

Zakład Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr n. farm. Ewa Karna

Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie nauk farmaceutycznych

Załącznik 2

Autoreferat

Białystok 2012

INFORMACJE O EDUKACJI, POSIADANE DYPLOMY

I STOPNIE NAUKOWE

1. Imię i nazwisko: Ewa Karna

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:

dyplom i tytuł magistra analityki medycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, Wydziału Farmaceutyczny, 1988,

dyplom i stopień doktora nauk farmaceutycznych, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach, Wydział Farmaceutyczny, 1999, uzyskany na podstawie rozprawy pt. *„Prolidaza i farmakologiczna regulacja jej aktywności w gruczołakorakach płuca ludzkiego”* wykonanej pod kierunkiem kierownika Zakładu Chemii i Analizy Leków, Akademii Medycznej w Białymstoku, Prof. Jerzego Pałki.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1989-1991 asystent w laboratorium Kliniki Endokrynologii Państwowego Szpitala Klinicznego w Białymstoku,

1994-2003 asystent w Zakładzie Chemii i Analizy Leków, Akademii Medycznej w Białymstoku,

2001-2002 stypendium naukowe w Center for Cell Biology and Cancer Research, Albany Medical College, NY, USA,

od 2003 adiunkt w Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz.595 ze zm.):

a) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

I. **Karna E.,** Miltyk W., Pałka J.A.: Butyrate-induced collagen biosynthesis in cultured fibroblasts is independent on alpha2beta1 integrin signalling and undergoes through IGF-I receptor cascade.

Mol Cell Biochem. 2006; 286: 147-152.

IF=1,862

Udział własny: wykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

II. **Karna E.,** Pałka J.A.: Phosphoenolpyruvate-dependent inhibition of collagen biosynthesis, alpha2beta1 integrin and IGF-I receptor signaling in cultured fibroblasts.

Mol Cell Biochem. 2008; 315: 61-67.

IF=1,764

Udział własny: koncepcja pracy, projektowanie i wykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

III. **Karna E.,** Miltyk W, Surażyński A, Pałka J.A.: Protective effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of beta1-integrin and insulin-like growth factor-I receptor signaling and collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes.

Mol Cell Biochem. 2008; 308: 57-64.

IF=1,764

Udział własny: współwykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

IV. **Karna E.,** Pałka J.A.: Mechanism of betulinic acid inhibition of collagen biosynthesis in human endometrial adenocarcinoma cells.

Neoplasma 2009; 56: 361-366.

IF=1,192

Udział własny: koncepcja pracy, projektowanie badań, wykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

- V. **Karna E.**, Szoka Ł, Pałka J.A.: Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells.

Mol Cell Biochem. 2010; 340: 15-20.

IF=2,168

Udział własny: koncepcja pracy, projektowanie badań, współwykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

- VI. **Karna E.**, Szoka Ł, Pałka J.A.: Captopril-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured fibroblasts.

Pharmazie 2010; 65: 1-4.

IF=0,869

Udział własny: koncepcja pracy, projektowanie badań, współwykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

- VII. **Karna E.**, Szoka Ł., Pałka J.: Thrombin-dependent modulation of β 1-integrin-mediated signaling up-regulates prolidase and HIF-1 α through p-FAK in colorectal cancer cells.

Mol Cell Biochem. 2012; 361: 235-41.

IF=2,168

Udział własny: koncepcja pracy, projektowanie badań, współwykonanie i opracowanie wyników badań, przygotowanie piśmiennictwa, udział w przygotowaniu pracy do druku.

Impact factor podano na podstawie danych z 2010 roku; (IF=11,787)

- b) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Kolagen stanowiący 1/3 wszystkich białek organizmu jest nie tylko podstawowym białkiem strukturalnym tkanki łącznej. Jako ligand receptorów integrzynowych indukuje szlaki sygnałowe, stanowiące ważny mechanizm regulacji ekspresji genów, różnicowania oraz wzrostu komórek. Głównym receptorem kolagenu jest integryna $\alpha_2\beta_1$. Jej aktywacja po połączeniu z ligandem np. kolagenem zapoczątkowuje kaskadę przekaźnictwa sygnału poprzez kinazę FAK (focal adhesion kinase), interakcję z kinazami Src, Shc, następnie z białkiem adaptorowym Grb-2. Białko to (Grb-2) posiada obszary SH2, które warunkują wiązanie z bogatymi w prolinę domenami białka SOS (będącym białkiem wymieniającym nukleotydy guanidynowe), co powoduje translokację białka SOS do błony komórkowej i połączenie z białkiem Ras. Uaktywnione w ten sposób białko Ras łączy się z białkiem Raf, które włącza kaskadę MAPK. Końcowym etapem szlaku sygnałowego zainicjowanego przez pobudzony receptor integrzynowy jest fosforylacja dwóch MAP kinaz ERK1 i ERK2. Zakłócenie interakcji pomiędzy kolagenem a receptorem integrzynowym prowadzi do zaburzeń metabolicznych w komórce. Z tego względu zakłócenie biosyntezy kolagenu może mieć ważny wpływ na metabolizm komórki.

