz modelowego, nieselektywnego inhibitora PDE, związku IBMX. Wartości IC₅₀ uzyskane dla poszczególnych izoform PDE dla związków **1 i 2** były porównywalne

do wartości hamowania IC_{50} selektywnych inhibitorów PDE (w tym winpocetyny, EHNA, milrinonu, rolipramu, zaprinastu, papaweryny, czy BRL-50481). W kolejnym etapie badań zweryfikowano wpływ związków **1** i **2** na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP. Wykazano, że obydwa badane związki istotnie podnoszą poziom tego wtórnego przekaźnika sygnału w komórkach w sposób porównywalny do IBMX oraz znanego aktywatora cAMP – forskoliny. Co ciekawe, traktowanie ASMC za pomocą związków **1** i **2** powodowało silniejszą akumulację cAMP w wnętrzu komórek, w porównaniu zarówno do teofiliny, jak i selektywnych inhibitorów PDE użytych jako związki referencyjne – winpocetyny, milrinonu, roflumilastu, cilomilastu, czy BRL-50481.

Biorąc pod uwagę fakt, że obydwie badane pochodne **1** i **2** reprezentują silne inhibitory pan-PDE oraz znacząco podnoszą wewnątrzkomórkowy poziom cAMP, następnie zweryfikowano ich wpływ na fenotyp zwłóknieniowy ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych. Przeanalizowano wpływ badanych związków na indukowane surowicą lub TGF- β takie cechy ASMC jak: nadmierna proliferacja (hiperplazja), nadmierny rozrost (hipertrofia), zwiększona produkcja składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz migracja.

Analiza tempa podziałów komórek wykazała, że związki **1** i **2** obniżają proliferację ASMC. Takiego działania nie wykazano dla referencyjnych, selektywnych inhibitorów PDE1, 3, 4 i 7, w tym winpocetyny, milrinonu, roflumilastu, cilomilastu, czy BRL-50481. Jednocześnie nieselektywne inhibitory PDE, teofilina i IBMX posiadały nieznaczną aktywność obniżania proliferacji badanych komórek. W celu potwierdzenia silnego działania ograniczającego hiperplazję komórek mięśni gładkich dróg oddechowych przez inhibitory pan-PDE wykonano doświadczenie, w którym zastosowano mieszaninę selektywnych inhibitorów PDE1, 3, 4 i 7 w równych stężeniach oraz stężeniach odpowiadających aktywności badanych związków **1** i **2**. Obydwie mieszaniny selektywnych inhibitorów znacząco obniżyły tempo proliferacji ASMC, potwierdzając tym samym znaczenie hamowania ww. izoform w obserwowanym efekcie związków **1** i **2**.

Dalsze analizy potwierdziły, że obydwa badane inhibitory pan-PDE skutecznie ograniczają nie tylko hiperplazję ASMC, ale także ich nadmierny rozrost (poprzez ograniczanie indukowanego TGF- β poziomu genów profibrotycznych – *ACTA2* oraz *CNN1* oraz głównego markera komórek mięśni gładkich – α -SMA), syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej (poprzez ograniczanie indukowanego TGF- β poziomu genów kolagenu $1\alpha 1$, fibronektyny czy wersykanu jak i samego kolagenu I) oraz zwiększoną w odpowiedzi na TGF- β migrację. Warto podkreślić, że opisane przeciwzwłóknieniowe efekty związków **1** i

2 były znacznie silniejsze, niż te obserwowane dla dwóch znanych inhibitorów PDE4 – roflumilastu i cilomilastu.

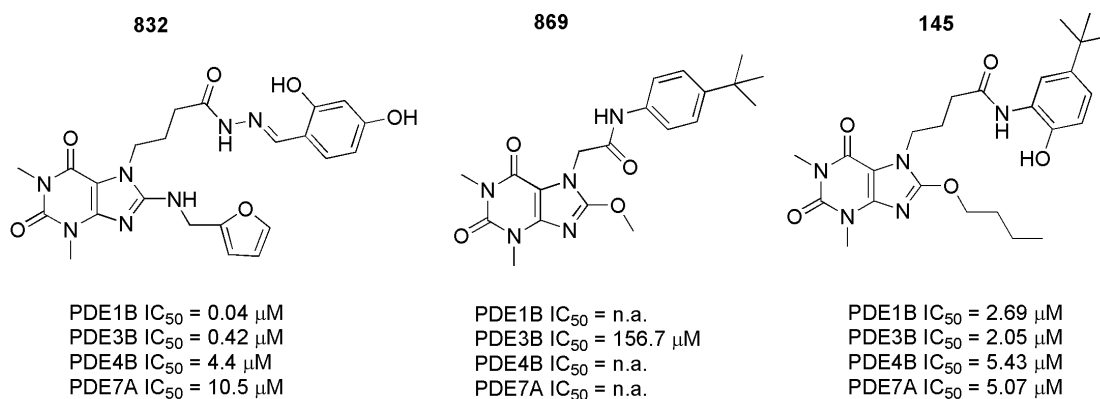
Biorąc pod uwagę obiecującą aktywność przeciwzwłóknieniową związków **1** i **2** w ludzkich komórkach mięśniowych dróg oddechowych w ramach pracy **H1** oceniono również ich stabilność metaboliczną. Badania stabilności metabolicznej wykonane w modelu ludzkich mikrosomów wątrobowych (*ang. human liver microsomes*, HLM) potwierdziły stabilność metaboliczną obydwu inhibitorów pan-PDE. Wiedząc, że mechanizm działania teofiliny obejmuje nie tylko hamowanie izoform PDE, ale również antagonizowanie receptorów adenozynowych, w ramach pracy **H1** przeanalizowano również wpływ antagonistów receptorów adenozynowych - A₁ i A_{2A} na hiperplazję ASMC. Przeprowadzone badania wykluczyły udział blokowania tych receptorów w obniżaniu tempa proliferacji ludzkich komórek mięśniowych dróg oddechowych.

Podsumowując, badane związki **1** i **2** zostały scharakteryzowane jako silne, inhibitory pan-PDE, posiadające obiecujący profil farmakologiczny. Obydwie 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu skutecznie obniżały fenotyp zwłóknieniowy ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych, a ich przeciwzwłóknieniowa aktywność w ASMC była znacznie lepsza niż słabych i nieselektywnych inhibitorów PDE (teofiliny oraz IBMX) jak i znanych, selektywnych inhibitorów PDE, w tym winpocetyny, milrinonu, roflumilastu, cilomilastu, czy BRL-50481.

H2. Wójcik-Pszczola K, Chłoń-Rzepa G, Jankowska A, Ślusarczyk M, Ferdek PE, Kusiak AA, Świerczek A, Pociecha K, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Wyska E, Pękała 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*. Int J Mol Sci. 2020, 21(11): 4008. doi: 10.3390/ijms21114008.

Wiedząc, że przebudowa dróg oddechowych to skomplikowany proces, obejmujący zmiany zachodzące w różnych typach komórek, w pracy **H2** poddano analizie wpływ kolejnych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, na indukowany TGF- β fenotyp zwłóknieniowy ludzkich fibroblastów płucnych linii MRC-5. Do badań wybrano trzy związki – **832**, **869** i **145** (związek **2** z pracy **H1**), przedstawione na rycinie 4.

Badania wstępne przedstawione w pracy **H2** wykazały, że związek **832** i **145** posiadają bardzo dobrą aktywność hamowania wybranych izoform PDE (Ryc. 4). Jednocześnie nie potwierdzono takich właściwości dla związku **869**. Wiedząc, że niektóre 7,8-dipodstawione

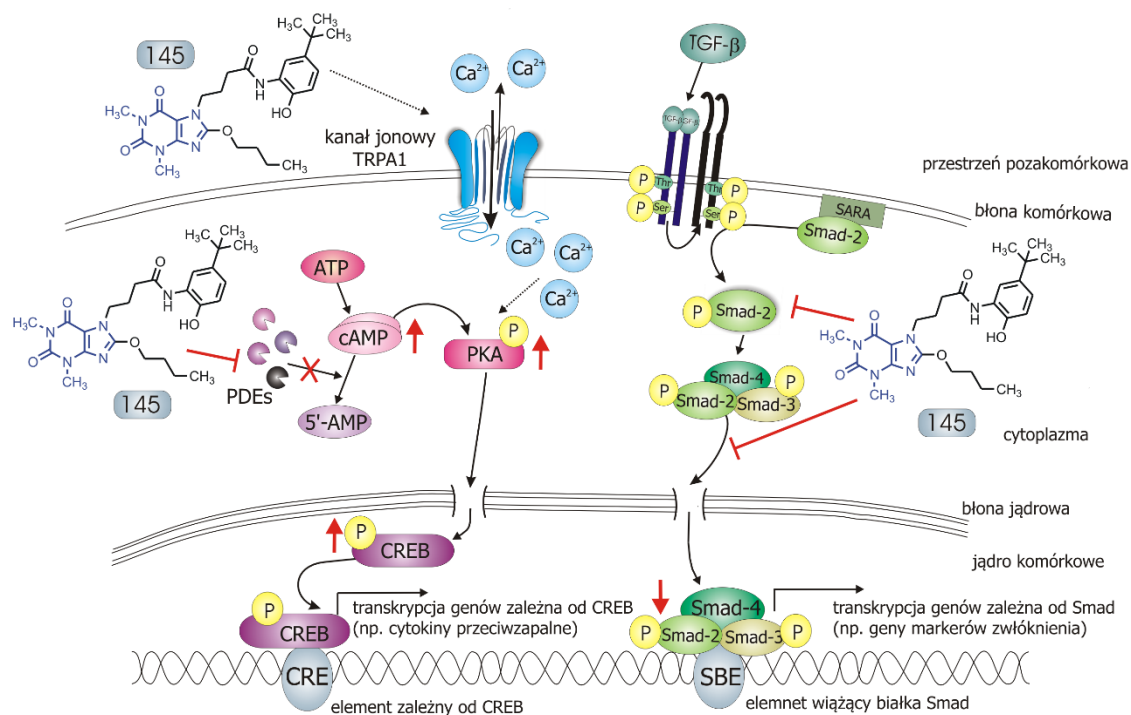


Rycina 4. Budowa chemiczna wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu, związków 832, 869 i 145 oraz ich właściwości jako inhibitorów pan-PDE.

pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu mogą również regulować aktywność kanału TRPA1 [47], przeprowadzono analizę wpływu związków **832**, **869** i **145** na aktywację/blokowanie tego kanału. Wykazano, że spośród badanych pochodnych, jedynie pochodną **869**, można scharakteryzować jako antagonistę kanału TRPA1.

Dalsze badania przeprowadzone w indukowanych TGF-β ludzkich fibroblastach płucnych linii MRC-5 wykazały, że badane związki w zróżnicowany sposób oddziałują na fenotyp zwłóknieniowy tych komórek. Badano wpływ związków **832**, **869** i **145** na wywołane TGF-β zwiększoną proliferację, migrację, właściwości kurczliwe oraz jeden z ważniejszych procesów zachodzących w trakcie przebudowy drzewa oskrzelowego u chorych na astmę, tj. różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty. Spośród wszystkich badanych związków, **145** w największym stopniu hamował indukowaną TGF-β proliferację i migrację komórek MRC-5 oraz ograniczał ich zdolności kurczliwe. Najśłabszą aktywność posiadał związek **869**. Ponadto pochodna **145** w znaczący sposób ograniczała również wywołane TGF-β fenotypowe różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty. Zanotowano obniżenie poziomu transkryptu genów tj. *ACTA2*, *MYH11*, *SM22*, *COL1A1*, *TNC*, *FN1*, czy *VCAN* oraz głównych markerów miofibroblastów, w tym α-SMA i kolagenu I w fibroblastach MRC-5 traktowanych **145** i indukowanych TGF-β. Pozostałe związki również ograniczały fenotyp zwłóknieniowy ludzkich fibroblastów płucnych, jednak ich efekt był nieco słabszy. Ponieważ analizy sygnałów wapniowych w komórkach MRC-5 wskazywały, że związek **145** może w nieznaczny sposób oddziaływać na przepływ jonów Ca²⁺, w kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ aktywacji/blokowania kanału TRPA1 na przeciwzwłóknieniową aktywność **145**. Dowiedziono, że modulacja tego kanału nie prowadzi do wzmocnienia/osłabienia właściwości związku **145**.

Mając na uwadze korzystne właściwości przeciwzwłóknieniowe *in vitro* związku **145**, w ramach badań zaprezentowanych w pracy **H2** podjęto także próbę określenia jego wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania. Wykazano, że związek **145** w indukowanych TGF- β komórkach MRC-5 oddziałuje z kanonicznym szlakiem sygnalizacji TGF- β przez białka Smad, ograniczając zarówno poziom fosforylacji białka Smad-2 jak i translokacji jego fosforylowanej formy do jądra komórkowego. Można przypuszczać, że taka aktywność **145** może prowadzić do zahamowania ekspresji wielu genów zwłóknieniowych (Ryc. 5). Jednocześnie stwierdzono, że w indukowanych TGF- β komórkach MRC-5 związek **145** wzmacnia sygnalizację na osi cAMP/PKA/CREB. Wykazano, że badany inhibitor pan-PDE podnosi wewnątrzkomórkowy poziom cAMP, wzmacnia aktywność kinazy białkowej A, zwiększa poziom fosforylacji czynnika transkrypcyjnego CREB oraz jego translokację do jądra (Ryc. 5) w komórkach aktywowanych TGF- β . Wiadomo, że aktywacja tej kaskady sygnalizacyjnej w wielu przypadkach prowadzi do uruchomienia transkrypcji genów zależnych od CREB, do których należą np. cytokiny przeciwzapalne [52,53].



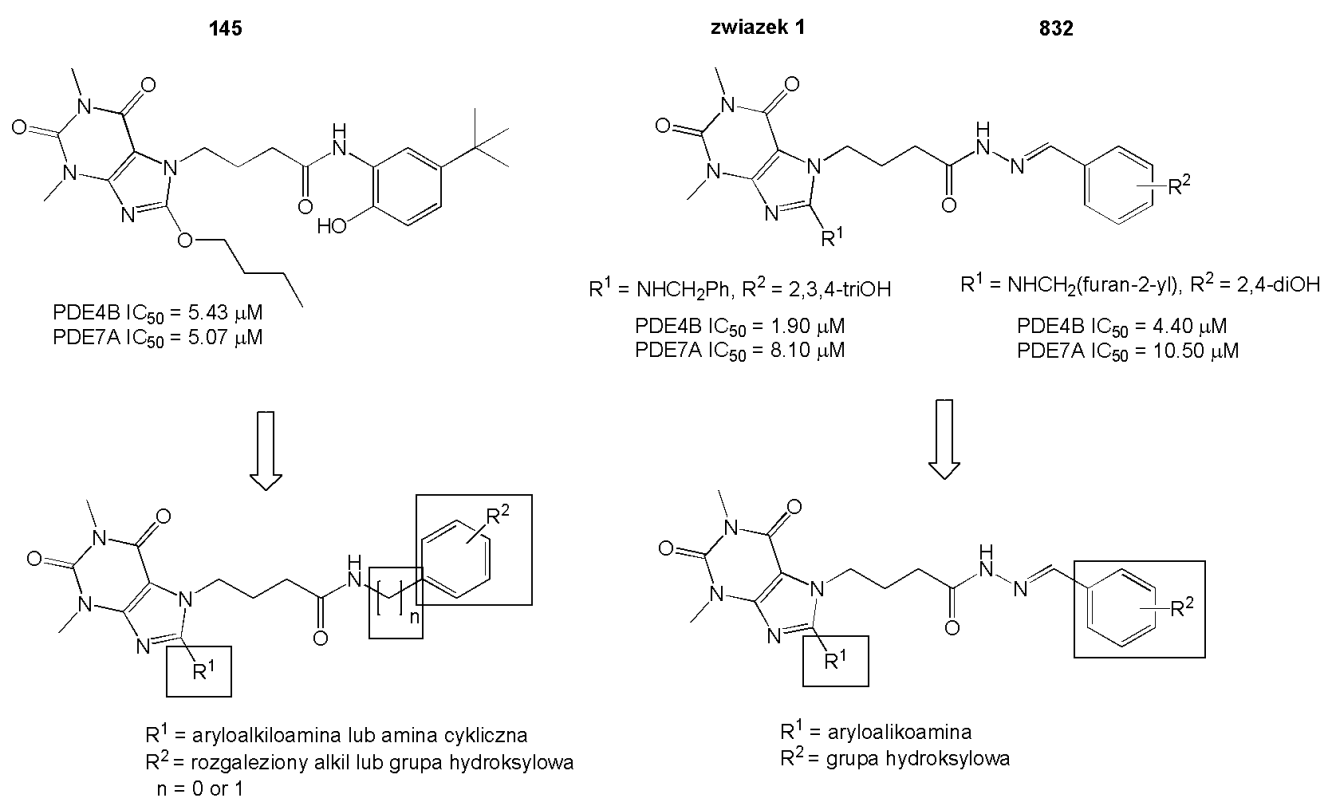
Rycina 5. Proponowany mechanizm przeciwzwłóknieniowego działania związku **145** [H2].

