

Samodzielna Pracownia Analizy Leków
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr n. farm. Wojciech Miłtyk

**Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie nauk farmaceutycznych**

Załącznik 2

AUTOREFERAT

Białystok 2012

DANE OSOBOWE

Imię i nazwisko: Wojciech Miltyk

Miejsce pracy: Samodzielna Pracownia Analizy Leków, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. A. Mickiewicza 2D, 15-522 Białystok, tel. (85)7485845.

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- Dyplom specjalizacji pierwszego stopnia z farmacji aptecznej: Białystok, 15 listopad 2003.
- Doktor nauk farmaceutycznych: Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec, 23 luty 2000.
- Dyplom magistra farmacji: Akademia Medyczna w Białymstoku, 2 czerwiec 1995

Zatrudnienie

1995 – 2003	Asystent, Zakład Chemii i Analizy Leków, Akademia Medyczna w Białymstoku
2000 – 2001	Staż naukowy, Department of Nutrition, University of North Carolina, Chapel Hill, USA
2001 - 2002	Staż naukowy, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA
2003	2 miesięczna misja naukowa w National Cancer Institute, Frederick, MD, USA
2003 - 2007	Adiunkt, Zakład Chemii i Analizy Leków, Akademia Medyczna w Białymstoku
Od 2007	p.o. kierownika, Samodzielna Pracownia Analizy Leków, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

OSIĄGNIĘCIA OKREŚLONE W ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595, Z PÓŹN. ZM.)

Główny nurt mojej działalności naukowej dotyczy poszukiwania molekularnych mechanizmów zaburzeń regulacji metabolizmu komórkowego w przebiegu różnych chorób, identyfikacji punktów uchwytu potencjalnej farmakoterapii oraz oceny molekularnych mechanizmów działania leków. Jestem współautorem 92 prac w tym: 42 prac doświadczalnych o łącznym współczynniku wpływu (IF) 62,699 i punktacji wg MNiSW wynoszącej 623, dwóch skryptów do ćwiczeń z analizy leków, 5 prac poglądowych oraz 43 streszczeń zjazdowych. Według bazy Web of Science moje prace były cytowane w literaturze 208 razy, wskaźnik Hirscha wynosi 9 (dane na dzień 25.02.2012).

Z mojego dorobku naukowego wyodrębniłem siedem prac zawierających wyniki badań nad molekularnymi mechanizmami zaburzeń metabolicznych w patologicznych liniach komórkowych oraz potencjalnymi punktami uchwytu nowych strategii farmakologicznych:

1. **Miltyk W.**, Surazyński A., Grabowska J., Pałka J.A. Prolidase dependent inhibition of collagen biosynthesis in Chinese hamster ovary cells. 2008. Journal of Biochemistry. 144, 409-414.
Wskaźnik Impact Factor: 1,878. Punktacja MNiSW: 20,00
2. **Miltyk W.**, Karna E., Pałka J.A. Prolidase-independent mechanism of camptothecin-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. 2007. Journal of Biochemistry. 141, 287-292.
Wskaźnik Impact Factor: 2,02. Punktacja MNiSW: 20,00
3. **Miltyk W.**, Surazyński A., Wolczynski S., Pałka J. Combined therapy with disintegrin and melphalan as a new strategy in inhibition of endometrial cancer cell line (Ishikawa) growth. 2009. Folia Histochemica et Cytobiologica. 47, 121-125.
Wskaźnik Impact Factor: 1,081. Punktacja MNiSW: 13,00
4. Surazyński A., **Miltyk W.**, Prokop I., Pałka J. Prolidase-dependent regulation of TGF α and TGF β receptor expressions in human skin fibroblasts. 2010. European Journal of Pharmacology . 649, 115-9.
Wskaźnik Impact Factor: 2,585. Punktacja MNiSW: 27,00

5. **Miltyk W.**, Palka M., Karna E., Jarzabek K., Boujrad N., Knapp P. Antimitotic activity of high affinity ligands for peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in some normal and neoplastic cell lines. 2006. *Advances in Medical Sciences*. 51, 156-159.

