

**Autoreferat**

**przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych**

*Załącznik nr 2a*

dr n. med. Anna Tankiewicz-Kwedlo

Zakład Farmakoterapii Monitorowanej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Krystyna Pawlak

Białystok 2018

**1. Imię i nazwisko:** Anna Tankiewicz-Kwedlo, do 2007 r. Tankiewicz

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuły pracy magisterskiej/rozprawy doktorskiej.**

**1999 r. Dyplom magistra analityki medycznej** (nr 604/2/99) na podstawie pracy magisterskiej pt. „Ocena przeciwzakrzepowego działania antagonisty receptora 5-HT2A – DV-7028 w modelu zakrzepicy żylnej i tętniczej u szczura” wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki Akademii Medycznej w Białymstoku (Promotor dr n. med. Dariusz Pawlak)

**2002 r. Dyplom doktora nauk medycznych** w specjalności biologia medyczna uzyskany w dniu 17.10.2002 r. decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Białymstoku na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. „Enzymy szlaku kinureninowego w doświadczalnym modelu przewlekłej niewydolności nerek u szczura” (Promotor Prof. dr hab. Włodzimierz Buczko)

**2003 r. Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej** – uprawnienie (nr 02271) wydane uchwałą Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych nr 31/2003 z dnia 15.10.2003 r.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych**

1999-2003 Asystent, Zakład Farmakodynamiki, Akademia Medyczna w Białymstoku

2003-2004 Stypendium naukowe w Instytucie Farmakologicznym Mario Negrii w Bergamo, Włochy (12 miesięcy)

2004-2007 Asystent, Zakład Farmakodynamiki, Akademia Medyczna w Białymstoku

2007-2012 Adiunkt, Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

od 2012 Adiunkt, Zakład Farmakoterapii Monitorowanej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

1. **Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**A. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Wpływ egzogennej erytropoetyny na rozwój raka jelita grubego

**B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

Uzyskane osiągnięcie naukowe zostało przedstawione w jednotematycznym cyklu 5 prac, wymienionych poniżej, opublikowanych w latach 2010-2018 o sumarycznym współczynniku oddziaływania (IF) wymienionych prac wynoszącym 16.345 i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynoszącej 135. Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajduje się w **załączniku nr 4**.

**H1 Tankiewicz-Kwedlo A**, Pawlak D, Domaniewski T, Buczko W. 2010. Effect of erythropoietin, 5-fluorouracil and SN-38 on the growth of DLD-1 cells. Pharmacol Rep. 62, 926-37 **(IF = 2.500; MNiSW = 20)**

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji projektu, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu wraz z rycinami, przygotowaniu manuskryptu do druku, korespondencji z redakcją. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na* ***80%****.*

**H2** **Tankiewicz-Kwedlo A,** Hermanowicz J, Surażyński A, Rożkiewicz D, Pryczynicz A, Domaniewski T, Pawlak K, Kemona A, Pawlak D. 2016. Erythropoietin accelerates tumor growth through increase of erythropoietin receptor (EpoR) as well as by the stimulation of angiogenesis in DLD-1 and Ht-29 xenografts. Mol Cell Biochem. 421, 1-18 **(IF = 2.669; MNiSW = 20)**

 *Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji projektu, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu wraz z rycinami, przygotowaniu manuskryptu do druku, korespondencji z redakcją. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na* ***50%****.*

**H3** **Tankiewicz-Kwedlo A,** Hermanowicz JM, Surażyński A, Kwedlo W, Rożkiewicz D, Pawlak K, Domaniewski T, Pawlak D. 2017. Erythropoietin enhances the cytotoxic effect of hydrogen peroxide on colon cancer cells. Curr Pharm Biotechnol. 18, 127-137 **(IF = 2.459; MNiSW = 25)**

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji projektu, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redagowaniu manuskryptu wraz z rycinami, przygotowaniu manuskryptu do druku, korespondencji z redakcją. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na* ***75%****.*

**H4 Tankiewicz-Kwedlo A**, Hermanowicz JM, Domaniewski T, Pawlak K, Rusak M, Pryczynicz A, Surazynski A, Kaminski T, Kazberuk A, Pawlak D. 2018. Simultaneous use of erythropoietin and LFM-A13 as a new therapeutic approach for colorectal cancer. Br J Pharmacol. 175, 743-762 **(IF = 5.491; MNiSW = 40)**

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji projektu, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu wraz z rycinami, przygotowaniu manuskryptu do druku, korespondencji z redakcją. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na* ***55%****.*

**H5 Tankiewicz-Kwedlo A**, Hermanowicz JM, Pawlak K, Czarnomysy R, Bielawski K, Prokop I, Pawlak D. 2018. Erythropoietin Intensifies the Proapoptotic Activity of LFM-A13 in Cells and in a Mouse Model of Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 19, 1262 **(IF = 3.226; MNiSW = 30)**

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji projektu, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu wraz z rycinami, przygotowaniu manuskryptu do druku, korespondencji z redakcją. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na* ***65%****.*

**C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Rak jelita grubego stanowi istotny problem zarówno w aspekcie medycznym, jak też społecznym. Dynamika wzrostu zachorowań na ten nowotwór w Polsce jest wyższa niż w innych krajach Europy. Stosowana obecnie terapia jest zdecydowanie niezadawalająca. Niewątpliwe istnieje konieczność zintensyfikowania badań w zakresie zarówno wczesnej diagnostyki, jak też samej terapii tego schorzenia. Pacjenci z rakiem jelita grubego stanowią stosunkowo heterogenną grupę chorych, w związku z tym trudno jest wskazać jedyny w pełni skuteczny schemat leczenia. Istnieją pewne standardy postępowania z chorym onkologicznym, w tym przypadku podstawowym elementem terapii jest leczenie chirurgiczne mające na celu uzyskanie wolnych od nacieku nowotworowego tkanek jelita. Jako niezbędne leczenie uzupełniające do wcześniejszej interwencji chirurgicznej wprowadza się chemioterapię. Opiera się ona głównie na fluoropirymidynie, 5 fluorouracylu/kwasie foliowym, kapecytabinie oraz oksaliplatynie. W zależności od stopnia zaawansowania nowotworu oraz stanu klinicznego pacjenta stosowany jest odpowiedni schemat terapii. Według obecnie obowiązujących wytycznych celem leczenia przeciwnowotworowego jest aktywna terapia prowadząca do eradykacji komórek nowotworowych oraz zapewnienie choremu optymalnej jakości życia.

Progresja zmian nowotworowych prowadzi do wyczerpania rezerw kompensacyjnych organizmu, pojawienia się szeregu objawów utrudniających, czy wręcz uniemożliwiających funkcjonowanie chorego w społeczeństwie. Obok choroby podstawowej – niekontrolowanego rozrostu, poważny problem kliniczny stanowi niedokrwistość. Występuje ona u około 60-90% pacjentów onkologicznych, a niemal u 30% obserwowana jest niedokrwistość ciężka lub wręcz zagrażająca życiu. Stopień jej nasilenia zależy od rodzaju histopatologicznego nowotworu, stopnia zaawansowania klinicznego, czasu trwania choroby, obecności powikłań oraz metod i intensywności stosowanej terapii. W przypadku zmian nowotworowych jelita grubego do głównych przyczyn występowania niedokrwistości należą przede wszystkim przewlekle krwawienia, upośledzony pasaż jelitowy oraz zaburzenia wchłaniania. Według pacjentów onkologicznych największym problemem oprócz dolegliwości bólowych, które prawidłowo leczone są kontrolowane, jest przewlekłe wyczerpanie, które dramatycznie obniża komfort życia, co ważniejsze zmniejsza także skuteczność prowadzonej terapii (1). Opublikowane w 2004 roku wyniki badania obserwacyjnego ECAS (*European Cancer Anemia Survay*) jednoznacznie dowiodły istnienia ścisłego związku pomiędzy stężeniem hemoglobiny, a stanem sprawności pacjenta. Leczenie niedokrwistości w przebiegu chorób nowotworowych polega głównie na podawaniu koncentratu krwinek czerwonych lub suplementacji rekombinowaną ludzką erytropoetyną (Epo).

