

**Załącznik 2.**

## **AUTOREFERAT**

**Dr n. biol. Magdalena Skonieczna**

**Gliwice, 2019**

1. Imię i nazwisko: **Magdalena Skonieczna**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

**I**

W latach 1997 - 2002 studiowałam w Poznaniu na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza na Wydziale Biologii, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii, gdzie w roku **2002** uzyskałam stopień **magistra biologii** w zakresie **biologii molekularnej** na podstawie pracy zatytułowanej „Rola i udział cGMP w regulacji ekspresji genu syntazy chalkonowej u *Arabidopsis thaliana*”.

**II**

W roku 2002 rozpoczęłam studia doktoranckie na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na Wydziale Biologii, w Instytucie Biologii Eksperymentalnej, gdzie **16 marca 2017** roku uzyskałam tytuł **doktora nauk biologicznych w zakresie biologii - fizjologii zwierząt**. Praca doktorska pt. „Funkcje neuropeptydów z rodziny FMRF-amidu u chrząszczy” otrzymała wyróżnienie.

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

od - do	Nazwa placówki, adres	stanowisko
wrzesień 2008 - obecnie	Politechnika Śląska w Gliwicach, Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów; Ul. Akademicka 16 44-100 Gliwice, Polska Tel. 0048 32 2371168	Adiunkt
luty 2017 - obecnie	Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Zakład Patofizjologii;	Wykładowca (umowa o dzieło) ED-pathophysiology
październik 2007 – luty 2012 październik 2016 – luty 2017	Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra Fizjologii;	Wykładowca (umowa o dzieło) fizjologia; ED- physiology
grudzień 2006 – wrzesień 2008	Politechnika Śląska w Gliwicach, Instytut Informatyki, Zakład Teorii i Projektowania Systemów Komputerowych ;	Specjalista biolog -

4. 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 i lista publikacji będących podstawą wniosku o nadanie tytułu doktora habilitowanego z dziedziny nauk medycznych.

**Ocena stresu oksydacyjnego i indukcji śmierci komórkowej (programowanej i nieprogramowanej) w komórkach prawidłowych i nowotworowych pod wpływem fizycznych, chemicznych i naturalnych czynników (promieniowanie jonizacyjne IR, daleka czerwień FR, ftalocyjaniny PDT, fluorescencyjne nośniki leków, resveratrol i berberyna) w warunkach *in vitro*. (cykl publikacji)**

b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok publikacji.

1. **Magdalena Skonieczna**, Tomasz Hejmo, Aleksandra Poterala-Hejmo, Artur Cieslar-Pobuda and Rafal J. Buldak. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2017, Article ID 9420539, 15 pages <https://doi.org/10.1155/2017/9420539>. Impact Factor: **4.936**; Punktacja MNiSW: **30**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu publikacji przeglądowej, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, przygotowaniu figur oraz dokonaniu przeglądu literaturowego, a także merytorycznej korekcie wersji końcowej i korespondencji z wydawnictwem (**jestem pomysłodawcą i autorem korespondencyjnym**).

Mój udział procentowy szacuję na **70 %**.

2. **Magdalena Skonieczna**, Artur Cieslar-Pobuda, Yuriy Saenko, Marek Foksinski, Ryszard Olinski, Joanna Rzeszowska-Wolny, Emilia Wiechec. The Impact of DIDS-Induced Inhibition of Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) on Cellular Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. Medicinal Chemistry Volume 13, Issue 5, 2017 DOI : 10.2174/1573406413666170421102353. Impact Factor: **2.631**; Punktacja MNiSW: **20**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu eksperymentów biologicznych, głównie cytometrycznych pomiarów, opracowaniu i analizie wyników, przygotowaniu na ich podstawie figur, a także napisaniu części manuskryptu (metodyka i dyskusja wyników), jego korekcie po recenzjach i przygotowaniu wersji finalnej (**jestem jednym z głównych wykonawców badań biologicznych**).

Mój udział procentowy szacuję na **40%**.

3. Nackiewicz J, Kliber-Jasik M, **Skonieczna M**. A novel pro-apoptotic role of zinc octacarboxyphthalocyanine in melanoma Me45 cancer cell's photodynamic therapy (PDT). Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 190 (2019) 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.002>. Impact Factor: **3.165**; Punktacja MNiSW: **30**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu biologicznej części pracy, wykonaniu eksperymentów biologicznych, głównie pomiarów cytometrycznych, cytotoksyczności, obrazowaniu mikroskopowym, opracowaniu i analizie wyników, przygotowaniu na ich podstawie figur, a także napisaniu biologicznej części manuskryptu wraz z dyskusją, korekcie po recenzjach i przygotowaniu wersji finalnej (**mój udział jest równy z pierwszym autorem, jestem pomysłodawcą i autorem korespondencyjnym**).

Mój udział procentowy szacuję na **40%**.

4. Anna Mielanczyk, **Magdalena Skonieczna**, Katarzyna Bernaczek and Dorota Neugebauer. Fluorescein nanocarriers based on cationic star copolymers with acetal linked sugar cores. Synthesis and biochemical characterization. RSC Adv., 2014, 4(60):31904-31913. DOI: 10.1039/C4RA03579H. Impact Factor: **3.840**; Punktacja MNiSW: **35**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu biologicznej części pracy, wykonaniu eksperymentów biologicznych, w tym pomiarów cytometrycznych, cytotoksyczności, obrazowaniu mikroskopowym, opracowaniu i analizie wyników, przygotowaniu na ich podstawie figur, a także napisaniu biologicznej części manuskryptu wraz z dyskusją, korekcie po recenzjach i przygotowaniu wersji finalnej (**jestem pomysłodawcą i głównym wykonawcą badań biologicznych**).

Mój udział procentowy szacuję na **30%**.

5. Anna Mielanczyk, **Magdalena Skonieczna**, Dorota Neugebauer. Cellular response to star-shaped polyacids. Solution behavior and conjugation advantages. Toxicology Letters Volume 274, 15 May 2017, Pages 42-50. Impact Factor: **3.166**; Punktacja MNiSW: **35**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu biologicznej części pracy, wykonaniu eksperymentów biologicznych, w tym pomiarów cytometrycznych, cytotoksyczności, obrazowaniu mikroskopowym, opracowaniu i analizie wyników, przygotowaniu na ich podstawie figur, a także napisaniu biologicznej części manuskryptu wraz z dyskusją, korekcie po recenzjach i przygotowaniu wersji finalnej (**jestem pomysłodawcą i głównym wykonawcą badań biologicznych**).

Mój udział procentowy szacuję na **30%**.

6. **Magdalena Skonieczna**, Dorota Hudy, Aleksandra Poterala-Hejmo, Tomasz Hejmo, Rafal J. Buldak, Arkadiusz Dziedzic. Effects of Resveratrol, Berberine, and Their Combinations on Reactive Oxygen Species, Survival, and Apoptosis in Human Squamous Carcinoma (SCC-25) Cells. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry DOI : 10.2174/1871520619666190405111151. Impact Factor: **2.556**; Punktacja MNiSW: **35**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu tematu, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów, opracowaniu wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, przygotowaniu figur oraz dokonaniu przeglądu literaturowego, a także merytorycznej korekcie wersji końcowej, poprawie manuskryptu po recenzjach i korespondencji z wydawnictwem (**jestem pomysłodawcą i autorem korespondencyjnym**).

Mój udział procentowy szacuję na **70 %**.

Osiągnięcie składa się z serii 6 publikacji – całkowita wartość wskaźników wynosi odpowiednio:

**Impact Factor = 20,294**

**Punktacja MNiSW: 185**

W trzech publikacjach jestem pierwszym autorem; w jednej trzecim, ale o współudziale równorzędnym z pierwszym; w trzech publikacjach jestem autorem korespondencyjnym; w dwóch publikacjach jestem drugim autorem (odpowiadającym za główne badania biologiczne). Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

## **WPROWADZENIE**

Badanie śmierci komórkowej, poprzez regulację procesów programowanych (apoptozy, autofagii), jak i nieprogramowanych (ferroptozy, nekrozy) mają istotne znaczenie w aspekcie podejmowanych terapeutycznych strategii przeciwnowotworowych. Wynikające z tego potrzeby dostosowywania istniejących protokołów leczenia wzmacniają obszar poszukiwania nowych regulatorów, cząsteczek uwrażliwiających, jak i badania kombinacji istniejących i stosowanych na rynku leków. Ograniczona zdolność adaptacyjna dojrzałych komórek organizmu ludzkiego do zmian powstających w ich otoczeniu (poza komórkami układu odpornościowego), jest głównie warunkowana mechanizmami wytworzonymi na drodze ewolucji oraz procesami różnicowania komórek w dojrzałe tkanki. Jednak odkrycie komórek macierzystych (stem cells), poza embrionalnymi komórkami macierzystymi (embrional stem cells), które są obecne w dojrzałym ludzkim organizmie zrewolucjonizowało poglądy na temat plastyczności i umiejętności adaptacyjnych ludzkich komórek. Wiąże się to przede wszystkim z możliwością reprogramowania i różnicowania nawet już upostaciowanych i dojrzałych komórek w konkretnej tkance. Kolejnym etapem okazało się odkrycie zdolności do wtórnego reprogramowania i wytworzenia z dojrzałych komórek somatycznych indukowalnych komórek pluripotentnych, iPS (induced pluripotent stem cells). Wytworzone narzędzia, służące obecnie głównie medycynie regeneracyjnej i w leczeniu nowotworów, okazały się być także pomocne w odkryciu istniejących w ludzkim organizmie nowotworowych komórek macierzystych (cancer stem cells). Nowo zdobyta wiedza na temat różnorodności, reprogramowania i różnicowania ludzkich komórek otworzyła z kolei drogę ku wytworzeniu nowych strategii badawczych nakierowanych właśnie na komórki macierzyste i nowotworowe komórki macierzyste oraz procesy w nich zachodzące. Indukcja śmierci komórkowej w tego typu komórkach wydaje się być pożądanym celem terapeutycznym, a ograniczenie proliferacji i poznanie programu różnicowania lub umiejętność jego sterowaniem wydaje się być obecnie idealnym narzędziem terapeutycznym.

W prezentowanym cyklu publikacji przedstawione zostaną procesy związane ze zdolnością komórek do kontrolowanej indukcji śmierci komórkowej, zarówno przez komórki macierzyste oraz nowotworowe komórki macierzyste, komórki nowotworowe, jak i prawidłowe różnych modelowych linii komórkowych *in vitro*. Stan indukcji śmierci komórkowej wiąże się z zaburzeniem wewnątrzkomórkowej równowagi oksydo-redukcyjnej (redox), wynikającej z nasilonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA). Skutkiem stresu oksydacyjnego może być zmiana profilu ekspresyjnego genów i białek oraz włączenie lub wyłączenie specyficznych ścieżek sygnałowych. Aktywacja wewnątrzkomórkowych źródeł wolnych rodników może być też skutkiem fizjologicznych procesów, takich jak fosforylacja oksydacyjna w łańcuchu mitochondrialnym,  $\beta$ -oksydacji lipidów, peroksydacji białek i ich degradacji w proteasomach, a także produkcji cząsteczek sygnałowych, np. NO. W komórkach istnieje szereg enzymów, które są fizjologicznie zaangażowane w procesy i przemiany biochemiczne, gdzie wolne rodniki są głównym lub pośrednim produktem. Natywne, jak i indukowane zewnętrznie stres oksydacyjny może stać się zatem podstawą śmierci komórkowej; naglej nieprogramowanej nekrozy lub ferroptozy, czy też programowanej apoptozy lub autofagii. Apoptoza, sama w sobie stanowi zatem oczekiwany skutek działania wielu czynników terapeutycznych: tych ograniczających proliferację i będących cytostatykami, jak i cytotoksycznymi, które są ostatecznie wobec komórek nowotworowych letalne.