Badania zaprezentowane w pracy **H2** dowiodły, że wybrane inhibitory pan-PDE, związek **832**, a szczególnie **145**, poprzez zmniejszanie sygnalizacji za pomocą szlaku TGF- β /białka Smad mogą skutecznie ograniczać fenotyp zwłóknieniowy ludzkich fibroblastów płucnych. Ponadto ich aktywność jest o wiele lepsza, w porównaniu

do nieselektywnego inhibitora PDE, związku IBMX, a także nie jest związana z oddziaływaniem na kanał TRPA1. Podsumowując, można stwierdzić że inhibitory pan-PDE, opisane w pracy H2, mogą stanowić struktury wiodące do poszukiwania nowych substancji o działaniu przeciwzapalnym i przeciwzwłóknieniowym w drogach oddechowych.

H3. Wójcik-Pszczola K, Jankowska A, Ślusarczyk M, Jakiela B, Plutecka H, Pocięcha K, Świerczek A, Popiół J, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Wyska E, Pękala E, Gosens R, Chłóń-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*. Bioorg Chem. 2021, 117: 105409. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105409.

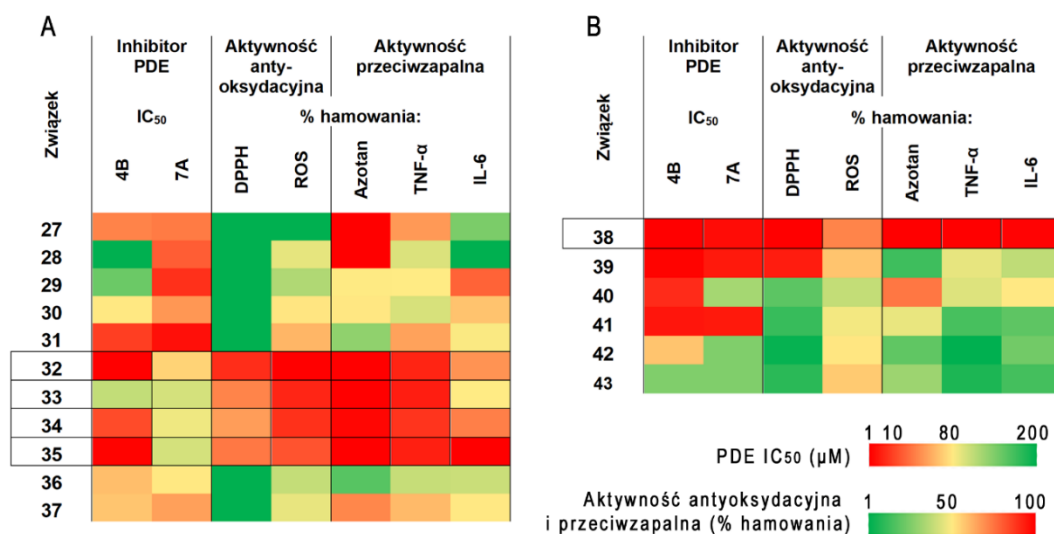
Obiecujące wyniki badań, dotyczące aktywności przeciwzwłóknieniowej *in vitro* badanych inhibitorów pan-PDE zaprezentowane w pracach **H1** i **H2**, skłoniły nas do podjęcia kolejnych doświadczeń – opisanych w pracy **H3**, których celem było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowych *N'*-fenylo- lub *N'*-benzylobutanamidowych- i *N'*-arylidenobutanohydrazydowych pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu (Ryc. 6).



Rycina 6. Projektowanie nowych *N'*-fenylo- lub *N'*-benzylobutanamidowych- i *N'*-arylidenobutanohydrazydowych pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu poprzez modyfikację strukturalną najbardziej aktywnych związków z naszych wcześniejszych badań.

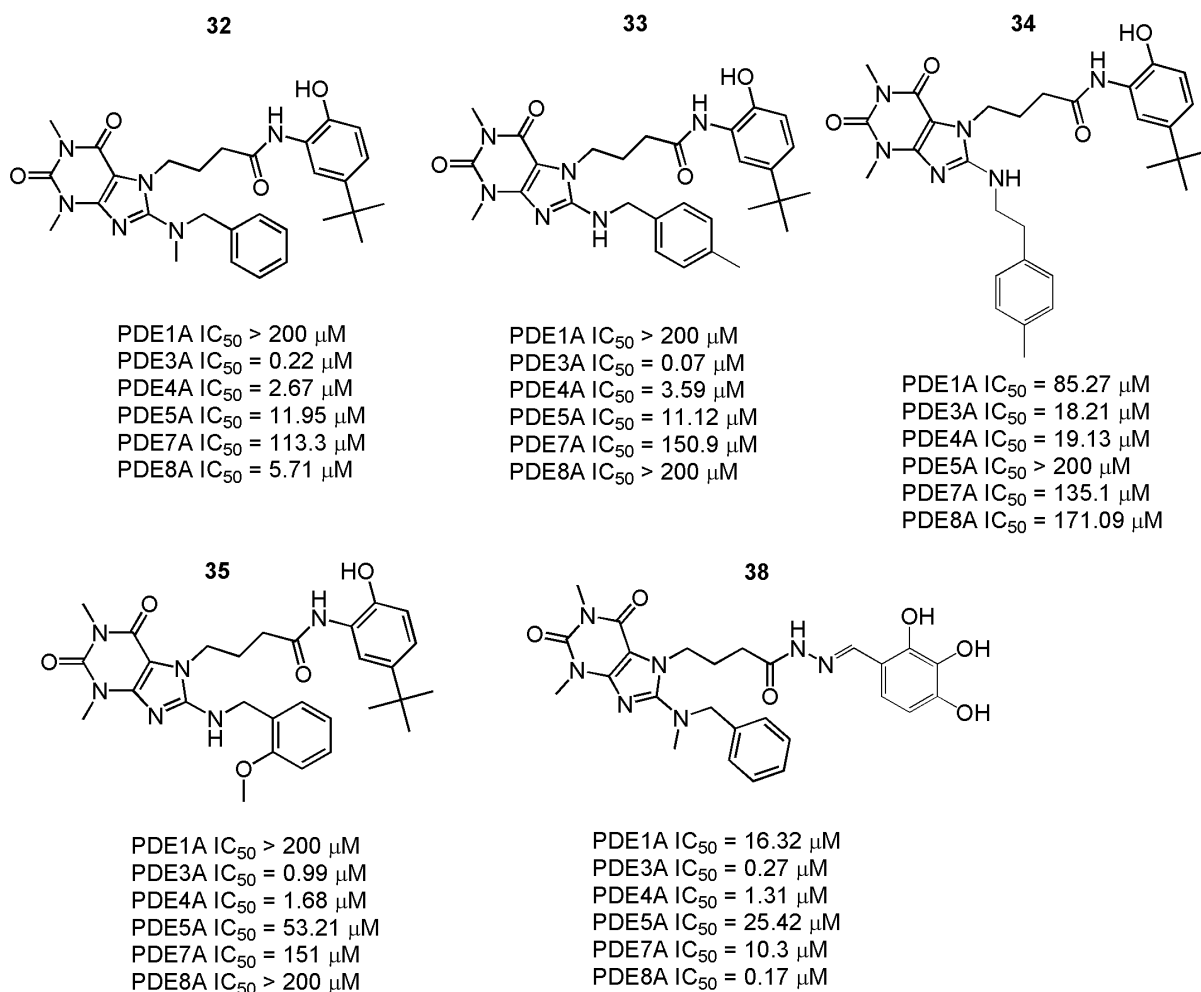
Powyższe serie związków obejmowały bliskie analogi związków: **145** (praca **H2**/związek **2** z pracy **H1**), **1** (praca **H1**) oraz **832** (praca **H2**), zmodyfikowane pod względem fragmentu hydrofobowego w pozycji 8 oraz rodzaju podstawienia w grupie fenylowej, w ugrupowaniach amidowych lub hydrazydowych (Ryc. 6). Zgodnie z wcześniejszymi wynikami badań modelowania molekularnego podstawnik w pozycji 8 układu 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu zawierający akceptor lub donor/akceptor wiązań wodorowych oraz część hydrofobową jest kluczowy dla hamowania aktywności PDE4/7 [47]. Założono, że nowe pochodne zawierające różne ugrupowania aminowe (aryloalkilamina lub amina cykliczna) spełnią wymagania strukturalne dla tych celów biologicznych.

Dla wszystkich nowo zsyntetyzowanych i opisanych w pracy **H3**, *N*'-fenylo- lub *N*'-benzylobutanamidowych- (związki **27-37**) i *N*'-arylidenobutanohydrazydowych (związki **38-43**) pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu wykonano badania przesiewowe pod kątem ich zdolności do hamowania izoform PDE4B i 7A, aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwzapalnej *in vitro*. Aktywność antyoksydacyjną określono za pomocą testu DPPH, oraz oznaczając poziom reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species*, ROS) w mysich makrofagach linii RAW264.7, hodowanych w obecności badanych związków i indukowanych za pomocą lipopolisacharydu (LPS). Aktywność przeciwzapalną określono w oparciu o analizę poziomu czynników prozapalnych takich jak azotan, TNF- α i IL-6 w mysich makrofagach hodowanych w obecności badanych związków i indukowanych za pomocą LPS. Wyniki badań przesiewowych dla związków **27-43** przedstawiono graficznie na rycinie 7 za pomocą mapy ciepła.



Rycina 7. Mapa ciepła przedstawiająca aktywność badanych *N*'-fenylo- lub *N*'-benzylobutanamidowych- (**27-37**) i *N*'-arylidenobutanohydrazydowych (**38-43**) pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu.

Na podstawie uzyskanych danych z całej grupy nowych N'-fenylo- lub N'-benzylobutanamidowych- i N'-arylidenobutanohydrazydowych pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu wyselekcjonowano 5 związków – 32, 33, 34, 35 i 38, które najsilniej hamowały izoformy PDE4B i 7A, a jednocześnie posiadały bardzo dobre właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Dla wybranych związków przeprowadzono rozszerzoną analizę ich profilu hamowania w stosunku do innych izoform PDE, w tym 1A, 1B, 3A, 3B, 4A, 4D, 5A i 8A (Ryc. 8).



Rycina 8. Budowa chemiczna związków 32-35, 38 oraz ich właściwości jako inhibitorów pan-PDE.

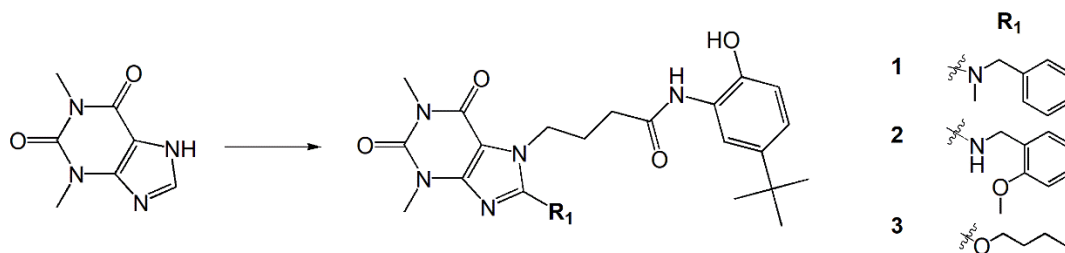
Wykonane analizy potwierdziły, że wyselekcjonowane z grupy N'-fenylo- lub N'-benzylobutanamidowych i N'-arylidenobutanohydrazydowych pochodnych 8-aminopuryno-2,6-dionu związki stanowią bardzo dobre inhibitory pan-PDE (Ryc. 8). Skłoniło to nas do podjęcia kolejnych badań, których celem miało być zweryfikowanie aktywności przeciwzapalnej i przeciwzwłóknieniowej związków 32-35 oraz 38 w modelu komórek budujących drogi oddechowe.

W pracy **H3** do powyższych badań wykorzystano ludzkie komórki nabłonka oddechowego (*ang. human bronchial epithelial cells*, HBEC) wyizolowane od pacjentów ze zdiagnozowaną astmą oskrzelową. Komórki te hodowano w obecności badanych inhibitorów pan-PDE, a następnie indukowano za pomocą IL-13 (w celu wywołania w nich fenotypu pro-zapalnego) lub TGF- β (w celu wywołania w nich fenotypu zwłóknieniowego). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że badane inhibitory pan-PDE skutecznie ograniczają zarówno ekspresję genów pro-zapalnych, tj. *CXCL8*, *CCL26*, *TSLP*, czy *POSTN* i poziom czynników pro-zapalnych tj. IL-8, eotaksyna 3, periostyna, czy IL-13, jak i ekspresję genów wybranych markerów zwłóknienia tj. *FN1*, *MMP-9*, *SNAIL1*, czy *VIM*, w aktywowanych komórkach HBEC, a ich aktywność jest o wiele lepsza niż struktury wyjściowej, teofiliny.

Podsumowując, wybrane do badań zaprezentowanych w pracy **H3**, nowo zsyntetyzowane *N'*-fenylo- lub *N'*-benzylobutanamidowe- i *N'*-arylidenobutanohydrazydowe pochodne 8-aminopuryno-2,6-dionu, będące silnymi inhibitorami pan-PDE, posiadały korzystną aktywność przeciwzapalną oraz przeciwzwłóknieniową w modelu indukowanych komórek nabłonka oddechowego pochodzących od osób chorujących na astmę oskrzelową. Wyniki te potwierdziły zasadność poszukiwania nowych kandydatów na leki przeciwastmatyczne w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu.

H4. Wójcik-Pszczola K, Chłóń-Rzepa G, Jankowska A, Ferreira B, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Pękała 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* (Basel). 2022, 15(4): 423. doi: 10.3390/ph15040423.

Publikacja **H4** stanowi kontynuację badań nad przeciwzwłóknieniowym charakterem wybranych 7,8-dipodstawionych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu. Na podstawie wcześniej zaprezentowanych wyników zauważono, że wyróżniającą na tle innych związków aktywność mogą posiadać 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu posiadające w pierścieniu fenylowym znajdującym się w obrębie podstawnika w położeniu 7, grupy 2-OH, 5-*tert*-Bu. Z tego powodu, do badań opisanych w pracy **H4** wybrano 3 inhibitory pan-PDE posiadające taką budowę (8-podstawione 1,3-dimetylo-2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahydro-7*H*-puryn-7-yl-*N*-(5-(*tert*-butylo)-2-hydroksyfenylo)butanamidy): związek **1** i **2** (odpowiednio związki **32** i **35** z pracy **H3**) oraz związek **3** (odpowiednio związek **145** z pracy **H2** i związek **2** z pracy **H1**) (Ryc. 9).