Erytropoetyna jest glikoproteiną zbudowaną ze 166 aminokwasów o masie cząsteczkowej około 30-34 kD (w zależności od zawartości węglowodanów), wytwarzaną głównie przez komórki śródmiąższowe nerek (80-90%). Gen kodujący syntezę erytropoetyny znajduje się na chromosomie 7, a stopień niedotlenienia oraz niedokrwistość to główne czynniki determinujące intensywność tego procesu (2). Erytropoetyna działa za pośrednictwem specyficznego receptora EpoR, indukując jego homodimeryzację prowadzi do aktywacji (poprzez wzajemną fosforylację) dwóch kinaz tyrozynowych JAK2. Dochodzi wówczas do fosforylacji samego receptora, jak również ośmiu reszt tyrozynowych zlokalizowanych w cytoplazmatycznej domenie receptora. W dalszej drodze wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału biorą udział kinazy MAP (aktywacja różnicowania i proliferacji), czynniki transkrypcyjne STAT5 (hamowanie apoptozy), kinaza białkowa C (nasilenie proliferacji) i inne. Erytropoetyna jest powszechnie stosowanym w leczeniu niedokrwistości czynnikiem wzrostu odpowiedzialnym za utrzymanie odpowiedniej liczby erytrocytów w układzie krążenia, zapewniając w ten sposób prawidłowe utlenowanie tkanek. Lek ten promuje przeżycie, proliferację i różnicowanie progenitorów erytropoezy, wykazuje działanie proangiogenne i antyapoptotyczne. Badania ostatnich lat wskazują, iż stosowanie erytropoetyny w leczeniu niedokrwistości u pacjentów ze zmianami rozrostowymi, poza korzystnym wpływem na parametry hematologiczne, może być obarczone poważnym działaniem niepożądanym, jakim jest promowanie procesu nowotworowego (3, 4). Działanie to wiąże się między innymi z ekspresją erytropoetyny i jej receptora na niektórych tkankach nowotworowych. Ich obecność wykazano w raku gruczołu piersiowego, szyjki i trzonu macicy, żołądka oraz jelita grubego (5). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż w obszarach nowotworu objętych niedotlenieniem obserwuje się szczególnie nasiloną ekspresję Epo i EpoR (6, 7).Stosowanie erytropoetyny daje zatem możliwość dodatkowej aktywacji receptora erytropoetynowego.Takie działanie może prowadzić do progresji choroby nowotworowej oraz skrócenia życia chorych poddawanych terapii Epo. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Leyland-Jones i wsp., w których wykazano, iż stosowanie Epo alfa u pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego z przerzutami było przyczyną wzrostu śmiertelności z powodu progresji choroby oraz incydentów zakrzepowych (8). Udowodniono także, iż terapia erytropoetyną beta u pacjentów z nowotworami głowy i szyi leczonych radioterapią zmniejszała przeżycie chorych oraz nasilała progresję guza (9). Jednocześnie część dostępnych danych literaturowych nie potwierdza takiego działania Epo, a wręcz je neguje (10). Pojawia się więc pytanie, czy stosowanie erytropoetyny rekomendowanej w leczeniu niedokrwistości u pacjentów z rakiem jelita grubego jest w pełni uzasadnione? Czy lek ten posiada czynny wpływ na przebieg choroby nowotworowej? Dziś wiemy, iż stosowanie erytropoetyny w nowotworze piersi czy nowotworach głowy i szyi skraca całkowity czas przeżycia. Czy podobnie jest w przypadku raka jelita grubego?

Biorąc powyższe pod uwagę wykonałam badania, których wyniki zostały opublikowane w artykułach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. W pierwszym etapie przeprowadziłam badania *in vitro* na komórkach gruczolakoraka jelita grubego linii DLD-1 (ATCC, USA), w których potwierdziłam konstytutywną obecność receptorów dla erytropoetyny (EpoR). Wykazałam także, iż jednoczesne zastosowanie Epo (NeoRecormon, Roche, Switzerland) i czynników cytotoksycznych, takich jak 5-FU i irinotekanu (w postaci jego aktywnego metabolitu, tj. SN-38), powoduje nasilenie działania przeciwnowotworowego, na co wskazuje zmniejszenie żywotności w teście MTT, obniżenie liczby komórek nowotworowych oraz znaczne zmniejszenie syntezy DNA ocenianej inkorporacją tymidyny. Wykorzystując metodę Chou-Talalaya udowodniłam występowanie synergizmu pomiędzy Epo a badanymi cytostatykami. Zaobserwowałam również obniżenie ekspresji EpoR w komórkach poddanych działaniu 5-FU, SN-38 oraz obu tych związków jednocześnie w porównaniu do poziomu ekspresji występującej po inkubacji z Epo. Ekspresja apoptycznego białka Bax uległa znacznemu wzrostowi po inkubacji komórek raka jelita grubego z 5-FU i 5-FU + SN38, jak również, choć w mniejszym stopniu po jednoczesnej inkubacji z Epo, 5-FU oraz SN-38 w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto stwierdziłam istotny wzrost ekspresji antyapotycznego białka Bcl-2 po inkubacji z samą Epo, jak również jej kombinacji z cytostatykami. Wynik ten był dla mnie dużym zaskoczeniem. Jednak porównując siłę działania apoptycznego z antyapoptycznym stwierdziłam przewagę działania apoptycznego po inkubacji komórek jednocześnie z Epo, 5-FU i SN-38, co jednoznacznie wskazuje na utrzymujący się efekt cytotoksyczny. Wykazałam także wzrost ekspresji Akt1 w komórkach inkubowanych z Epo oraz spadek, choć nieistotny statystycznie, jego ekspresji po jednoczesnej inkubacji komórek DLD-1 z Epo, 5-FU i SN-38. A zatem, w pracy tej potwierdziłam konstytucyjną ekspresję EpoR w komórkach raka jelita grubego linii DLD-1, jak również udział Epo w modulowaniu cytotoksycznego działania 5-FU i SN-38 w mechanizmie zależnym od EpoR (**H1**).

W dalszym etapie badań poszerzyłam materiał badawczy o komórki gruczolakoraka jelita grubego linii HT-29 (ATCC, USA), stanowiące negatywną kontrolę genu EpoR. W pracy tej porównałam wpływ egzogennej Epo (NeoRecormon, Roche, Switzerland) na komórki posiadające gen i białko EpoR, tj. DLD-1 oraz ich pozbawione, tj. HT-29. W dalszym etapie skonfrontowałam wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* z rezultatami otrzymanymi w modelu zwierzęcym (**H2**). Wykazałam, że Epo zwiększa liczbę komórek linii DLD-1, natomiast nie wykazuje istotnego wpływu na linię HT-29 w warunkach normoksji. Wykorzystując metodę obrazowania konfokalnego zaobserwowałam, że Epo nasila ekspresję ufosforylowanej postaci EpoR w EpoR-poztywynej linii, natomiast nie wpływa na linię pozbawioną tego receptora. Okazało się, że po inkubacji z Epo ekspresja całkowitej Akt ulega obniżeniu w linii HT-29, natomiast ekspresja ufosforylowanej formy Akt uległa wzrostowi w obu liniach. Obserwowany spadek ekspresji na poziomie genu oraz wzrost na poziomie białka jest najprawdopodobniej wynikiem zachodzących zmian potranslacyjnych. Podsumowując udowodniłam, że egzogenna Epo poprzez EpoR za pośrednictwem Akt aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy, promując wzrost i proliferację komórek raka okrężnicy. Celem potwierdzenia otrzymanych w warunkach *in vitro* wyników dalsze badania prowadziłam w modelu *in vivo*. Myszy szczepu Cby.Cg-Foxn1nu/J (Jackson Laboratory, USA) zostały podskórnie ostrzyknięte linią DLD-1, jak również HT-29, otrzymywały terapeutyczną dawkę Epo, tj. 600 IU/ml. Zaobserwowałam różnice w dynamice przyrostu masy guza pomiędzy ksenograftami DLD-1, a HT-29. Ku mojemu zdziwieniu szybszy przyrost masy guza stwierdziłam u EpoR negatywnych ksenograftów. W badaniach immunohistochemicznych potwierdzałam wyższy poziom ekspresji EpoR zlokalizowanego błonowo-cytoplazmatycznie oraz śródkomórkowo u DLD-1 ksenograftów w porównaniu do HT-29 ksenograftów. Badanie to wykazało, że egzogenna Epo poprzez wzrost ekspresji EpoR, jak również receptora czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (Flt-1) nasila angiogenezę, a tym samym przyczynia się do wzrostu guza. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno komórki EpoR-pozytywne jak i EpoR-ujemne podlegają regulacji przez egzogenną Epo. A zatem, egzogenna Epo zwiększa ryzyko progresji guza w raku jelita grubego i nie powinna być stosowana w leczeniu anemii występującej w tego typu nowotworach. Wciąż otwartym pozostawało jednak pytanie, w jaki sposób Epo oddziaływuje na komórki EpoR-ujemne.