Punktacja MNiSW: 5,00

6. **Miltyk W.**, Surazynski A., Dondziło J., Palka J. 4¹-Chlorodiazepam - Agonist of peripheral benzodiazepine receptors as a protecting factor in IL-1 induced deregulation of collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes. 2010. *European Journal of Pharmacology*. 647, 31-36.

Wskaźnik Impact Factor: 2,585. Punktacja MNiSW: 27,00

7. Surazynski A., **Miltyk W.**, Czarnomysy R., Grabowska J., Palka J. Hyaluronic acid abrogates nitric oxide-dependent stimulation of collagen degradation in cultured human chondrocytes. 2009. *Pharmacological Research*. 60, 46-49.

Wskaźnik Impact Factor: 3,929. Punktacja MNiSW: 27,00

Łączny Impact Factor dla tych prac wynosi: 13,439. Punktacja MNiSW: 139.

Przedmiotem badań stanowiących treść wyodrębnionych publikacji jest poszukiwanie punktów uchwytu terapii schorzeń przebiegających z zaburzeniami metabolizmu kolagenu. Kolagen jest bowiem nie tylko kluczowym składnikiem strukturalnym tkanek, ale pełni również ważną rolę w regulacji metabolizmu komórkowego jako ligand receptora integrynowego. Szlak sygnałowy indukowany przez pobudzony receptor β_1 -integrynowy aktywuje prolidazę, enzym który odzyskuje prolinę z imidodipeptydów do resyntezy kolagenu. Jakkolwiek główny nurt mojej działalności badawczej skupiłem na dostarczeniu argumentów przemawiających za kluczową rolę prolidazy w regulacji biosyntezy kolagenu [1 oraz „pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze” str. 6], to jednak szereg moich obserwacji wskazuje na udział wielu innych czynników w tym procesie.

Zaproponowałem kamptotecynę jako potencjalny eksperymentalny czynnik zapobiegający zwłóknieniu tkanek. Wykazałem, jednak że kamptotecyna dodana do hodowli fibroblastów skóry ludzkiej powoduje wzrost aktywności prolidazy. Zjawisku temu towarzyszyło pobudzenie ekspresji receptora β_1 -integrynowego, białek sygnałowych Sos, kinaz MAPK (ERK1, ERK2) i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Zaproponowałem mechanizm inhibitorowego działania kamptotecyny na proces biosyntezy kolagenu niezależny od

aktywności prolidazy polegający na stymulacji ekspresji NF- κ B, odpowiadającego za hamowanie transkrypcji genów kolagenu w hodowli fibroblastów skóry ludzkiej [2].

Rola receptorów integrzynowych w regulacji metabolizmu komórkowego skłoniła mnie do zastosowania dezintegryny w poszukiwaniu sposobów zwiększenia skuteczności eksperymentalnej terapii lekami przeciwnowotworowymi z grupy środków alkilujących. Do badań wykorzystałem komórki raka endometrium (Ishikawa) – jednego z najpowszechniej występujących nowotworów u kobiet. Moje badania wskazują, że skojarzone działanie melfalanu - powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego z dezintegryną (echistatyną), przyczynia się do zdecydowanego zwiększenia efektywności przeciwnowotworowej melfalanu oraz zmniejszenia jego cytotoksyczności w porównaniu do działania melfalanu bez dezintegryny. Mechanizm działania cytotoksycznego obydwu substancji podanych łącznie, wynika z inhibicji sygnału indukowanego przez receptor β_1 -integrzynowy, hamowania ekspresji receptora IGF-I oraz hamowania biosyntezy kolagenu [3].

W toku dalszych badań wskazałem na bardzo istotną, regulacyjną rolę produktów reakcji katalizowanej przez prolidazę: proliny i hydroksyproliny. Aminokwasy te indukują wzrost ekspresji TGF- β_1 , receptora tej cytokiny oraz fosforylowanego czynnika transkrypcyjnego mTOR uczestniczącego w przekazywaniu sygnału przez receptor TGF- β_1 . Zjawisko udziału tych aminokwasów w regulacji metabolizmu komórkowego dobrze opisane jest w odniesieniu do regulacji aktywności transkrypcyjnej HIF-1 α .