Czynniki fizyczne oraz chemiczne pochodzące ze środowiska naturalnego, a także te produkowane na potrzeby różnych branż przemysłowych, spożywczych czy farmaceutycznych mogą być induktorami stresu oksydacyjnego, tym samym mogą być odpowiedzialne za regulację procesów fizjologicznych i patologicznych w komórkach i całym organizmie. Promieniowanie jonizujące (IR), ultrafioletowe (UV), termiczne dalekiej czerwieni (FR; far red) służą od wielu lat w terapiach związanych z indukcją stresu oksydacyjnego w zmienionych chorobowo obszarach ciała, narządach, a także w leczeniu nowotworów. Jednak poznanie podstaw procesów wyindukowanych stresem oksydacyjnym, w tym doprowadzenie do przeżycia lub śmierci, wzmocnienia lub zahamowania proliferacji, pozostaje ciągle w obszarze zainteresowań wielu badaczy. Stres oksydacyjny i apoptoza, poznanie mechanizmów sterujących kanonicznymi lub zewnętrznymi ścieżkami tego szlaku było podłożem do zastosowania celowanych wobec nowotworów specyficznych fotouczulaczy, które w odpowiednim protokole traktowania miały wzmocnić stres oksydacyjny w komórkach czerniaka. Fotouczulacze oparte o strukturę ftalocyjanin występujących w przyrodzie, skompleksowanych z metalami zostały wybrane do badań śmierci komórkowej w terapii fotodynamicznej (PDT). Strategia taka zapewnia użycie energii czerwieni lub dalekiej czerwieni do wzbudzenia centrum aktywnego cząsteczki i uruchomienia reakcji wolnorodnikowych, konsekwencją czego miałyby być śmierć apoptotyczna w komórkach nowotworowych. Terapia fotodynamiczna przeżywa obecnie renesans dzięki możliwości zastosowania selektywnych molekuł opartych np. o przeciwciała do wybiórczego nakierowania na komórki będące dla nich celem. Takie selektywne molekuly można sprzęgać z fotouczulaczami, przez co uzyskuje się wysoką specyficzność oddziaływania terapii PDT wobec wybranych komórek nowotworowych. Redukuje się przez to niepożądane efekty oddziaływania terapii na zdrowe i prawidłowe komórki koegzystujące w sąsiedztwie nowotworów.

Dostarczanie leku wymaga zatem rozwinięcia nośników, które dostarczałyby je do wnętrza tylko wybranych komórek nowotworowych – celu terapeutycznego. Idealne nośniki powinny w odpowiednim środowisku (temperaturze, pH) umożliwić wniknięcie cząsteczki aktywnej tylko do wybranej komórki. Dodatkowo sprzęgnięcie nośnika z markerem lokalizacji, np. znacznikiem fluorescencyjnym ułatwia śledzenie procesów zachodzących już na terenie komórki bez potrzeby jej zabijania lub ingerowania w układ eksperymentalny. Samo wniknięcie nośnika i leku do wnętrza komórki nie zapewnia jednak maksymalnego efektu, zwłaszcza gdy nośnik nie ulega np. wewnątrzkomórkowej degradacji.

Zastosowanie degradowalnych nośników, zapewnia zatem maksymalną koncentrację substancji aktywnej w środku komórki, a po jej uwolnieniu potęguje końcowy efekt, który może być związany z indukcją stresu oksydacyjnego i apoptozą.

Ostatecznie w celu osiągnięcia optymalnych założeń strategii przeciwnowotworowych, polegających na ograniczeniu proliferacji i indukcji śmierci komórkowej, zastosowano również naturalne regulatory powszechnie występujące w przyrodzie, pochodzenia roślinnego i stosowane od wielu lat: resvertrol i brberynę. Obecne w diecie naturalne czynniki, które w zależności od dawki mogą mieć charakter protekcyjny lub zabójczy wobec komórek nowotworowych okazują się być nadal interesującymi molekułami w badaniach *in vitro*. Efektem ostatecznym miałyby być celowana wyłącznie wobec nowotworów, kombinowana terapia oparta o naturalne cząsteczki i fizjologiczne mechanizmy aktywacji programowanej śmierci komórkowej – apoptozy, bez dodatkowego efektu sąsiedztwa (bystander) w prawidłowych i zdrowych komórkach. Umiejętności indukcji takiej programowanej śmierci w komórkach nowotworowych i w niezbyt licznych w organizmie macierzystych komórek nowotworowych byłoby obiecującą strategią leczenia.

## CELE BADAŃ

Założeniem podjętych badań o istotnym znaczeniu z punktu widzenia zdrowia publicznego w obszarze badań podstawowych, prezentowanych w cyklu publikacji naukowych, było poszerzenie aktualnego stanu wiedzy na temat, procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących na terenie komórek *in vitro*, związanych z wewnątrzkomórkowym stresem oksydacyjnym i indukowaną przez niego śmiercią komórkową. Procesy te zostały omówione dla komórek nowotworowych, w tym macierzystych komórek nowotworowych, a także prawidłowych, które wykorzystują wolne rodniki do sygnalizacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej.

Specyficzne enzymy odpowiadające za produkcję reaktywnych form tlenu mają ogromne znaczenie dla różnicowania komórek nowotworowych i ich przeprogramowania. W przeglądowej **publikacji nr 1** NADPH-zależne oksydazy (NOX) zostały omówione jako główne źródła mające decydujące znaczenie dla stanu redox w komórkach nowotworowych i macierzystych komórkach nowotworowych w związku z ich dużym potencjałem różnicowania i reprogramowania.

Sama apoptoza indukowana stresem oksydacyjnym, poza fizjologicznymi procesami, jest stymulowana czynnikami fizykochemicznymi, dlatego w **publikacji nr 2** skupiono się na zbadaniu wpływu promieniowania jonizującego na indukcję apoptozy w komórkach

nowotworowych, zwłaszcza w pętli sprzężenia z reaktywnymi formami tlenu i azotu. Dodatkowo zastosowanie specyficznego inhibitora DIDS dla kanałów mitochondrialnych regulowanych napięciem (VDAC, voltage dependent anion channel) umożliwiło przeanalizowanie roli anionorodnika ponadtlenkowego w indukcji kanonicznej, mitochondrialnej ścieżki apoptozy w nowotworowych komórkach limfoblastycznych K562.

Unikanie radiotoksyczności, wynikającej z uszkodzeń wyidukowanych także w tkankach prawidłowych, skłaniają do rozwijania strategii wykorzystujących promieniowanie o niższej energii, np. czerwieni i dalekiej czerwieni (FR) stosowanej w terapii fotodynamicznej (PDT). Zastosowanie selektywnych wobec nowotworowej linii ludzkiego czerniaka Me45 fotouczulaczy o właściwościach pro-oksydacyjnych i pro-apoptotycznych było podstawą badań omówionych w **publikacji nr 3**.

Z kolei możliwość precyzyjnego dostarczenia leku do komórki nowotworowej, gdzie stres oksydacyjny i związana z nim apoptoza miałyby być widoczne, wiąże się z koniecznością dostosowywania i projektowania nośników, o właściwościach zmieniających się w zależności od warunków środowiskowych. W **publikacji nr 4** wobec linii HCT 116 ludzkiego nowotworu okrężnicy przebadano nośniki sprzęgnięte z fluorescencyjnym markerem molekularnym lokalizacji (FITC), co pozwoliło na precyzyjne zlokalizowanie leku w komórkach i osiągnięcie maksymalnego efektu terapeutycznego.

Wewnątrzkomórkowa akumulacja pro-oksydacyjnego i letalnego leku powinna być wysoce specyficzna i związana ze zmianą struktury nośnika, który np. pod wpływem zmian pH na terenie cytoplazmy powinien uwolnić substancję czynną. Taki mechanizm dostarczania leku został przebadany w **publikacji nr 5** wobec linii nowotworowej HCT 116 i MCF-7. Letalne efekty i śmierć komórkowa w takim układzie eksperymentalnym zostały odniesione do wpływu na prawidłowe fibroblasty NHDF.

Substancje czynne, powszechnie stosowane charakteryzują się zazwyczaj szerokim spektrum działania, zależnym od zastosowanej dawki i celu wobec, którego je zastosowano. Resveratrol i berberyna znane są jako protekcyjne i antyoksydacyjne suplementy występujące powszechnie w diecie o naturalnym pochodzeniu roślinnym. Z kolei zastosowanie ich w terapii przeciwnowotworowej pokazuje także ich odwrotne działanie, pro-oksydacyjne i pro-apoptotyczne lub pro-nekrotyczne. Jednoczesna ich kombinacja została przebadana w **publikacji nr 6** wobec linii SCC-25, tj. nowotworu pochodzenia nabłonkowego, raka koleczystokomórkowego (ang. *squamous cell carcinoma* - SCC). Zagadnienia wpływu substancji naturalnych występujących w pożywieniu, wobec prawidłowych i nowotworowych komórek wywodzących się z układu nabłonkowego głowy i szyi pozostaje nie w pełni przebadana. Zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego i śmierci komórkowej wydaje się być zatem istotna dla wykorzystania wymienionych substancji w profilaktyce oraz leczeniu schorzeń zapalnych i nowotworowych.

Na podstawie powyższych przesłanek sformułowano główne założenia i cele cyklu publikacji, gdzie została przedstawiona:

**Ocena stresu oksydacyjnego i indukcji śmierci komórkowej (programowanej i nieprogramowanej) w komórkach prawidłowych i nowotworowych pod wpływem fizycznych, chemicznych i naturalnych czynników (promieniowanie jonizacyjne IR, daleka czerwień FR, ftalocyjaniny PDT, fluorescencyjne nośniki leków, resveratrol i berberyna) w warunkach *in vitro*. (Cykl publikacji)**



Szczegółowy opis wyników cyklu prac naukowych 1-6 prezentuję poniżej.