Promieniowanie jonizujące, jak również stosowanie leków alkilujących prowadzą do wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach, które wraz z rozwijającym się nowotworem mogą przyczynić się do wystąpienia niedokrwistości obserwowanej u około 60-80% pacjentów onkologicznych (11). Dlatego też w kolejnym etapie badań próbowałam ocenić efekty działania egzogennej Epo na komórki narażone na stres oksydacyjny w eksperymentalnym modelu radioterapii (**H3**). W tym celu zastosowałam model *in vitro* odzwierciedlający zmiany wewnątrzkomórkowe spowodowane wysokim stężeniem reaktywnych form tlenu w komórkach linii DLD-1, a następnie zastosowałam egzogenną Epo. Uzyskane wyniki dowiodły, że jednoczesna inkubacja komórek raka okrężnicy z Epo i nadtlenkiem wodoru (H2O2) wykazuje działanie przeciwnowotworowe wyrażone zahamowaniem wzrostu i proliferacji. Ponadto zaobserwowałam, że dodanie Epo do H2O2 nasila efekty powodowane przez H2O2, tj.obniża ekspresję EpoR, ufosforylowanej postaci EpoR oraz antyapoptycznego białka Bcl-2, natomiast nasila ekspresję Akt oraz ufosforylowanej postaci. Reasumując, dodanie Epo do H2O2 intensyfikuje jego efekt cytotoksyczny. A zatem, zastosowanie egzogennej Epo podczas radioterapii nasila efekty cytotoksyczne wywierane przez powstające reaktywne formy tlenu i tym samym może stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w walce przeciwnowotworowej.

Kinaza Brutona (Btk) odgrywa ważną rolę w rozwoju nowotworów wywodzących się z komórek B, aktywując szlaki antyapoptyczne (12). Blokowanie aktywności Btk poprzez stosowanie wprowadzonych już do lecznictwa (ibrutynib, sorafenib), bądź obecnie intensywnie badanych (GDC0834, CGI-560, CGI-1746) licznych inhibitorów tej kinazy skutecznie hamuje proces nowotworowy. Należy wyraźnie podkreślić, że inhibitory Btk znalazły dotychczas zastosowanie w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. Brak jest natomiast jakichkolwiek danych dotyczących jego wpływu na komórki raka jelita grubego. Dlatego też w dalszych etapach badań skupiłam się na LFM-A13, niskocząsteczkowym inhibitorze Btk, który dodatkowo hamuje także kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz indukowaną Epo fosforylację receptora EpoR. Udowodniono, że związek ten blokuje związane z receptorem EpoR kinazy janusowe JAK 2 (JAK2), przerywając w ten sposób wewnątrzkomórkowy szlak przekaźnictwa sygnału (13). Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań zawarłam w pracy **H5.** W modelu *in vivo* wykazałam, że jednoczesne zastosowanie Epo wraz z LFM-A13, jako powtarzany schemat terapeutyczny, nie tylko istotne spowalniało tempo wzrostu komórek nowotworowych, ale także prowadziło do całkowitej regresji niskozaawansowanych zmian nowotworowych. Połączenie czynnika wzrostu, jakim jest Epo, z LFM-A13 skutecznie hamowało wzrost masy guza u myszy z indukowanym nowotworem linii DLD-1 i HT-29. W przypadku guzów o niewielkiej objętości terapia skojarzona skutkowała całkowitym zanikiem zmian rozrostowych. Wykazałam, iż Epo istotnie nasila przeciwnowotworową aktywność LFM-A13, prawdopodobnie na drodze fosforylacji wewnątrzkomórkowych szlaków, które jedynie w formie aktywnej stanowią punkt uchwytu dla działania powyższego inhibitora Btk. Oprócz wspomnianego powyżej efektu cytostatycznego, zaproponowana skojarzona terapia korygowała rozwijającą się u badanych zwierząt niedokrwistość, prowadząc tym samym do poprawy parametrów hematologicznych. Połączenie to okazało się także skuteczne w badaniach *in vitro*, gdzie łączne podanie Epo z LFM-A13 skutkowało zahamowaniem proliferacji, zmniejszeniem liczby komórek, ograniczeniem przyczepności do podłoża, osłabianiem szlaków sygnałowych indukowanych przez Btk, jak również obniżeniem ekspresji kinazy Polo-podobnej 1 (Plk) i zaburzeniem tworzenia wrzeciona kariokinetycznego w komórkach raka jelita grubego, co prowadziło do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych. Reasumując, zaprezentowany w tej pracy schemat terapeutyczny wykazuje wysoką skuteczność wobec komórek raka jelita grubego. Przedstawione w tej pracy wyniki badań zostały zawarte w zgłoszeniu patentowym (P.413921).

Poszukując mechanizmu synergistycznego działania jednocześnie zastosowanej Epo i LFM-A13 na proces apoptozy przeprowadziłam kolejne badania *in vitro* i *in vivo*, których wyniki zamieściłam w pracy **H5**. Potwierdziłam w nich obniżenie żywotności komórek gruczolaka jelita grubego linii DLD-1 oraz HT-29, a dodatkowo wykazałam nasilenie apoptozy będące efektem wyciszenia szlaków wewnątrzkomórkowych, takich jak JAK, AKT i MAPK. Stwierdziłam natomiast wzrost ekspresji BAX oraz wskaźnika BAX/BCL-2 potwierdzający nasilenie procesu apoptozy. Obserwowane zmiany były bardziej nasilone w linii DLD-1 niż HT-29. Efekt cytotoksyczny Epo i LFM-A13 potwierdziłam także metodą cytometrii przepływowej z użyciem aneksyny V. W celu zbadania komórkowego mechanizmu apoptozy w komórkach raka jelita grubego oceniałam zmiany mitochondrialnego potencjału transbłonowego za pomocą analizy cytometrii przepływowej. Stwierdziłam, że Epo i LFM-A13 zwiększa liczbę komórek o obniżonym poziomie potencjału mitochondrialnego (MMP) zarówno w komórkach linii DLD-1, jak i HT-29. W badaniach *in vivo* potwierdziłam wcześniej obserwowaną redukcję objętości guza u DLD-1 i HT-29 ksenograftów (**H4**). Badania immunohistochemiczne w guzie HT-29 ksenograftów wykazały wysoką ekspresję drugiego receptora dla Epo (β *common receptor*; βcR), która ulega istotnej redukcji podczas terapii Epo i LFM-A13. Obserwacja ta okazała się odpowiedzią na nurtujące pytanie dotyczące mechanizmu oddziaływania Epo na komórki EpoR negatywne. Wykazałam, że w komórkach EpoR ujemnych, takich jak linia HT-29, egzogenna Epo działa poprzez receptor βcR. Wyniki zawarte w pracy **H4** oraz **H5** jednoznacznie potwierdzają skuteczność antyproliferacyjną i proapotyczną łącznego stosowania Epo i LFM-A13. Wdrożenie prezentowanej terapii opartej na kojarzeniu efektów wywołanych przez oba te związki stwarza realne szanse eradykacji komórek raka jelita grubego przy stosunkowo słabo zaznaczonych działaniach niepożądanych. Do chwili obecnej nie opracowano skutecznej i bezpiecznej terapii przeciwnowotworowej, która z jednej strony hamowałaby sam proces nowotworowy, natomiast z drugiej, redukowała objawy niedokrwistości towarzyszące chorobie podstawowej. Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że łączne zastosowanie Epo i LFM-A13 posiada implikacje kliniczne, a zaproponowany sposób eliminacji komórek nowotworowych na drodze niezależnych mechanizmów wykazuje wysoką efektywność, co z kolei przedkłada się na możliwość wdrożenia tej metody do rutynowej terapii pacjentów chorych na raka jelita grubego.