Mechanizm zaburzeń metabolizmu kolagenu, w przebiegu wielu chorób nie jest do końca poznany, dlatego poszukiwałam zarówno induktorów, jak i inhibitorów biosyntezy kolagenu. W regulację tego procesu zaangażowanych jest wiele czynników endogennych, zwłaszcza ligandy receptorów czynników wzrostowych i receptorów adhezyjnych.

Jednym z czynników endogennych jest maślan – produkt fermentacji powstający w jelicie grubym, modulujący wzrost, różnicowanie oraz przeżywalność komórek nowotworowych. Jego rola jest szczególnie ważna w indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Mechanizm apoptozy wywołanej przez ten związek, w komórkach raka jelita grubego polega na osłabieniu funkcji receptora $\alpha_2\beta_1$ integrzynowego, który jest głównym receptorem kolagenu. Wcześniejsze doniesienia wykazały, że podjednostka β_1 receptora integrzynowego uczestniczy w regulacji biosyntezy kolagenu poprzez regulację aktywności i ekspresji prolidazy.

Prolidaza (E.C. 3.4.13.9) jest cytoplazmatyczną egzopeptydazą powszechnie występującą w tkankach organizmów zwierzęcych. Enzym ten katalizuje hydrolizę dipeptydów, zawierających w pozycji C-końcowej prolinę lub hydroksyprolinę. Substratem tego enzymu są imidodipeptydy pochodzące z wewnątrzkomórkowej degradacji białek endogennych, zwłaszcza kolagenu i prokolagenu a także białek egzogennych - białek diety zawierających prolinę lub hydroksyprolinę. Wewnątrzkomórkowa, cytoplazmatyczna lokalizacja tej egzopeptydazy oraz jej niezwykła specyficzność substratowa sugerują, że może ona pełnić ważną regulacyjną funkcję w metabolizmie białek zawierających prolinę lub hydroksyprolinę. Przyjmuje się, że biologiczna rola tego enzymu polega na odzyskaniu L-proliny z imidodipeptydów do resyntezy kolagenu. Wrodzony niedobór prolidazy zakłóca bowiem metabolizm tkanki łącznej, zwłaszcza podstawowego jej składnika - kolagenu. Biosyntezę kolagenu pobudza również insulino podobny czynnik wzrostowy (IGF-I) za pośrednictwem receptora IGF-IR. Wyszłam hipotezę, że maślan indukuje obniżenie funkcji receptora integrynowego β_1 przyczyniając się do zaburzeń biosyntezy kolagenu poprzez mechanizm hamowania aktywności oraz ekspresji prolidazy. Jednakże wykazałam, iż w fibroblastach, maślan pobudza biosyntezę kolagenu i aktywność prolidazy, niezależnie od sygnału indukowanego przez receptor $\alpha_2\beta_1$ integrynowy. Mechanizm jego działania zachodzi poprzez szlak sygnałowy generowany przez receptor IGF-IR. Podwyższonej ekspresji IGF-IR towarzyszy wzrost ekspresji białek Sos oraz MAP-kinaz. Uzyskane wyniki wyjaśniają mechanizm działania maślanu na biosyntezę kolagenu w fibroblastach. Wiedza w tym zakresie może przyczynić się do zastosowania nowych strategii w farmakoterapii schorzeń którym towarzyszy upośledzenie biosyntezy kolagenu [1].

Inhibitorem prolidazy „in vitro” jest fosfoenolpirogonian. Powstaje on w organizmie w procesie glukoneogenezy. Produktem glikolizy jest pirogonian, który najpierw ulega przemianie do szczawiooctanu pod wpływem karboksylazy pirogonianowej, a następnie do fosfoenolpirogonianu (PEP) pod wpływem karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej. W przebiegu procesów katabolicznych np. podczas głodzenia, następuje stymulacja aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej, a pod wpływem stymulacji anabolicznej, np. insuliną w wielu komórkach następuje zahamowanie aktywności tego enzymu. PEP ulega przekształceniu w pirogonian pod wpływem kinazy pirogonianowej (PK), z

utworzeniem cząsteczki ATP. Jest to reakcja nieodwracalna. PK jest silnie hamowana przez nieorganiczne fosforany, które zużywane są do syntezy ATP, obniżonej w procesach głodzenia. Stężenie PEP rośnie więc w tkankach zwierząt głodzonych, w tym również w skórze, wykazującej obniżoną aktywność prolidazy, a procesowi temu towarzyszy obniżona biosynteza kolagenu. Obniżona aktywność PK spowalnia przemianę PEP do pirogronianu, co skutkuje kumulacją PEP w komórkach syntetyzujących kolagen. Podwyższone stężenie PEP może hamować wewnątrzkomórkową aktywność prolidazy. Podjęłam próbę wyjaśnienia mechanizmu tego zjawiska.