### ***1. Regulacja stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych i macierzystych komórkach nowotworowych***

Ostatnie lata przyniosły nam obiecujące narzędzie do biologii komórek macierzystych i medycyny regeneracyjnej, indukowalne pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS). Te "sztuczne" komórki macierzyste, oprócz korzyści (np. etycznie akceptowalne źródło swoistych dla pacjenta komórek macierzystych do zastosowań klinicznych) budzą obawy dotyczące kwestii bezpieczeństwa. Wykazano, że tkanki wyprowadzone z iPS mają zwiększoną skłonność do tworzenia nowotworów, a wstrzyknięcie komórek iPS zwierzętom prowadzi do powstania potworniaków. Sugeruje to, że komórki iPS mogą mieć wiele wspólnego z rakowymi komórkami macierzystymi (CSC). Wykazują one podobieństwo do CSC nie tylko w zdolności wywoływania nowotworów, ale także w aspektach ekspresji niektórych genów lub regulacji cyklu komórkowego. Badanie podobieństw i różnic pomiędzy CSC i iPS może prowadzić do zmniejszenia ryzyka powstawania potworniaków w tkankach pochodzących z iPS w medycynie regeneracyjnej. Inną kwestią jest zwiększona odporność CSC na leczenie konwencjonalne. CSC w dużej mierze są odporne na radioterapię i na większość zwykłych leków chemioterapeutycznych. Wiele szlaków sygnałowych, np. Notch, Wnt, Hedgehog, które są niezbędne do cyklu komórkowego, różnicowania i metabolizmu, mogą być w komórkach macierzystych w porównaniu z innymi komórkami rozregulowane. Badanie ekspresji genów związanych z kancerogenezą, samo-odnawianiem i progresją cyklu komórkowego w iPS i CSC w celu znalezienia wspólnych, a także różnicujących te linie komórkowe czynników jest obecnie mocno eksplorowane. Poznanie dodatkowo kluczowych czynników odpowiedzialnych za odporność na promieniowanie CSC oraz poszerzenie stanu wiedzy na temat regulacji tych procesów może dostarczyć istotnych informacji na temat zrozumienia fizjologii CSC i iPS. Dostarczenie nowych wskazówek pomocnych w opracowaniu strategii terapeutycznych przeciwko radiooporności CSC mogą być pomocne w opracowaniu markerów prognostycznych służących do optymalizacji radioterapii lub chemioterapii. Indukcja stresu oksydacyjnego za pomocą radioterapii w CSC mogłaby być przyczynkiem do zaindukowania w nich programowanej śmierci komórkowej – apoptozy, tak pożądanej u pacjentów leczonych promieniowaniem, bez wywoływania w zdrowych tkankach stanu zapalnego i efektu sąsiedztwa (bystander). Wskazane jest zatem prowadzenie badań nad zrozumieniem molekularnych podstaw procesów zachodzących w tych komórkach, zwłaszcza nad wyjaśnieniem roli czynników odpowiedzialnych za samo-odnawianie, progresję cyklu komórkowego i kancerogenezę, zarówno w CSC, jak i w iPS, co tym samym wypełnia kryterium prowadzenia badań podstawowych. Jednak poznanie procesów wewnątrzkomórkowych powinno być oparte przede wszystkim o poznanie podstawowych procesów fizjologicznych w nich zachodzących. Stąd wyniknęła nadrzędna potrzeba zweryfikowania stanu wiedzy w obszarze fizjologicznego stanu redox w komórkach macierzystych i mechanizmów wzmacniających lub hamujących stres oksydacyjny i w konsekwencji apoptozę. Podjęłam się zatem dokonania przeglądu literaturowego i napisania pracy przeglądowej, w której skupiłam się na omówieniu roli enzymów odpowiadających za

nadprodukcję w komórkach anionorodników ponadtlenkowych – oksydaz NADPH (NOX), zarówno w komórkach nowotworowych, jak i macierzystych nowotworowych.

### Publikacja 1

**Magdalena Skonieczna, Tomasz Hejmo, Aleksandra Poterala-Hejmo, Artur Cieslar-Pobuda and Rafal J. Buldak. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2017, Article ID 9420539, 15 pages <https://doi.org/10.1155/2017/9420539>. Impact Factor: **4.936**; Punktacja MNiSW: **30****

W pracy tej byłam głównym pomysłodawcą i autorem korespondencyjnym.

Oksydazy NADPH (NOX) należą do grupy enzymów generujących reaktywne formy tlenu (RFT) przez co wpływają na liczne szlaki sygnałowe zależne od stanu redox w komórkach. NOX są zatem istotnymi regulatorami różnicowania komórkowego, wzrostu i proliferacji, mechanizmów ważnych w rozwoju embrionalnym, remodelowaniu i regeneracji tkanek, a także w rozwoju i metastazie nowotworów. W pracy podjęłam dyskusję na temat roli NOX i produkowanych przez nie RFT w aspekcie nowotworzenia, fizjologii i funkcjonowania komórek macierzystych i nowotworowych komórek macierzystych, ponieważ **pełne zrozumienie funkcji NOX może mieć wpływ na zastosowanie komórek macierzystych (SC; stem cells) w inżynierii tkankowej, medycynie regeneracyjnej i rozwoju nowych terapii wobec inwazyjnych form nowotworu.**

Reaktywne formy tlenu (RFT) to wysoce reaktywne molekuły, wśród nich można wymienić wolne rodniki, np. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, a także nierodnikowe formy tlenu np. ozon czy nadtlenek wodoru. W zależności od stanu reaktywności RFT mogą pełnić dwojaką rolę i być mediatorami, jako molekuły sygnałowe, co jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki lub być czynnikiem uszkadzającym prowadzącym do mutacji, kancerogenezy i śmierci komórkowej – apoptozy. W komórkach istnieją równoległe systemy antyoksydacyjne, zapewniające równowagę redox, jednak w nowotworowych komórkach taka tarcza ochronna może z kolei promować wzrost guza i jego metastazę. W komórkach oprócz łańcucha oddechowego, oksydazy NADPH są głównymi źródłami RFT. Ich fizjologiczne funkcje są obszerne, wiadomo, że odpowiadają za proliferację komórek, biosyntezę serotoniny, sygnalizację endotelialną, regulację funkcji nerek i aktywację układu immunologicznego wobec mikroorganizmów, (jako źródło wybuchu ponadtlenkowego), jednak nadprodukcja RFT przyczynia się także do rozwoju zaburzeń nerkowych i powstania różnych typów nowotworów<sup>1,2,3,4</sup>. Dokładna rola NOX została głównie przebadana w komórkach prawidłowych, ale ich rola w komórkach nowotworowych i komórkach nowotworowych macierzystych jest mało znana. Zatem **rozważania roli**

<sup>1</sup> C. Angeloni, C. Prata, F. Vieceli Dalla Sega, R. Piperno, and S. Hrelia, "Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 370312, p. 10, 2015.

<sup>2</sup> A. C. Loureiro, I. C. Rêgo-Monteiro, R. A. Louzada et al., "Differential expression of NADPH oxidases depends on skeletal muscle fiber type in rats," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 6738701, p. 10, 2016.

<sup>3</sup> D. Burger, M. Turner, M. N. Munkonda, and R. M. Touyz, "Endothelial microparticle-derived reactive oxygen species: role in endothelial signaling and vascular function," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 5047954, pp. 1–10, 2016.

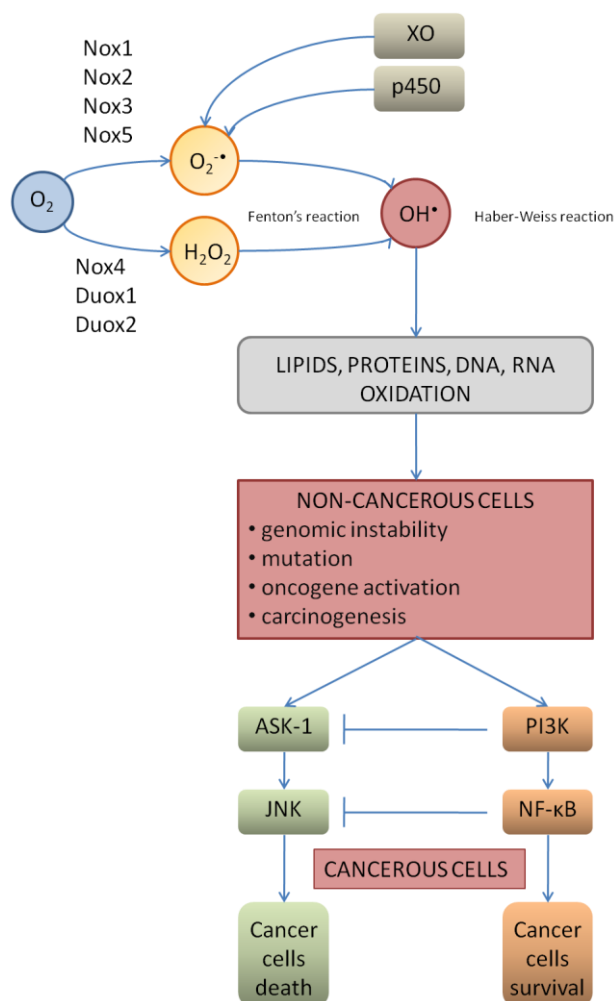
<sup>4</sup> A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio, and S. Batra, "NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity associated pathologies," *Cellular & Molecular Immunology*, vol. 12, no. 1, pp. 5–23, 2015.

**produkowanych przez te enzymu RFT w aspekcie oporności wobec stosowanych chemio- i radioterapii wydaje się być jednym z najważniejszych obszarów badań w aktualnej medycynie oksydacyjnej.** Dlatego dokonałam w pracy przeglądowej omówienia znaczenia NOX i produkowanych przez nie RFT dla funkcjonowania komórek nowotworowych i nowotworowych komórek macierzystych, ze szczególnym uwzględnieniem roli NOX w różnicowaniu, odnowie, proliferacji, procesów angiogenezy i metastazy.

U ssaków zidentyfikowano siedem białek z rodziny NOX (1-5) i Duox 1, 2 (dual oxidase 1, 2). NADPH oksydazy występują głównie w komórkowej błonie cytoplazmatycznej (NOX1–5 i DUOX1-2), ale znaleziono je również w retikulum endoplazmatycznym (NOX2, NOX4 i NOX5), błonie mitochondrialnej (NOX4), otoczce jądrowej (NOX4 i NOX5), a także w wyspecjalizowanych błoniastych mikrodomenach kaweoli i tratwach lipidowych (NOX1), w punkcie kontaktu adhezyjnego (NOX4) i inwadopodiach (NOX1 i NOX4)<sup>5</sup>. Te transbłonowe enzymy przenoszą elektrony z NADPH i redukują tlen do RFT, w tym do anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) i nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ). Dlatego NOX i mitochondrialny łańcuch elektronowy uznawane są za główne źródła RFT w komórkach, pomimo tego, że inne potencjalne źródła, takie jak cytochrom p450, oksydaza ksantynowa (XO) lub syntaza tlenu azotu (NOS) również przyczyniają się do modulowania potencjału redoks. RFT, w tym produkowane przez NOX  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  hamują aktywność wielu biomolekuł. Przy niskiej koncentracji grają rolę raczej wtórnych przekaźników sygnału, dopiero przy wyższych stężeniach wywołują uszkodzenia oksydacyjne w DNA, białkach, lipidach poprzez ich bezpośrednią oksydację lub poprzez reakcję przejściową metali Habera-Weissa do ekstremalnie reaktywnego rodnika hydroksylowego ( $OH^{\cdot}$ ) (**Rys. 1**).

---

<sup>5</sup> M Skonieczna, T Hejmo, A Poterala-Hejmo, A Cieslar-Pobuda and RJ Buldak. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2017, Article ID 9420539, 15 pages



**Rys. 1** Endogenne źródła wolnych rodników i ich znaczenie w nowotworach. Nadprodukcja anionorodnika ponadtlennkowego i  $H_2O_2$  przez NOX (NOX i Duox), oksydazę cytochromu c, oksydazę ksantynową (XO) i w konsekwencji wzrost poziomu rodnika hydroksylowego (powstającego głównie w reakcji Fentona albo reakcji Habera-Weissa) prowadzi do oksydacji lipidów, białek i kwasów nukleinowych, czego skutkiem jest niestabilność genomowa, mutacje i kancerogeneza. W takich warunkach przeżycie lub śmierć komórki zależy od aktywacji kinaz ASK-1 lub PI3K: wysoki poziom RFT aktywuje ścieżkę ASK-1/JNK prowadzącą do śmierci, podczas gdy niski poziom RFT może aktywować kinazę PI3K (inhibującą ASK-1/JNK) i NF-κB-zależną ścieżkę przeżycia zostaje uruchomiona.