TGF- β_1 uczestniczy w regulacji wzrostu i proliferacji wielu typów komórek. Czynniki ten stymuluje także biosyntezę kolagenu, co może prowadzić do zwłóknienia tkanek. Modulacja aktywności prolidazy katalizującej hydrolizę imidodipeptydów do wolnej proliny i hydroksyproliny może zatem stanowić ważny czynnik regulujący aktywność biologiczną TGF- β_1 [4].

Dalsze badania nad poszukiwaniem nowych strategii terapii nowotworów obejmowały wykorzystanie ligandów obwodowych receptorów benzodiazepinowych (PBR). Zwiększoną ekspresję PBR obserwuje się w wielu nowotworach. Ocenilem aktywność mitotyczną ligandów tych receptorów: Pk-11195 (antagonista) i 4'-chlorodiazepamu (agonista) w hodowlach fibroblastów, makrofagów, komórek MCF-7, MDA-MB231 i raka endometrium (Ishikawa). Wykazałem, że obydwa ligandy hamowały podziały komórek MDA-MB231 i makrofagów, co może stanowić nową strategię w terapii estrogeno-niezależnego

raka piersi. Natomiast hamowanie podziałów makrofagów przez obydwa ligandy PBR może stanowić nową strategię regulacji ich aktywności w przebiegu procesów zapalnych [5].

Kontynuacja tego kierunku badań nasunęła przypuszczenie o możliwości zastosowania ligandów receptora PBR w zaburzeniach metabolizmu kolagenu indukowanych przez interleukinę-1 (IL-1) w chondrocytach ludzkich. IL-1 jest jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój procesów zapalnych oraz degradację tkanki chrzęstnej w przebiegu procesów zapalnych, np. reumatoidalnego zapalenie stawów. Wykazałem, że agonista PBR - Ro-54684 przeciwdziała hamowaniu biosyntezy kolagenu i DNA indukowanemu przez IL-1. Mechanizm protekcyjnego działania Ro-54864 obejmuje indukcję ekspresji receptora insulino-podobnego czynnika wzrostowego – I, białka mTOR, aktywację AKT oraz hamowanie apoptozy indukowanej przez IL-1. Przeprowadzone przeze mnie badania sugerują, że zastosowanie agonistów PBR może stanowić nowy kierunek w terapii procesów zapalnych [6].

Zwieńczeniem badań nad patobiochemią i farmakoterapią procesów zapalnych było wyjaśnienie mechanizmu protekcyjnego działania kwasu hialuronowego na zaburzenia metabolizmu kolagenu obserwowane w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów. Wykazałem, że w eksperymentalnym modelu procesu zapalnego indukowanym przez IL-1, dochodzi do pobudzenia degradacji kolagenu przez metaloproteinazy, a czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję tego procesu jest tlenek azotu. Inkubacja ludzkich chondrocytów z IL-1 spowodowała aktywację czynnika NF- κ B oraz indukcję ekspresji syntazy tlenu azotu (iNOS). Zastosowanie kwasu hialuronowego hamowało aktywację NF- κ B i ekspresję iNOS, a w efekcie przeciwdziało indukowanej przez IL-1 aktywacji metaloproteinaz i degradacji kolagenu. Wskazuje to na ważną rolę tlenu azotu w mechanizmie protekcyjnego działania HA na proces degradacji kolagenu w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów ludzkich [7]. Wiedza w tym zakresie może przyczynić się do doskonalenia farmakoterapii zapalenia stawów poprzez zastosowanie inhibitorów NF- κ B lub iNOS.

Moje pionierskie badania wyjaśniły mechanizmy zaburzeń metabolizmu komórek nowotworowych oraz patologicznych procesów związanych z upośledzoną biosyntezą kolagenu i wskazały na nowe, efektywne, dotychczas nie stosowane metody eksperymentalnej farmakoterapii tych zaburzeń.

POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE.

Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 11 prac doświadczalnych i poglądowych, jeden skrypt a także 4 doniesienia zjazdowe, prezentowane na konferencjach i zjazdach naukowych. Łączny IF prac stanowiących dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi 4,536 i 44 punkty KBN.

Przedmiotem szczególnego zainteresowania badawczego w tym okresie była ocena roli prolidazy w metabolizmie kolagenu w tkankach.