W toku przeprowadzonych badań wykazałam, że PEP hamuje biosyntezę kolagenu w fibroblastach. Mechanizm tego działania polega na obniżeniu ekspresji receptora integrynowego $\alpha_2\beta_1$ (receptora kolagenu typu I) oraz receptora IGF-I i w następstwie obniżeniu aktywności prolidazy [II]. Znaczenie zależnej od PEP regulacji aktywności prolidazy może być niezwykle ważne nie tylko w regulacji biosyntezy kolagenu, ale również w funkcjonowaniu OUN. W wielu przypadkach, wrodzonemu niedoborowi prolidazy towarzyszy również upośledzenie umysłowe. Może ono wynikać z obniżenia stężenia L-proliny w OUN. Wiadomo bowiem, że L-prolina odgrywa ważną rolę w pobudzaniu neuronów glutaminergicznych. Prawdopodobnie w procesie tym największą rolę mogłaby odgrywać prolidaza erytrocytów. Wiadomo, że imidodipeptydy (np: glicylo-L-prolina) wykazują zdolność do penetracji erytrocytów, gdzie pod wpływem prolidazy ulegają degradacji do wolnych aminokwasów. Z uwagi na fakt, że erytrocyty nie zużytkowują aminokwasów do własnych procesów życiowych, można przypuszczać, że przy współudziale prolidazy biorą one czynny udział w sekrecji aminokwasów, pochodzących z hydrolizy imidodipeptydów. Niedobór prolidazy obniża stężenie L-proliny w krążeniu, co może zakłócać wyżej wspomnianą funkcję neuronów glutaminergicznych. Istnieją doniesienia sugerujące, że zahamowanie aktywności kinazy pirogronianowej mózgu, katalizującej przekształcenie fosfoenolopirogronianu w pirogronian, obserwowane w mózgu pacjentów z fenyloketonurią może być powiązane z obniżonym metabolizmem glukozy. Może to być jeden z mechanizmów wyjaśniających zaburzenia neurologiczne występujące u tych pacjentów. Aktualnie, mechanizm tego zjawiska stanowi przedmiot moich dalszych planów badawczych.

Zaburzenia metabolizmu kolagenu mają miejsce również w przebiegu zapalenia, a jednym z czynników prozapalnych jest interleukina-1 (IL-1), ważna w patogenezie zapalenia stawów. Traktowanie chondrocytów IL-1 β stanowi model doświadczalnego zapalenia. IL-1 pobudza degradację składników chrząstki, hamując syntezę kolagenu i stymulując aktywność metaloproteinaz w chondrocytach. Jej rola w destrukcji stawów jest dobrze opisana. Pomimo opracowania wielu farmakologicznych procedur leczenia tej choroby, żadna nie jest do końca skuteczna w regeneracji chrząstki.

Czynnikiem endogennym, którego zawartość ulega obniżeniu w procesie starzenia wielu tkanek i narządów jest kwas hialuronowy (HA). Udowodniono klinicznie, że dostawowe podawanie HA łagodzi objawy reumatoidalnego zapalenia stawów. Wiadomo, że HA odgrywa ważną rolę w „smarowaniu stawów” i zapobiega ich degradacji, może także wpływać na metabolizm chondrocytów poprzez przekazanie sygnałowe biegnące od receptorów HA, takich jak CD44 i RHAMM. Pomimo, że HA od ponad 30 lat jest stosowany w farmakoterapii zapalenia stawów, mechanizm jego protekcyjnego działania w zaburzeniach metabolizmu kolagenu, wywołanych przez zapalenie nie jest znany. Z tego względu kolejne badania poświęciłam ocenie mechanizmu protekcyjnego działania HA na zaburzenia metabolizmu kolagenu w hodowli chondrocytów poddanych działaniu IL-1 β . Zaburzenia metabolizmu kolagenu wywołane tą interleukiną oceniano poprzez pomiar biosyntezy kolagenu oraz aktywność enzymów degradujących kolagen (MMP-2 i MMP-9, prolidaza). Badaniem objęto również ekspresję receptorów HA (CD44 i RHAMM), receptora IGF-I i receptora β 1-integrinowego a także ekspresję białek szlaków sygnałowych indukowanych przez te receptory (FAK, Grb2, Sos, ERK1/ERK2, Akt, p38 MAP, NF- κ B). W toku przeprowadzonych badań wykazałam, że IL-1 β silnie hamuje biosyntezę kolagenu w chondrocytach, a kwas hialuronowy (HA) znosi hamujący wpływ IL-1 β na ten proces. Stwierdzono, że mechanizm tego zjawiska ma miejsce na poziomach transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Wykazano, że IL-1 β upośledza biosyntezę kolagenu poprzez hamowanie ekspresji mRNA podjednostek kolagenu typu II [praca 19] oraz pobudza degradację kolagenu poprzez indukcję aktywności MMP-2 i MMP-9 [III]. Mechanizm tego procesu obejmuje indukcję ekspresji receptora β 1-integrinowego, kinazy FAK i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz hamowanie ekspresji receptora IGF-I i fosforylacji białek Akt i p38MAP [III]. Wszystkie zakłócenia opisanych procesów uległy normalizacji pod wpływem HA [prace 16, III]. Przedstawione badania wykazały, że

protekcjne działanie HA na zaburzenia metabolizmu kolagenu chondrocytów w przebiegu doświadczalnego zapalenia zachodzi na poziomie szlaków sygnałowych transmitowanych przez receptor IGF-I i receptor β 1-integryny [prace 16, III]. Przeprowadzone badania sugerują, że niektóre białka szlaku integrynowego (np. NF- κ B) mogą stanowić punkt uchwytu nowoczesnych strategii zapobiegania destrukcji chrząstki w przebiegu zapalenia [III].