$H_2O_2$  indukuje apoptozę w wielu liniach nowotworowych *in vitro* poprzez aktywację kaskady kaspaz. Wiele leków przeciwnowotworowych, np. winblastyna, doksorubicyna czy kamptotecyna wykazują zdolność do aktywacji apoptozy poprzez  $H_2O_2$ , co potwierdza przeciwnowotworowe działanie nadtlennku wodoru. Znane jest jednak bimodalne działanie  $H_2O_2$  i  $O_2^{\bullet-}$  zależne od stężenia: niskie (submikromolarne) stymuluje proliferację i wzrost, podczas, gdy stężenie wyższe (>10–30 mikromolarne) wywołuje apoptozę i nekrozę. Ten fenomen został po raz pierwszy zbadany w komórkach immortalizowanych, i tych które poddane zostały transformacji<sup>6,7</sup>. Wzmoczona ekspresja NOX1, NOX2, NOX4 i NOX5 lub elementów, które się z nimi kompleksują została wykazana w wielu liniach nowotworowych, a także w nowotworach we wczesnym i późnym etapie tumorogenezy, co wskazuje na ważny

<sup>6</sup> R. Day and Y. Suzuki, "Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione," Dose-Response, vol. 3, no. 3, pp. 425–442, 2005.

<sup>7</sup> J. Fang, T. Sawa, T. Akaike, and H. Maeda, "Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide," Cancer Research, vol. 62, no. 11, pp. 3138–3143, 2002.

udział tych enzymów w rozwoju nowotworów i ich progresji. Rola NOX3, DUOX1 i DUOX2 w komórkach nowotworowych i macierzystych nie została do tej pory w pełni poznana. Wszystkie nowotwory cechują się typowymi umiejętnościami i cechami (hallmarks), w tym niewrażliwością na inhibitory wzrostu, nieograniczonym potencjałem replikacyjnym, samowystarczalnością w produkcji cząsteczek sygnałowych, unikaniem apoptozy, trwałą angiogenezą, inwazyjnością do otaczających tkanek i przerzutowaniem<sup>8</sup>. Metastaza to proces wieloetapowy polegający na inwazji komórek nowotworowych do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, extracellular matrix) i degradacji jej komponentów poprzez wytwarzanie metaloproteinaz – enzymów proteolitycznych. Następnie migracji do endotelium naczyń krwionośnych (intrawazacja) i potem ich opuszczenie (extrawazacja), a ostatecznie kolonizacja prowadząca do powstania wtórnego ogniska przerzutowania. Enzymy NOX przyczyniają się do aktywnej migracji poprzez zwiększanie zdolności wytwarzania przez komórki nowotworowe inwadopodiów, służących do aktywnego przemieszczania się. Wytwarzanie inwadopodiów zależy od produkcji RFT przez oksydazy NOX.

Komórki macierzyste są istotne dla procesów dojrzewania komórek progenitorowych dla wszystkich typów komórek, komórek macierzystych pluripotentnych, zwłaszcza we wczesnej embriogenezie, a także w definiowaniu komórek do różnicowania ich w komórki o wyspecjalizowanych funkcjach. Wiele badań pokazuje, że ten potencjał mógłby być wykorzystany w terapiach komórkami macierzystymi. Okazuje się, że stan redoks warunkuje to, że komórka na cechy komórki macierzystej i RFT biorą udział w różnicowaniu różnych typów komórek prekursorowych. RFT produkowane przez NOX, a także inne źródła, są wzmacniaczami sygnalizacji komórek macierzystych, ale także mogą je uszkadzać. Dlatego w tym zakresie prace powinny być prowadzona na szeroką skalę. Dodatkowo idea sterowania różnicowaniem i reprogramowaniem komórek macierzystych nowotworowych poprzez RFT mogła by przyczynić się do ukierunkowanego wprowadzenia ich na ścieżkę programowanego starzenia – senescencji (senescence). Stan wiedzy w tym zakresie pozostaje nadal niewystarczający. Istnieją za to istotne doniesienia, wskazujące na to, że po zastosowaniu chemioterapii wobec dużych guzów ich wtórny wzrost i oporność może wiązać się z obecnością małej populacji komórek macierzystych nowotworowych (CSC)<sup>9</sup>. CSC zasiedlają preferencyjnie mikrośrodowiskowe nisze wewnątrz tkanki nowotworowej, gdzie zazwyczaj dostęp do tlenu jest ograniczony. Takie hipoksyjne warunki wydają się być istotne dla odnawiania puli CSC, ich metastazyjnego potencjału i oporności na stosowane terapie. Okazuje się, że CSC wykazują również wysoką ekspresję białek anty-apoptotycznych w porównaniu z dojrzałymi komórkami tej samej tkanki, co może być wytłumaczeniem ich oporności wobec stosowanych cytotoksycznych terapeutyków. RFT produkowane przez NOX w komórkach CSC reguluje ich odpowiedź na chemioterapię<sup>10</sup>.

NOX były intensywnie badane w ostatniej dekadzie, a uzyskana na ich temat wiedza wzmocniła obszar aktywacji regulacji ścieżek sygnałowych zależnych od RFT. Natomiast wciąż niewiele wiadomo na temat ich roli *in vivo*, zwłaszcza w zwierzęcych układach modelowych. Rola NOX w procesach nowotworzenia, progresji i oporności nowotworów, a

<sup>8</sup> D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.

<sup>9</sup> M. Zaccarin, V. Bosello-Travain, M. L. Di Paolo et al., "Redox status in a model of cancer stem cells," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 617 no. 2017, pp. 120–128, 2017.

<sup>10</sup> Z. Zhang, Q. Duan, H. Zhao et al., "Gemcitabine treatment promotes pancreatic cancer stemness through the Nox/ROS/NF- $\kappa$ B/STAT3 signaling cascade," *Cancer Letters*, vol. 382, no. 1, pp. 53–63, 2016.

także ich związek z komórkami macierzystymi stały się podstawą do napisania **publikacji nr 1** prezentowanej w cyklu publikacyjnym.

## ***2. Indukcja apoptozy w limfoblastycznych komórkach nowotworowych K562 pod wpływem promieniowania jonizującego***

Promieniowanie jonizujące (IR) stosowane w terapiach antynowotworowych generuje fale wolnych rodników, np. reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA), które penetrują struktury komórkowe. Skutkuje to bezpośrednią śmiercią komórek lub hamuje ich proliferację. Dodatkowymi efektami ubocznymi są stałe lub przejściowe zmiany w strukturach komórkowych. Część z nich prowadzi do niestabilności kwasów nukleinowych objawiającej się pęknięciami pojedynczo- lub podwójnoniciowymi (ang. single-, double-stranded breaks; SSBs, DSBs) utratą nukleotydów lub oksydacją zasad azotowych. Te ostatnie zmieniają strukturę pierwszorzędową DNA i RNA, co wpływa na późniejsze interakcje tych molekuł z innymi komórkowymi komponentami. Może to mieć wpływ na oddziaływanie kwasów nukleinowych z czynnikami białkowymi biorącymi udział w procesach replikacji, transkrypcji czy translacji. Sygnalizacja komórkowa jest nie tylko procesem związanym z przekazywaniem sygnału poza komórkę w formie konkretnej cząsteczki sygnałowej, ale to także sposób reagowania populacji komórkowej na specyficzny bodziec. Na te procesy składa się po pierwsze sposób transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowo, od zapisanej w genomie informacji (sekwencji genów w DNA) do transkryptu mRNA, na bazie którego dopiero w kolejnym etapie może powstać produkt białkowy decydujący o wypadkowej odpowiedzi komórkowej. W warunkach stresu oksydacyjnego, powstającego w momencie napromieniania komórki nowotworowej, procesy decyzyjne o aktywacji lub wyciszeniu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych decydują o przeżyciu komórki. Stąd jako główny badawczy prezentowany w **publikacji nr 2** było prześledzenie apoptotycznej ścieżki sygnałowej w komórkach K562 pod wpływem stresu oksydacyjnego, a zwłaszcza stworzenie modelu odpowiedzi na działanie promieniowania jonizującego.

### **Publikacja nr 2**

**Magdalena Skonieczna**, Artur Cieslar-Pobuda, Yuriy Saenko, Marek Foksinski, Ryszard Olinski, Joanna Rzeszowska-Wolny, Emilia Wiechec. The Impact of DIDS-Induced Inhibition of Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) on Cellular Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. Medicinal Chemistry Volume 13 , Issue 5 , 2017 DOI : 10.2174/1573406413666170421102353. Impact Factor: **2.631**; Punktacja MNiSW: **20**  
W pracy tej byłam jednym z głównych wykonawców badań biologicznych.

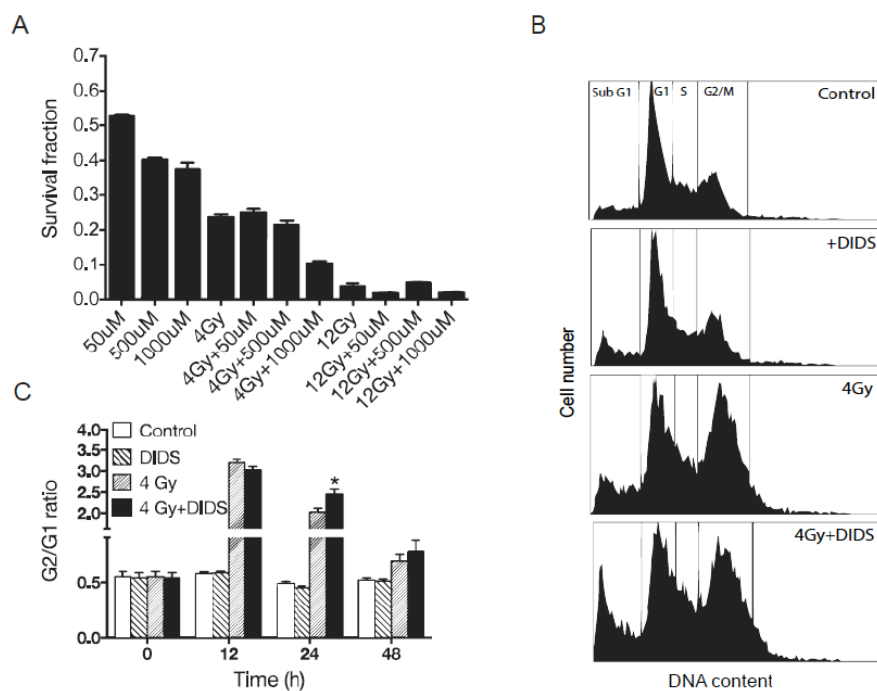
Komórki zaczynają produkować RFT i RFA zaledwie w parę godzin od napromienienia, a ich poziom zależy głównie od potencjału błonowego mitochondriów. Przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej i przepływ jonów na zewnątrz do cytoplazmy, i z powrotem do przestrzeni międzybłonowej jest regulowana przez specyficzne wewnętrzne i zewnętrzne kanały mitochondrialne, w tym regulowane napięciem jonowe kanały błonowe VDAC (voltage-dependent anion channel). Ponadto, ich rola w regulacji

funkcji samych mitochondriów, kontrolowanie przeżycia lub śmierci komórki jest obszernie dyskutowana w literaturze. Dlatego na potrzeby **publikacji nr 2** podjęłam się wykonania eksperymentów biologicznych w celu wykazania istotnej roli kanałów VDAC w wewnątrzkomórkowej sygnalizacji pomiędzy mitochondriami i resztą komórki. Promieniowanie jonizujące w linii limfoblastycznej K562 znacząco wpłynęło na indukcję śmierci komórkowej – apoztozę i obniżenie ich przeżywalności.