Prolidaza (peptydaza D, imidopeptydaza, E.C.3.4.13.9) jest cytoplazmatyczną egzo-peptydazą, katalizującą hydrolizę imidodipeptydów, w których aminokwasem C-końcowym jest prolina lub hydroksyprolina [E2]. Pochodzą one (imidodipeptydy) z wewnątrzkomórkowej degradacji białek endogennych: prokolagenu (wewnątrzkomórkowej formy kolagenu), kolagenu (zewnątrzkomórkowej formy tego białka) i innych białek zawierających prolinę (stanowiących jednak niewielki procent imidodipeptydów), a także białek egzogennych - białek diety zawierających prolinę. Soki trawienne przewodu pokarmowego nie zawierają bowiem enzymów zdolnych do trawienia III-rzędowego wiązania imidowego. Imidodipeptydy stanowią zatem końcowe produkty degradacji kolagenu w przewodzie pokarmowym. Cytoplazmatyczna lokalizacja tej egzo-peptydazy i jej unikalne wymagania substratowe nasunęły przypuszczenie, że może ona pełnić ważną rolę regulatorową w metabolizmie białek zawierających prolinę, zwłaszcza kolagenu. Kolagen, stanowiący około jedną trzecią wszystkich białek organizmu ludzkiego jest polipeptydem zawierającym największą liczbę wiązań imidowych spośród wszystkich znanych białek. Występują one głównie jako glicylo-prolina. W łańcuch α_1 kolagenu typu I (235 aminokwasów) ten dublet występuje 25 razy. W innych białkach prolina rzadko występuje w sąsiedztwie glicyny. Stało się to podłożem hipotezy zakładającej, że prolidaza może stanowić enzym zaangażowany w regulację metabolizmu kolagenu.

Kolagen jest niezbędnym składnikiem tkanki łącznej, zapewniającym jej integralność i prawidłową funkcję [E21]. Oprócz funkcji podporowych pełni również rolę sygnałową za pośrednictwem receptorów adhezyjnych komórek. Interakcja między komórkami a białkami macierzy pozakomórkowej, zachodząca między innymi za pośrednictwem receptorów

integrynowych indukuje szlak sygnałowy regulujący ekspresję genów, różnicowanie, wzrost i inne funkcje komórek [E21]. Nasunęło to przypuszczenie, że prolidaza może pełnić ważną rolę w procesie biosyntezy kolagenu - liganda receptorów integrynowych, wpływając tym samym na regulację metabolizmu komórkowego. Początkowe badania z tego zakresu pozwoliły wykazać ważną rolę prolidazy w patobiochemii głodzenia [D1], awitaminozy C, cukrzycy [D2], reumatoidalnego zapalenia stawów [E1] i choroby nowotworowej [E5].

Powyzsze badania sklonily mnie do poszukiwania mechanizmow regulacji aktywnosci prolidazy. Wysunalem przypuszczenie, ze moga byc to czynniki pobudzajace biosynteze kolagenu. Jednym z najlepiej poznanych dotychczas induktorow biosyntezy kolagenu jest insulino-podobny czynnik wzrostowy-I (IGF-I). Wykazalem, ze IGF-I pobudza aktywnosc prolidazy, co powoduje zwiekszenie dostepnosci kluczowego substratu - wolnej proliny do procesu biosyntezy kolagenu [E6]. Jednakze transport proliny przez biony biologiczne powoduje jej konwersje do kwasu 1-pirolino-5-karboksylowego (P5C) przy udziale oksydazy prolinowej, a P5C do proliny przy udziale reduktazy P5C. Wysunalem przypuszczenie, ze udzial IGF-I w procesie pobudzania biosyntezy kolagenu moze odbywac sie na drodze posredniej. Zalozyłem, ze funkcje posrednika w tym procesie moga pelnic mechanizmy warunkujace dostepnosc glownego substratu - proliny do tego procesu. Uznalem, ze potencjalnym czynnikiem mogacym uczestniczyc w regulacji podazy proliny moze byc P5C - metabolit proliny oraz prolidaza. Stosujac model badawczy choroby glodowej i cukrzycy u szczurów (w przebiegu ktorych stężenie IGF-I w surowicy krwi oraz biosynteza kolagenu w tkance łącznej zwierząt ulegają drastycznemu obnizeniu), a takze hodowle fibroblastów ocenilem znaczenie zmian stężeń IGF-I i P5C w surowicy krwi oraz podlozu hodowlanym na aktywnosc prolidazy i biosynteze kolagenu w skórze zwierząt bądź w hodowlach fibroblastów. Wykryłem, ze zarówno w przebiegu cukrzycy jak i głodzenia, zawartosc IGF-I, a takze P5C w surowicy szczurów uległa drastycznemu obnizeniu, czemu towarzyszylo uposlędzenie biosyntezy kolagenu w skórze tych zwierząt [D1, E8]. W celu sprawdzenia hipotezy posredniego udzialu IGF-I w procesie biosyntezy kolagenu surowice pochodzace z badanych zwierząt porównalem pod wzgledem ich zdolnosci do pobudzania biosyntezy DNA i kolagenu oraz aktywnosci prolidazy w hodowlach fibroblastów. W wyniku przeprowadzonych doswiadczeń wykazalem, ze zdolnosc surowic zwierząt głodzonych i z cukrzycą do pobudzania biosyntezy DNA, kolagenu i aktywnosci prolidazy jest o wiele mniejsza niz surowicy zwierząt kontrolnych. Wzbogacenie tych surowic w IGF-I spowodowalo