Terapii wieloma lekami towarzyszą zaburzenia dermatologiczne, prawdopodobnie związane z zaburzeniem metabolizmu kolagenu i procesu angiogenezy. Jednym z tych leków jest kaptopril. Budowa tego leku jest podobna do dipeptydów zawierających L-prolinę w pozycji C-końcowej. Dipeptydy o takiej budowie są substratami prolidazy odgrywającej ważną rolę w odzyskiwaniu proliny do biosyntezy kolagenu. Zaburzenia aktywności tego enzymu utrudniają więc odzyskiwanie proliny z produktów degradacji kolagenu.

Wykazałam, że aktywność prolidazy w fibroblastach skóry ludzkiej jest hamowana przez kaptopril. Prolidaza pełni jednocześnie funkcję enzymu katabolicznego, (zaangażowanego w degradację imidodipeptydów pochodzących z rozpadu kolagenu) oraz enzymu anabolicznego (odgrywającego ważną rolę w reutilizacji proliny do procesu biosyntezy kolagenu i wzrostu komórek). Działanie tego enzymu zapewnia zatem równowagę pomiędzy procesami katabolicznymi i anabolicznymi.

Wrodzony niedobór prolidazy zakłóca metabolizm tkanki łącznej, zwłaszcza podstawowego jej składnika - kolagenu. Objawem klinicznym tego schorzenia jest między innymi owrzodzenie podudzi. Patogeneza zmian skórnych we wrodzonym niedoborze prolidazy nie jest znana. Przypuszcza się, że u jej podstaw leży zaburzenie regulacji biosyntezy i degradacji kolagenu, w którym to procesie olbrzymią rolę odgrywają imidodipeptydy, zwłaszcza glicylo-L-prolina.

Wykazałam, że mechanizm działania kaptoprilu polega na obniżeniu ekspresji integryny $\alpha_2\beta_1$ (receptora kolagenu typu I) oraz receptora IGF-I. Szlaki sygnałowe generowane przez podjednostkę integrynową β_1 oraz receptor IGF-I stymulują aktywność prolidazy, więc obniżenie ich ekspresji wpływa obniżająco na aktywność tego enzymu oraz biosyntezę kolagenu [praca VI].

Jedną z konsekwencji transformacji nowotworowej komórek są zaburzenia biosyntezy niektórych białek macierzy pozakomórkowej, głównie fibronektyny i kolagenu typu I. Wiadomo, że interakcje pomiędzy komórkami i białkami macierzy

pozakomórkowej, (np. kolagenem), mogą regulować nie tylko ekspresję genów i różnicowanie, ale również odgrywać ważną rolę w inwazyjności i wzroście guza. Interakcje te zachodzą za pośrednictwem integryn uczestniczących w migracji, proliferacji, progresji i przeżyciu komórek nowotworowych. $\alpha_2\beta_1$ integryna odgrywa ważną rolę w procesie migracji komórek i przerzutów nowotworowych. Aktywacja tego głównego receptora kolagenu zapoczątkowuje kaskadę przekazywania sygnału, którego końcowym etapem jest fosforylacja dwóch MAP kinaz ERK1 i ERK2, i aktywacja niektórych czynników transkrypcyjnych. Szlaki sygnałowe aktywowane przez pobudzony receptor IGF-I odgrywają również ważną rolę w karcinogenezie i progresji nowotworów.

Wspólną cechą większości komórek nowotworowych jest ich zwiększona zdolność do biosyntezy i sekrecji proteaz. Zjawisko to ułatwia komórkom nowotworowym penetrację błon podstawnych i macierzy pozakomórkowej (ECM). Z tego względu progresja nowotworu zależy od degradacji głównego ich składnika, kolagenu, a także innych białek ECM. Jakkolwiek degradację kolagenu zapoczątkowują kolagenazy tkankowe, to końcowy etap tego procesu katalizuje prolidaza. Z powyższego względu podjęto badania dotyczące roli prolidazy w patogenezie zaburzeń metabolicznych w komórkach nowotworowych.

Wysoką cytotoksyczność względem wielu typów komórek nowotworowych wykazuje naturalny triterpen - kwas betulinowy (KB). Wywołuje on apoptozę ludzkich komórek nowotworowych, wywodzących się z różnych tkanek: płuc, jajnika, szyjki macicy, prostaty, szyi i głowy. Indukcja apoptozy odbywa się niezależnie od udziału genu 53 oraz receptora CD95 w tym procesie. Wiadomo, że KB zaburza metabolizm energetyczny, pobudza powstawanie wolnych rodników, hamuje topoizomerazę I, aktywuje kaskadę MAP kinaz i moduluje czynniki transkrypcyjne.

Szczególne zainteresowanie budzi zdolność KB do hamowania procesu angiogenezy. Mechanizm jego działania w tym zakresie był jednak opisany tylko w odniesieniu do raka prostaty, gdzie związek ten obniża ekspresję czynnika wzrostu komórek śródbłonna (VEGF). Wiadomo również, że kwas betulinowy hamuje in vitro aktywność N-aminopeptydazy, odgrywającej ważną rolę w angiogenezie.