Rycina 9. Ogólna budowa chemiczna związków **1 - 3** (praca **H4**). Ich właściwości jako inhibitorów pan-PDE przedstawiono na Ryc. 4 i 8.

W ramach pracy **H4** analizowano wpływ związków **1**, **2** oraz **3** na zwłóknieniowy/mezenchymalny fenotyp indukowanych TGF- β komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II, linii A549. Wykazano, że wszystkie badane inhibitory pan-PDE w istotny sposób wpływają na obniżenie poziomu ekspresji wybranych genów charakterystycznych dla fenotypu mezenchymalnego komórek A549, tj. *CDH2*, *SNAIL1*, *VIM*, *FN1*, czy *TGFB1*, jak również skutecznie zmniejszają wewnątrzkomórkowy poziom markerów zwłóknienia tj. wimentyny, α -SMA, czy kolagenu I. Co więcej związki **1-3** zmniejszały również indukowaną TGF- β migrację komórek A549, zarówno w modelu zarastania rany jak i migracji przez mikroporowatą membranę w systemie Transwell®. Jednocześnie ich aktywność była znacznie lepsza niż teofiliny.

Podjęte w pracy **H4** badania pozwoliły także ustalić wewnątrzkomórkowy mechanizm działania badanych inhibitorów pan-PDE w indukowanych TGF- β komórkach A549. Wykazano, że związki **1-3** skutecznie ograniczają fosforylację oraz translokację do jądra komórkowego jednego z głównych efektorów szlaku sygnalizacyjnego TGF- β – białka Smad-2. Równolegle, związki te wzmagają fosforylację czynnika transkrypcyjnego CREB, co potwierdza silną aktywację szlaku cAMP/CREB w komórkach A549 hodowanych w obecności badanych inhibitorów pan-PDE oraz indukowanych TGF- β . Co ciekawe efektu takiego nie wywoływała sama teofilina, najprawdopodobniej ze względu na bardzo słabą zdolność hamowania PDE, przez ten nieselektywny inhibitor.

Podsumowując, badane w pracy **H4**, 8-podstawione 1,3-dimetylo-2,6-dioksa-1,2,3,6-tetrahydro-7H-pyryn-7-ylo-*N*-(5-(*tert*-butylo)-2-hydroksyfenylo)butanamidy charakteryzowały się bardzo dobrymi właściwościami przeciwwzłóknieniowymi w indukowanych komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych typu II, a ich aktywność uzależniona była od blokowania sygnalizacji TGF- β poprzez białka Smad. Dodatkowo ich przeciwwzłóknieniowe działanie było znacznie lepsze niż związku wyjściowego, teofiliny,

co stanowi kolejny dowód na zasadność modyfikacji tej struktury w celu uzyskania lepszego profilu farmakologicznego nowych związków.

H5. Wójcik-Pszczola 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*. Toxicol Appl Pharmacol. 2022, 457: 116318. doi: 10.1016/j.taap.2022.116318.

Na podstawie wyników badań własnych zawartych w pracach **H1-H4** oraz danych niepublikowanych ustalono, że w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu najlepszą aktywność inhibitora pan-PDE oraz profil przeciwpalny i przeciwzłótnieniowy *in vitro* w różnych typach komórek budujących drogi oddechowe posiadają związki **38** (praca **H3**) i **145** (praca **H2** oraz odpowiednio związek **2** z pracy **H1** i związek **3** z pracy **H4**). Biorąc pod uwagę preferencyjne właściwości powyższych związków, w ramach pracy **H5** postanowiono zweryfikować ich ogólny profil bezpieczeństwa *in vitro* oraz właściwości farmakokinetyczne po dożylnym i dootrzewnowym podaniu myszom szczepu Balb/c.

Dla obydwu inhibitorów pan-PDE zaplanowano serię badań *in silico*, w ramach których określono podstawowe parametry ADMET i potencjalne kierunki metabolizmu oraz badania *in vitro*, mające na celu zbadanie potencjału cytotoksycznego z wykorzystaniem wybranych linii komórkowych, genotoksycznego w teście mikrojądrowym, mutagennego w teście Ames'a, zdolności przenikania w teście PAMPA i stabilności metabolicznej w modelu mysich i ludzkich mikrosomów wątrobowych. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że obydwie 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu nie wykazywały działania hepatocytotoksycznego (HepG2), neurocytotoksycznego (SH-SY5Y), kardiocytotoksycznego (H9c2(2-1)), mutagennego i genotoksycznego *in vitro*. Związki **38** i **145** wykazywały umiarkowaną stabilność metaboliczną w modelu mikrosomów wątrobowych myszy i człowieka, a także zostały zaliczone do kategorii związków o niskim lub średnim przenikaniu. Dodatkowe analizy ujawniły również brak oddziaływania badanych inhibitorów pan-PDE z receptorami adenozynowymi, w tym A₁, A_{2A} i A_{2B}.

Mając na uwadze fakt, że opisane w pracy **H5**, 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu posiadają satysfakcjonujący profil

bezpieczeństwa *in vitro*, w kolejnym kroku zdecydowano przeprowadzić dla obydwu inhibitorów pan-PDE analizy farmakokinetyczne. Do badań wykorzystano samice myszy szczepu Balb/c, którym podano dożylnie lub dootrzewnowo pojedyncze dawki związków **38** i **145**. Po podaniu dożylnym obydwa badane inhibitory pan-PDE były wykrywalne w surowicy, mózgu, wątrobie i sercu, jednak ich stężenia były zdecydowanie niższe niż wartości IC₅₀ uzyskane w trakcie analizy toksyczności *in vitro*, z użyciem linii komórkowych, co wskazuje na potencjalne bezpieczeństwo ich stosowania. Po podaniu dootrzewnowym obydwa badane 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu były skutecznie wchłaniane z jamy otrzewnej. Jednocześnie były one szeroko rozprowadzane do płuc myszy i wykrywane w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych po podaniu dootrzewnowym. Analiza niekompartmentowa wykazała, że związki **38** i **145** osiągały wysokie stężenia w surowicy i płucach myszy i były obecne w tych tkankach przez długi czas (ponad 4 h), co wydaje się wystarczające z punktu widzenia utrzymania efektu farmakologicznego przez pożądany okres oddziaływania. Analiza farmakokinetyczna wykazała również że obydwa badane inhibitory pan-PDE ulegały powolnej eliminacji z płuc, co może być korzystne, biorąc pod uwagę fakt, że jest to narząd docelowy dla obydwu związków.

Podsumowując, badania zaprezentowane w pracy **H5** dostarczyły dowodów, że związki **38** i **145** posiadają zadowalający profil bezpieczeństwa *in vitro* i akceptowalne właściwości farmakokinetyczne po dożylnym i dootrzewnowym podaniu myszom szczepu Balb/c. Można zatem stwierdzić, że modyfikacje struktury wyjściowej 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, podjęte w celu zwiększenia selektywności i aktywności badanych związków jako inhibitorów pan-PDE, nie naruszyły ich korzystnego profilu bezpieczeństwa. Związki **38** i **145** reprezentują zatem dobrych kandydatów do dalszych badań farmakologicznych *in vivo*, np. w modelu mysiej astmy alergicznej.

Badania zawarte w pracach **H1-H5** pozwoliły na dogłębne poznanie aktywności związków **38** i **145** w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Podsumowanie właściwości obydwu związków przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 2).

Tabela 2. Podsumowanie bezpieczeństwa i właściwości farmakologicznych *in vitro* związków **38** i **145**.

		38	145
Inhibitor pan-PDE	PDE1B	10.89	2.69
	PDE3A	0.27	0.18
	PDE3B	0.06	2.05
IC₅₀ [μM]¹			

¹ Na podstawie wyników opisanych w pracach H1-H4 oraz danych niepublikowanych

PDE4A	1.31	1.59
PDE4B	2.81	5.43
PDE4D	1.88	13.85
PDE5A	25.42	103.88
PDE7A	10.30	5.07
PDE8A	0.17	14.4

Bezpieczeństwo <i>in vitro</i>²		
genotoksyczność/mutagenność		
hepatocytotoksyczność (HepG2)		brak
neurocytotoksyczność (SH-SY5Y)		
kardiocytotoksyczność (H9c2(2-1))		

Aktywność przeciwzapalna <i>in vitro</i>³	↓ poziom azotanu, TNF-α i IL-6 w makrofagach
---	--

Aktywność antyoksydacyjna <i>in vitro</i>³	↓ poziom reaktywnych form tlenu w makrofagach
--	---

Aktywność przeciwzwłóknieniowa <i>in vitro</i>⁴		
	↓ fenotyp zwłóknieniowy fibroblastów płucnych	
	↓ fenotyp zwłóknieniowy komórek mięśni gładkich dróg oddechowych	
	↓ fenotyp zwłóknieniowy komórek nabłonka oddechowego astmatyków	↓ fenotyp mezenchymalny komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II

H6. Wójcik-Pszczola K, Pocięcha K, Chłóń-Rzepa G, Zadrozna M, Nowak B, Plutecka H, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Przejcowska-Pomierny K, Pękala E, Gosens R, Wyska E. *Inhaled pan-phosphodiesterase inhibitors ameliorate ovalbumin-induced airway inflammation and remodeling in murine model of allergic asthma.* Int Immunopharmacol. 2023, 119: 110264. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110264.

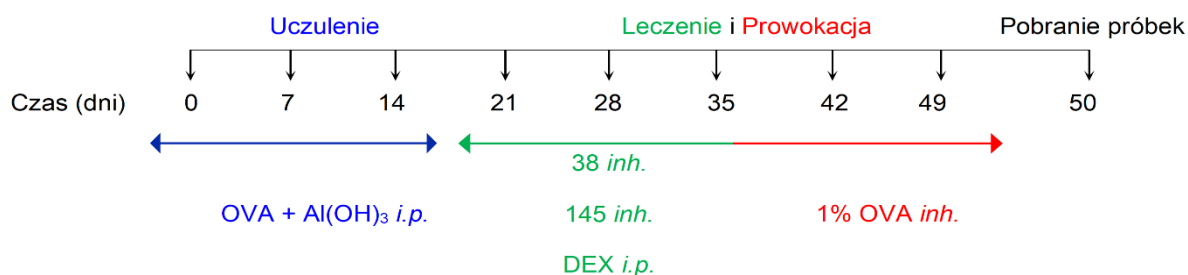
Badania zaprezentowane w pracy **H6** zostały podjęte w celu ustalenia aktywności farmakologicznej związków **38** i **145** o właściwościach inhibitorów pan-PDE (Ryc. 4 i 8, Tab. 2) w modelu indukowanej owoalbuminą (OVA) przewlekłej astmy alergicznej u myszy. W celu wywołania objawów choroby u myszy szczepu Balb/c, w pierwszym etapie eksperymentu zwierzęta uczulano za pomocą OVA, a następnie w drugim etapie drogi oddechowe myszy poddawano wziewnej prowokacji alergenem (Ryc. 10). Badane związki **38** i **145** podawano myszom wziewnie, przed każdą prowokacją OVA, za pomocą dedykowanej wieży inhalacyjnej. Wziewna aplikacja inhibitorów pan-PDE została podyktowana chęcią uzyskania wysokiego stężenia w ich docelowym miejscu działania, a także potrzebą ograniczenia ewentualnych efektów systemowych, które mogłyby wystąpić w trakcie eksperymentu. W modelu użyto jako kontroli pozytywnej powszechnie stosowanego leku glikokortykosteroidowego, o silnej aktywności przeciwzapalnej – deksametazonu, który

² Na podstawie wyników opisanych w pracy H5

³ Na podstawie wyników opisanych w pracy H3 oraz danych niepublikowanych

⁴ Na podstawie wyników zaprezentowanych w pracach H1-H5 oraz danych niepublikowanych

podawano zwierzętom dootrzewnowo, również przed każdorazową prowokacją OVA. Przebieg czasowy modelu przewlekłej astmy alergicznej indukowanej alergenem przedstawiono schematycznie na rycinie 10.



Rycina 10. Schemat modelu przewlekłej astmy alergicznej indukowanej alergenem.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że obydwa badane inhibitory pan-PDE, związki **38** i **145**, zmniejszają cechy zapalne związane z odpowiedzią astmatyczną typu Th2 u samic myszy szczepu Balb/c. Wysoce podwyższona w odpowiedzi na aktywację alergenu liczba komórek zapalnych, w tym eozynofili, poziomy IgE i stężenia cytokin prozapalnych w próbkach pobranych od myszy poddanych prowokacji OVA były znacząco zmniejszone u zwierząt, które inhalowano za pomocą związków **38** i **145**. Jednocześnie badane inhibitory hamowały wiele typowych cech przebudowy dróg oddechowych, w tym metaplastę komórek kubkowych, nadmierne wydzielanie śluzu, nadprodukcję i odkładanie kolagenu, jak również poziom markerów zwłóknieniowych tj. *Tgfb1*, VEGF i α -SMA w drogach oddechowych myszy prowokowanych OVA. Bardzo ciekawe wyniki uzyskano w trakcie analizy poziomu VEGF i α -SMA w homogenatach tkanki płucnej pochodzących od myszy prowokowanych alergenem, którym podawano badane inhibitory pan-PDE. U zwierząt tych oznaczono bardzo niski poziom wspomnianych białek, co sugeruje, że związki **38** i **145** mogą posiadać bardzo korzystne działanie hamujące obrzęk tkanek występujący w astmie i związany z przepuszczalnością naczyń, a także inną bardzo ważną cechą przebudowy dróg oddechowych - hiperplazję i hipertrofię komórek mięśni gładkich. Deksametazon, zgodnie z oczekiwaniami hamował stan zapalny u myszy prowokowanych alergenem, ale w nieznacznym stopniu zmniejszał przebudowę dróg oddechowych. Przeciwwzapalny efekt terapeutyczny **38** i **145** w modelu astmy alergicznej u myszy był porównywalny z tym wywołanym deksametazonem, jednakże badane inhibitory pan-PDE posiadały lepsze właściwości przeciwzwłóknieniowe.

Wyniki badań zaprezentowane w pracy **H6** wskazują również że za aktywność przeciwzapalną i przeciwzwłóknieniową badanych związków **38** i **145** odpowiada ich oddziaływanie na szlak sygnalizacyjny TGF- β przez białka Smad. W homogenatach tkanki płucnej pobranych od zwierząt prowokowanych alergenem, którym podawano badane inhibitory pan-PDE, oznaczono niski poziom fosforylacji dwóch głównych białek kanonicznego szlaku sygnalizacji TGF- β – Smad-2 i Smad-3.

Przedstawione w pracy **H6** badania po raz pierwszy wykazały, że jednoczesne hamowanie różnych PDE obecnych w drogach oddechowych i zaangażowanych w rozwój astmy, przez silne inhibitory pan-PDE z grupy 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu aplikowane wziewnie, skutecznie łagodzi zarówno proces zapalny, jak i przebudowę dróg oddechowych w modelu przewlekłej astmy alergicznej wywołanej OVA u myszy. Biorąc pod uwagę dane dotyczące korzystnego profilu bezpieczeństwa i aktywności *in vitro*, jak również właściwości farmakokinetyczne związków **38** i **145**, można stwierdzić że badane inhibitory pan-PDE reprezentują obiecujące, oddziałujące zarówno na proces zapalny jak i przebudowę dróg oddechowych, struktury wyjściowe w poszukiwaniach nowych i skutecznych kandydatów na leki przeciwastmatyczne.