**Podsumowanie osiągnięć stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego**

Przedstawione powyżej etapy badań, będące przedmiotem niniejszej rozprawy, których szczegółowe wyniki przedstawiłam w załączonych do wniosku kopiach prac (**Załącznik nr 4**), oceniają wpływ egzogennej erytropoetyny na komórki gruczolaka jelita grubego.

Do najważniejszych osiągnięć poznawczych należy zaliczyć:

1. Wykazanie różnic w efektach działania egzogennej Epo zależnie od wysokiej (linia DLD-1) lub niskiej ekspresji EpoR (linia HT-29).
2. Potwierdzenie udziału receptora βcR w mechanizm działania egzogennej Epo w linii pozbawionej obecności receptora EpoR.
3. Zaobserwowanie synergizmu pomiędzy egzogenną Epo a cytostatykami, takimi jak 5-fluorouracyl i irinotekan, w ich efekcie cytotoksycznym. Stwierdzenie intensyfikacji efektu cytotoksycznego nadtlenku wodoru po dodaniu egzogennej Epo oraz wykazanie, że zastosowanie Epo podczas chemioterapii lub radioterapii może nieść potencjalne korzyści dla pacjentów z rakiem okrężnicy.
4. Udowodnienie, że jednoczesne zastosowanie Epo i LFM-A13 wykazuje działanie antyproliferacyjne wobec komórek raka okrężnicy, jak również skutecznie zmniejsza tempo przyrostu guza u ksenograftów. Uzyskane wyniki badań sugerują, że pobudzane przez Epo receptory EpoR znajdujące się na komórkach nowotworowych wykazują silną fosforylację kinaz jansunowych, będących punktem uchwytu LFM-A13, co wydaje się odpowiadać za silniejszy efekt przeciwnowotworowy tego związku w obecności Epo.
5. Zaproponowany sposób eliminacji komórek nowotworowych na drodze niezależnych mechanizmów wykazuje wysoką efektywność, co z kolei przekłada się na możliwość wdrożenia tej metody do rutynowej terapii pacjentów chorych na raka jelita grubego przy jednoczesnej redukcji działań niepożądanych obserwowanych w czasie klasycznej terapii, tj. niedokrwistości.

Piśmiennictwo

1. Alexiusdottir KK, Möller PH, Snaebjornsson P, Jonasson L, Olafsdottir EJ, Björnsson ES, Tryggvadottir L, Jonasson JG. 2012. Association of symptoms of colon cancer patients with tumor location and TNM tumor stage. Scand J Gastroenterol. 47, 795-801.
2. Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y. 2008. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. Expert Rev Mol Med. 10, e36.
3. Tong H, Ren Y, Zhang F, Jin J. 2008. Homoharringtonine affects the JAK2-STAT5 signal pathway through alteration of protein tyrosine kinase phosphorylation in acute myeloid leukemia cells. Eur J Haematol. 81, 259–266.
4. Tsuboi M, Ezaki K, Tobinai K, Ohashi Y, Saijo N. 2009. Weekly administration of epoetin for chemotherapyinduced aemia in cancer patients: Results of a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebocontrolled study. Jpn J Clin Oncol. 39, 163–168.
5. Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA, Haroon ZA. 2002. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. Lab Invest. 82, 911–918.
6. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. Cancer Res. 61, 3561-3565.
7. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. 2008. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. Crit Rev Oncol Hematol. 67, 39–61.
8. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. 2005. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. J Clin Oncol. 23(25), 5960-5972.
9. Henke M, Laszig R, Rübe C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. 2003. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 362(9392),1255-1260.
10. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. 2006. Erythropoietin biology in cancer. Clin Cancer Res. 12, 332–339.
11. Rosso R, Del Mastro L, Venturini M, Bergaglio M, Pasquetti W, Garrone O. 1997. Use of erythropoietin in oncology. Tumori 83(4), S26-S30.
12. Uckun F. M., Zheng Y. United States patent number 6,221,900 April 24, 2001B1 United States Government Printing Office BTK inhibitors and methods for their identification and use. Washington, DC.
13. van den Akker E, van Dijk TB, Schmidt U, Felida L, Beug H, Löwenberg B, von Lindern M. 2004.The Btk inhibitor LFM-A13 is a potent inhibitor of Jak2 kinase activity. Biol Chem. 385(5), 409-413.

**5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.**

**A. Dane bibliometryczne.**

Jestem autorką i współautorką 35 publikacji naukowych, w tym 33 prac oryginalnych, z których w 18 jestem pierwszym lub drugim autorem. Ponadto, jestem współautorką 34 doniesień zjazdowych, w tym 19 krajowych i 15 zagranicznych opublikowanych w czasopismach lub materiałach zjazdowych.

Łączny dorobek naukowy wynosi:

* Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 33.385; łączna punktacja MNiSW: 322 pkt
* Liczba wszystkich cytowań publikacji według Web of Science TM Core Collection: 225
* Liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji według Web of Science TM Core Collection: 207
* Indeks Hirscha według Web of Science TM Core Collection: 7

**B. Tematyka prac badawczych (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w punkcie 4).**

**Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

Od trzeciego roku studiów aktywnie uczestniczyłam w kole naukowym przy Zakładzie Farmakodynamiki. Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora składał się z 6 prac doświadczalnych, 1 pracy poglądowej oraz 10 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Łączny IF stanowiących dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi 6.787 i 56 pkt MNiSW. Prace z tego okresu można pogrupować w dwa, poniżej zaprezentowane, cykle tematyczne przede wszystkim związane z chorobami nerek.

**A. Metabolizm tryptofanu szlakiem kinureninowym**

Cykl ten obejmuje prace przedstawiające zachowanie się metabolitów tryptofanu w doświadczalnym modelu przewlekłej choroby nerek u szczurów. Wykazaliśmy w nich wzrost przemian tryptofanu szlakiem kinureninowym prowadzący do kumulacji związków neuroaktywnych, takich jak kwas kinureninowy, kwas chinolinowy oraz związków wysoce reaktywnych, jak 3-hydroksykinurenina, czy kwas 3-hydroksyantanilowy. Obserwowany w tkankach obwodowych oraz w ośrodkowym układzie nerwowym wzrost stężeń tych związków z jednej strony spowodowany był ich kumulacją wskutek zaburzenia funkcji wydalniczej nerek, ale również wzrostem aktywności enzymów zaangażowanych w proces ich syntezy.