przywrócenie im prawidłowej zdolności do pobudzania omawianych procesów. Surowica zwierząt głodzonych, wzbogaconych w IGF-I wymagała o wiele więcej czasu do pobudzenia biosyntezy kolagenu (około 48-72 godzin) niż do pobudzenia biosyntezy DNA (około 24 godzin) co popierało słuszność hipotezy pośredniego udziału IGF-I w procesie biosyntezy kolagenu sugerując, że IGF-I może pobudzać biosyntezę hipotetycznego czynnika (nieobecnego w surowicy zwierząt głodzonych), który w następstwie indukuje biosyntezę kolagenu. W toku przeprowadzonych badań wykazałem, że dodatek P5C do surowicy zwierząt głodzonych przywracał jej pełną zdolność do pobudzania biosyntezy i sekrecji kolagenu do ECM oraz aktywności prolidazy w hodowlach fibroblastów. Wykazałem ponadto, że pobudzający wpływ P5C na aktywność prolidazy jest następstwem wzrostu ekspresji tego enzymu. Efekt pobudzenia omawianych zjawisk przez P5C zachodził już po 24 godzinach inkubacji, sugerując bezpośredni jego udział w indukcji tych procesów [D1, E8].

Mechanizm pobudzającego działania P5C na biosyntezę kolagenu w fibroblastach polega na dostarczaniu komórce dużej ilości proliny do tego procesu. Zjawisko to może zachodzić na dwóch drogach. Po pierwsze transport P5C do komórki związany jest ze specyficznym mechanizmem jego konwersji w prolinę, katalizowanym przez reduktazę P5C. Po drugie, pobudzający wpływ P5C na aktywność prolidazy prowadzi do uwolnienia dużej ilości proliny z imidodipeptydów (produktów degradacji kolagenu). Obydwa procesy przyczyniają się do wzrostu wewnątrzkomórkowej puli proliny, wykorzystywanej do biosyntezy kolagenu [E9]. Obniżenie stężenia P5C upośledza obydwie procesy, a w następstwie zmniejsza intensywność biosyntezy kolagenu. Mechanizm ten może stanowić czynnik ograniczający tempo obrotu kolagenu w tkankach, niezależnie od ekspresji genów kolagenu.

Prolina pochodząca z P5C wydaje się mieć jednak niewielkie znaczenie jako substrat do biosyntezy kolagenu. Zarówno płyny ustrojowe jak i podłoża hodowli komórkowych zawierają niewielkie (nmolowe) ilości P5C. Przeważająca większość proliny (w ilościach mmolowych) wykorzystywanej w procesie biosyntezy kolagenu pochodzi z endogennych i egzogennych produktów degradacji kolagenu. Pozwala to sądzić, że pobudzające działanie P5C na aktywność prolidazy (a nie P5C jako substrat proliny) stanowi kluczowy mechanizm indukcji biosyntezy kolagenu [E8, E9]. Wyniki niniejszych badań były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt.: „Regulacyjna rola kwasu 1-pirolino-5-karboksylowego w procesie biosyntezy kolagenu” [D1].