Wykazałam, że kwas betulinowy posiada potencjalne właściwości przeciwnowotworowe również w stosunku do komórek raka endometrium linii Ishikawa. Związek ten okazał się efektywnie działającym inhibitorem podziałów komórkowych, a

także biosyntezy kolagenu oraz ekspresji prolidazy, receptora integrynowego α_2 , receptora IGF-I a także białek zaangażowanych w przekaźnictwo sygnału (FAK, Grb2, SOS, ERK1, ERK2). Kwas betulinowy stymulował natomiast ekspresję czynnika jądrowego NF- κ B. W świetle przeprowadzonych badań, stwierdziłam, że hamowanie biosyntezy kolagenu jest następstwem zaburzeń przekaźnictwa sygnału indukowanego przez receptor IGF-I. Wykazałam, że towarzyszy temu procesowi stymulacja NF- κ B – potencjalnego inhibitora ekspresji genów kolagenu, a także obniżenie ekspresji podjednostki α_2 receptora integrynowego [praca 26]. Przeprowadzone badania sugerują, że kwas betulinowy wpływa na kaskadę przekaźnictwa sygnału białek zaangażowanych w proces nowotworowy, co stwarza nadzieję na zastosowanie jego pochodnych w farmakoterapii schorzeń u podłoża których leży patologiczny rozrost komórek endometrium (IV).

Omawiany szlak sygnałowy indukowany przez receptor β_1 integrynowy jest odpowiedzialny za aktywność prolidazy, która może odgrywać ważną rolę w procesie angiogenezy. Wiadomo bowiem, że genetycznie uwarunkowanemu niedoborowi prolidazy towarzyszy opóźnienie gojenia ran w następstwie angiopatii.

Proces angiogenezy indukowany jest przez jeden z czynników transkrypcyjnych, HIF-1 (hypoxia-inducible factor). Pobudza on ekspresję genu kodującego VEGF (vascular endothelial growth factor), którego ekspresja koreluje z procesem angiogenezy i przynajmniej w przypadku niektórych nowotworów (np. rak żołądka) stanowi czynnik prognostyczny.

Wykazałam, że kwas betulinowy hamując HIF-1 α może obniżyć ekspresję białek zaangażowanych w progresję nowotworu. Związek ten wywiera właściwości przeciwnowotworowe poprzez hamowanie biosyntezy kolagenu oraz ekspresji prolidazy, podjednostek integrynowych α_1 i α_2 , poprzez które kolagen wiąże się ze swoimi głównymi receptorami: integrynami $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_2\beta_1$. Dane literaturowe wskazują, że ekspresja wspomnianych integryn pobudzana przez VEGF, koreluje z procesem angiogenezy, ponieważ zablokowanie ich przeciwciałami hamuje proces angiogenezy in vivo.

W świetle moich badań kwas betulinowy okazał się efektywnie działającym inhibitorem ekspresji HIF-1 i VEGF w badanych komórkach i może być rozważany jako potencjalny antyangiogeny czynnik terapeutyczny w niekontrolowanym rozroście komórek endometrialnych i raku endometrium [V].

Bezpośrednim białkiem aktywowanym przez pobudzony receptor β_1 integrynowy jest FAK, niereceptorowa kinaza białkowa o aktywności kinazy tyrozynowej. W następstwie pobudzenia receptora integrynowego kinaza FAK ulega fosforylacji. Odgrywa ona ważną rolę w przekazywaniu sygnału w komórce i modulacji takich procesów jak wzrost, różnicowanie, migracja, przeżycie, zapalenie i nowotworzenie. Jej ekspresja ulega zmianie w zaawansowanych stadiach wielu nowotworów oraz koreluje ze zdolnością komórek nowotworowych do rozprzestrzeniania się i progresji nowotworu do fenotypu złośliwego. Zahamowanie sygnału indukowanego przez FAK powoduje upośledzenie produkcji czynników pobudzających angiogenezę i inwazyjność [VII].

W kolejnych badaniach oceniłam rolę modulatorów receptora β_1 integrynowego (echistatyny i trombiny) w regulacji ekspresji prolidazy, p-FAK i HIF-1 α w komórkach raka okrężnicy. Wykazałam, że trombina przyczynia się do obniżenia ekspresji prolidazy i jednoczesnego nasilenia jej fosforylacji, pozwalając na utrzymanie wysokiej aktywności tego enzymu. Zjawisku temu towarzyszyło przywrócenie przez trombinę, upośledzonej przez inhibitor FAK (1,2,4,5-tetrahydrochlorek benzeno-tetraminy) autofosforylacji FAK (pY³⁹⁷). Jakkolwiek ekspresja receptora integrynowego $\alpha_2\beta_1$ nie uległa zmianie pod wpływem trombiny, to jednak sygnał indukowany przez ten receptor (pod wpływem trombiny) przyczynił się do wzrostu ekspresji jądrowego HIF-1 α oraz MAPK, ERK₁ i ERK₂ [VII]. Przedstawione badania sugerują, że szlak sygnałowy indukowany przez receptor integrynowy $\alpha_2\beta_1$ jest nasilony w komórkach raka okrężnicy i może stanowić punkt uchwytu potencjalnej terapii przeciwnowotworowej. Może ona obejmować blokowanie receptora integrynowego β_1 , hamowanie autofosforylacji FAK, hamowanie aktywności prolidazy bądź bezpośrednio hamowanie aktywacji HIF-1 α [VII].