W pierwszej pracy ocenialiśmy obwodowy metabolizm tryptofanu w różnych stadiach eksperymentalnej przewlekłej choroby nerek u szczurów. Wykazaliśmy znaczne zaburzenia w tym szlaku, polegające na istotnym statystycznie obniżeniu stężenia tryptofanu w osoczu i wzroście stężenia jego metabolitów. Wysokie stężenia 3-hydroksykynureniny, kwasu ksanturenowego, kinureninowego, antranilowego i kwasu chinolinowego dodatnio korelowały ze stopniem niewydolności nerek. Biorąc pod uwagę biologiczne właściwości metabolitów tryptofanu, ich akumulacja we krwi może być co najmniej częściowo odpowiedzialna za nasilenie mocznicy, jak również za powikłania towarzyszące temu schorzeniu, takie jak neuropatia, zwiększona podatność na infekcje, nadciśnienie, zaburzenia lipidowe i niedokrwistość (1A).

Nerki biorą udział w metabolizmie tryptofanu na dwa sposoby. Z jednej strony czynnie eliminują jego pochodne, a z drugiej posiadają enzymy biorące udział w metabolizmie tryptofanu głównie szlakiem kinureninowym. Dokładna charakterystyka enzymów, jak również ich substratów i produktów została przedstawiona w pracy poglądowej (2A). Celem kolejnego badania była ocena przebiegu zmian w obwodowej degradacji tryptofanu podczas eksperymentalnej przewlekłej choroby nerek u szczurów. Oceniliśmy w nim stężenie tryptofanu, kinureniny, 3-hydroksykinureniny, kwasu kinureninowego, ksanturynowego, antranilowego i chinolinowego w osoczu stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV, fluorescencyjną i elektrochemiczną. Zaobserwowaliśmy obniżenie stężenia tryptofanu z jednoczesnym wzrostem stężeń metabolitów szlaku kinureninowego, co wyraźnie wskazuje na znaczne zaburzenia obwodowego szlaku kinureninowego w przebiegu przewlekłej choroby nerek mogące przyczyniać się do występowania objawów towarzyszących mocznicy (4A).

Ponieważ przewlekła choroba nerek powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego nie można wykluczyć, iż zmieniony metabolizm niektórych kinurenin może odgrywać ważną rolę w patogenezie encefalopatii mocznicowej. W tym celu oceniliśmy poziom tryptofanu, kinureniny i 3-hydroksykinureniny w osoczu oraz różnych regionach mózgu szczurów z mocznicą. Całkowite stężenie tryptofanu w osoczu, jak również we wszystkich badanych obszarach mózgu uległo istotnemu statystycznie obniżeniu u zwierząt z zaawansowaną chorobą nerek w porównaniu do grupy kontrolnej. Niespodziewanie zaobserwowaliśmy wzrost stężenia kinureniny i 3-hydroksykinureniny zarówno w osoczu, jak i w różnych regionach mózgu. U zwierząt mocznicowych poziom kinureniny był~~y~~ około dwa razy wyższy w móżdżku, śródmózgowiu i korze mózgowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast zmiany poziomu 3-hydroksykinureniny były najbardziej widoczne w prążkowiu i rdzeniu. Dane te sugerują, że przewlekła choroba nerek powoduje głębokie zaburzenia szlaku kinureninowego w OUN, co może być odpowiedzialne za nieprawidłowości neurologiczne obserwowane u mocznicy (5A).

Kolejnym tematem badawczym była ocena zachowania się metabolitów tryptofanu szklaku kinureninowego u pacjentów z zaćmą towarzyszącą cukrzycy (3A). Stężenie tryptofanu, kynureniny, 3-hydroksykinureniny, kwasu kinureninowego i antranilowego mierzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w cieczy wodnistej i soczewkach pozyskanych w trakcie chirurgicznego usunięcia zaćmy. Stwierdziliśmy wzrost stężenia kinureniny, 3-hydroksykinureniny i kwasu antranilowego w cieczy wodnistej pacjentów z cukrzycą, jak również wzrost stężenia tryptofanu i wszystkich jego analizowanych metabolitów w soczewkach. Uzyskane wyniki wskazują, iż przyczyną występującego u tych pacjentów zmętnienia soczewki najprawdopodobniej są efekty wywierane przez pochodne tryptofanu (3A).

1. Pawlak D, **Tankiewicz A**, Buczko W. 2001. Kynurenine and its metabolites in the rat with experimental renal insufficiency. J Physiol Pharmacol. 52, 755-766.
2. **Tankiewicz A**, Pawlak D, Buczko W. 2001. Enzymy szlaku kinureninowego. Postepy Hig Med Dosw. 55, 715-731.
3. Andrzejewska-Buczko J, Pawlak D, **Tankiewicz A**, Matys T, Buczko W. 2001. Possible involvement of kynurenamines in the pathogenesis of cataract in diabetic patients. Med Sci Monit. 7, 742-745.
4. Pawlak D, **Tankiewicz A**, Mysliwiec P, Buczko W. 2002. Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in experimental chronic renal failure. Nephron 90, 328-335.
5. Topczewska-Bruns J, Pawlak D, Chabielska E, **Tankiewicz A**, Buczko W. 2002. Increased levels of 3-hydroxykynurenine in different brain regions of rats with chronic renal insufficiency. Brain Res Bull. 58, 423-428.

**B. Zmiany behawioralne i farmakoterapia przewlekłych chorób nerek**

Kontynuując temat chorób nerek w dalszym etapie oceniliśmy zmiany behawioralne u szczurów z doświadczalnie indukowaną niewydolnością nerek. W teście otwartego pola zaobserwowaliśmy spadek aktywności lokomotorycznej, eksploracyjnej i emocjonalnej u zwierząt z zaawansowaną chorobą nerek. Zmianom tym towarzyszył wzrost poboru wody z jednoczesnym zmniejszeniem spożycia pokarmu, co prowadziło do spadku masy ciała. Zatem zaobserwowane zaburzenia zachowania towarzyszące przewlekłym chorobom nerek u szczurów wykazywały szereg analogii do zaburzeń występujących u pacjentów, przez co opisany przez nas eksperymentalny model przewlekłej choroby nerek wydaje się być dobrym narzędziem do badań farmakologicznych (6A).

Długotrwałe leczenie cyklosporyną A wskazane między innymi po transplantacji nerki wiąże się z rozwojem nadciśnienia i nefrotoksycznością. Inhibitory konwertazy angiotensyny, podobnie jak antagoniści receptora 1 angiotensyny, posiadają właściwości nefroprotekcyjne i mogą zapobiegać nadciśnieniu wywołanemu przez cyklosporynę A. Dlatego też w dalszym etapie zbadaliśmy czy losartan lub enalapryl podawany wraz z cyklosporyną A obniża nefrotoksyczne działanie cyklosporyny A u szczurów z doświadczalnie indukowaną mocznicą. Udowodniliśmy, że leczenie cyklosporyną A w kombinacji z losartanem lub enalaprylem powoduje wzrost stężenia kreatyniny i mocznika oraz obniżenie hematokrytu u szczurów. Uzyskane wyniki sugerują zachowanie szczególnej ostrożności w przypadku biorców allogenicznych nerki leczonych losartanem lub enalaprylem w połączeniu z cyklosporyną (7A).

1. Topczewska-Bruns J, **Tankiewicz** **A**, Pawlak D, Buczko W. 2001. Behavioral changes in the course of chronic renal insufficiency in rats. Pol J Pharmacol. 53, 263-269.
2. Azzadin A, Małyszko J, Małyszko JS, **Tankiewicz A**, Myśliwiec M, Buczko W. 2002. Effects of combination of cyclosporine with losartan or enalapril on kidney function in uremic rats. Pol J Pharmacol. 54, 469-473.

**Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w roku 2002 kontynuowałam zainteresowania badawcze koncentrując się na metabolizmie tryptofanu szlakiem kinureninowym w różnych stanach patologicznych, takich jak niewydolność nerek, niedokrwistość czy schorzenia alergiczne. Poniższe prace cechują się różnorodnością modeli badawczych, w tym badania *ex vivo* na materiale ludzkim oraz badania *in vivo* – przeprowadzone na modelach zwierzęcych.

**A. Metabolizm tryptofanu szlakiem kinureninowym**

Nasze wcześniejsze prace wskazywały, że szlak kinureninowy może być ważnym patomechanizmem w rozwoju przewlekłej choroby nerek. Dlatego w dalszym badaniu przeprowadzonym na szczurach ze schyłkową przewlekłą chorobą nerek oceniliśmy w osoczu, jak również w nerkach i wątrobie stężenie tryptofanu, kinureniny oraz 3-hydroksykinureniny. Dodatkowo poszukując mechanizmu prowadzącego do wcześniej zaobserwowanych zmian, oceniliśmy aktywność enzymatyczną 2,3-dioksygenazy tryptofanowej (TDO) w wątrobie, 2,3-dioksygenazy indolowej w nerkach (IDO) i 3-hydroksylazy kinureninowej (HK) w wątrobie i nerkach. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, stężenie tryptofanu w osoczu i tkankach uległo istotnemu statystycznie obniżeniu, natomiast stężenia jego metabolitów wzrosły w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowaliśmy wzrost aktywności TDO i HK, podczas gdy aktywność IDO pozostała niezmieniona. Uzyskane wyniki wskazują, iż wzrost aktywności TDO i HK wraz z zaburzeniami funkcji wydalniczej nerek może być odpowiedzialny za wzrost stężenia kinureniny i 3-hydroksykinureniny w eksperymentalnej przewlekłej chorobie nerek (1B).

Przewlekła choroba nerek związana jest z zaburzeniami neurologicznymi, ale wciąż nie jest dokładnie sprecyzowane, które substancje odpowiedzialne są za te nieprawidłowości. Dlatego celem dalszych naszych badań była ocena stężenia tryptofanu, kinureniny i kwasu antranilowego w osoczu, a także w różnych regionach mózgu u szczurów z mocznicą. Wykazaliśmy w nich, że stężenie tryptofanu w osoczu i mózgu uległo zmniejszeniu, natomiast poziom kinureniny i kwasu antranilowego podwyższeniu, zarówno w osoczu, jak i w ośrodkowym układzie nerwowym. Jedynie w móżdżku i hipokampie nie stwierdziliśmy różnic w stężeniu kwasu antraniliowego pomiędzy szczurami kontrolnymi a mocznicowymi. Przypuszczamy, że kumulacja metabolitów tryptofanu w tkance nerwowej może być zaangażowana w patogenezę szeregu zaburzeń neurologicznych w mocznicy (2B).

W ostatniej, podsumowującej pracy przeprowadzonej na modelu zwierzęcym, zbadaliśmy dystrybucję oraz metabolizm kinureniny u szczurów z doświadczalną przewlekłą chorobą nerek o różnym nasileniu, wywołaną jednostronną nefrektomią i częściowym usunięciem przeciwległej kory nerki. Wykazaliśmy obniżenie stężenia tryptofanu w osoczu i homogenatach nerek, wątroby, płuc, jelita i śledziony u zwierząt z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu do grupy kontrolnej. Zmianom tym towarzyszyła zwiększona aktywność 2,3-dioksygenazy tryptofanowej, enzymu ograniczającego szybkość przemian tryptofanu szlakiem kinureninowym u szczurów, podczas gdy aktywność 2,3-dioksygenazy indolowej pozostawała niezmieniona. Zmianom tym towarzyszył wzrost stężenia w osoczu i tkankach kinureniny, 3-hydroksykinureniny, jak również kwasu antranilowego, kinureninowego, ksanturynowego i chinolinowego w nerkach, wątrobie, płucach, jelicie, śledzionie i mięśniach. Stopień kumulacji kinureniny i produktów jej degradacji był proporcjonalny do stopnia niewydolności nerek i korelował ze stężeniem markera funkcji nerek - kreatyniny. Aktywność aminotransferazy kinureninowej, kinureninazy i 3,4-dioksygenazy kwasu 3-hydroksyantranilowego była zmniejszona lub niezmieniona, podczas gdy aktywność 3-hydroksylazy kinureninowej była znacznie zwiększona. Uzyskane wyniki wskazują, że przewlekła choroba nerek wiąże się z gromadzeniem metabolitów tryptofanu, które mogą być zaangażowane w patogenezę niektórych zespołów mocznicowych (3B).

Wykazaliśmy także wzrost stężenia kinureniny, 3-hydroksykinureniny, kwasu kinureninowego i antranilowego w osoczu oraz ślinie u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami, co sugeruje zmieniony metabolizm kinureniny w mocznicy i potwierdza wcześniejsze wnioski wysunięte na podstawie badań w modelu zwierzęcym (10B).

Niedokrwistość normocytowa jest powszechnym zespołem występującym u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Jednocześnie u tych pacjentów obserwuje się wzrost degradacji tryptofanu szlakiem kinureninowym. Na podstawie tych obserwacji staraliśmy się zbadać, czy jeden z metabolitów tryptofanu, kwas antranilowy, oddziaływuje na błony erytrocytów i z tego powodu może przyczyniać się do rozwoju anemii. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek zaobserwowaliśmy zmiany charakterystyczne dla anemii normocytowej, takie jak zmniejszenie liczby erytrocytów, obniżenie stężenia hemoglobiny, obniżenie hematokrytu i zmniejszenie oporności osmotycznej erytrocytów, jak również wzrost stężenia kwasu antranilowego w osoczu w porównaniu do osób zdrowych. Wykazaliśmy również istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy stężeniem kwasu antranilowego, a stężeniem kreatyniny i mocznika, a także ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem kwasu antranilowego, a parametrami hematologicznymi. Ponadto udowodniliśmy, że inkubacja zdrowych erytrocytów z kwasem antranilowym w stężeniu 10 i 100 µM powodowała przesunięcie krzywej hemolizy w prawo, co wskazuje na spadek oporności osmotycznej. Podsumowując wykazaliśmy, że wzrost stężenia kwasu antranilowego w osoczu może być jednym z wielu czynników uszkadzających błonę erytrocytów, a tym samym przyczyniającym się do rozwoju niedokrwistości u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (4B). Kontynuując problem anemii wykazaliśmy, że 3-hydroksykinurenina hamując syntezę erytropoetyny również przyczynia się do rozwoju niedokrwistości w przebiegu przewlekłej choroby nerek (5B).

Kolejne prace powstały w ramach współpracy z Kliniką Chirurgii Szczękowej (6B, 11B). Udowodniliśmy w nich, że degradacja tryptofanu jest ściśle powiązana z modulacją proliferacji komórek raka płaskonabłonkowego (SCC). Oceniając stężenie tryptofanu i jego pochodnych, takich jak kwas antranilowy i kinureninowy w osoczu, ślinie i guzie oraz w zdrowej błonie śluzowej jamy ustnej u pacjentów z SCC stwierdziliśmy wzrost stężenia tryptofanu, kwasu antranilowego i kinureninowego w tkance nowotworowej. Możemy przypuszczać, że te substancje mogą być jednym z wielu czynników odpowiedzialnych za rozwój raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (6B,8B).

Następny cykl tematyczny dotyczy prac w ramach współpracy z Zakładem Ortodoncji i Zakładem Histologii. Wiedząc, iż kwas antranilowy odgrywa ważną rolę w regulacji procesów immunologicznych, jak również wykazuje działanie przeciwbakteryjne celem naszych badań było oznaczenie stężenia tego związku w ślinie młodych pacjentów poddanych leczeniu ortodontycznemu. Po raz pierwszy wykazaliśmy wzrost stężenia kwasu antranilowego w ślinie młodych osób z aparatami ortodontycznymi. Nie zaobserwowaliśmy istnienia korelacji między stężeniem kwasu antranilowego w ślinie, a czasem leczenia ortodontycznego. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że kwas antranilowy może być jednym z wielu czynników inicjujących choroby przyzębia podczas leczenia ortodontycznego (7B, 9B).