Dalsze badania pozwoliły wykazać zależność pomiędzy biosyntezą kolagenu a aktywnością prolidazy w hodowlach fibroblastów skóry ludzkiej traktowanych niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi [E1], w procesie doświadczalnego starzenia fibroblastów skóry ludzkiej [E2] oraz w procesie chemotaksji fibroblastów [E3].

Badania wykonywane w latach 1995 – 2000 finansowane były w ramach działalności statutowej Uczelni, w tym projekty badawcze, których byłem głównym wykonawcą.

W latach 1991-2005 byłem wyróżniony zespołową nagrodą naukową Ministra Zdrowia (2001) oraz trzema nagrodami JM Rektora Akademii Medycznej w Białymstoku (2003, 2004, 2005).

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 75 prac, w tym 36 prac doświadczalnych i poglądowych, 1 skrypt a także 38 doniesień zjazdowych, prezentowanych na konferencjach i zjazdach naukowych. Opublikowane prace zawierają wyniki badań nad molekularnymi mechanizmami zaburzeń metabolicznych w patologicznych liniach komórkowych oraz identyfikacja punktów uchwytu nowych strategii farmakologicznych. Łączny IF prac stanowiących dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 58,163 i 579 punktów KBN.

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora stanowiła kontynuację zainteresowań mechanizmami regulacji aktywności prolidazy. Przedmiotem głównego nurtu badawczego w tym okresie było przedstawienie argumentów bezpośredniego udziału prolidazy w procesie biosyntezy kolagenu oraz wyjaśnienie molekularnego mechanizmu tego zjawiska. W tym celu odbyłem w latach 2001-2002 staż naukowy w Narodowym Instytucie Raka we Frederick, MD, USA w zespole dr Jamesa Phang'a, wybitnego specjalisty z zakresu metabolizmu aminokwasów. Moje badania dotyczyły roli prolidazy w mechanizmie karcynogenazy indukowanej przez nikiel. Wykazałem, że jeden z mechanizmów toksycznego działania tego pierwiastka polega na hamowaniu aktywności prolidazy. Pionierskie badania z tego zakresu pozwoliły dostarczyć dowodów, że nikiel (II) wykazuje kompetycyjny mechanizm hamowania aktywności prolidazy (wobec manganu (II), który jest niezbędny do osiągnięcia aktywności katalitycznej enzymu) w hodowli komórek CHO [E13]. Zahamowanie aktywności prolidazy powodowało jednocześnie zahamowanie wzrostu badanych komórek.

Po powrocie do Polski kontynuowałem badania nad mechanizmami toksycznego działania niklu. Wysunąłem przypuszczenie, że zahamowanie aktywności prolidazy może prowadzić do upośledzenia metabolizmu kolagenu i w efekcie zaburzać interakcję między komórkami a macierzą pozakomórkową przyczyniając się do zakłócenia szlaków sygnałowych regulujących ekspresję genów, stabilność genomu, różnicowanie i proliferację komórek. Przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły te założenia. W komórkach poddanych działaniu niklu (II) zaobserwowałem obniżenie biosyntezy kolagenu. Zjawisko to nie było związane z obniżeniem ekspresji genów kolagenu, gdyż nie zaobserwowałem obniżenia ekspresji mRNA tego białka w badanych komórkach. Sugerowało to regulację tego procesu na etapie post-transkrypcyjnym. Zaobserwowałem obniżenie ekspresji białek Sos i

fosforylowanych MAP-kinaz [E24]. Badania te potwierdziły kluczową rolę prolidazy w procesie biosyntezy kolagenu. Zjawisko to sugerowało wykorzystanie prolidazy jako potencjalnego punktu uchwytu terapii schorzeń przebiegających z zaburzeniami metabolizmu kolagenu.

Wyniki powyższych badań nasunęły przypuszczenie, że zwłóknienie płuc i nerek indukowane przez związki niklu (II) może być następstwem wpływu tego metalu na prolidazę. W hodowli fibroblastów skóry ludzkiej, poddanych działaniu chlorku niklu (II) wykazałem wzrost biosyntezy kolagenu i aktywności prolidazy. Zahamowanie aktywności prolidazy kwasem acetylosalicylowym – wcześniej opisanym inhibitorem aktywności tego enzymu (E1), spowodowało normalizację biosyntezy kolagenu pobudzonej przez Ni (II) w hodowli fibroblastów skóry ludzkiej. Obserwacja ta pozwoliła zaproponować zastosowanie kwasu acetylosalicylowego w prewencji zwłóknienia tkanek u osób narażonych na związki niklu [E11].