Biorąc pod uwagę złożoność procesów biochemicznych w których bierze udział prolidaza, celem mojej pracy naukowej była ocena jej udziału w eksperymentalnych zaburzeniach metabolicznych komórek, w których dotychczas rola tego enzymu nie była uwzględniana. W przedstawionym powyżej cyklu prac dokonano oceny roli prolidazy w regulacji metabolizmu kolagenu oraz oceniono wpływ czynników farmakologicznych na aktywność tego enzymu i metabolizm kolagenu, a także oceniono nieopisaną dotychczas rolę prolidazy w mechanizmie zaburzeń metabolicznych w przebiegu procesu nowotworowego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Mój dorobek naukowy stanowią 33 prace oryginalne, 1 praca pogładowa (IF-39,775, MNiSW-379, liczba cytowań-182, indeks Hirscha-9), 2 skrypty i 21 streszczeń naukowych. Pełniłam funkcję recenzenta czasopisma The American Journal of the Medical Sciences – IF 1,257.

W mojej dotychczasowej działalności naukowej mogę wyróżnić następujące kierunki badań:

A. Badania dotyczące endogennej (hormonalnej) regulacji metabolizmu kolagenu ze szczególnym uwzględnieniem roli prolidazy:

-opublikowane prace oryginalne: nr prac 2, 3, 6, 7, 10, 20, 24, 25, 27

-komunikaty zjazdowe: nr 4, 6, 9, 10, 13, 14, 15

B. Badania dotyczące wpływu czynników farmakologicznych na aktywność prolidazy i metabolizm kolagenu:

-opublikowane prace oryginalne: nr prac 1, 9, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 29, 31

-komunikaty zjazdowe: nr 8, 11, 18

C. Badania dotyczące roli prolidazy w patogenezie chorób, a w szczególności w przebiegu procesu nowotworowego:

-opublikowane prace oryginalne: nr prac 4, 5, 8, 11, 12, 14, 15, 26, 28, 32

-komunikaty zjazdowe: nr 5, 7, 16, 19, 20

D. Inne:

-opublikowane prace oryginalne: nr prac 21, 30, 33

-komunikaty zjazdowe: nr 1, 2, 3, 12, 17

Ad. A

Wewnątrzkomórkowa, cytoplazmatyczna lokalizacja Prolidazy (E.C. 3.4.13.9) oraz jej niezwykła specyficzność substratowa sugerują, że może ona pełnić ważną regulacyjną funkcję w metabolizmie białek zawierających prolinę lub hydroksyprolinę. Przyjmuje się, że biologiczna rola tego enzymu polega na odzyskaniu L-proliny z imidodipeptydów do resyntezy kolagenu. Wrodzony niedobór prolidazy zakłóca bowiem metabolizm tkanki łącznej, zwłaszcza podstawowego jej składnika - kolagenu.

Nasunęło to przypuszczenie, że regulacja aktywności prolidazy może stanowić ważny mechanizm regulacji metabolizmu kolagenu.

W związku z powyższym podjęto próbę oceny wpływu czynników endogennych (hormonalnych) oraz mechanizmów ich działania na aktywność prolidazy. Stwierdzono, że w przebiegu doświadczalnego starzenia fibroblastów skóry ludzkiej w warunkach *in vitro*, obniżonej aktywności prolidazy towarzyszyło obniżenie zawartości kolagenu, związane ze zmniejszoną liczbą komórek i upośledzoną ich zdolnością do biosyntezy kolagenu. Przedstawiłam dowody, że obniżenie podziałów komórkowych i zawartości kolagenu w skórze w przebiegu starzenia jest wynikiem upośledzenia aktywności i ekspresji prolidazy [komunikat 4; prace 2,24]. Wykazałam ponadto, że aktywność prolidazy w fibroblastach może odzwierciedlać ich zdolności chemotaktyczne i wysunęłam sugestię, iż mechanizm migracji tych komórek związany jest z transportem enzymów lizosomalnych, prawdopodobnie za pośrednictwem receptora IGF-II/mannoza-6-fosforanu [praca 3]. Wykazano, że wśród czynników regulujących aktywność prolidazy w hodowlach fibroblastów skóry ludzkiej ważną rolę odgrywają telopeptydy - produkty degradacji kolagenu typu I. Prawdopodobnie regulacja tego procesu ma miejsce na etapach potranslacyjnych [komunikat 6; praca 6]. Wykazano ponadto, że insulino podobny czynnik wzrostowy I (IGF-I), induktor biosyntezy kolagenu pobudza aktywność prolidazy w fibroblastach skóry ludzkiej [7]. Ważnym stymulatorem biosyntezy kolagenu jest również glutamina. Wyjaśniono, iż mechanizm jej wpływu na ten proces odbywa się za pośrednictwem kwasu pirolino-5-karboksylowego (P5C) [komunikat 9; praca 10].