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną obejmującą aktywację układu odpornościowego regulowanego przez szlak kinureninowy. Celem oceny zaangażowania metabolitów tryptofanu w patogenezę tego schorzenia indukowaliśmy szczurzy model astmy stosując albuminę jaja kurzego (OVA). Rozwój astmy potwierdziliśmy pomiarem całkowitego IgE w osoczu i badaniem histologicznym. U uczulonych szczurów OVA stężenie całkowitej IgE było statystycznie istotnie zwiększone w porównaniu do grupy kontrolnej. U zwierząt chorych na astmę znacznie wzrosła liczba eozynofili, neutrofili i komórek tucznych, występowały zmiany nabłonkowe i wzrost komórek nabłonkowych dróg oddechowych oraz obrzęk błony śluzowej oskrzeli. Nie obserwowaliśmy żadnych znaczących zmian w stężeniu kinureniny w osoczu, płucach i wątrobie pomiędzy badanymi grupami. Podsumowując, stwierdziliśmy, że stężenie kinureniny pozostaje niezmienione u zwierząt chorych na astmę w porównaniu z grupa kontrolną (11B).

Szlak kinureninowy może być zaangażowany w występowanie i rozwój nadciśnienia. Celem kolejnego badania była ocena aktywności obwodowego szlaku kinureninowego u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym w modelu Goldblatta 2K1C. Nadciśnienie indukowaliśmy poprzez zwężenie tętnicy nerkowej lewej nerki u szczurów. Oznaczenie metabolitów szlaku tryptofanu i kinureniny ocenialiśmy w osoczu i tkankach uzyskanych w 4, 8 i 16 tygodniu po interwencji chirurgicznej. Ingerencja chirurgiczna doprowadziła do wzrostu wartości średniego ciśnienia krwi i skurczowego ciśnienia krwi, podczas gdy stężenie tryptofanu uległo obniżeniu u zwierząt doświadczalnych w porównaniu z kontrolą. Jednocześnie zaobserwowaliśmy znaczny wzrost stężenia kinureniny, jak również aktywności 2,3-dioksygenazy tryptofanu u szczurów z rozwiniętym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z kontrolą. Stwierdziliśmy występowanie odwrotnej zależności między stężeniem tryptofanu w osoczu, a wartościami ciśnienia skurczowego i stężeniem angiotensyny II. Tryptofan wpływał na stężenie angiotensyny II u szczurów z nadciśnieniem. Natomiast aktywność 2,3-dioksygenazy tryptofanu i metabolity kinureniny w osoczu korelowały dodatnio z wartościami ciśnienia krwi, jak również z poziomami angiotensyny II u tych zwierząt. 2,3-dioksygenaza tryptofanowa i część metabolitów kinureninowych w osoczu i tkankach dodatnio korelowały z wartościami ciśnienia krwi i poziomem angiotensyny II. Reasumując, nadciśnienie naczyniowe wpływa na szlak kinureninowy i prowadzi do zaburzenia równowagi tryptofanu i jego metabolitów. Chociaż mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska są niejasne, nasz eksperyment po raz pierwszy wykazał związek między nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym a aktywacją szlaku kinureninowego (12B).

1. **Tankiewicz A**, Pawlak D, Topczewska-Bruns J, Buczko W. 2003. Kidney and liver kynurenine pathway enzymes in chronic renal failure. Adv Exp Med Biol. 527, 409-414.
2. Topczewska-Bruns J, Pawlak D, **Tankiewicz A**, Chabielska E, Buczko W. 2003. Kynurenine metabolism in central nervous system in experimental chronic renal failure. Adv Exp Med Biol. 527, 177-182.
3. Pawlak D, **Tankiewicz A**, Matys T, Buczko W. 2003. Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. J Physiol Pharmacol. 54, 175-189.
4. **Tankiewicz A**, Pawlak D, Pawlak K, Szewc D, Myśliwiec M, Buczko W. 2005. Anthranilic acid-uraemic toxin damaged red cell's membrane. Int Urol Nephrol. 37, 621-627.
5. Pawlak D, Koda M, **Tankiewicz A**, Wołczyński S, Buczko W. 2003. 3-Hydroksykinurenina - toksyna mocznicowa, która hamuje syntezę erytropoetyny w przewlekłej niewydolności nerek. Acta Haematologica Polonica 34 (supl. 2), 374-375.
6. **Tankiewicz A**, Dziemiańczyk D, Buczko P, Szarmach IJ, Grabowska SZ, Pawlak D. 2006. Tryptophan and its metabolites in patients with oral squamous cell carcinoma: preliminary study. Adv Med Sci. 51 Suppl 1, 221-224.
7. **Tankiewicz A**, Buczko P, Szarmach IJ, Kasacka I, Pawlak D. 2006.The concentration of anthranilic acid in saliva of orthodontic appliances. Adv Med Sci. 51 Suppl 1, 31-33.
8. **Tankiewicz-Kwedlo A**, Buczko P, Dziemiańczyk-Pakieła D, Szarmach IJ, Grabowska SZ, Topczewska-Bruns J, Pawlak D. 2007. Tryptophan metabolism in patients with oral squamous cell carcinoma. Polish Journal of Environmental Studies 16(2C Part 1), 120-124.
9. Szarmach IJ, Buczko P, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Kasacka I, Tankiewicz J, Pawlak D. 2007. The concentration of kynurenine and anthranilic acid in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. Polish Journal of Environmental Studies 16 (2C Part 1), 125-127.
10. Buczko P, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Buraczewska A, Myśliwiec M, Pawlak D. 2007. Accumulation of kynurenine pathway metabolites in saliva and plasma of uremic patients. Pharmacological Reports 59 (supl. 1), 199-204.
11. Kucharewicz I, Kasacka I, Pawlak D, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Mroczko B, Buczko W, Bodzenta-Lukaszyk A. 2008. The concentration of kynurenine in rat model of asthma. Folia Histochem Cytobiol. 46, 199-203.
12. Bartosiewicz J, Kaminski T, Pawlak K, Karbowska M, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Pawlak D. 2017. The activation of the kynurenine pathway in a rat model with renovascular hypertension. Exp Biol Med (Maywood). 242, 750-761.

**B. Patogeneza i farmakoterapia schorzeń układu sercowo-naczyniowego**

 Poszukując mechanizmów zakrzepicy wewnątrznaczyniowej występującej w czasie farmakoterapii aliskirenem, tj. pierwszym doustnym inhibitorem reniny, przeprowadziliśmy badania z użyciem doświadczalnego modelu nadciśnienia nerkopochodnego u szczurów. Zwierzęta otrzymywały *per os* aliskirenem (10, 30 i 100 mg/kg/dziennie) przez 10 dni, po czym przez elektryczną stymulację wspólnej tętnicy szyjnej została wywołana zakrzepica tętnicza. Zaobserwowaliśmy, że aliskiren w sposób zależny od dawki obniża masę zakrzepu tętniczego u szczurów normotensyjnych i hipertensyjnych. Wynik ten nie był związany z wpływem na ciśnienie krwi, stężenie tromboplastyny tkankowej, czasem protrombinowym, czasem kaolinowo-kefalinowym, stężeniem fibrynogenu i parametrami hematologicznymi. Stwierdziliśmy natomiast wzrost aktywności t-PA z równoczesnym obniżeniem aktywności jego inhibitora. Uzyskane wyniki wskazują, że aliskiren hamuje hemostazę w zakrzepicy tętniczej u szczurów. Działanie przeciwzakrzepowe jest związane z poprawą równowagi fibrynolitycznej, a także zależy od działania przeciwpłytkowego (15B). W modelu zakrzepicy żylnej wykazaliśmy zależną od dawki redukcję masy zakrzepu u szczurów z nadciśnieniem i normotensją. Ponadto zaobserwowaliśmy zmniejszenie indukowanej kolagenem agregacji płytek krwi, jak również wzrost aktywności enzymatycznej tkankowego aktywatora plazminogenu. Udowodniliśmy, że zarówno inhibitor syntazy tlenku azotu, jak i inhibitor syntezy prostacykliny znoszą jego aktywność przeciwzakrzepową. Wykazaliśmy, że aliskiren zapobiega rozwojowi zakrzepicy żylnej poprzez nasilenie fibrynolizy i hamowanie płytek krwi w mechanizmie zależnym od tlenku azotu i / lub prostacykliny (13B).