4.1.6. Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Najważniejsze wnioski płynące z moich badań przedstawionych w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy stanowiących osiągnięcie naukowe są następujące:

1. Po raz pierwszy wykazano, że wybrane 7,8-dipodstawione pochodne puryno-2,6-dionu, związki będące inhibitorami pan-PDE, wykazują bardzo dobrą aktywność przeciwzapalną i przeciwzwłóknieniową w różnych modelach komórek budujących drogi oddechowe, w tym komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych, fibroblastach płucnych, komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych typu II i komórkach nabłonka oskrzeli pochodzących od astmatyków.
2. Udokumentowano bardzo dobry profil bezpieczeństwa *in vitro* wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dionu oraz potwierdzono ich satysfakcjonujący profil farmakokinetyczny po podaniu dootrzewnowym.

3. Wykazano znaczącą aktywność przeciwzapalną i przeciwzwłóknieniową wybranych 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu w modelu przewlekłej astmy indukowanej alergenem u myszy.
4. Po raz pierwszy wskazano, że za właściwości przeciwzwłóknieniowe wybranych inhibitorów pan-PDE z grupy 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, odpowiada ich ograniczające oddziaływanie na kanoniczny szlak sygnalizacji TGF- β poprzez białka Smad. Można zatem postulować, że ścieżka ta stanowi dobry cel dla potencjalnych terapii przeciwzwłóknieniowych.
5. Wyniki badań przeprowadzonych w modelu *in vivo* potwierdzają, że w kontekście chorób układu oddechowego, wziewna droga podania może stanowić dobrą alternatywę dla terapii z wykorzystaniem inhibitorów PDE. Zastosowany w doświadczeniach sposób aplikacji badanych związków zapewnia nie tylko ich precyzyjne dostarczenie, a tym samym bezpośrednie działanie inhibitorów pan-PDE w tkance docelowej, ale może wpływać na ograniczenie ich ogólnoustrojowych efektów i potencjalnych skutków ubocznych.
6. Wyniki zaprezentowanych badań dowodzą również, że aktualny trend wykorzystania znanych już struktur (tj. teofiliny) w poszukiwaniu nowych leków jest warty uwagi. Modyfikacje wprowadzone w pozycji 7 i 8 układu 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu przekładają się na korzystną aktywność badanych związków jako inhibitorów pan-PDE i będące jej wynikiem zdecydowanie lepsze, w porównaniu do związku macierzystego, właściwości farmakologiczne.
7. Nowością zaprezentowanych danych jest również wykazanie, że inhibitory pan-PDE, związki wykazujące jednocześnie zdolność do silnego hamowania wybranych, istotnych z punktu widzenia patogenezy astmy oskrzelowej izoform PDE, posiadają dużo lepszą aktywność farmakologiczną w układzie oddechowym niż selektywne (np. roflumilast, cilomilast) i nieselektywne (np. teofilina, IBMX) inhibitory PDE. Dodatkowo uzyskane w ramach niniejszego projektu wyniki badań jednoznacznie wskazują, że inhibitory pan-PDE ograniczają zarówno zapalenie jak i większość procesów związanych z remodelingiem dróg oddechowych. Można zatem postulować, że równoczesne hamowanie kilku różnych izoform PDE może przynieść wiele korzyści terapeutycznych i z pewnością warto rozważyć taki kierunek w dalszych poszukiwaniach nowych leków przeciwastmatycznych.

Podsumowując, wyniki uzyskane i opisane w ramach cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy stanowiących osiągnięcie naukowe, poszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący możliwości przeciwdziałania przebudowie drzewa oskrzelowego w astmie, dostarczają dowodów wskazujących na liczne korzyści płynące z potencjalnego zastosowania w terapii inhibitorów pan-PDE, a szczególnie ich wziewnej aplikacji. Wybrane 7,8-dipodstawione pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu, związki oddziałujące zarówno na zapalenie jak i remodeling dróg oddechowych, z pewnością stanowią obiecujące struktury wiodące w dalszych poszukiwaniach nowych leków przeciwastmatycznych.

4.2. Pozostałe osiągnięcia naukowe

4.2.1. Badania wpływu czynników regulujących fenotypowe różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty w astmie oskrzelowej

Za swoje drugie, najważniejsze osiągnięcie naukowe uważam szerokie badania prowadzone nad naturą procesu fenotypowego różnicowania się fibroblastów w miofibroblasty (FMT) w ramach których dokonałam odkrycia współdziałania dwóch ważnych czynników wzrostu, TGF- β i czynnika wzrostowego tkanki łącznej (CTGF), w trakcie różnicowania fibroblastów oskrzelowych pochodzących od astmatyków w miofibroblasty, jak również zidentyfikowałam kilka możliwych sposobów ograniczania samego procesu FMT. Zjawisko FMT zachodzi w trakcie przebudowy drzewa oskrzelowego w astmie oskrzelowej i obecnie nie jest celem żadnej strategii terapeutycznej stosowanej w leczeniu tej choroby. Poznanie jego dokładnej natury jak również czynników biorących udział w jego regulacji przyczynia się do poszerzenia wiedzy w zakresie możliwości przeciwdziałania FMT.

Interdyscyplinarne prace badawcze nad różnymi czynnikami mogącymi regulować FMT realizowałam w ramach swojej pracy doktorskiej w dwóch odrębnych jednostkach badawczych: Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, Wydziału Lekarskiego UJCM oraz w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Zaplanowane i wykonane przeze mnie badania po raz pierwszy wykazały, że w fibroblastach oskrzelowych pochodzących od astmatyków, dochodzi do silnej ekspresji i wydzielania CTGF pod wpływem innego znanego czynnika pro-zwłóknieniowego, TGF- β , a addytywne działanie obydwu czynników znacząco wzmaga proces FMT w komórkach pobranych od osób z astmą oskrzelową. Efektu tego nie wykazałam w fibroblastach

oskrzelowych osób zdrowych, co dodatkowo identyfikuje CTGF jako bardzo istotny czynnik wzmagający proces FMT w przebiegu astmy oskrzelowej. W swoich badaniach udowodniłam również po raz pierwszy, że wyciszenie ekspresji CTGF w fibroblastach oskrzelowych pobranych od astmatyków, powoduje zahamowanie ich różnicowania w miofibroblasty. Rezultaty moich badań nie tylko wskazują na niezwykle istotną rolę CTGF we wzmacnianiu procesu FMT i przyczyniają się do lepszego zrozumienia zmian zachodzących w trakcie przebudowy drzewa oskrzelowego w astmie, ale także wyznaczają nowe możliwe punkty uchwytu dla potencjalnych leków przeciwastmatycznych, oddziałujących na proces przebudowy dróg oddechowych. Swoje obserwacje i uzyskane wyniki przedstawiłam w dwóch niżej przedstawionych pracach, w których jestem pierwszym autorem. Dodatkowo, pierwsza z wymienionych poniżej prac została dostrzeżona i nagrodzona II miejscem w konkursie Redaktor Naczelnej Polish Archives of Internal Medicine na najlepszą studencką pracę oryginalną opublikowaną w tym czasopiśmie, w 2012 roku.

- **Wójcik K**, Koczurkiewicz P, Michalik M, Sanak M. *Transforming growth factor- β -induced expression of connective tissue growth factor is enhanced in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients.* *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122(7-8):326-32. PMID: 22814516.
- **Wójcik-Pszczola K**, Jakiela 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 Feb;102:187-190. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.002.

Zależność współdziałania TGF- β i CTGF w procesie FMT w astmie oskrzelowej była również podstawą moich doniesień konferencyjnych, np.: PP10, PP37 czy prezentacji ustnej (PU4) wygłoszonej w trakcie 1st Congress BIO 2014, w Sesji Protein functions in Cellular Signaling, w Warszawie.

Swoje spostrzeżenia dotyczące znaczenia udziału różnych czynników w wzmacnianiu procesu FMT w astmie oskrzelowej, zaprezentowałam również w pracy przeglądowej, której jestem pierwszym (równo cenny udział) i korespondencyjnym autorem.

- Michalik M, **Wójcik-Pszczola K**, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, Pękala E, Madeja Z. *Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma.* *Cell Mol Life Sci.* 2018 Nov;75(21):3943-3961. doi: 10.1007/s00018-018-2899-4.

Praca ta stanowi kompendium aktualnej wiedzy dotyczącej zarówno udziału różnych czynników w procesie FMT jak i potencjalnych możliwości jego regulacji w astmie oskrzelowej. Praca ta była do tej pory cytowana ponad 70 razy, co potwierdza zarówno jej bardzo dobrą pozycję w aktualnym piśmiennictwie, jak również znaczenie samego procesu

FMT w patogenezie astmy oskrzelowej i możliwości jego regulacji, jako nowy kierunek w poszukiwaniach nowych kandydatów na leki przeciwastmatyczne.

W trakcie badań prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, uczestniczyłam również w realizacji interdyscyplinarnych projektów naukowych, w ramach których podjęto liczne próby zidentyfikowania natury samego procesu FMT, jak i substancji mogących przeciwdziałać i/lub ograniczać FMT. Bezpośrednio prowadziłam badania, w ramach których udało się zidentyfikować kilka sposobów hamowania FMT w komórkach pochodzących od astmatyków, w tym za pomocą należącej do statyn – lowastatyny, przedstawiciela z grupy flawonoidów – apigeniny, stosowanych w zaburzeniach afektywnych dwubiegunowych – soli litu, czy też poprzez ograniczenie kontaktów komórka-komórka lub wyciszenie ekspresji koneksyny 43. Rezultaty tych badań przyczyniły się do odkrycia i wytypowania nowych kierunków poszukiwania skutecznych, oddziałujących na zachodzący w drzewie oskrzelowym chorych na astmę proces FMT, kandydatów na leki przeciwastmatyczne. Efektem mojego zaangażowania w powyższe prace są liczne publikacje badawcze, których jestem współautorem:

- Michalik M, Pierzchalska M, Włodarczyk A, **Wójcik KA**, Czyż J, Sanak M, Madeja Z. Transition of asthmatic bronchial fibroblasts to myofibroblasts is inhibited by cell-cell contacts. *Respir Med.* 2011 Oct;105(10):1467-75. doi: 10.1016/j.rmed.2011.04.009.
- Michalik M, **Wójcik KA**, Jakiela B, Szpak K, Pierzchalska M, Sanak M, Madeja Z, Czyż J. Lithium Attenuates TGF- β (1)-Induced Fibroblasts to Myofibroblasts Transition in Bronchial Fibroblasts Derived from Asthmatic Patients. *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:206109. doi: 10.1155/2012/206109.
- **Wójcik KA**, Skoda M, Koczurkiewicz P, Sanak M, Czyż J, Michalik M. Apigenin inhibits TGF- β 1 induced fibroblast-to-myofibroblast transition in human lung fibroblast populations. *Pharmacol Rep.* 2013;65(1):164-72. doi: 10.1016/s1734-1140(13)70974-5.
- Michalik M, Soczek E, Kosińska M, Rak M, **Wójcik KA**, Lasota S, Pierzchalska M, Czyż J, Madeja Z. Lovastatin-induced decrease of intracellular cholesterol level attenuates fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients. *Eur J Pharmacol.* 2013 Mar 15;704(1-3):23-32. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.023.
- Paw M, Borek I, Wnuk D, Ryszawy D, Piwowarczyk K, Kmietek K, **Wójcik-Pszczola KA**, Pierzchalska M, Madeja Z, Sanak M, Błyszczuk P, Michalik M, Czyż J. Connexin43 Controls the Myofibroblastic Differentiation of Bronchial Fibroblasts from Patients with Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017 Jul;57(1):100-110. doi: 10.1165/rcmb.2015-0255OC.

oraz liczne doniesienia konferencyjne, np.: PP1-5, P8, PP14-15, PP17-20, PP23-27, PP29, PP31, PP34-35, PP40-43, PP72

Podjmowane poszukiwania i liczne próby identyfikacji substancji ograniczających proces FMT leżały również u początków moich zainteresowań grupą metyloksantyn. Do grupy tych związków należy m.in. teofilina, lek stosowany w niektórych przypadkach astmy oskrzelowej. Wiadomo, że ma ona silne działanie przeciwzapalne, ale niewiele było wiadomo na temat jej oddziaływania na przebudowę dróg oddechowych. W ramach mojej autorskiej koncepcji badań udało się wykonać serię doświadczeń, które potwierdziły, że trzy związki należące do grupy metyloksantyn, tj. teofilina, pentoksyfilina i jej metabolit lizofilina, mogą skutecznie hamować proces FMT. Uzyskane rezultaty badań zostały przeze mnie opisane i zaprezentowane w formie doniesień konferencyjnych (PP49, PP52, PP73), a także w poniższej pracy, której jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem:

- **Wójcik-Pszczola K, Hińcza K, Wnuk D, Kądziołka D, Koczurkiewicz P, Sanak M, Madeja Z, Pękala E, Michalik M.** *Pentoxifylline and its active metabolite lisofylline attenuate transforming growth factor β 1-induced asthmatic bronchial fibroblast-to-myofibroblast transition.* *Acta Biochim Pol.* 2016;63(3):437-42. doi: 10.18388/abp.2016_1357.

oraz stały się przyczynkiem do podjęcia dalszych prac nad związkami z grupy metyloksantyn i ich pochodnych, a ich rezultatem są wyniki badań zawarte w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe zaprezentowane w punkcie 4.1 (H1-H6).

4.2.2. Badania bezpieczeństwa nowych kandydatów na leki

Niezwykle ważnym aspektem mojej pracy naukowo-badawczej, stanowiącym jednocześnie moje kolejne osiągnięcie naukowe, są prowadzone w ramach wstępnej oceny parametrów ADMETox w warunkach *in vitro*, badania bezpieczeństwa zarówno nowo syntetyzowanych kandydatów na leki jak i potencjalnych składników nowych preparatów kosmetycznych. Badania te prowadzę od początku mojego zatrudnienia w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej.

Wykluczenie działania toksycznego substancji chemicznych jak również potwierdzenie ich stabilności metabolicznej jest priorytetowe i powinno być przeprowadzane już we wczesnym etapie rozwoju nowej cząsteczki – potencjalnego leku. Analizy takie mają, zgodnie z zasadą 3R, na celu zminimalizowanie liczby zwierząt potrzebnych do badań *in vivo*, ograniczenie ich cierpienia oraz poszukiwanie alternatywnych metod badań. Doskonałym narzędziem odpowiadającym na te potrzeby są analizy wykonywane w warunkach *in vitro*.

Z wykorzystaniem metodyki opartej o hodowlę różnych typów komórek, brałam udział w licznych badaniach mających na celu zweryfikowanie działania hepatocytotoksycznego, neurocytotoksycznego, kardiocytotoksycznego, czy też drażniącego skórę dla nowych związków. Wykluczenie powyższych aktywności pozwoliło na wytypowanie optymalnych i bezpiecznych związków do kolejnych badań, a tym samym przełożyło się na dalszy rozwój wybranych grup pochodnych.

Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie analiz bezpieczeństwa stały się podstawą rozwoju m.in. takich grup związków jak: 1,3-podstawione pochodne pirolidyno-2,5-dionu o działaniu przeciwdrgawkowym; 3,3-difenylopropionamidy o aktywności antynocyceptywnej; 3-(2-chlorofenylo)- i 3-(3-chlorofenylo)-2,5-diokso-pirolidyn-1-ylo-acetamidy posiadające właściwości przeciwdrgawkowe i przeciwbólowe; znakowane fluorescencyjnie pochodne zydowudyny, czy też związki o aktywności fotoprotekcyjnej z grupy pochodnych ksantonu lub 5-arylidenoimidazolidyno-2,4-dionu.