Kolejnym zaproponowanym przeze mnie eksperymentalnym czynnikiem zapobiegającym zwłóknieniu tkanek była kamptotecyna. Alkaloid ten dodany do pożywki hodowlanej fibroblastów skóry ludzkiej indukował aktywność prolidazy, ekspresję receptora β_1 -integrynowego, białek sygnałowych Sos, kinaz MAPK (ERK1, ERK2) oraz czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Mechanizm inhibitorowego działania kamptotecyny na proces biosyntezy kolagenu wynikał ze stymulacji ekspresji czynnika NF- κ B hamującego transkrypcję genów kolagenu w hodowli fibroblastów skóry ludzkiej [E21].

Kolejnym aspektem prowadzonych przeze mnie badań było poszukiwanie sposobów zwiększenia skuteczności eksperymentalnej terapii lekami przeciwnowotworowymi z grupy środków alkilujących na przykładzie komórek raka endometrium (Ishikawa). Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że skojarzone działanie dezintegryny (echistatyny) z melfalanem, powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym, przyczynia się do zwiększenia efektywności przeciwnowotworowej melfalanu (zmniejszenia C_{50}) i zmniejszenia jego cytotoksyczności w porównaniu do działania melfalanu bez dezintegryny. Zaproponowałem mechanizm działania cytotoksycznego obydwu substancji podanych łącznie, obejmujący hamowanie sygnału indukowanego przez receptor β_1 -integrynowy, hamowanie ekspresji receptora IGF-I oraz hamowanie biosyntezy kolagenu [E27].

Podczas pobytu stypendialnego w Chapel Hill, NC, USA brałem udział w pierwszych na świecie badaniach nad genotoksycznością izoflawonoidów soi. Preparaty zawierające izoflawonoidy soi stosowane są powszechnie w prewencji raka piersi, prostaty lub w celu łagodzenia objawów menopauzy. Protokół badawczy obejmował podawanie pacjentom z rakiem prostaty izoflawonoidów soi (genisteinę, daidzeinę i glycetinę) przez 56 dni. W limfocytach wyizolowanych od pacjentów oceniałem uszkodzenia DNA metodami Comet, Micronucleus i FISH. Kontrolę stanowiły limfocyty wyizolowane od zdrowych pacjentów. Przeprowadzone badania nie wykazały genotoksycznego wpływu izoflawonoidów soi u pacjentów w badanym zakresie stężeń [E10].

Ważny obszar moich zainteresowań naukowych stanowią badania nad poszukiwaniem nowych strategii w terapii nowotworów. Dużo uwagi poświęciłem obwodowym receptorom benzodiazepinowym (PBR), których zwiększoną ekspresję obserwuje się w nowotworach piersi, przetyku, jajników, okrężnicy i innych. Ligandy receptorów PBR zaangażowane są bowiem w regulację proliferacji komórek. Oceniałem aktywność mitotyczną ligandów PBR: Pk-11195 (antagonista) i 4'-chlorodiazepamu o aktywności agonisty (Ro-54864) w hodowlach fibroblastów, makrofagów, komórek MCF-7 (estrogeno-zależnych), MDA-MB231 (estrogeno-niezależnych) i raka endometrium (Ishikawa). Wykazałem, że obydwa ligandy hamowały podziały komórek MDA-MB231 i makrofagów [E15]. Zjawisko to może stanowić nową strategię w terapii raka piersi, estrogeno-niezależnego. Natomiast hamowanie podziałów makrofagów przez obydwa ligandy PBR może pozwolić na modulację ich aktywności w przebiegu procesów zapalnych.