Ad. B

Kolejny cykl prac dotyczy oceny mechanizmów działania czynników farmakologicznych na aktywność prolidazy i metabolizm kolagenu. W toku tych badań wykazano, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zaburzają metabolizm kolagenu poprzez hamowanie aktywności prolidazy w komórkach syntetyzujących kolagen [praca 1]. Przedstawiono prawdopodobny mechanizm hamującego działania doxycykliny na proces biosyntezy kolagenu, polegający na obniżeniu aktywności prolidazy na etapie potranslacyjnej modyfikacji tego enzymu [komunikat 8; praca 9].

Wykazano, że melanina nasila inhibitorowy wpływ gentamycyny oraz kanamycyny na biosyntezę kolagenu oraz DNA w fibroblastach, czym tłumaczyć można wzrost toksyczności tych leków w tkankach bogatych w melaninę [komunikat 11; prace 13,18]. Wykazano, również, że melanina przeciwdziała inhibitorowemu działaniu puromycyny na metabolizm kolagenu w fibroblastach. Skojarzone użycie puromycyny i melaniny powoduje przywrócenie komórkom zdolności do biosyntezy kolagenu i DNA, całkowite przywrócenie prawidłowej ekspresji IGF-IR oraz częściowe przywrócenie ekspresji MAP-kinaz [praca 17]. Badania te wyjaśniają mechanizm zależności pomiędzy toksycznością leków a ich zdolnością do tworzenia kompleksów z melaniną. Niezależne badania z tego zakresu prowadzone w innych ośrodkach naukowych wykazały, że mechanizm tych zjawisk uzależniony jest od stałych wiązania lek-melanina oraz okresu półtrwania tych kompleksów.

Badania prowadzone nad hamującym wpływem kamptotecyny na biosyntezę kolagenu wykazały, że u podłoża tego procesu leży stymulacja szlaku sygnałowego, zależnego od NF- κ B. Obserwowano bowiem w jego przebiegu wzrost aktywności prolidazy oraz wzrost ekspresji receptora β 1-integrynowego, który aktywuje NF- κ B oraz pobudza aktywność prolidazy. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że kamptotecyna może być rozważana jako potencjalny lek przeciwdziałający zwłóknieniu narządów [praca 22]. Podobny mechanizm obserwowano w przypadku hamującego wpływu skutelaryny na biosyntezę kolagenu [komunikat 18; praca 31]. Ten flawonoid jest składnikiem badanych obecnie proleków przeciwwzawałowych.

Ad. C

Początkowe badania dotyczyły nowotworów płuc. Wiadomo, że metabolizm kolagenu w nowotworach płuc jest zmieniony. Nasunęło to przypuszczenie, że aktywność prolidazy - enzymu warunkującego intensywność obrotu kolagenu, może odzwierciedlać zaburzenia metabolizmu kolagenu zachodzące w tkance nowotworowej. Z powyższego względu zbadano aktywność prolidazy w gruczolakorakach płuca ludzkiego, o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Stwierdzono, że gruczolakoraki płuca ludzkiego wykazują wyższą aktywność prolidazy w stosunku do tkanki zdrowej. Zachodzi korelacja pomiędzy aktywnością prolidazy i stopniem zróżnicowania histologicznego komórek guza. Im niższy stopień zróżnicowania komórek tym wyższa aktywność prolidazy. Aktywność tego enzymu, jak również prolinazy, katalizującej hydrolizę dipeptydów zawierających prolinę w pozycji N-końcowej, może więc odzwierciedlać stopień histologicznego zróżnicowania gruczolakoraka. Ponadto w gruczolakorakach o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego wzrósł aktywności prolidazy towarzyszy wyższa zawartość kolagenu oraz obniżenie zawartości produktów degradacji kolagenu w stosunku do gruczolakoraków bardziej zróżnicowanych [praca 5]. Wykazano również, że wysoka aktywność prolidazy w gruczolakorakach o niskim stopniu zróżnicowania jest prawdopodobnie następstwem wzmożonej interakcji kolagenu z receptorem integrynowym β_1 komórek guza. Tkanka ta wykazuje bowiem zwiększoną zawartość obydwu składników (kolagenu i receptorów integrynowych β_1) uczestniczących w generowaniu sygnału pobudzającego aktywność prolidazy [komunikat 5; praca 4]. Stwierdzono, że aktywność żelatynolityczna w tkance gruczolakoraka o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego była podobna do tkanki prawidłowej płuca. Ponadto gruczolakoraki o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego wykazują obniżenie aktywności kolagenolitycznej w stosunku do gruczolakoraków bardziej zróżnicowanych, gdzie obserwowano podwyższoną aktywność metaloproteinaz MMP-2 oraz MMP-9. Kwas acetylosalicylowy zahamował aktywność żelatynolityczną zarówno w tkance zdrowej jak i nowotworowej płuca, szczególnie aktywne formy żelatynaz MMP-2 oraz MMP-9. Z badań tych wynika, że gruczolakoraki bardziej zróżnicowane, cechujące się zwiększoną ekspresją MMP-2 oraz MMP-9 reprezentują bardziej inwazyjny fenotyp niż gruczolakoraki o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego i mogą być poddawane terapii inhibitorami metaloproteinaz.