Innym bardzo ważnym elementem wstępnych badań ADMETox nowych kandydatów na leki *in vitro* jest badanie biotransformacji i wyznaczenie możliwych ścieżek metabolizmu z wykorzystaniem modelu mikrosomów wątrobowych. W ramach kilku projektów brałam również udział w tego typu analizach, a uzyskane rezultaty moich badań pozwoliły na potwierdzenie stabilności metabolicznej wybranych struktur wiodących w obrębie takich grup związków jak: agonistów receptora 5-HT₇ o właściwościach przeciwdepresyjnych i anksjolitycznych, wybranych nowych chiralnych N-aminoalkilowych pochodnych trans-2-aminocykloheksan-1-olu wykazujących działanie przeciwdrgawkowe, czy też nowych pochodnych hydantoiny o obiecujących właściwościach fotoochronnych.

Reasumując, prowadzone przeze mnie na szeroką skalę wstępne badania ADMETox *in vitro* nowych kandydatów na leki oraz potencjalnych składników preparatów kosmetycznych przyczyniły się do wyselekcjonowania optymalnych pod kątem bezpieczeństwa i stabilności metabolicznej struktur do dalszych badań. Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie analiz pojawiły się w następujących pracach:

- Rybka S, Obniska J, Żmudzki P, Koczurkiewicz P, **Wójcik-Pszczola K**, Pękala E, Bryła A, Rapacz A. Synthesis and Determination of Lipophilicity, Anticonvulsant Activity, and Preliminary Safety of 3-Substituted and 3-Unsubstituted N-[(4-Arylpiperazin-1-yl)alkyl]pyrrolidine-2,5-dione Derivatives. *ChemMedChem*. 2017 Nov 22;12(22):1848-1856. doi: 10.1002/cmdc.201700539.

- Rapacz A, Obniska J, Koczurkiewicz P, **Wójcik-Pszczola K**, Siwek A, Gryboś A, Rybka S, Karcz A, Pękala E, Filipek B. *Antiallodynic and antihyperalgesic activity of new 3,3-diphenyl-propionamides with anticonvulsant activity in models of pain in mice.* Eur J Pharmacol. 2018 Feb 15;821:39-48. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.036.
- Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Piska K, Żelaszczyk D, Koczurkiewicz P, Słoczyńska K, **Wójcik-Pszczola K**, Krupa A, Kryczyk-Poprawa A, Żesławska E, Nitek W, Żmudzki P, Marona H, Pękala E. *Discovery of Novel UV-Filters with Favorable Safety Profiles in the 5-Arylideneimidazolidine-2,4-dione Derivatives Group.* Molecules. 2019 Jun 24;24(12):2321. doi: 10.3390/molecules24122321.
- Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Słoczyńska K, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Piska K, **Wójcik-Pszczola 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.* Int J Mol Sci. 2020 Dec 22;22(1):34. doi: 10.3390/ijms22010034.
- Góra M, Czopek A, Rapacz A, Gębska A, **Wójcik-Pszczola K**, Pękala E, Kamiński K. *Synthesis, Anticonvulsant, and Antinociceptive Activity of New 3-(2-Chlorophenyl)- and 3-(3-Chlorophenyl)-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-acetamides.* Molecules. 2021 Mar 12;26(6):1564. doi: 10.3390/molecules26061564.
- Kasza P, Pocięcha K, **Wójcik-Pszczola K**, Canale V, Wyska E, Zajdel P, Szafranski PW, Cegła M. *Ligand assisted CuAAC labelling and RP-HPLC analysis of zidovudine and Retrovir using propargyl-Fmoc probe.* Eur J Pharm Sci. 2022 Nov 1;178:106293. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106293.
- Słoczyńska K, **Wójcik-Pszczola K**, Canale V, Żmudzki P, Zajdel P, Pękala E. *Biotransformation of 4-fluoro-N-(1-{2-[(propan-2-yl)phenoxy]ethyl}-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)-benzenesulfonamide, a novel potent 5-HT₇ receptor antagonist with antidepressant-like and anxiolytic properties: In vitro and in silico approach.* J Biochem Mol Toxicol. 2018 May;32(5):e22048. doi: 10.1002/jbt.22048.
- Słoczyńska K, Koczurkiewicz P, Piska K, Powroźnik B, **Wójcik-Pszczola K**, Kłaś K, Wyszowska-Kolatko M, Pękala E. *Similar Safety Profile of the Enantiomeric N-Aminoalkyl Derivatives of Trans-2-Aminocyclohexan-1-ol Demonstrating Anticonvulsant Activity.* Molecules. 2019 Jul 9;24(13):2505. doi: 10.3390/molecules24132505.
- Popiół J, Piska K, Słoczyńska K, Bień A, Żelaszczyk D, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, **Wójcik-Pszczola K**, Marona H, Pękala E. *Microbial biotransformation of some novel hydantoin derivatives: Perspectives for bioremediation of potential sunscreen agents.* Chemosphere. 2019 Nov;234:108-115. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.254.

a także, w licznych doniesieniach konferencyjnych, np.: PP22, PP48, PP51, PP55, PP57-58, PP63, PP69-70, PP77, PP79, PP91.

4.2.3. Badania dotyczące udziału kanału TRPA1 w chorobach zwłóknieniowych płuc

Od kilku lat jestem również aktywnie zaangażowana w badania prowadzone w Zakładzie Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM, mające na celu określenie wpływu związków modulujących kanał TRPA1 (zarówno agonistów, jak i antagonistów) na procesy związane z przebudową dróg oddechowych w przewlekłych chorobach układu oddechowego, takich jak astma czy POChP. Badania ostatnich lat wskazują, że kanał ten może odgrywać istotną rolę w rozwoju astmy, przez indukowanie m.in. zapalenia neurogennego, nadreaktywności dróg oddechowych i późnej odpowiedzi astmatycznej. W ramach aktualnie trwającego projektu OPUS (PR7), którego kierownikiem jest dr hab. Grażyna Chłoń-Rzepa, prof. UJ, jestem odpowiedzialna za prowadzenie badań biologicznych w modelach komórkowych, jak również badań biochemicznych z wykorzystaniem tkanek zwierzęcych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie dotychczas badań potwierdzają, że wybrani antagoniści kanału TRPA1 mogą ograniczać fenotyp zwłóknieniowy w pierwotnych ludzkich komórkach mięśni gładkich oskrzeli oraz fibroblastach płucnych. W swoich badaniach wykazałam, między innymi, że wybrane związki posiadające aktywność inhibitora PDE oraz modulatora kanału TRPA1 posiadają aktywność przeciwzapalną (badania w modelu mysich makrofagów indukowanych lipopolisacharydem) oraz przeciwzwłóknieniową *in vitro* (badania w modelach indukowanych TGF- β komórek mięśni gładkich oskrzeli i fibroblastów płucnych). Dodatkowo udowodniliśmy, że najbardziej aktywni w badaniach *in vitro*, antagoniści kanału TRPA1 ograniczają również proces zapalny oraz cechy związane z POChP w modelu wywołanej elastazą rozedmy u myszy. Aktualnie koordynuję również badania przesiewowe, które prowadzi pod moją opieką doktorantka, mgr Natalia Kocot w grupie nowo zaprojektowanych i zsyntetyzowanych pochodnych teobrominy, benzimidazolu, 8-alkoksyteofiliny oraz triazyny, związków modulujących aktywność kanału TRPA1. Dotychczasowe wyniki badań potwierdzają, że związki wpływające na aktywność kanału TRPA1 stanowią niezwykle ciekawą i wartą dalszych analiz grupę nowych kandydatów na leki, możliwych do zastosowania w terapii przewlekłych chorób układu oddechowego. Ze względu na wstępny charakter projektu, wyniki naszych analiz były dotychczas podstawą doniesień konferencyjnych (PP68, PP71, PP86, PP95), a najnowsze są przedmiotem publikacji będącej w trakcie opracowania.

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. Department of Molecular Pharmacology, University of Groningen, Holandia

W 2017 roku samodzielnie nawiązałam trwającą do dnia dzisiejszego, współpracę naukowo-badawczą z prof. Reinoudem Gosens, z Department of Molecular Pharmacology, University of Groningen, w Holandii. Niezwykle owocna współpraca rozpoczęła się od mojego czterotygodniowego stażu w zespole prof. Gosensa i udziale w pracach badawczych prowadzonych w tym czasie w Jednostce. Wyjazd i pobyt był możliwy dzięki uzyskaniu na drodze konkursu środków finansowych w ramach stypendium ERS Short Term Research Fellowship. Realizowany pod opieką prof. Gosensa mój projekt badawczy miał na celu analizę wpływu dualnych inhibitorów PDE3/4 na funkcje komórek mięśni gładkich dróg oddechowych w astmie oskrzelowej. Badania przeprowadziłam z wykorzystaniem wyprowadzonych i unieśmiertelnionych przez prof. Gosensa linii komórkowych. W trakcie pobytu w Department of Molecular Pharmacology moje obowiązki polegały m.in. na zakładaniu oraz rutynowej hodowli komórek ASMC, przygotowaniu komórek do doświadczeń, wykonywaniu testów proliferacji oraz analizy żywotności, izolacji RNA z komórek ASMC, przeprowadzaniu reakcji RT-PCR, a następnie ocenie ilości transkryptu wybranych genów za pomocą analizy qPCR, ponadto byłam zaangażowana w organizację pracy w laboratorium, jak również uczestniczyłam w wydarzeniach dodatkowych tj. wykłady, seminaria i konsultacje naukowe. W trakcie mojego pobytu w zespole prof. Gosensa poznałam szereg procedur i wykonałam liczne eksperymenty, a wyniki mojej pracy zostały zawarte w doniesieniu zjazdowym (PP76) oraz były podstawą jednej z publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (praca **H1**).

W ramach samodzielnie zaplanowanych i zrealizowanych w Department of Molecular Pharmacology, University of Groningen w Holandii badań wykazałam, że wybrane pochodne puryno-2,6-dionu, reprezentujące inhibitory PDE3/4 istotnie ograniczają wybrane cechy związane z fenotypem zwłóknieniowym w stymulowanych TGF- β komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych. Udowodniłam między innymi, że wybrane związki z tej grupy obniżają tempo proliferacji ASMC oraz ekspresję ważnych genów związanych z ich fenotypem zwłóknieniowym. Głównym rezultatem moich badań było potwierdzenie działania przeciwzwłóknieniowego wybranych pochodnych puryno-2,6-dionu, co w konsekwencji przyczyniło się do podjęcia dalszych badań i prac nad tą grupą związków oraz ich przeciwastmatycznym charakterem.

Dodatkowo, nasza współpraca polegająca na prowadzeniu wspólnych badań, regularnej dyskusji naukowej, wymianie poglądów i wsparciu merytorycznemu była bardzo

owocna i jej częściowym efektem są również dalsze publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe (prace **H2-H4, H6**), jak również inne doniesienia konferencyjne (PP67, PP85, PP87, PP94).

Nasza współpraca trwa nieustannie od 2017 roku, a prof. Gosens był jednym z wykonawców kierowanego przeze mnie projektu OPUS. Korzystając ze wsparcia merytorycznego i wieloletniego doświadczenia profesora w prowadzeniu badań w zwierzęcych modelach astmy *in vivo*, możliwe było wdrożenie ww. modelu do rutynowych badań na Wydziale Farmaceutycznym UJCM. Już w trakcie pobytu w Department of Molecular Pharmacology, poznałam podstawy teoretyczne modelu mysiej, przewlekłej astmy indukowanej alergenem oraz warunki konieczne do jego przeprowadzenia. Dzięki nabytym umiejętnościom możliwe było zaplanowanie i zorganizowanie przeze mnie zaplecza naukowo-technicznego, a następnie dzięki niezwykle zaangażowaniu i współpracy z zespołem prof. Elżbiety Wyski z Zakładu Farmakokinytyki i Farmacji Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM, jego opracowanie i wykonanie w warunkach naszego Wydziału. W najbliższym czasie planujemy także rozbudowę naszego modelu o moduł umożliwiający wykonywanie pomiarów pletyzmograficznych oraz generator dymu papierosowego (w celu wywoływania u zwierząt laboratoryjnych innych, przewlekłych chorób płuc m.in. POChP). Badania prowadzone z wykorzystaniem modeli chorób płuc, jak również wziewna aplikacja substancji (możliwa dzięki zastosowaniu unikatowej wieży inhalacyjnej) są prowadzone przez pojedyncze jednostki naukowe w Polsce, a wdrożenie ich do rutynowych badań na Wydziale Farmaceutycznym UJCM z pewnością było możliwe dzięki umiejętnościom i wiedzy zdobytej w trakcie mojego pobytu i pracy w Groningen.

Dzięki stałej współpracy z zespołem prof. Gosensa możliwe jest prowadzenie dalszych badań z wykorzystaniem komórek ASMC, również w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJCM. Aktualnie w Department of Molecular Pharmacology prowadzone są zaplanowane badania nad właściwościami rozkurczowymi nowych inhibitorów pan-PDE z grupy pochodnych puryno-2,6-dionu, w modelu *ex vivo* z wykorzystaniem precision cut lung slices (PCLS). Dlatego też moje najbliższe plany naukowo-badawcze obejmują kolejny pobyt w zespole prof. Gosensa celem dokończenia tych badań, a także zdobycia doświadczenia dotyczącego potencjału wykorzystania PCLS w badaniach obejmujących zarówno poszukiwania nowych punktów uchwytu dla substancji o działaniu przeciwastrymatycznym, jak również szersze badania farmakologiczne *ex vivo* potencjalnych kandydatów na leki oddziałujące na układ oddechowy.

5.2. Zespół Biofizyki Molekularnej i Bioenergetyki, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków

W okresie od czerwca 2010 do lipca 2011 roku, w Zespole Biofizyki Molekularnej i Bioenergetyki, na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH, kierowanym przez prof. dr hab. Kvetoslave Burda, brałam udział w prowadzeniu wielokierunkowych badań dotyczących właściwości nanomechanicznych komórek zmienionych chorobowo. Wiele ze znanych leków np. przeciwnowotworowych oddziałuje na architekturę cytoszkieletu komórki, prowadząc do jej upośledzenia. To z kolei przekłada się na zmianę właściwości nanomechanicznych komórki. Istniejąca korelacja pomiędzy strukturą cytoszkieletu, a właściwościami nanomechanicznymi komórki daje podstawy dla możliwości wykorzystania właściwości elastycznych komórki w procesie oceny działania nowych kandydatów na leki [54].

W ramach prowadzonych na AGH badań, w oparciu o połączenie analizy wykonanej za pomocą mikroskopu sił atomowych oraz wyników badań biologicznych odkryliśmy po raz pierwszy, że fibroblasty oskrzelowe wyizolowane z biopsji pobranych od pacjentów z astmą oskrzelową i hodowane na podłożu szklanym w standardowych warunkach *in vitro*, charakteryzują się odmiennymi właściwościami nanomechanicznymi, w porównaniu do komórek pobranych od osób zdrowych. Wykazaliśmy, że komórki te posiadają prawie 4-krotnie wyższą sztywność, wyrażoną za pomocą modułu Younga, w porównaniu do fibroblastów oskrzelowych pochodzących od osób zdrowych. Zwiększone napięcie i aktywność mechaniczna tych komórek przekłada się z kolei na ich zdolność do fenotypowego różnicowania w kierunku miofibroblastów, a tym samym na progresję zwłóknienia.