W toku dalszej działalności badawczej wyniki moich nieopublikowanych badań nasunęły mi przypuszczenie o możliwości zastosowania ligandów receptora PBR w zaburzeniach metabolizmu kolagenu indukowanych przez interleukinę-1 (IL-1) w chondrocytach ludzkich. IL-1 jest jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój procesów zapalnych oraz degradację tkanki chrzęstnej w takich procesach zapalnych jak np. reumatoidalne zapalenie stawów. Zastosowanie IL-1 jest powszechnie przyjętym modelem badawczym doświadczalnego zapalenia w hodowli komórkowej. Wykazałem, że Ro-54864 - agonista PBR przeciwdziała hamowaniu biosyntezy kolagenu i DNA indukowanemu przez IL-1. Pk-11195 - antagonistą tych receptorów nie powodował normalizacji obydwu omawianych procesów. Mechanizm protekcyjnego działania Ro-54864 obejmował indukcję ekspresji receptora insulino-podobnego czynnika wzrostowego – I, białka mTOR i fosforylację AKT. Nie

wpływał natomiast na szlak sygnałowy zależny od kinaz Ras-Raf-MAPK. Ro-54684 powodował także hamowanie apoptozy indukowanej przez IL-1. Mechanizm tego zjawiska może wiązać się z aktywacją szlaku mTOR i AKT. Badania te sugerują, że zastosowanie agonistów PBR może stanowić nowy kierunek w terapii procesów zapalnych [E33].

Jedną ze strategii w farmakoterapii chorób reumatycznych jest zastosowanie kwasu hialuronowego (HA). Do-stawowe wstrzyknięcie HA moduluje proliferację i różnicowanie chondrocytów, biosyntezę glikozaminoglikanów i kolagenu. Postanowiłem wyjaśnić mechanizm protekcyjnego działania tego leku na zaburzenia metabolizmu kolagenu obserwowane w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów. Wykazałem, że w eksperymentalnym modelu procesu zapalnego wywołanym IL-1 następuje pobudzenie degradacji kolagenu przez metaloproteinazy (MMP). Wysunąłem przypuszczenie, że czynnikiem odpowiedzialnym, za indukcję tego procesu może być tlenek azotu (NO). Inkubacja ludzkich chondrocytów z IL-1 spowodowała aktywację czynnika NF- κ B oraz indukcję ekspresji syntazy tlenu azotu. Zastosowanie HA hamowało aktywację NF- κ B i ekspresję iNOS, a w efekcie przeciwdziało indukowanej przez IL-1 aktywacji MMPs i degradacji kolagenu [E31]. Uzyskane wyniki wskazują na ważną rolę tlenu azotu w mechanizmie protekcyjnego działania HA w procesie degradacji kolagenu w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów ludzkich.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń wskazują także na bardzo istotną, regulacyjną rolę produktów reakcji katalizowanej przez prolidazę: proliny i hydroksyproliny. Aminokwasy te indukują wzrost ekspresji TGF- β_1 , receptora tej cytokiny oraz fosforylowanego czynnika transkrypcyjnego mTOR uczestniczącego w przekazywaniu sygnału przez receptor TGF- β_1 . TGF- β_1 uczestniczy w regulacji wzrostu i proliferacji komórek w wielu tkankach. Czynniki te stymulują także biosyntezę kolagenu, co może prowadzić do zwłóknienia tkanek. Modulacja aktywności prolidazy katalizującej hydrolizę imidodipeptydów do wolnej proliny i hydroksyproliny może zatem stanowić ważny czynnik regulujący aktywność biologiczną TGF- β_1 [E38].

Nagrody otrzymane za działalność naukową:

- 1996 nagroda zespołowa I stopnia Rektora
- 1998 nagroda zespołowa I stopnia Rektora AMB
- 1999 nagroda zespołowa I stopnia Rektora AMB
- 2000 nagroda zespołowa I stopnia Rektora AMB
- 2001 nagroda zespołowa Ministra Zdrowia
- 2006 nagroda zespołowa III stopnia Rektora AMB
- 2007 dwie nagrody zespołowe I stopnia Rektora AMB
- 2008 nagroda zespołowa II stopnia Rektora UMWB
- 2008 nagroda zespołowa III stopnia Rektora UMWB
- 2009 nagroda zespołowa I stopnia Rektora UMWB
- 2010 nagroda zespołowa I stopnia Rektora UMWB
- 2011 dwie nagrody zespołowe I stopnia Rektora UMWB

Ujściek Piłtyk