Kwas acetylosalicylowy może być rozważany jako czynnik terapeutyczny zapobiegający powstawaniu i rozwojowi gruczolakoraka płuca [komunikat 7, praca 11]. Badane przeze mnie niesteroidowe leki p/zapalne (kwas acetylosalicylowy, indometacyna, fenylobutazon) również znacząco hamowały aktywność prolidazy w gruczolakoraku płuca ludzkiego [praca 15].

Kolejne badania prowadzono nad płaskonabłonkowym rakiem płuca, w tkance którego obserwowano również wyższą zawartość kolagenu, wolnej proliny oraz podwyższenie aktywności kolagenolitycznej. Procesom tym towarzyszył wzrost aktywności i ekspresji prolidazy. Z badań tych wynika, że prolidaza odzwierciedla zaburzenia metabolizmu kolagenu także w płaskonabłonkowym raku płuca i może być niespecyficznym markerem tej choroby [praca 8].

Podobną sytuację obserwowano w chorobach trzustki. W zmienionej zapalnie tkance trzustki stwierdzono wyższą zawartość kolagenu, podwyższoną aktywność kolagenolityczną oraz ekspresję podjednostki integrynowej β_1 , jednakże zmianom tym towarzyszyła obniżona aktywność i ekspresja prolidazy, w porównaniu do tkanki zdrowej. W raku trzustki stwierdzono natomiast znaczący wzrost aktywności kolagenolitycznej i znaczne obniżenie aktywności prolidazy oraz jej ekspresji. Stwierdzono, że aktywność prolidazy może być czynnikiem różnicującym zapalenie i raka trzustki [praca 14]. Zaburzenia metabolizmu kolagenu w chorobach trzustki związane są ze wzrostem aktywności metabolicznej insulino-podobnego czynnika wzrostowego-I (IGF-I). Wykazano podwyższony poziom IGF-I oraz jego białek wiążących: IGFBP-3 i IGFBP-1 w surowicy krwi, co również może służyć diagnostyce raka trzustki [komunikat 10; praca 12].

Ad. D

Kolejny kierunek badań obejmowały prace, które powstały w większości w ramach współpracy naukowej prowadzonej z innymi jednostkami badawczymi.

Badając aktywność ligandów obwodowych receptorów beznodiazepinowych w makrofagach i estrogeno - niezależnych komórkach raka piersi wykazano, że hamując biosyntezę DNA, działają one antymitotycznie a receptory te mogą być rozważane jako punkt uchwytu w terapii przeciwzapalnej i raka sutka [praca 21].

Kolejne badania dotyczyły oceny aktywności antyproliferacyjnej olejków eterycznych z ziela i korzeni przymiotna ostrego (*Erigeron acris*) oraz z ziela przymiotna białego (*Erigeron annuus*). Aktywność antyproliferacyjną badano wobec linii komórkowych raka sutka (MCF-7 i MDA-MBA-231), raka endometrium (Ishikawa) i raka okrężnicy (DLD-1) oraz komórek kontrolnych, fibroblastów. Badania te wykazały aktywność antyproliferacyjną badanych olejków eterycznych. Najwyższą aktywność antyproliferacyjną wykazywał olejek z korzeni *E. acris* wobec komórek MCF-7 ($IC_{50}=14.5 \mu\text{g/mL}$). Przy tym stężeniu nie zaobserwowano działania toksycznego na komórki zdrowe. Dla pozostałych linii komórkowych wartość ta wyniosła ponad 50 $\mu\text{g/mL}$. Nie stwierdzono działania antyproliferacyjnego olejku z ziela *E. acris*. Na tej podstawie można przypuszczać, że za działanie antyproliferacyjne odpowiedzialne są związki poliacetylenowe, które dominują w korzeniach [komunikat 48, praca 30].

Prowadziłam również badania aktywności antyproliferacyjnej olejków eterycznych z korzeni ostrożeńca błotnego (*Cirsium palustre*) i ostrożeńca łąkowego (*C. rivulare*). Aktywność antyproliferacyjną badano wobec linii komórkowych raka sutka (MCF-7 i MDA-MBA-231) oraz komórek kontrolnych, fibroblastów. Badane olejki eteryczne wykazały umiarkowaną (niewielką) aktywność antyproliferacyjną wobec wymienionych linii komórkowych ($IC_{50}=110-140 \mu\text{g/mL}$). Przy tym stężeniu nie zaobserwowano działania toksycznego na komórki prawidłowe [praca 33].

Nagrody otrzymane za działalność naukową

1. Ministra Zdrowia

a/ zespołowa nagroda Ministra Zdrowia w roku akademickim 2001/2002 za cykl prac dotyczących metabolizmu kolagenu,

2. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

a/ zespołowe nagrody I stopnia Rektora AMB za osiągnięcia naukowe w latach akademickich 1994/95, 1997/98, 1998/99, 2002/2003, 2006/2007, 2008/2009, 2009/2010 oraz II stopnia za osiągnięcia naukowe w latach akademickich 2000/2001, 2007/2008 oraz III stopnia za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2005/2006 oraz 2010/2011.

Data 15-06-2012

Ewa Kami