Moja rola w realizowanym projekcie polegała na udziale w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu i prowadzeniu badań biologicznych, obejmujących propagację hodowli komórkowych, przygotowanie komórek do pomiarów z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych, analizę właściwości cytofluorymetrycznych komórek, wykonanie analiz immunofluorescencyjnych oraz porównanie danych z wynikami analiz nanomechanicznych. Wykazałam m.in., istnienie różnic w organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz wielkości kontaktów zogniskowanych występujące pomiędzy fibroblastami oskrzelowymi pochodzącymi od astmatyków i osób zdrowych. Rezultaty moich badań pozwoliły także na odnalezienie korelacji pomiędzy właściwościami nanomechanicznymi, a strukturą cytoszkieletu fibroblastów oskrzelowych pochodzących od astmatyków. Biorąc pod uwagę

skomplikowane zmiany zachodzące w architekturze cytoszkieletu komórek strukturalnych dróg oddechowych w trakcie przebiegu astmy oskrzelowej, wyniki tych prac mogą przełożyć się na możliwość wykorzystania właściwości elastycznych zarówno w monitorowaniu zmian strukturalnych zachodzących w komórce w trakcie przebiegu astmy oskrzelowej, jak i w procesie weryfikacji działania nowych potencjalnych leków przeciwastmatycznych. W trakcie badań prowadzonych w Zespole Biofizyki Molekularnej i Bioenergetyki, na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH byłam również zaangażowana w projekt, w ramach którego udokumentowaliśmy po raz pierwszy wpływ wybranych saponin triterpenowych na elastyczność i potencjał inwazyjny komórek ludzkiego raka prostaty prowadzący do osłabienia ich zdolności inwazyjnych. Wynikiem mojej aktywności prowadzonej w ww. jednostce są poniższe publikacje:

- Sarna M, **Wójcik KA**, Hermanowicz P, Wnuk D, Burda K, Sanak M, Czyż J, Michalik M. *Undifferentiated bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients display higher elastic modulus than their non-asthmatic counterparts*. PLoS One. 2015 Feb 13;10(2):e0116840. doi: 10.1371/journal.pone.0116840.
- Koczurkiewicz P, Podolak I, Skrzeczyńska-Moncznik J, Sarna M, **Wójcik KA**, 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*. Chem Biol Interact. 2013 Oct 25;206(1):6-17. doi: 10.1016/j.cbi.2013.08.003.

także doniesienia konferencyjne: PP6, PP11, PP28, PP30, PP31, PP34, PP36

5.3. Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

W lipcu 2010 roku, w trakcie studiów doktoranckich, odbyłam miesięczny staż w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod opieką pani dr hab. Beaty Burzyńskiej, prof. IBB PAN. W trakcie mojego pobytu w tej jednostce byłam aktywnie zaangażowana w pracę laboratoryjną, w tym m.in.: izolację RNA z komórek drożdży, izolację DNA z krwi ludzkiej, oczyszczanie produktów reakcji PCR do sekwencjonowania, prowadzenie rozdzału kwasów nukleinowych/białek za pomocą elektroforezy, wykonywanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym, projektowanie starterów, izolację leukocytów z pełnej krwi, a także analizę produktów sekwencjonowania oraz analizę mutacji przy użyciu odpowiedniego oprogramowania. Zapoznałam się także z metodyką mikromacierzy ekspresyjnych oraz techniką automatycznej izolacji kwasów nukleinowych. Jako stażystka uczestniczyłam w pracach badawczych realizowanych

wówczas w tej jednostce. Umiejętności i doświadczenie w pracy laboratoryjnej zdobyte w trakcie pobytu w Zakładzie Genetyki, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, zostały przeze mnie wykorzystane w trakcie późniejszej pracy naukowo-badawczej, w ramach projektów, których wyniki zawarto m.in. w wymienionych niżej publikacjach z moim współautorstwem, np.:

- 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. Cinnamamide derivatives with 4-hydroxypiperidine moiety enhance effect of doxorubicin to cancer cells and protect cardiomyocytes against drug-induced toxicity through CBR1 inhibition mechanism. *Life Sci.* 2022 Sep 15;305:120777. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120777.
- **Wójcik-Pszczola K**, Jakiela 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 Feb;102:187-190. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.002.
- **Wójcik KA**, Skoda M, Koczurkiewicz P, Sanak M, Czyż J, Michalik M. Apigenin inhibits TGF- β 1 induced fibroblast-to-myofibroblast transition in human lung fibroblast populations. *Pharmacol Rep.* 2013;65(1):164-72. doi: 10.1016/s1734-1140(13)70974-5.
- Koczurkiewicz P, Podolak I, **Wójcik KA**, 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 Biochim Pol.* 2013;60(3):331-8. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23869350.

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Działalność dydaktyczną rozpoczęłam już w trakcie studiów doktoranckich na Wydziale Lekarskim UJCM, a następnie kontynuowałam ją w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Z chwilą rozpoczęcia przeze mnie pracy na Wydziale Farmaceutycznym UJCM, zostałam zaangażowana w zajęcia dydaktyczne prowadzone w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej.

A. W ramach dotychczasowej pracy naukowo-dydaktycznej byłam promotorem 4 prac magisterskich na kierunku Farmacja (mgr Justyna Meserszmit, mgr Marcin Romanowski, mgr Klaudia Nowak oraz mgr Karolina Rajek) i 5 prac magisterskich na kierunku Kosmetologia (mgr Anna Nowak, mgr Karolina Kaźmierczak, mgr Aleksandra

Markowska, mgr Natalia Jaroś, mgr Dominika Janiec). Praca magisterska studentki farmacji, mgr Karoliny Rajek przygotowana pod moją opieką, zdobyła II miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich w roku akademickim 2020/21. Ponadto recenzowałam 2 prace magisterskie na kierunku Farmacja i 2 prace magisterskie na kierunku Kosmetologia. Od października 2022 roku pełnię również funkcję promotora pomocniczego pracy doktorskiej mgr Natalii Kocot, realizującej studia doktoranckie w Szkole Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu UJCM.

B. Od początku mojej pracy naukowo-dydaktycznej prowadziłam/prowadzę następujące zajęcia dydaktyczne:

- Biochemia (kierunek farmacja, Wydział Farmaceutyczny UJCM) – seminaria i ćwiczenia, 2013 – obecnie
- Biotechnologia w kosmetologii (kierunek kosmetologia, Wydział Farmaceutyczny UJCM) – ćwiczenia, 2013 – obecnie
- Biochemia ogólna i medyczna (Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego, UJCM) – wykłady, 2019 – obecnie
- Biology in Pharmaceutical Sciences (kierunek Drug Discovery and Development, Wydział Farmaceutyczny UJCM) - ćwiczenia, 2018 – obecnie
- Najnowsze technologie komórkowe w badaniach nad lekiem (kierunek farmacja, Wydział Farmaceutyczny UJCM) – zajęcia fakultatywne, 2016 – obecnie
- Biomedycyna i inżynieria tkankowa w kosmetologii (kierunek kosmetologia, Wydział Farmaceutyczny UJCM) – zajęcia fakultatywne, 2016 – 2018
- Biologia Komórki (Studia podyplomowe z biologii molekularnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ) – ćwiczenia, 2012
- Biologia komórki (kierunek biologia, biotechnologia i biochemia, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ) – ćwiczenia, 2011-2013
- Praktikum z biologii komórki (kierunek biologia, biotechnologia i biochemia, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ) – ćwiczenia, 2011-2013
- Genetyka (kierunek lekarski, Wydział Lekarski UJCM) – ćwiczenia, 2010-2012
- Genetyka (kierunek dietetyka, Wydział Lekarski UJCM) – ćwiczenia, 2011-2012

C. W latach 2017-2018 byłam uczestnikiem programu Erasmus+ staff mobility for teaching i brałam udział w kształceniu studentów uczelni zagranicznych. W trakcie pobytu w Uniwersytecie Lublańskim oraz w Uniwersytecie w Ratyzbonie realizowałam następujące zajęcia dydaktyczne:

- Biopharmaceutical Evaluation of Pharmaceutical Forms (przedmiot dla studentów 4 roku kierunku Farmacja na Uniwersytecie w Lublanie)
 - The Use of Genetic and Cellular Testing in Biomedicine and Pharmacy (przedmiot dla studentów 4 roku kierunku Farmacja na Uniwersytecie w Lublanie)
 - Clinical Pharmacy (seminaria dla studentów 4 i 5 roku kierunku Farmacja na Uniwersytecie w Ratyzbonie).
- D. W 2014 roku, byłam współodpowiedzialna za opracowanie programu oraz przygotowanie sylabusu zajęć fakultatywnych na kierunku Kosmetologia (Biomedycyna i inżynieria tkankowa w kosmetologii) oraz kierunku Farmacja (Najnowsze technologie komórkowe w badaniach nad lekiem). Obydwa fakultety zostały pozytywnie zaopiniowane i weszły do programu kształcenia na kierunkach Kosmetologia i Farmacja.
- E. W trakcie swojej dotychczasowej pracy naukowo-dydaktycznej sprawowałam również opiekę nad studentami realizującymi projekty naukowe, prace magisterskie, stypendia, staże zarówno w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, jak i w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM:
- W okresie 01.02.2021 – 30.04.2021 byłam opiekunem naukowym studenta kierunku Farmacja, Uniwersytetu w Porto, Portugalia – Bruno Ferreira, który odbywał staż w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, w ramach programu Erasmus+. Do moich obowiązków należał nadzór merytoryczny nad projektem naukowym stażu, opieka w laboratorium, koordynacja pracy studenta, a także nauczanie podstawowych technik laboratoryjnych. Oprócz realizacji założonych planów badawczych student został również zaangażowany w prace prowadzone w ramach projektu OPUS (PR3), a wynikiem tego jest publikacja oraz doniesienia konferencyjne, których jest współautorem (publikacja H4, doniesienie konferencyjne PP67).
 - W okresie 25.06.2018 – 13.07.2018 sprawowałam opiekę naukową nad studentką kierunku Farmacja, Uniwersytetu Marmara w Stambule, Turcja – Burçin Karaaslan, realizującą praktyki wakacyjne w ramach staży organizowanych przez Polskie Towarzystwo Studentów Farmacji. W trakcie pobytu stażystki

w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej byłam odpowiedzialna za organizację czasu jej pracy, nauczanie technik laboratoryjnych oraz nadzór merytoryczny.

- W okresie czerwiec-sierpień 2014 sprawowałam opiekę nad studentką kierunku Farmacja, Uniwersytetu w Bonn, Niemcy – Birte Niemann, realizującą naukowy staż wakacyjny w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej. Byłam odpowiedzialna za organizację zadań badawczych stażystki w laboratorium, nauczanie podstawowych technik laboratoryjnych i zasad pracy laboratorium hodowli komórkowych. Efekt naszej pracy to dwa doniesienia konferencyjne, których stażystka jest współautorką (PP21, PP44).
- W okresie od stycznia do lipca 2022 byłam opiekunem wolontariatu, który w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej odbywała mgr Natalia Kocot, absolwentka kierunku Farmacja, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy. Byłam odpowiedzialna za organizację pracy wolontariuszki i wdrożenie jej w rutynowe prace prowadzone w laboratorium, nauczanie metod hodowli komórkowych oraz biologii molekularnej, przygotowanie doniesień konferencyjnych. Wynikiem wspólnych prac było włączenie wolontariuszki jako współautora kilku doniesień konferencyjnych i jednej publikacji (PP89, PP93, publikacja H5).
- Od 2013 roku jestem zaangażowana w opiekę nad studentami biochemiczno-biotechnologicznego koła naukowego „Cytogenom”, działającego w ramach Zakładu Biochemii Farmaceutycznej. Efektem tej aktywności są liczne doniesienia konferencyjne (PP54, PP61, PP74, PP78), jak i publikacje (P11, P12, P46).
- W latach 2010 – 2013 byłam również zaangażowana w opiekę nad studentami kierunków Biologia i Biotechnologia, wykonującymi prace magisterskie w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

F. W celu podnoszenia swoich kompetencji dydaktycznych zrealizowałam również następujące kursy i szkolenia:

- Warsztaty Ars Docendi – rok akademicki 2011/2012 – cykl warsztatów dydaktycznych służących wspieraniu początkujących nauczycieli akademickich

w rozwijaniu kompetencji dydaktycznych, warsztaty zorganizowane przez Dział Rozwoju i Jakości Kształcenia, Centrum Wsparcia Dydaktyki UJ

- Innovative teaching methods in the fields of Technology and Chemical Engineering according to the best standards of the Bologna Process – 04.07.2017
- Prawo autorskie w działalności naukowej i dydaktycznej – 05.06.2020
- Tworzenie prezentacji i wizerunek naukowca” – 26.11.2020
- Akademia Wystąpień Publicznych: Dykcja i impostacja głosu bez tajemnic – 05.04.2022
- Udział w szkoleniu pt. „Teaching & Learning Means Getting in Mental Synchrony” wygłoszonych przez prof. Barbarę Oakley – światowej sławy ekspertką w dziedzinie dydaktyki akademickiej, a także autorką jednego z najpopularniejszych webinarów na platformie Coursera pt. Learning How to Learn. – 31.05.2023

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

- A. W latach 2010 – 2012 byłam członkiem Rady Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Przewodnicząca Komisji TDUJ ds. Collegium Medicum. Do moich obowiązków należało uczestniczenie w posiedzeniach Rady, przygotowanie protokołów, współodpowiedzialność za podejmowanie decyzji dotyczących środowiska doktorantów UJ. Byłam również odpowiedzialna za przygotowanie propozycji podziału środków finansowych przyznawanych doktorantom w ramach świadczeń pomocy materialnej oraz wysokości stypendiów dla najlepszych doktorantów Wydziału Lekarskiego i Wydziału Farmaceutycznego UJCM
- B. W latach 2011 – 2013 pełniłam funkcję członka komitetu organizacyjnego Konferencji Naukowej Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego. Byłam współodpowiedzialna za kontakt z zaproszonymi gośćmi, sponsorami i zleceniobiorcami, opracowanie programu wydarzenia, przygotowanie materiałów graficznych, edycję materiałów naukowych oraz wydruki plakatów, koordynację stanowiska rejestracji oraz logistykę związaną z imprezą towarzyszącą.
- C. W latach 2013-2014 brałam udział w organizacji Małopolskiej Nocy Naukowców na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Moja rola polegała na koordynowaniu zapisów na poszczególne wydarzenia i nadzorze nad procesem rejestracji.

- D. W latach 2016 – 2019 pełniłam funkcję współorganizatora i koordynatora Małopolskiej Nocy Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym UJCM. Moja rola polegała na przygotowaniu programu wydarzenia na Wydziale Farmaceutycznym (program obejmował 18 warsztatów odbywających się w kilku Katedrach/Zakładach), współpracy z Działem Promocji Nauki UJ oraz Inspektorem BHP UJ, opracowaniu harmonogramu warsztatów oraz budżetu wydarzenia, prowadzeniu rejestracji indywidualnych i zbiorowych na poszczególne warsztaty, koordynacji stanowiska rejestracji w dniu wydarzenia, nadzorowaniu i przygotowaniu umów zlecenia/dzielo dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, rozliczaniu faktur, przygotowaniu raportu z wydarzenia i opracowania statystycznego.
- E. W roku 2016 byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego konferencji „Nowoczesna Kosmetologia - od Nauki do Biznesu”, wydarzenia organizowanego na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum. Moja rola polegała poszukiwaniu, a następnie na kontakcie ze sponsorami, opracowaniu, formatowaniu i złożeniu książki abstraktów oraz pomocy w przygotowaniu materiałów graficznych.
- F. W latach 2013 – 2017 byłam odpowiedzialna za funkcjonowanie strony internetowej Zakładu Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

- A. W 2011 roku brałam udział w Festiwalu Nauki, w ramach stoiska Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, na rynku głównym w Krakowie. W ramach wydarzenia promowałam wiedzę z zakresu podstaw biologii komórki. Prowadziłam krótką prelekcję i pokazy dotyczące obsługi mikroskopu fluorescencyjnego i możliwości jego zastosowania w badaniach podstawowych.
- B. W 2012 roku brałam udział w Dniach Otwartych Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, w ramach których prowadziłam pokazy w sali ćwiczeń Zakładu Biologii Komórki, dotyczące obserwacji komórek w mikroskopie jasnego pola, a także podstaw pracy z hodowlami komórkowymi w laboratorium.
- C. W 2018 roku byłam odpowiedzialna za przygotowanie i wygłoszenie prelekcji dotyczącej badań bezpieczeństwa i ich roli w procesie rozwoju nowych leków oraz oprowadzanie po laboratorium uczestników warsztatów pt. „Skąd się biorą leki”, zorganizowanych przez Sekcję ds. projektów promocyjnych UJ, w ramach inicjatywy „Uniwersytet Bliżej Was – wycieczki na Uniwersytet Jagielloński”.