Ekspozycja na promieniowanie jonizujące wprowadza zmiany w strukturach i zachowaniu komórek nie tylko bezpośrednio, ale także poprzez radiolizę wody w cytoplazmie lub przestrzeni międzykomórkowej i wygenerowanie RFT i RFA. Te reaktywne molekuly aktywują ścieżki, co może prowadzić do inhibicji cyklu komórkowego, indukcji apoptozy i naprawy uszkodzonego DNA, a także służą, jako cząsteczki sygnałowe pomiędzy sąsiadującymi tkankami wywołując efekt sąsiedztwa (bystander effect)<sup>11</sup>. Kanały VDAC są zbudowane z małych (~30 kDa) białek i znajdują się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej niemalże u wszystkich badanych gatunków. Przepływ jonów i małych cząsteczek poprzez błonę mitochondrialną jest kluczowe dla prawidłowych funkcji fizjologicznych komórki, a kanały VDAC są ważniejszymi regulatorami jej przepuszczalności. Otwieranie kanałów jest regulowane potencjałem błonowym, przy jego wysokiej wartości pozostają zamknięte, zatem ich stan wpływa na przepływ ATP i ADP a także innych substratów oddechowych pomiędzy cytozolem a przestrzenią międzybłonową w mitochondriach. VDAC odpowiadają także za uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) z przestrzeni międzybłonowej mitochondrialnej do cytoplazmy, przez co regulują w komórce stan redoks. Promieniowanie jonizujące wpływa z kolei na transport jonowy w komórkach nowotworowych, w tym zaburza prawidłowe działanie kanałów VDAC. Ponadto, komórki nowotworowe wykazują podwyższoną ekspresję białek kanałowych w błonie komórkowej i błonach organelli. Zatem powstało pytanie, jakie inne efekty w komórkach nowotworowych może wywołać IR skoro moduluje aktywność kanałów VDAC produkujących RFT i RFA? Do badań zastosowałam 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), niespecyficzny wobec kanałów VDAC inhibitor, wpływający na wiele funkcji komórkowych, w tym dystrybucję białek i organelli, naprawę DNA. Blokada kanałów jonowych w mitochondriach na skutek zastosowania DIDS miałyby pokazać, jaką rolę odgrywają one w wygenerowanym IR stresie oksydacyjnym. **Celem nadrzędnym pracy było zbadanie procesów śmierci komórkowej po IR, kanonicznej mitochondrialnej ścieżki apoptozy, zbadanie cyklu komórkowego, ścieżki naprawy DNA i poziomu RFT i RFA.** Takie całościowe ujęcie problemu daje nowe światło na procesy związane z przeżyciem i ewentualną progresją komórek nowotworowych. **Wyniki mogą się przekładać także na predykcję odpowiedzi całego organizmu przy zastosowanej do leczenia nowotworów radioterapii, zwłaszcza do ograniczania jej skutków ubocznych (side effects) obserwowanych u pacjentów.**

---

<sup>11</sup> M Widel, A Krzywón, K Gajda, M Skonieczna, J Rzeszowska-Wolny (2014). Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 68, 278-287.



**Rys. 2** Wpływ DIDS na przeżywalność i cykl komórkowy komórek K562 po napromienieniu. Test na klonogenność dla K562 napromienionych (4Gy i 12Gy) w obecności (50 µM, 500 µM, 1000 µM) lub bez DIDS (A). Analiza cytometryczna cyklu komórkowego dla K562 inkubowanych w obecności lub bez DIDS (500 µM) i napromienionych (B). Cykl komórkowy przedstawiony jako stosunek ilości komórek w fazie G2 do G1(C). Wyniki przedstawione jako wartość średnia ± S.D. z 3 niezależnych eksperymentów.\* oznacza istotność statystyczną pomiędzy komórkami ekspozycjami na IR i IR+DIDS ( $p < 0.05$ ).

W pracy wykonałam szereg oznaczeń cytometrycznych na linii K562 w różnych wariantach napromienienia, z dodatkiem lub bez inhibitora kanałów VDAC. Oznaczyłam cykl komórkowy i poziomy RFT i RFA. Dodatkowo w długoterminowych badaniach testem na klonogenność wykazałam, że rozprężenie mitochondriów i zaburzenia równowagi redox znacząco obniżają potencjał klonogeny komórek K562 (**Rys. 2**). Po napromienieniu komórki przeżywają, jednak nie są zdolne do proliferacji, co wcale nie oznacza, że po kolejnych tygodniach nie będą zdolne do wtórnej wzmożonej zdolności podziałowej. Wyniki te sugerują istnienie komórek spośród nowotworowych po napromienieniu, które mogą w cyklu komórkowym być zatrzymane w fazie G0/G1 – takim fenotypem charakteryzują się także opisane w **publikacji nr 1** macierzyste komórki nowotworowe. Czy zatem napromienianie, np. w protokole dawki frakcjonowanej może przyczynić się do uaktywnienia wyciszonych wcześniej puli komórek macierzystych CSC, które w kolejnych tygodniach mogą przyczynić się do wznowy i metastazy nowotworu? Uzyskane wyniki pokazują, że prawidłowo dobrana dawka promieniowania blokuje komórki K562 głównie w fazie G2/M, co implikuje raczej zaburzenia w podziałach komórkowych na skutek powstałych uszkodzeń DNA i wtórnej produkcji wolnych rodników. Rozkład cyklu komórkowego ujawnia znaczną frakcję komórek apoptotycznych i nekrotycznych, jako rosnąca w czasie frakcja sub-G1 (**Rys. 2**).

Reasumując, na podstawie wykonanych badań wykazałam, że IR w obecności inhibitora VDAC prowadzi do obniżenia frakcji przeżywającej SF (survival fraction), co potwierdza właściwości DIDS jako dobrego radio-uczulacza. Zaobserwowałam wzrost blokady cyklu komórkowego, przedstawionej, jako stosunek frakcji komórkowych G2/G1 w czasie, w komórkach pre-inkubowanych przed napromienieniem, z DIDS. Takie wyniki potwierdzają



wcześniejsze doniesienia na temat właściwości DIDS jako radio-uczulacza, stąd konkluzja, że **poprzez zastosowanie tego typu radio-uczulaczy można skutecznie modulować ścieżki sygnałowe, w tym te gwarantujące przeżycie i poprzez nie obniżyć radio-oporność komórek nowotworowych.** Do tej pory z powodzeniem zastosowano inhibitory deacetylazy histonowej, zmutowanych białek ataxia telangiectasia, Raf, Hsp90 czy PI3K/mTOR do obniżenia radiooporności komórek nowotworowych<sup>12</sup>. Wykonane badania pokazały także, że w komórkach K562 indukuje się kanoniczna mitochondrialna ścieżka apoptozy, związana z rozprzęgnięciem mitochondriów i wyciekaniem do cytoplazmy cytochromu c, wraz z aktywacją kaskad kaspazy. **Zastosowanie DIDS wyidukowało apoptozę w napromienionych komórkach K562 poprzez aktywację kaspazy 8 i 9, dla długoterminowych efektów po napromienieniu jest to bardzo istotne, ponieważ w tym typie śmierci nie będzie indukowany stan zapalny i nie będzie potęgowany niepożądany w radioterapii efekt sąsiedztwa.** Kanały VDAC kontrolują cykl komórkowy i odpowiedź komórkową na promieniowanie poprzez modulacje poziomów RFT i RFA i zależnych od nich ścieżek sygnałowych, w tym naprawy DNA. Dlatego DIDS wydaje się być obiecującym radio-uczulaczem do zastosowania w terapiach celowanych wobec nowotworów.

### ***3. Zastosowanie pro-apoptotycznych ftalocyjanin jako fotouczulaczy do terapii fotodynamicznej wobec komórek czerniaka ludzkiego Me45***

Potrzeba skojarzenia nowoczesnej chemioterapii i terapii fotodynamicznej oraz prowadzenie badań nad opracowaniem skutecznej terapii łączonej, która pozwoliłaby na wyeliminowanie efektów ubocznych i niedostatków każdej z tych terapii z osobna były podstawą do wykonania badań i napisania **publikacji nr 3**. Nieprawidłowo stosowana radioterapia niesie ze sobą niebezpieczeństwo pobudzenia nowotworowych komórek macierzystych (CSC) do progresji i metastazy, a także wywołuje efekty uboczne (side effects) w komórkach bezpośrednio napromienianych, jak i w tych, które znajdują się w otoczeniu guza (efekt sąsiedztwa – bystander effect). Badanie efektów ubocznych wymaga zastosowania skomplikowanego układu eksperymentalnego, w celu zrozumienia sygnalizacji międzykomórkowej podczas terapii, a otrzymane wyniki nie zawsze bywają jednoznaczne. Obserwacje prowadzone w układzie bystander wymagają dużego zaangażowania operatorów i dużej wiedzy w zakresie komunikacji komórkowej<sup>13</sup>. Rozwój nowoczesnych metod leczenia chorób nowotworowych to również poszukiwanie innych niż chemioterapia i radioterapia rozwiązań terapeutycznych. Wśród nich jako jedną z najbardziej obiecujących wymienia się terapię fotodynamiczną (PDT), która obecnie przeżywa renesans. Opiera się ona na specyficznej odpowiedzi komórek nowotworowych, w których skumulowany fotouczulacz, w odpowiedzi na promieniowanie z zakresu światła widzialnego wyzwala energię i wzbudza

---

<sup>12</sup> Magdalena Skonieczna, Artur Cieslar-Pobuda, Yuriy Saenko, Marek Foksinski, Ryszard Olinski, Joanna Rzeszowska-Wolny, Emilia Wiechec. The Impact of DIDS-Induced Inhibition of Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) on Cellular Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. Medicinal Chemistry Volume 13 , Issue 5 , 2017 DOI : 10.2174/1573406413666170421102353.

<sup>13</sup> A. Krzywon, M Widel, K Fujarewicz, M Skonieczna, J Rzeszowska-Wolny (2018). Modulation by neighboring cells of the responses and fate of melanoma cells irradiated with UVA. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 178, 505-511.

falę wolnych rodników. Sam fotouczulacz nie jest toksyczny, ale wprowadzony do komórek nowotworowych pod wpływem światła przechodzi do stanu wzbudzonego i następnie wypromieniowuje nadmiar energii w postaci emisji, wywołując w komórkach nowotworowych powstanie wolnych rodników i tlenu singletowego, co prowadzi do zmian w błonach komórkowych i w efekcie do autolizy komórek nowotworowych. Zaletą PDT jest jej bardzo niska inwazyjność oraz selektywność względem komórek nowotworowych, na poziomie nieosiągalnym w chemioterapii, a także daje możliwość precyzyjnego sposobu naświetlenia wyłącznie chorego obszaru. Jednakże tak duża selektywność w połączeniu z precyzyjnym sposobem padania pociąga za sobą niemożność uwzględnienia potencjalnych ognisk przerzutowych, które pojawiają się w przypadkach nowotworów złośliwych lub mogą być wywołane pobudzeniem nowotworowych komórek macierzystych CSC.

W **publikacji nr 3** przebadalam pod względem aktywności biologicznej, biodostępności i wywołanych efektów wobec nowotworów skóry fotouczulacz, który strukturalnie oparty o ftalocyjaniny zawiera w centum aktywnym metal Zn.