 Kolejne dwie prace powstały we współpracy z kardiologami. Pierwszą z nich (14B) jest opis przypadku nawracającej i objawowej arytmii przedsionkowej opornej na dostępne leczenie farmakologiczne u starszego i obciążonego innymi chorobami pacjenta. Kilkudniowy proces diagnostyki ujawnił, iż jedną z rzadkich przyczyn uciążliwej arytmii był szybko rozwijający się guz płuca. Guz ten rosnący w obrębie oskrzela naciekał i uciskał naczynia płucne, będąc przyczyną częstych napadów migotania przedsionków i wieloogniskowego częstoskurczu przedsionkowego. W opisanym przypadku dodatkowym czynnikiem arytmii była nadczynność tarczycy, która rozwinęła się w przebiegu leczenia amiodaronem oraz spowodowana była przerzutami pierwotnego guza do tarczycy (14B).

 W kolejnej pracy (16B) badaliśmy udział metaloproteinazy-9 w remodelingu przedsionków. Wykazaliśmy, że w grupie pacjentów z utrwalonym i przetrwałym migotaniem przedsionków występuje wyższe stężenie MMP-9 w porównaniu z grupą kontrolną osób bez arytmii. Stwierdziliśmy ponadto, że stężenie MMP-9 dodatkowo wzrastało u pacjentów z przetrwałym migotaniem przedsionków poddanych kardiowersji elektrycznej. Uzyskane wyniki sugerują, że MMP-9 odgrywa istotną rolę w remodelingu przedsionków, mogąc być jego markerem i jednocześnie punktem uchwytu do ewentualnej regulacji przebudowy miocardium u pacjentów z migotaniem przedsionków (16B).

1. Hermanowicz JM, Hermanowicz A, Buczko P, Leszczynska A, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Mogielnicki A, Buczko W. 2013. Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one- clip hypertensive rats. Thromb Res. 131, e39-44.
2. Lewkowicz J, Sobkowicz B, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Skibińska E. 2013. Rzadka przyczyna nawracającego, opornego na leczenie migotania przedsionków. Polski Przegląd Kardiologiczny 15, 231-233.
3. Hermanowicz JM, Buczko P, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Hermanowicz A, Buczko W. 2015. Impact of aliskiren on some hemostatic parameters in experimental arterial thrombosis in rats. Pharmacol Rep. 67, 173-188.
4. Lewkowicz J, Knapp M, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Sawicki R, Kamińska M, Waszkiewicz E, Musiał WJ. 2015. MMP-9 in atrial remodeling in patients with atrial fibrillation. Ann Cardiol Angeiol (Paris). 64, 285-291.

**C. Wpływ leczenia ortodontycznego na tkanki przyzębia**

U pacjentów leczonych ortodontycznie udowodnione jest uwalnianie niklu ze stałych aparatów. Dlatego podjęliśmy się oceny zależności pomiędzy stanem klinicznym jamy ustnej, poziomem IgE, a czasem trwania leczenia ortodontycznego. Wykazaliśmy wzrost stężenia IgE w ślinie młodych osób z objawami nadwrażliwości na nikiel. Udowodniliśmy, że profil immunologiczny pacjenta odgrywa kluczową rolę w wyborze typu urządzenia stosowanego do leczenia nieprawidłowości narządu żucia, a oznaczenie stężenia IgE jest konieczne w przypadku historii alergologicznej (17B).

 Ponadto wykazaliśmy, że pacjenci z alergią stosujący stałe aparaty ortodontyczne wykazują zmiany w morfologii i składzie komórek śliny w porównaniu z pacjentami kontrolnymi poddanymi leczeniu ortodontycznemu, ale bez objawów alergii. Różnice w obrazie morfologicznym były najbardziej widoczne w pierwszych miesiącach leczenia ortodontycznego. Udowodniliśmy także, iż liczba i morfologia komórek obecnych w ślinie pacjentów alergicznych ulega zmianie w odpowiedzi na jony uwalniane ze stopów dentystycznych. Tym samym nasze badania potwierdziły, że ślina może być wykorzystywana jako materiał diagnostyczny (18B,19B,20B,21B).

1. Szarmach IJ, Kasacka I, Buczko P, **Tankiewicz A**, Pawlak D. 2006. Oral cavity status and IgE level in orthodontic patients. Adv Med Sci. 51 Suppl 1, 210-212.
2. Kasacka I, Szarmach IJ, Buczko P, **Tankiewicz A**, Pawlak D. 2006. Preliminary evaluation of saliva composition in allergic patients subjected to orthodontic treatment; morphological examination. Adv Med Sci. 51 Suppl 1, 55-158.
3. Kasacka I, Szarmach IJ, Buczko P, **Tankiewicz A**, Pawlak D. 2006. Preliminary evaluation of morphological parameters of the saliva in patients undergoing orthodontic treatment. Adv Med Sci. 51 Suppl 1, 52-54.
4. Kasacka I, Szarmach IJ, Buczko P, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Łapińska J. 2007.
Contrastive analysis of saliva morphology in food allergic and non-allergic patients in initial treatment with fixed orthodontic appliances. Pol J Environ Stud. 16 (2C Part 1), 135-138.
5. Kasacka I, Szarmach IJ, Buczko P, **Tankiewicz-Kwedlo A**, Łapińska J. 2007. Preliminary evaluation of morphological parameters of saliva in patients subjected to orthodontic treatment with amalgam restorations. Pol J Environ Stud .16 (2C Part 1), 132-134.

**C. Medycyna spersonalizowana**

Poniższa praca powstała w czasie przebywania na stypendium naukowym w Instytucie Mario Negri we Włoszech. Stanowi ona przegląd badań poświęconych polimorfizmom genów, takich jak TPMT, MDR1, CYP3A4 oraz ich wpływom na farmakoterapię lekami o wąskim indeksie terapeutycznym, jak azatiopryna, kwas mykofenolowy, rapamycyna czy inhibitory kaleneuryny, takie jak takrolimus i cyklosporyna. Analiza literatury wskazuje, że farmakogenomika poprzez analizę podłoży osobniczych różnic w skuteczności i ewentualnej toksyczności leku stanowi dopełnienie do powszechnie stosowanej farmakoterapii monitorowanej.

1. Cattaneo D, **Tankiewicz A**, Merlini S, Perico N, Remuzzi G. 2004. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of immunosuppressive agents: perspective for individualized therapy. Personalized Medicine 1, 53-62.

**D. Erytropoetyna a rak jelita grubego – badania wstępne**

Praca te przedstawia wyniki badań wstępnych, które zapoczątkowały późniejsze badania opisane w osiągnięciu. Zaobserwowano w nich wrażliwość komórek raka jelita grubego na egzogenną erytropoetynę, jak również wykazano obecność EpoR na komórkach linii DLD-1.

1. **Tankiewicz-Kwedlo A**, Pawlak D, Domaniewski T, Buczko W. 2010. Erythropoietin increases Epo and EpoR expression in DLD-1 cells. Pol Ann Med. 17, 16-24.