- D. Prowadzenie prelekcji dotyczącej badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM oraz roli podstawowych badań przedklinicznych w procesie rozwoju nowych leków dla uczniów szkół ponadpodstawowych oraz studentów uczelni zagranicznych wizytujących Wydział Farmaceutyczny.
- E. Udział w materiale telewizyjnym Jak odkrywać nowe leki? promującym nowy kierunek studiów prowadzonych na Wydziale Farmaceutycznym UJCM – Drug Discovery and Development.
- F. Jestem współautorką kilku prac o charakterze popularnonaukowym, w tym np.:
- Artykułu opublikowanego na zaproszenie w branżowym czasopiśmie Świat Przemysłu Farmaceutycznego; Kubowicz P, Koczurkiewicz P, **Wójcik K**, Pękała E, Rok M, Ślipek P, Zastosowanie ciekłego azotu w biotechnologii, farmacji i medycynie.” Świat przemysłu farmaceutycznego, 2014, vol. 27, no. 01, pp.: 8 – 12.
 - Artykułu opublikowanego na zaproszenie w branżowym czasopiśmie Dermatologia Estetyczna; **Wójcik-Pszczola K**, Koczurkiewicz P, Pękała E. Hodowle komórkowe - wybrane zastosowania w kosmetologii. Dermatologia Estetyczna, Vol. 19, nr 1, pp.: 22 – 29, 2017.
- G. Popularyzacja prowadzonych badań oraz ich wyników w ramach portali internetowych, np.: artykuł informacyjny dotyczący realizowanego projektu OPUS na portalu Rzecz.pl, promocja wyników badań na portalach tj. Encyclopedia MDPI czy Po Prostu Nauka UJCM.

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

A. Poza aktywnością naukową omówioną w punkcie 4. i 5. niniejszego Autoreferatu, byłam również zaangażowana w realizację następujących badań naukowych:

1. Badania dotyczące poszukiwania związków pochodzenia naturalnego o charakterze przeciwnowotworowym. Badania, w których brałam udział były realizowane w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ oraz w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej WF UJCM i pozwoliły na zidentyfikowanie kilku nowych aktywności związanych z działaniem przeciwnowotworowym wybranych związków np. saponin triterpenowych wyizolowanych z *Lysimachia ciliata*, i *Lysimachia clethroides*, ekstraktów z *Bacopa monnieri*, galaktolipidów wyizolowanych

- z *Impatiens parviflora*, czy też piperlonguminy, alkaloidu pochodzącego z *Piper longum*. Wynikiem prowadzonych badań jest kilka publikacji oryginalnych (P7, P11, P13, P19, P29) i przeglądowych (P38, P39, P40, P42), których jestem współautorem.
2. Badania dotyczące poszukiwania substancji o charakterze kardioprotekcyjnym w grupie nowych pochodnych kwasu cynamonowego, z wykorzystaniem modeli szczurzych kardiomiocytów oraz kardiomiocytów ludzkich pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Badania prowadzone były w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, przy współpracy z Zakładem Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Wynikiem prowadzonych badań jest są publikacje oryginalne: P28 i P32 oraz doniesienia konferencyjne: PP62, PP64, PP83, których jestem współautorem.
 3. Badania dotyczące poszukiwania nowych, skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach nowych pochodnych arylidenohydantoiny i kwasu cynamonowego. Badania prowadzono w ramach projektu OPUS (PR5), kierowanego przez prof. dr hab. Elżbietę Pękałą i realizowanego w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Katedry Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM. W ramach projektu powstały liczne doniesienia konferencyjne (PP57-58, PP77, PP79) i publikacje badawcze (P20, P21, P26).
 4. Badania aktywności neurotoksycznej i przeciwzapalnej barwników gomfreninowych pozyskiwanych z ekstraktów *Basella alba*. Badania prowadzono w ramach współpracy z prof. dr hab. Sławomirem Wybrańcem z Katedry Technologii Chemicznej i Analityki Środowiskowej, Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, w ramach projektu OPUS NCN, nr UMO-2017/27/B/NZ9/02831 pt. "Badania aktywności i stabilności barwników gomfreninowych z ekstraktów *Basella alba* L."
 5. Badania bezpieczeństwa oraz aktywności przeciwzapalnej nanocząstek srebra. Badania prowadzono w ramach współpracy z dr Magdaleną Wypij, z Katedry Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Wyniki badań zaprezentowano w publikacji badawczej (P33).
 6. Badania dotyczące molekularnych mechanizmów działania nowych związków o potencjale hamującym monogenezę z grupy pochodnych kwasu cynamonowego. Badania prowadzono w ramach współpracy z dr hab. Agnieszką Gunią-Krzyżak z Zakładu Chemii Bioorganicznej, Katedry Chemii Organicznej, Wydziału

Farmaceutycznego UJCM w ramach projektu LIDER (PR9). Wynikiem badań jest polskie zgłoszenie patentowe (ZP1) oraz doniesienia zjazdowe (PP96, PP97).

B. Uczestniczyłam również w projektach komercyjnych realizowanych przez UJCM na zlecenie firm zewnętrznych, w tym m.in. z firmą:

1. AERO-BW Krzysztof Domagała Sp.J. z siedzibą w Chrzanowie, w zakresie „Opracowania receptury maseczki do włosów na bazie placenty roślinnej. Analiza cytotoksyczności, mutagenności i potencjału antyoksydacyjnego”, jako kierownik projektu.
2. Insignes Labs Sp. z o.o. z siedzibą w Krakowie, w zakresie „Wykonania usługi prac badawczych i eksperymentalno-rozwojowych dotyczących analizy dodatku antymikrobiotycznego pod względem potencjalnej cytotoksyczności, mutagenności i ekotoksykologii oraz biotransformacji w modelu biologicznym”, jako wykonawca zadań badawczych.
3. AERO-BW Krzysztof Domagała Sp.J. z siedzibą w Chrzanowie, w zakresie „Badania aktywności biologicznej ekstraktów uzyskanych z komórek macierzystych; Badania bezpieczeństwa stosowania ekstraktów uzyskanych z komórek macierzystych”, jako wykonawca zadań badawczych.
4. Adamed Pharma S.A. z siedzibą w Pieńkowie, w zakresie „Rozwoju wziewnej formy AD-051.4”, jako kierownik projektu.

C. W ramach aktywności naukowej prowadzonej w innych jednostkach naukowych zrealizowałam następujące projekty:

1. W 2009 roku, w Zakładzie Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii UJCM, uczestniczyłam w 7 tygodniowym stażu szkoleniowym w zakresie metod biologii molekularnej, techniki hodowli komórkowych *in vitro* oraz pracy ze zwierzętami doświadczalnymi.
2. W 2010 roku, w ramach kursu Advanced Lecture Course – Analysis and Engineering of Biomolecular Systems, który odbył się w Grecji uczestniczyłam w serii wykładów i seminariów dotyczących najnowszych metod modelowania molekularnego i dedykowanego oprogramowania komputerowego. Prelekcje w których uczestniczyłam, poświęcone były również badaniom i analizie oddziaływań różnych

związków z celami molekularnymi i wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnalizacyjnymi. Udział w szkoleniu był możliwy dzięki wsparciu stypendium FEBS.

3. W 2016 roku, w trakcie pobytu w Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, w Słowenii wygłosiłam cykl wykładów naukowych dotyczący podstaw wstępnej analizy ADMET w warunkach *in vitro*, a także możliwości badań prowadzonych z wykorzystaniem metod alternatywnych do oceny bezpieczeństwa nowych związków. Wygłosiłam również wykład otwarty dla pracowników Uniwersytetu pt. „Fibroblast to myofibroblast transition in bronchial asthma – possible targets for pharmacological intervention”.
4. W 2017 roku, w trakcie pobytu w Department of Pharmaceutical Technology, University of Regensburg, w Niemczech wygłosiłam cykl wykładów naukowych dotyczący znaczenia metod alternatywnych we wstępnej analizie ADMET wykonywanej w ramach badań przedklinicznych. Wygłoszono również referat na zaproszenie dla pracowników Uniwersytetu pt. „*In vitro* studies of fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma – attempts to limit this phenomenon”.
5. W 2023 roku, w King’s College of London, w Wielkiej Brytanii uczestniczyłam w szkoleniu pt. „Eosinophilic Lung Disease” zorganizowanym przez European Respiratory Society w ramach podnoszenia kompetencji i kwalifikacji zawodowych w obszarze podłoża i patogenezы różnych eozynofilowych chorób płuc, a także najnowszych możliwości ich leczenia. Zapoznałam się również z najnowszymi doniesieniami dotyczącymi biologii eozynofilii, technik laboratoryjnych stosowanych w badaniach tych komórek, a także biomarkerów zapalenia eozynofilowego. Szkolenie było prowadzone zarówno przez pracowników King’s College of London, jak również przez specjalistów w dziedzinie chorób płuc z poza tej jednostki. Udział w szkoleniu był możliwy dzięki otrzymaniu stypendium ERS.

D. W ramach podnoszenia swoich kwalifikacji zawodowych ukończyłam następujące kursy, szkolenia i seminaria zawodowe:

1. Szósta szkoła letnia komórek macierzystych – 05-06.06.2009, Kraków, Zakład Transplantologii UJCM

2. IV Biogerontological Meetings at the Nencki Institute – 17.10.2009, Warszawa, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
3. Western Blotting – 07.06.2010, Kraków, Merck Millipore
4. Od błony plazmatycznej do jądra komórkowego – szlaki sygnalizacyjne niezbędne do życia – 16.10.2010, Warszawa, Organizator: Komitet Cytobiologii PAN
5. Bezpieczne Laboratorium, Pewny Pomiar, Niezawodny sprzęt – oferta firmy Merck – 25.10.2010, Kraków, Organizator: Merck Millipore
6. Hodowle komórek ssaków – 09.06.2011, Kraków, Organizator: Merck Millipore
7. Testy komórkowe: metody i narzędzia do badania odpowiedzi komórkowej – 15.10.2012, Kraków, Organizator: Promega
8. Hodowle komórkowe – Analiza komórek – 29.10.2012, Kraków, Organizator: Merck Millipore
9. Cykl szkoleniowo-warsztatowy dla pracowników sektora B+R „Naukowiec w Biznesie”:
 - Rozwój i zarządzanie produktami innowacyjnymi w obszarze nauk medycznych, 17-18.11.2012, Kraków, Organizator: Investin
 - Badania prekliniczne i kliniczne omówione na przykładzie projektów naukowych, 24-25.11.2012, Kraków, Organizator: Investin
 - Komercjalizacja produktów biotechnologicznych i medycznych w projekcie, 15-16.12.2012, Kraków, Organizator: Investin
10. Biologia komórki w miniony półwieczu – 01.12.2012, Warszawa, Organizator: Komitet Cytobiologii PAN
11. Protokół dyplomatyczny & etykieta dla młodych naukowców – 02.12.2012, Kraków, Organizator: Towarzystwo Doktorantów UJ
12. Bioluminescencyjne systemy genów reporterowych – niezawodne narzędzia do badania regulacji genów i szlaków sygnałowych w komórkach – 23.04.2013, Kraków, Organizator: Promega
13. Odwrotna transkrypcja i Real-Time PCR - technika, źródła najczęstszych problemów i ich rozwiązania. Klonowanie molekularne – optymalizacja techniki. Technologia RNAi i jej zastosowanie w badaniach biologicznych – 20.05.2014, Kraków, Organizator: ABO
14. Granty indywidualne w ramach działań Marii Skłodowskiej-Curie. Jak przygotować dobry wniosek? – 15.06.2015, Kraków, Organizator: Centrum Transferu Technologii Politechnika Krakowska
15. Szkolenie łączone dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń na zwierzętach – 19.09.2015-01.10.2015, Kraków, Organizator: PolLASA, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych
16. Dzień informacyjny Inicjatywy Leków Innowacyjnych – 29.02.2016, Warszawa, Organizator: Ministerstwo Zdrowia, Departament Nauki i Szkolnictwa Wyższego
17. Skuteczne Zarządzanie Projektem – 10-11.03.2016, Kraków, Organizator: UJCM, warsztaty finansowane ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego 2012-2017
18. Ekstrakcja i oczyszczanie białek – 20.04.2016, Kraków, Organizator: Merck Millipore

19. Kwas liponowy – od biochemii do farmakologii i terapii – 17.02.2017, Kraków, Organizator: Zakład Biochemii Ogólnej, Katedra Biochemii Lekarskiej UJCM
20. Nowe testy komórkowe w czasie rzeczywistym oraz analiza metabolizmu energetycznego – 29.03.2017, Kraków, Organizator: Promega
21. Optimize your RNA workflow-hints and pitfalls of RT-qPCR – 14.05.2018, Kraków, Organizator: Promega
22. Cell Culture, Stem Cells & Transfection – 15.05.2018, Kraków, Organizator: Thermo Fisher Scientific
23. Cell-based Assays – from basic principles and helpful tips & tricks to distinct applications – 27.05.2019, Kraków, Organizator: Promega
24. From cell seeding to analysis - Getting the best out of your cell-based assay – 15.04.2020, On-line, Organizator: Eppendorf
25. Cell-Based Assays - From Basic Principles to Distinct Applications– 05.05.2020, On-line, Organizator: Promega
26. Optimize your RNA workflow - hints and pitfalls of RT-qPCR – 20.05.2020, On-line, Organizator: Promega
27. Mikroskopia konfokalna w pigułce – działanie, aplikacje, innowacje – 30.04.2020, On-line, Organizator: KAWA.SKA
28. Prawo autorskie w działalności naukowej i dydaktycznej – 05.06.2020, On-line, ZintegrUJ
29. Cellular Metabolism – Rapid, Selective and Sensitive Detection of Metabolic Changes in Biological Samples – 17.06.2020, On-line, Organizator: Promega
30. Pisanie artykułów naukowych – 26.11.2020, On-line, Organizator: Regionalny Punkt Kontaktowy Centrum Transferu Technologii Politechnika Krakowska
31. 5 sposobów na dobry wniosek grantowy – 25.11.2020, On-line, Organizator: Regionalny Punkt Kontaktowy Centrum Transferu Technologii Politechnika Krakowska
32. Tworzenie prezentacji i wizerunek naukowca – 26.11.2020, On-line, Organizator: Regionalny Punkt Kontaktowy Centrum Transferu Technologii Politechnika Krakowska
33. Real-Time Live-Cell Imaging and Analysis for Drug Discovery – 16.02.2022, On-line, Organizator: Promega
34. Akademia Wystąpień Publicznych: Dykcja i impostacja głosu bez tajemnic – 05.04.2022, On-line, Organizator: Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości UJ
35. Efektywny self-management. Jak realistycznie zaplanować swoją pracę? – 12.04.2022, On-line, Organizator: Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości UJ
36. Good plastics- Bad plastics? Jak materiały eksploatacyjne mogą wpłynąć na wyniki badań – 19.12.2022, On-line, Organizator Eppendorf
37. Eosinophilic lung disease – 6-7.06.2023, Londyn, Organizator: European Respiratory Society

E. Moja dotychczasowa praca naukowo-dydaktyczna została nagrodzona w następujący sposób:

1. Stypendium Federation of European Biochemical Societies – udział w konferencjach w Spetses (Grecja, 2010), w Sewilli (Hiszpania, 2012), w Krakowie (2018), w Pradze (Czechy, 2019).
2. Nagroda Redaktor Naczelnej Polskiego Archiwum Medycyny Wewnętrznej za najlepszą studencką oryginalną pracę opublikowaną w 2012 roku – II miejsce.
3. Stypendium Young Scientist Forum – udział w spotkaniu młodych naukowców w Sankt Petersburgu w 2013 roku.
4. Nagroda za najlepszą prezentację w sesji Basic Science session podczas International Student Medical Congress, w Koszycach (Słowacja), w 2013 roku.
5. Stypendium naukowe Rektora UJ dla najlepszych doktorantów– w latach 2010 – 2013.
6. Stypendium projakościowe Rektora UJ – w latach 2010 – 2013.
7. Nagroda UJCM za osiągnięcia dydaktyczne i naukowe w 2014 roku.
8. Stypendium Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego – udział w 19-th International Medical Esperanto Congress w Budapeszcie w 2014 roku.
9. Wyróżnienie rozprawy doktorskiej w 2015 roku.
10. Stypendium programu Erasmus+ - udział w stażach dydaktycznych w 2016 i 2017 roku.
11. Stypendium European Respiratory Society Short-Term Fellowship w 2017 roku.
12. Nagroda UJCM za osiągnięcia naukowe i organizacyjne w 2017 roku.
13. Nagroda okolicznościowa z okazji święta Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2018 roku.
14. Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii: Naukowiec przyszłości w 2020 roku.
15. Stypendium European Respiratory Society – udział w szkoleniu w King's College of London w 2023 roku.