### **Publikacja nr 3**

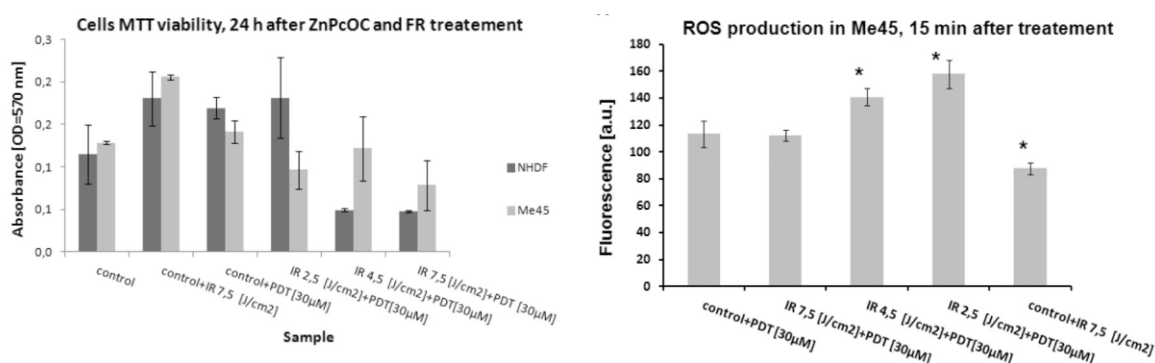
Nackiewicz J, Kliber-Jasik M, **Skonieczna M**. A novel pro-apoptotic role of zinc octacarboxyphthalocyanine in melanoma Me45 cancer cell's photodynamic therapy (PDT). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 190 (2019) 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.002>. Impact Factor: **3.165**; Punktacja MNiSW: **30**  
W publikacji mój udział był równorzędny z pierwszym autorem, byłam głównym pomysłodawcą części biologicznej i autorem korespondencyjnym.

Ftalocyjaniny zawierające Zn działają jak leki o charakterze foto-uczulaczy i są stosowane w terapii fotodynamicznej PDT w celu leczenia zmian nowotworowych. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykorzystalam octakarboksyftalocyjaninę zawierającą Zn (ZnPcOC), która w aktywowanej formie reaguje z tlenem i wyzwala falę wolnych rodników, które z kolei uszkadzają struktury wewnątrzkomórkowe. Poprzez nagłe wyprodukowanie RFT śmierć komórki następuje zazwyczaj natychmiast lub po niedługim czasie, na skutek indukcji nieprogramowanych ścieżek śmierci, nekrozy lub ferroptozy. Długoterminowe efekty mogą także być powiązane z pro-apoptycznym działaniem badanych związków, ponieważ obniżenie stężenia leku w celu zniwelowania bezpośredniej toksyczności nie spowoduje wywołania odpowiedniej fali rodników, dlatego efektywniejsza w tym przypadku może okazać się indukcja późniejszej, ale programowanej śmierci apoptozy, bez stanu zapalnego. Przeprowadzone przez mnie badania skupione były na ocenie efektów cytotoksycznych, dla ftalocyjaniny ZnPcOC zastosowanej w różnych dawkach, po wzbudzeniu jej falą światła czerwonego. Optoelektroniczny systemem wyposażony w diody laserowe LED emitował falę o długości  $\lambda = 685$  nm, a kombinacja ZnPcOC wraz z napromienieniem w różnych protokołach PDT były badane wobec komórek linii czerniaka ludzkiego Me45 i prawidłowych fibroblastów NHDF *in vitro*. Okazało się, że niskie stężenia ftalocyjaniny ZnPcOC, aktywowanej odpowiednią długością fali świetlnej, mogą indukować śmierć komórkową w Me45 poprzez zależną od RFT apoptozę. Te wyniki zostały potwierdzone w przeprowadzonych przez mnie pomiarach cytometrycznych. *In vitro* fotodynamiczna terapia, z zastosowaniem ZnPcOC wywołała letalne efekty już w niskich

dawkach 30  $\mu\text{M}$  wobec komórek Me45, podczas gdy wobec prawidłowych NHDF efekty te były mniej widoczne. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o specyficznej selektywności ZnPcOC wobec linii nowotworowej mniejszej toksyczności wobec komórek prawidłowych – jest to zgodne z złożeniem terapii celowanych wobec nowotworów (**Rys. 3**).

Ekspozycja na światło słoneczne niesie ze sobą ryzyko transformacji komórkowej, głównie w kierunku nowotworzenia. Obecnie nie tylko w regionach Afryki, ale także w Europie transformacja prawidłowych keratynocytów w kierunku melanomy jest przyczyną rosnących wskaźników zachorowań na nowotwory skóry, w tym czerniaka złośliwego<sup>14</sup>. Celem terapii PDT jest dostarczenie dokładnie do komórek nowotworowych leku lub w jego bliskie sąsiedztwo, i skoncentrowanie w tym obszarze fotouczulacza w możliwie najwyższym stężeniu. Zastosowanie nanocząsteczek, które w inteligentny sposób kumulowałyby się w obszarze nowotworowym jest celem nowoczesnych protokołów terapeutycznych, ponieważ eliminowałyby efekty uboczne w tkankach zdrowych. Efekty uboczne powinny być eliminowane na każdy krok terapii, ponieważ są niepożądane w klinice i wydłużają leczenie pacjenta. W radioterapii obserwuje się często efekty sąsiedztwa (bystander), a także abskopalne w odległych tkankach, mogą one być przedłożone w czasie i pojawiać się po wielu tygodniach a nawet miesiącach od zakończonej terapii<sup>15</sup>.

Zasada działania terapii PDT polega na współdziałaniu fotouczulacza, który jest aktywowany odpowiednią falą światła czerwonego, co z kolei go aktywuje. Fotouczulacz w aktywnej formie włącza na wzmożoną produkcję wolnych rodników przez mitochondrialne systemy, co ma wywoływać wtórne uszkodzenia oksydacyjne. Konsekwencją takiego działania jest lokalna cytotoksyczność i stres oksydacyjny – ostatecznie śmierć nieprogramowana (nekroza) lub programowana (apoptoza). Zaletą takiego systemu jest przede wszystkim to, że wszystkie trzy komponenty (fotouczulacz, światło i RFT/RFA) samodzielnie nie są cytotoksyczne, i obecność wszystkich trzech naraz może dopiero wywołać oczekiwany letalny efekt w komórkach.

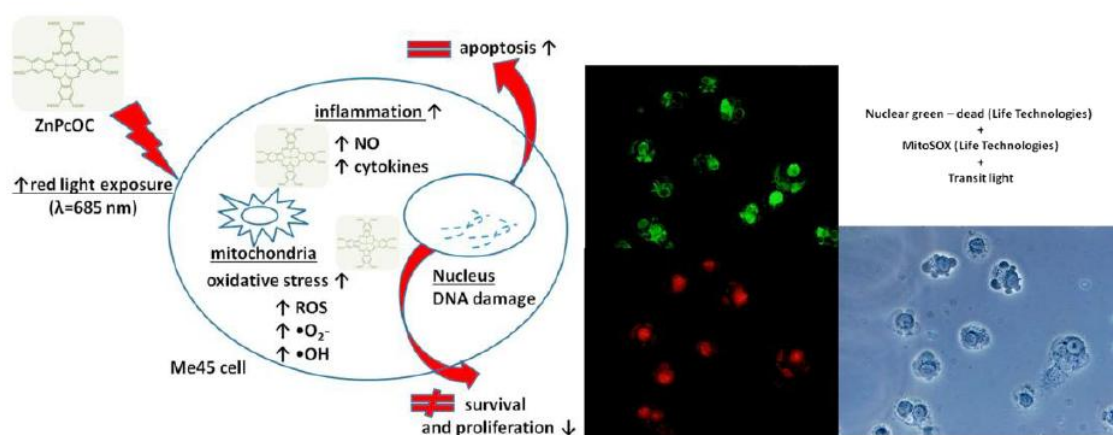


**Rys. 3** PDT z zastosowaniem ftalocyjaniny ZnPcOC i naświetleniem światłem czerwonym skutkuje obniżoną żywotnością komórek Me45 (lewa strona) i wybuchem RFT/RFA zaraz po napromienieniu (prawa strona).

<sup>14</sup> A.C. Geller, S.M. Swetter, K. Brooks, M.F. Demierre, A.L. Yaroch, Screening, Early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions, *J. Am. Acad. Dermatol.* 57 (2007) 555–572.

<sup>15</sup> M. Widel, M. Radiation Induced Bystander effect: from *in Vitro* Studies to Clinical Application, *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology* 5 (2016) 1–17.

Przeprowadzone przez mnie ewaluacje fotouczulaczy wykazały zależność nie tylko od dawki badanego związku, ale także od mocy zastosowanego światła. System LED z całą pewnością wyklucza zjawisko fototoksyczności, ponieważ zastosowana długość fali precyzyjnie trafia w centrum aktywne podanego do komórek leku. Jeśli ZnPcOc nie wniknęła do komórek została przed naświetleniem odpłukana, zgodnie z opracowanym protokołem postępowania. Zatem jedynie komórki, do których związek się dostał mogły odpowiedzieć wzmożoną produkcją RFT. Takie postępowanie ogranicza niebezpieczeństwo nieprawidłowego zinterpretowania uzyskanych wyników. W trakcie PDT wzbudzona światłem ZnPcOC o najwyższej mocy (7.5 J/cm<sup>2</sup>), przy stężeniu ZnPcOC 30 μM zaburza żywotności Me45 i ją obniżała, co wykazałam w 24- godzinnym teście MTT. Dodatkowo wykazałam, że wyidukowana terapią PDT śmierć w Me45 zależała od poziomu RFT i połączona była z indukowaną nimi programowaną apoptozą (**Fig. 4**).



**Fig. 4** Schemat indukowanej terapii PDT z zastosowaniem fotouczulacza ZnPcOC odpowiedzi komórkowej w komórkach czerniaka Me45 (po lewej) i mikroskopowy obraz apoptozy (po prawej).

Wyniki z przeprowadzonych przeze mnie badań mogą być wykorzystane do długoterminowych obserwacji popromiennych efektów sąsiedztwa (bystander) i abskopalnych w odległych tkankach u pacjentów, a także dowodzą tego, że **poza standardowymi terapiami, należy wykorzystywać także te, które mogą ograniczyć niekorzystne i długoterminowe skutki uboczne.**

#### ***4. Zastosowanie fluorescencyjnych nośników leków do identyfikacji programowanej śmierci komórkowej - apoptozy***

Wprowadzanie leku do komórki wiąże się z wysoką cytotoksycznością, jeśli z założenia ma on działać selektywnie wobec wybranego typu komórek praca jest utrudniona. W pierwszej kolejności należy zapewnić taką specyficzność, gwarantuje to otrzymanie efektów na skutek rzeczywistego wniknięcia badanego czynnika do tergetowej komórki, a nie jest wynikiem sygnalizacji międzykomórkowej i propagacji np. apoptozy poprzez zewnątrzkomórkowe szlaki z otaczających komórek (efekt sąsiedztwa). Terapia celowana skupia się właśnie na doprowadzaniu leku do właściwych komórek, tkanek, a nawet danego typu nowotworu. W strategii tej wykorzystywane są właściwości komórek nowotworowych, w tym znane zwiększone zapotrzebowanie na glukozę i efektywna glikoliza, także w

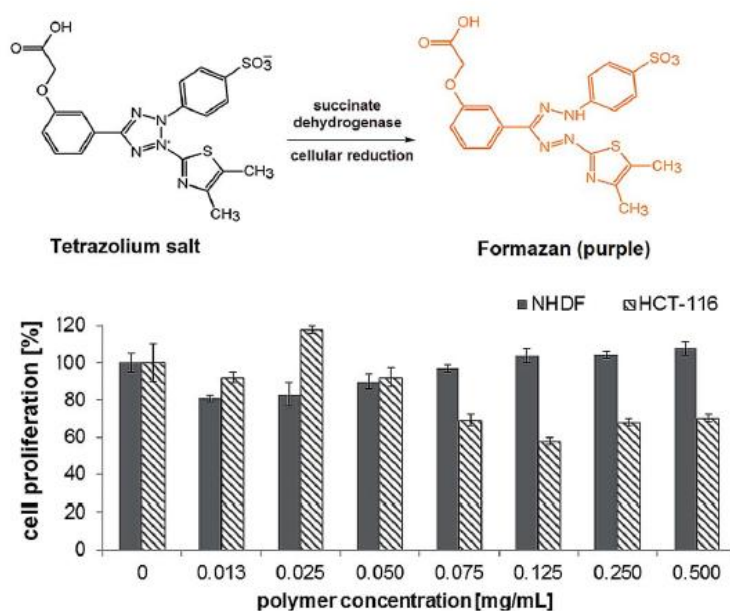
warunkach długu tlenowego. W oparciu o tę wiedzę skonstruowano fluorescencyjne nanoosiłki polimerowe o strukturze gwiazdzistej, mające charakter kationowy. Takie fizyko-chemiczne właściwości zapewniają docieranie do komórek o wysokim zapotrzebowaniu na cukry, mające podwyższony metabolizm. Gwarantuje to wstępną selektywność, komórki nowotworowe chętniej niż prawidłowe będą korzystały z takiego źródła węgla. W **publikacji nr 4** wykonałam szereg badań cytotoxyczości wobec prawidłowych fibroblastów NHDF, a także nowotworowej linii raka okrężnicy HCT 116. Uzyskane wyniki pokazują, że **w zależności od metabolizmu komórkowego można aplikować związki o selektywnym charakterze wobec wybranej linii komórkowej.**

#### **Publikacja 4**

Anna Mielanczyk, **Magdalena Skonieczna**, Katarzyna Bernaczek and Dorota Neugebauer. Fluorescein nanocarriers based on cationic star copolymers with acetal linked sugar cores. Synthesis and biochemical characterization. RSC Adv., 2014, 4(60):31904-31913. DOI: 10.1039/C4RA03579H. Impact Factor: **3.840**; Punktacja MNiSW: **35**

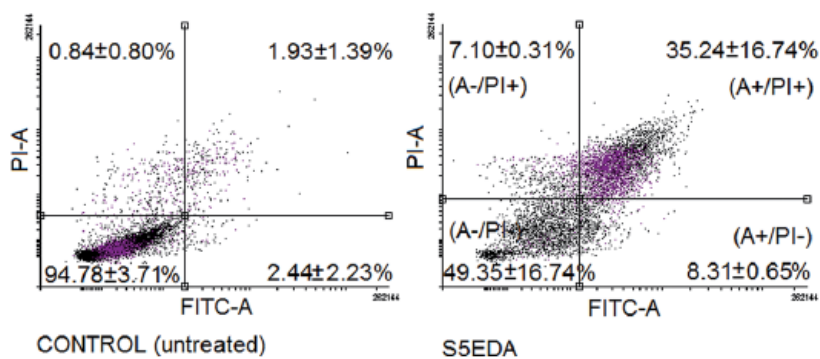
W tej pracy byłam głównym pomysłodawcą i wykonawcą badań biologicznych.

W badaniach testowałam sfunkcjonalizowane nośniki kationowe, zbudowane z acetalowych rdzeni metylo- $\alpha$ -D-glukopiranozydu z ramionami polimetakrylanowymi, zawierające oksiranowe grupy boczne, które zostały zmodyfikowane etylenodiaminą (EDA) do tworzenia polikationów amfifilowych, rozpuszczalne w wodzie. Dodatkowo do ramion przyłączono znacznik fluorescencyjny - izotiocyanian fluoresceiny (FITC). Przez to, że cząsteczka polimeru kationowego ma strukturę rdzenia cukrowego, zapewnia to w odpowiednich warunkach uwalnianie połączonego z takim nośnikiem leku. Może odbywać się to poprzez degradację cukrów na skutek działania odpowiednich enzymów wewnątrzkomórkowych. Internalizacja cząsteczek miała z kolei być zapewniona odpowiednią aktywacją błony komórkowej (kationowy polimer mógłby się w niej zakotwiczać), a to z kolei uruchamiałyby proces tworzenia przez komórkę endosomów. Badania, które przeprowadziłam skoncentrowane zostały na ocenie cytotoxyczości badanych nośników w teście MTS wobec wybranych linii komórkowych, prawidłowych NHDF i nowotworowych HCT 116. Po ocenie cytotoxyczości i wyznaczeniu dawki  $IC_{50}$  (powodującej śmiertelność połowy populacji komórkowej) skupiłam się na rozpoznaniu rodzaju śmierci komórkowej, wywołanej samymi nośnikami lub sprzęgniętymi z nimi substancjami aktywnymi. W tym celu wykonałam szereg pomiarów cytometrycznych, gdzie za pomocą testów z Aneksyną-V i znakowaniem jodkiem propidyny oszacowałam frakcje komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Okazuje się, że już samo badanie cytotoxyczości dostarczyło cennych informacji na temat badanych polimerów – wykazały one selektywność wobec komórek nowotworowych, zgodnie ze wstępnym założeniem, że **nowotwory charakteryzują się wyższym zapotrzebowaniem na cukry wobec tego w nich kumulacja leku i śmierć nastąpi szybciej.** Prawidłowe fibroblasty w 24 godzinnym teście MTS okazały się niewrażliwe na badane związki (**Rys. 5**).



**Rys. 5** Selektywność badanych polimerów na podstawie 24-godzinnego testu MTS wobec prawidłowych NHDF i nowotworowych komórek HCT 116.

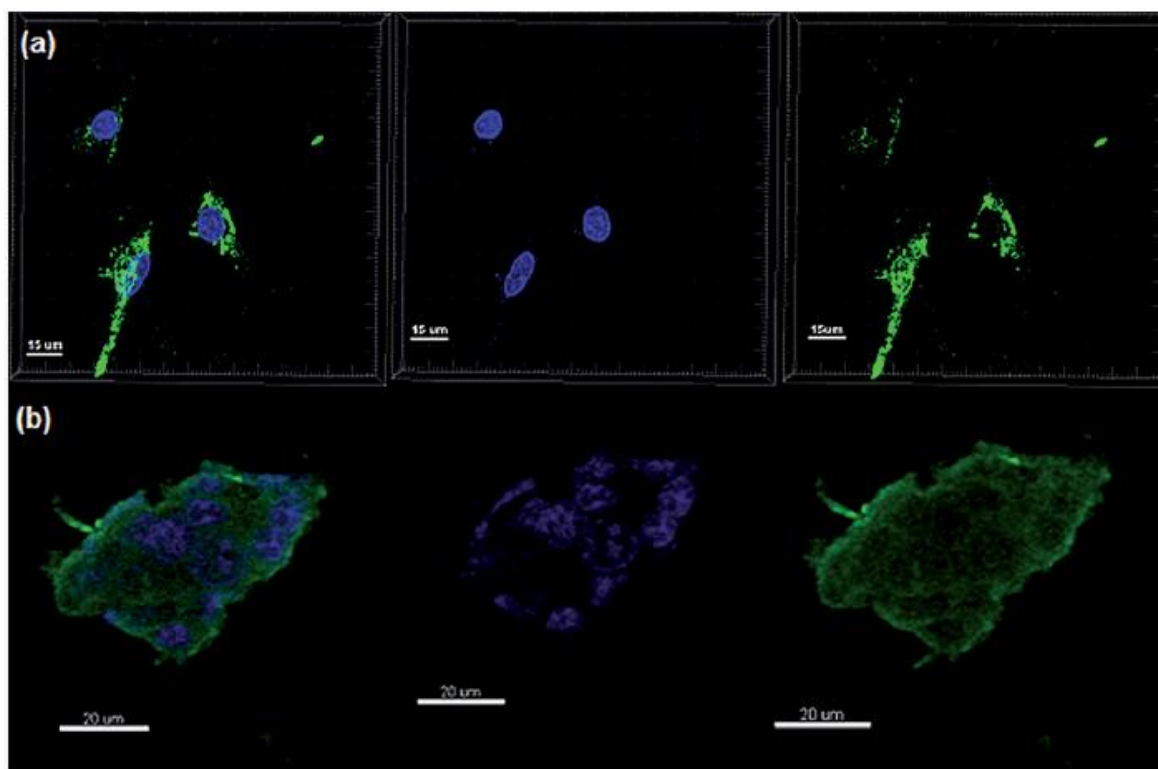
Wniknięcie gwiazdzistych polimerów do wnętrza komórek nie jest równoznaczne w indukcją śmierci komórkowej, zakotwiczenie w błonie komórkowej, opłaszczenie i blokowanie receptorów powierzchniowych mogą przyczynić się wtórnie do zatrzymania proliferacji i obniżenia żywotności. Efekty biologiczne badanych związków mają zazwyczaj złożony charakter, a mechanizmy aktywacji lub hamowania niektórych procesów wewnątrzkomórkowych są trudne do śledzenia. Obserwacje na komórkach powinny być precyzyjne a uzyskane wyniki jednoznaczne. Dlatego ocena typu śmierci, która jest lekiem wywołana odsłania poniekąd molekularny mechanizm działania leku. Cytometryczne pomiary apoptozy pokazały ponownie, że selektywność proponowanych nośników wobec HCT 116 jest wysoka - frakcja komórek apoptotycznych wynosiła po 24 h ponad 35 %, podczas gdy nietraktowanych populacjach kontrolnych zaledwie 2% (**Rys. 6**).



**Rys. 6** Apoptoza w komórkach HCT 116 po 24 h w populacji kontrolnej (po lewej) i po inkubacji z gwiazdzistymi polimerami (po prawej).

Ostatecznym potwierdzeniem działania polimerów na terenie komórek była ich lokalizacja w komórkach nowotworowych na podstawie obrazowania mikroskopią konfokalną z użyciem konfokalnego mikroskopu (CLSM, Olympus FV1000). Internalizacja została zainicjowana w specjalistycznych naczynkach hodowanych (chamber slides, BD), przystosowanych zarazem do obrazowania przyżyciowego. Komórki dodatkowo zostały wyznakowane barwnikiem Hoechst, który specyficznym wiąże się z DNA i pozwala na wizualizację jąder komórkowych w niebieskim kanale (DAPI). Przyłączenie na etapie syntezy chemicznej do nośnika polimerowego znacznika - fluoresceiny, pozwala na bezbłędne śledzenie lokalizacji związku na terenie komórki. W kanale FITC sygnał zielony obrazuje ko-lokalizację polimerów, w cytoplazmie lub na terenie jądra komórkowego. Uzyskane obrazy służąc, jako wskazówki dopełniają uzyskane wcześniej za pomocą testu MTT i z Aneksyną-V wyniki, głównie co do lokalizacji i mechanizmu działania polimerów wobec HCT 116. Cząsteczki wyznakowane fluoresceiną kumulują się głównie na terenie cytoplazmy zarówno fibroblastów, jak i komórek nowotworowych HCT 116. Jednak ko-lokalizacja z sygnałami niebieskimi dla jąder komórkowych pokazuje, że tylko w niektórych przypadkach nośnik tam dociera (**Rys. 7**). Jak się spodziewano wyższa koncentracja sygnałów była zaobserwowana dla HCT 116 i właśnie dla tych komórek sygnały obecności w jądrze zostały zarejestrowane. W przypadku prawidłowych fibroblastów taka kumulacja w jądrach nie miała miejsca lub była przypadkowa.