8. Piśmiennictwo

1. GINA *Gina Report 2023*; 2023;
2. Vos, T.; Lim, S.S.; Abbafati, C.; Abbas, K.M.; Abbasi, M.; Abbasifard, M.; Abbasi-Kangevari, M.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdelalim, A.; et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **2020**, 396, 1204–1222, doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9.

3. Saglani, S.; Lloyd, C.M. Novel concepts in airway inflammation and remodelling in asthma. *Eur. Respir. J.* **2015**, ERJ-01196-2014, doi:10.1183/13993003.01196-2014.
4. Bush, A. Pathophysiological Mechanisms of Asthma . *Front. Pediatr.* 2019, 7.
5. Hough, K.P.; Curtiss, M.L.; Blain, T.J.; Liu, R.-M.; Trevor, J.; Deshane, J.S.; Thannickal, V.J. Airway Remodeling in Asthma . *Front. Med.* 2020, 7, 191.
6. Salter, B.; Pray, C.; Radford, K.; Martin, J.G.; Nair, P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respir. Res.* **2017**, 18, 156, doi:10.1186/s12931-017-0640-8.
7. Michalik, M.; Wójcik-Pszczola, K.; Paw, M.; Wnuk, D.; Koczurkiewicz, P.; Sanak, M.; Płekala, E.; Madeja, Z. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, 75, 3943–3961, doi:10.1007/s00018-018-2899-4.
8. Halwani, R.; Al-Muhsen, S.; Al-Jahdali, H.; Hamid, Q. Role of Transforming Growth Factor- β in Airway Remodeling in Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, 44, 127–133, doi:10.1165/rcmb.2010-0027TR.
9. Calvén, J.; Ax, E.; Rådinger, M. The Airway Epithelium-A Central Player in Asthma Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 8907, doi:10.3390/ijms21238907.
10. Banno, A.; Reddy, A.T.; Lakshmi, S.P.; Reddy, R.C. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. *Clin. Sci.* **2020**, 134, 1063–1079, doi:10.1042/CS20191309.
11. Yap, H.M.; Israf, D.A.; Harith, H.H.; Tham, C.L.; Sulaiman, M.R. Crosstalk Between Signaling Pathways Involved in the Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Hyperplasia. *Front. Pharmacol.* **2019**, 10, 1148, doi:10.3389/fphar.2019.01148.
12. Li, L.; Zhang, W.; Qiu, C. Cellular sources of airway smooth muscle cells in asthmatic airway remodeling and their clinical relevance: a narrative review. *Ann. Transl. Med.* **2022**, 10, 838, doi:10.21037/atm-22-3219.
13. Jendzjowsky, N.G.; Kelly, M.M. The Role of Airway Myofibroblasts in Asthma. *Chest* **2019**, 156, 1254–1267, doi:10.1016/j.chest.2019.08.1917.
14. Boser, S.R.; Mauad, T.; Araújo-Paulino, B.B. de; Mitchell, I.; Shrestha, G.; Chiu, A.; Butt, J.; Kelly, M.M.; Caldini, E.; James, A.; et al. Myofibroblasts are increased in the lung parenchyma in asthma. *PLoS One* **2017**, 12, e0182378.
15. Calhoun, W.J.; Chupp, G.L. The new era of add-on asthma treatments: where do we stand? *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **2022**, 18, 42, doi:10.1186/s13223-022-00676-0.
16. Witt, A.; Douglass, J.A.; Harun, N.-S. Overview of recent advancements in asthma management. *Intern. Med. J.* **2022**, 52, 1478–1487, doi:https://doi.org/10.1111/imj.15904.
17. Volmer, T.; Effenberger, T.; Trautner, C.; Buhl, R. Consequences of long-term oral corticosteroid therapy and its side-effects in severe asthma in adults: a focused review of the impact data in the literature. *Eur. Respir. J.* **2018**, 52, 1800703, doi:10.1183/13993003.00703-2018.
18. Barnes, P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, 131, 636–645, doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1564.
19. Wadhwa, R.; Dua, K.; Adcock, I.M.; Horvat, J.C.; Kim, R.Y.; Hansbro, P.M. Cellular mechanisms underlying steroid-resistant asthma. *Eur. Respir. Rev.* **2019**, 28, 190096, doi:10.1183/16000617.0096-2019.
20. Berair, R.; Brightling, C.E. Asthma therapy and its effect on airway remodelling. *Drugs* **2014**, 74, 1345–1369, doi:10.1007/s40265-014-0250-4.
21. Prakash, Y.S.; Halayko, A.J.; Gosens, R.; Panettieri, R.A.; Camoretti-Mercado, B.; Penn, R.B. An Official American Thoracic Society Research Statement: Current Challenges Facing Research and Therapeutic Advances in Airway Remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, 195, e4–e19, doi:10.1164/rccm.201611-2248ST.
22. Huang, Y.; Qiu, C. Research advances in airway remodeling in asthma: a narrative review. *Ann. Transl.*

Med. Vol 10, No 18 (September 29, 2022) Ann. Transl. Med. 2022.

23. Durrani, S.R.; Viswanathan, R.K.; Busse, W.W. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 439–448, doi:10.1016/j.jaci.2011.06.002.
24. Nayak, A.P.; Deshpande, D.A.; Penn, R.B. New targets for resolution of airway remodeling in obstructive lung diseases. *F1000Research* **2018**, *7*, F1000 Faculty Rev-680, doi:10.12688/f1000research.14581.1.
25. Payne, D.N.R.; Rogers, A. V; Ädelroth, E.; Bandi, V.; Guntupalli, K.K.; Bush, A.; Jeffery, P.K. Early Thickening of the Reticular Basement Membrane in Children with Difficult Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *167*, 78–82, doi:10.1164/rccm.200205-414OC.
26. XUAN, W.E.I.; PEAT, J.K.; TOELLE, B.G.; MARKS, G.B.; BERRY, G.; WOOLCOCK, A.J. Lung Function Growth and Its Relation to Airway Hyperresponsiveness and Recent Wheeze. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1820–1824, doi:10.1164/ajrccm.161.6.9809118.
27. Bossley, C.J.; Fleming, L.; Gupta, A.; Regamey, N.; Frith, J.; Oates, T.; Tsartsali, L.; Lloyd, C.M.; Bush, A.; Saglani, S. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T_H2 cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *129*, 974-982.e13, doi:10.1016/j.jaci.2012.01.059.
28. Adatia, A.; Vliagoftis, H. Challenges in severe asthma: Do we need new drugs or new biomarkers? *Front. Med.* **2022**, *9*.
29. Dragonieri, S.; Carpagnano, G.E. Biological therapy for severe asthma. *Asthma Res. Pract.* **2021**, *7*, 12, doi:10.1186/s40733-021-00078-w.
30. Shah, P.A.; Brightling, C. Biologics for severe asthma—Which, when and why? *Respirology* **2023**, *n/a*, doi:https://doi.org/10.1111/resp.14520.
31. McGregor, M.C.; Krings, J.G.; Nair, P.; Castro, M. Role of Biologics in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *199*, 433–445, doi:10.1164/rccm.201810-1944CI.
32. Barnes, P.J. Theophylline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 901–906, doi:10.1164/rccm.201302-0388PP.
33. Oñatibia-Astibia, A.; Martínez-Pinilla, E.; Franco, R. The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. *Respir. Med.* **2016**, *112*, 1–9, doi:10.1016/j.rmed.2016.01.022.
34. Makino, S.; Fueki, M.; Fueki, N. Efficacy and safety of methylxanthines in the treatment of asthma. *Allergol. Int.* **2004**, *53*, 13–22, doi:https://doi.org/10.1046/j.1440-1592.2003.00306.x.
35. Mahemuti, G.; Zhang, H.; Li, J.; Tielwaerdi, N.; Ren, L. Efficacy and side effects of intravenous theophylline in acute asthma: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 99–120, doi:10.2147/DDDT.S156509.
36. Maurice, D.H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V.C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 290–314, doi:10.1038/nrd4228.
37. Zuo, H.; Cattani-Cavaleri, I.; Musheshe, N.; Nikolaev, V.O.; Schmidt, M. Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *197*, 225–242, doi:https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.002.
38. Page, C.P. Phosphodiesterase Inhibitors for the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2014**, *165*, 152–164, doi:10.1159/000368800.
39. Insel, P.A.; Murray, F.; Yokoyama, U.; Romano, S.; Yun, H.; Brown, L.; Snead, A.; Lu, D.; Aroonsakool, N. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 447–456, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x.
40. Billington, C.K.; Ojo, O.O.; Penn, R.B.; Ito, S.; Pharmacol, P.; Author, T. cAMP Regulation of Airway Smooth Muscle Function. *Pulm Pharmacol Ther* **2013**, *26*, 112–120, doi:10.1016/j.pupt.2012.05.007.
41. Cazzola, M.; Calzetta, L.; Barnes, P.J.; Criner, G.J.; Martinez, F.J.; Papi, A.; Gabriella Matera, M. Efficacy and safety profile of xanthines in COPD: a network meta-analysis. *Eur. Respir. Rev. an Off. J.*

- Eur. Respir. Soc.* **2018**, 27, doi:10.1183/16000617.0010-2018.
42. Matera, M.G.; Ora, J.; Cavalli, F.; Rogliani, P.; Cazzola, M. New Avenues for Phosphodiesterase Inhibitors in Asthma. *J. Exp. Pharmacol.* **2021**, 13, 291–302, doi:10.2147/JEP.S242961.
 43. Bondarev, A.D.; Attwood, M.M.; Jonsson, J.; Chubarev, V.N.; Tarasov, V. V; Liu, W.; Schiöth, H.B. Recent developments of phosphodiesterase inhibitors: Clinical trials, emerging indications and novel molecules . *Front. Pharmacol.* 2022, 13.
 44. Crocetti, L.; Floresta, G.; Cilibrizzi, A.; Giovannoni, M.P. An Overview of PDE4 Inhibitors in Clinical Trials: 2010 to Early 2022. *Molecules* **2022**, 27, doi:10.3390/molecules27154964.
 45. Naseem, S.; Hassan, M.; Akhtar, S.N.; Syed, F.; Khan, N.U.; Usman, M. Effectiveness of Roflumilast in Treating Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus* **2022**, 14, e22843, doi:10.7759/cureus.22843.
 46. Chłóń-Rzepa, G.; Jankowska, A.; Ślusarczyk, M.; Świerczek, A.; Pocięcha, K.; Wyska, E.; Bucki, A.; Gawalska, A.; Kołaczkowski, M.; Pawłowski, M. Novel butanehydrazide derivatives of purine-2,6-dione as dual PDE4/7 inhibitors with potential anti-inflammatory activity: Design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 146, 381–394, doi:10.1016/J.EJMECH.2018.01.068.
 47. Chłóń-Rzepa, G.; Ślusarczyk, M.; Jankowska, A.; Gawalska, A.; Bucki, A.; Kołaczkowski, M.; Świerczek, A.; Pocięcha, K.; Wyska, E.; Zygmunt, M.; et al. Novel amide derivatives of 1,3-dimethyl-2,6-dioxopurin-7-yl-alkylcarboxylic acids as multifunctional TRPA1 antagonists and PDE4/7 inhibitors: A new approach for the treatment of pain. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 517–533, doi:10.1016/J.EJMECH.2018.09.021.
 48. Wójcik-Pszczola, K.; Hińcza, K.; Wnuk, D.; Kądziołka, D.; Koczurkiewicz, P.; Sanak, M.; Madeja, Z.; Pękala, E.; Michalik, M. Pentoxifylline and its active metabolite lisofylline attenuate transforming growth factor β 1-induced asthmatic bronchial fibroblast-to-myofibroblast transition. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, 63, 437–442, doi:10.18388/abp.2016_1357.
 49. Wojcik-Pszczola, K.; Hincza, K.; Wnuk, D.; Kadziolka, D.; Koczurkiewicz, P.; Sanak, M.; Madeja, Z.; Pekala, E.; Michalik, M. Pentoxifylline and its active metabolite lisofylline attenuate transforming growth factor beta1-induced asthmatic bronchial fibroblast-to-myofibroblast transition. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, 63, 437–442, doi:10.18388/abp.2016_1357.
 50. Świerczek, A.; Wyska, E.; Baś, S.; Woźciechowska, M.; Mlynarski, J. PK/PD studies on non-selective PDE inhibitors in rats using cAMP as a marker of pharmacological response. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2017**, 390, 1047–1059, doi:10.1007/s00210-017-1406-z.
 51. Yano, Y.; Yoshida, M.; Hoshino, S.; Inoue, K.; Kida, H.; Yanagita, M.; Takimoto, T.; Hirata, H.; Kijima, T.; Kumagai, T.; et al. Anti-fibrotic effects of theophylline on lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 341, 684–690, doi:10.1016/J.BBRC.2006.01.018.
 52. Wen, A.Y.; Sakamoto, K.M.; Miller, L.S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* **2010**, 185, 6413–6419, doi:10.4049/jimmunol.1001829.
 53. Wang, X.; Ni, L.; Chang, D.; Lu, H.; Jiang, Y.; Kim, B.-S.; Wang, A.; Liu, X.; Zhong, B.; Yang, X.; et al. Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB) is Critical in Autoimmunity by Promoting Th17 but Inhibiting Treg Cell Differentiation. *EBioMedicine* **2017**, 25, 165–174, doi:https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.010.
 54. Kubiak, A.; Zieliński, T.; Pabijan, J.; Lekka, M. Nanomechanics in Monitoring the Effectiveness of Drugs Targeting the Cancer Cell Cytoskeleton. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21.



.....
(podpis wnioskodawcy)