Zatem **uzyskano potwierdzenie, co do selektywności działania polimerowych nośników wobec nowotworów w porównaniu z prawidłowymi komórkami**. Nastąpiła potwierdzona mikroskopową obserwacją przyżyciową dokomórkowa internalizacja, a dotarcie na teren jądra komórkowego utwierdza w zaplanowanych na etapie syntezy następstwach zastosowania polimerów. Forma wyidukowanej programowanej śmierci komórkowej, czyli apoptoza, potwierdzona wykonanymi przez mnie pomiarami cytometrycznymi, a także obniżona żywotność linii nowotworowej HCT 116 w teście MTT w pełni charakteryzują przebadane przez mnie kationowe polimery znakowane fluoresceiną, jako potencjalnie przeciwnowotworowe. Uzyskane wyniki predysponują je także do dalszych badań wobec innych linii komórkowych, a także w przyszłości do badań *in vivo*.



**Rys. 7** Internalizacja sprzęgniętych z FITC gwiaździstych kopolimerów do komórek NHDF (a) i HCT-116 (b) po 24 h. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego uzyskane przy powiększeniu 40 x (a) i 10 x (b). Zielona fluorescencja pochodzi od podjednostek FITC w gwiaździstych kopolimerach (wzbudzenie 488 nm); niebieska fluorescencja z jąder komórkowych w kanale DAPI (wzbudzenie 405 nm).

Mikroskopowa obserwacja konfokalna i detekcja sygnałów fluorescencyjnych dostarcza również informacji na temat koncentracji nośników w komórkach. Internalizacja zależna od dawki jest możliwa do prześledzenia zarówno w komórkach prawidłowych NHDF, jak i nowotworowych HCT 116. Aczkolwiek bardziej precyzyjna ko-lokalizacja wymaga zastosowania markerów dla wybranych organelli wewnątrzkomórkowych.

### ***5. Selektywna dokomórkowa dystrybucja leków i biologiczne efekty związane z indukcją apoptozy w wybranych liniach nowotworowych***

Nanopolimery, które można wykorzystać do projektowania nośników dla znaczników molekularnych i leków powinny charakteryzować się przede wszystkim na tyle małą wielkością, by nie agregować na powierzchni błony komórkowej i dodatkowo powinny być dobrze rozpuszczalne w środowisku hydrofilowym. Zaproponowane do badań biologicznych polimery o strukturze gwiaździstej zbudowane z polimetakrylanu dodatkowo w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika mogą się kompresować lub rozpręzać (~10 nm w 0.01 M PBS i 210 nm w wodzie). Taka właściwość implikuje zdolność do przybierania możliwie małej formy polimeru podczas przebywania np. płynach pozakomórkowych i rozprężania się w środowisku bardziej wodnym, już na terenie cytoplazmy. Dodatkowo obecność długich łańcuchów węglowych polepsza właściwości fizykochemiczne cząsteczki do zastosowań w



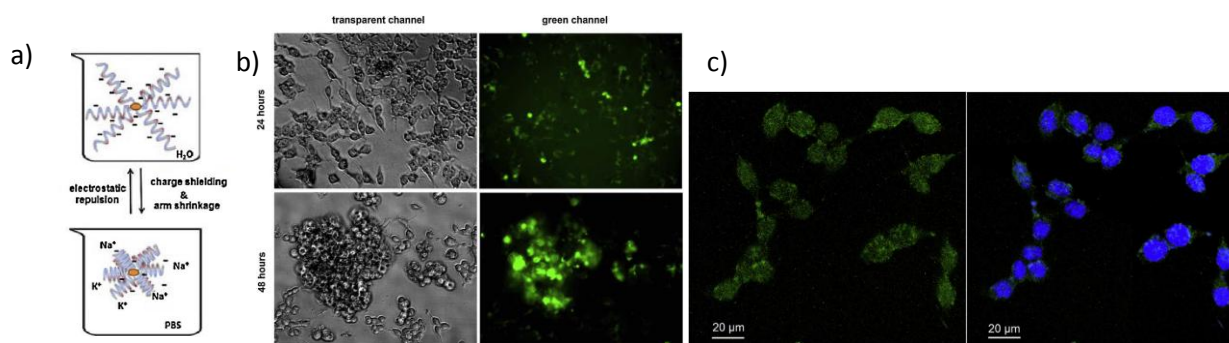
aplikacjach biologicznych, np. przy podaniu dożylnym leku. Grupy karboksylowe w zaproponowanych do zbadania nośnikach zostały dodatkowo sprzęgnięte ze znacznikiem fluorescencyjnym (fluoresceiną) lub z lekiem (doksorubicyną). Na potrzeby **publikacji nr 5** zaproponowałam i wykonałam szereg oznaczeń biologicznych na panelu linii komórkowych: prawidłowych fibroblastach NHDF i nowotworowych liniach HCT 116 i MCF-7/R (linia oporna na doksorubicynę).

### **Publikacja 5**

Anna Mielańczyk, **Magdalena Skonieczna**, Dorota Neugebauer. Cellular response to star-shaped polyacids. Solution behavior and conjugation advantages. Toxicology Letters Volume 274, 15 May 2017, Pages 42-50. Impact Factor: **3.166**; Punktacja MNiSW: **35**

W tej pracy byłam pomysłodawcą i wykonawcą badań biologicznych.

Poprzez wykonanie standardowych testów na cytotoksyczność wyznaczyłam dawki, w zakresie których spodziewano się dalszych efektów biologicznych, a także wstępnie oszacowano selektywność wobec wybranych linii komórkowych. Dla linii NHDF toksyczne okazały się polimery niekationowe, o ujemnym ładunku przypadkowym, podczas gdy wobec HCT 116 i MCF7/R były one obojętne. Dodanie do polimerów znacznika fluorescencyjnego lub leku tworzy specyficzny system dostarczania leku (DDS, polymeric drug delivery systems), który może być łatwo monitorowany przy udziale mikroskopii fluorescencyjnej. Samo dodanie organicznego fluorochromu może znacznie polepszyć wydajność dokomórkowego transportu. Jednak samo użycie znaczników fluorescencyjnych może stwarzać dwojakie poniekąd problemy, związane ze zbyt słabym świeceniem lub ze zjawiskiem foto-toksyczności przy zbyt dużej emisji (photobleaching). Zjawisko to jest na tyle gwałtowne, że może doprowadzić do uszkodzenia komórek wywołując tym samym ich rozpad, działają tak w większości stosowane barwniki organiczne, takie jak rodamina i cyjaniny. Z kolei zastosowanie białek fluorescencyjnych, o znacznie niższej fluorescencji wymaga stosowania ich dużej koncentracji, co z kolei doprowadza do toksycznego „przeładowania komórki” na skutek agregacji ich na terenie cytoplazmy. Zaproponowane rozpuszczalne w wodzie polimery kationowe, w przeciwieństwie do nierozpuszczalnych i kancerogennych, są biodegradowalne i wykazują wysoką czułość, jako biosensory lub chemiczne wskaźniki, dlatego są optymalne w biomedycznych aplikacjach *in vivo*. Wykonane przeze mnie badania i obrazowanie mikroskopowe wykazały, że badane związki z powodzeniem przedostają się do wnętrza komórek, HCT 116 i w zamieniających się warunkach pH kumulują się na terenie cytoplazmy. Mikroskopia konfokalna wykazała, że polimerowe nośniki są obecne także na terenie jąder komórkowych, co potwierdza ich działanie jako systemu transportującego DDS idealnego do dostarczania interkalatorów DNA (**Rys. 8**). Sprzęgnięcie związku z doksorubicyną jest zatem optymalnym rozwiązaniem, ponieważ można zmniejszać dawkę leku stosowaną wobec komórek nowotworowych, a inteligentny system dostarczania zapewni jego optymalną koncentrację na terenie cytoplazmy i jądra komórkowego.

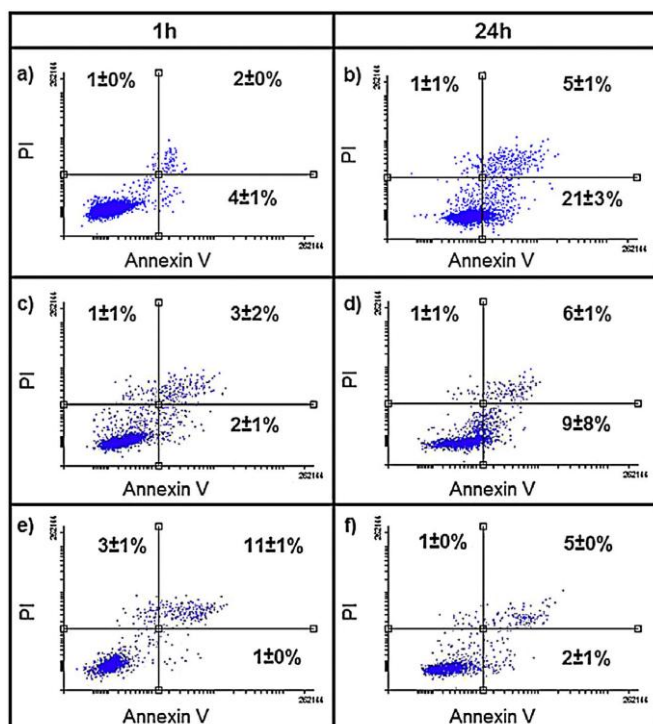


**Rys. 8** Zmiana wielkości cząsteczki nośnika w zależności od środowiska (a). Internalizacja sprzęgniętych z FITC gwiaździstych kopolimerów do komórek HCT 116 (b) po 24 i 48 h. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego uzyskane przy powiększeniu 10 x (b) i 40 x (c). Zielona fluorescencja pochodzi od podjednostek FITC w gwiaździstych kopolimerach (wzbudzenie 488 nm); niebieska fluorescencja z jąder komórkowych w kanale DAPI (wzbudzenie 405 nm).

Zastosowane polimery, same rdzenie z funkcjonalnymi ramionami okazały się być nietoksyczne wobec NHDF i linii nowotworowych HCT 116 i MCF-7/R. W teście MTS proliferacja komórkowa nie została obniżona, w niektórych przypadkach, w zależności od podanej koncentracji nośnika obserwowano nawet stymulację wzrostu, prawdopodobnie na skutek dostarczonego do komórek rdzenia cukrowego, co stanowi dla komórek dodatkowe źródło węgla. Dopiero dodanie do nośników grup funkcjonalizujących, sprzęgnięcie z fluoresceiną i z doksorubicyną przyniosło oczekiwane zahamowanie wzrostu linii nowotworowych. W przypadku linii MCF-7/R okazało się, że użycie inteligentnego systemu dostarczania DDS pozwala na zmniejszenie dawki leku w stosunku do dawek znanych z literatury. Pomimo tego, że linia ta jest oporna na doksorubicynę udało się efektywnie zmniejszyć jej proliferację i przeżywalność dopiero po zastosowaniu badanych nośników polimerowych<sup>16</sup>. Po wnikięciu polimerów do wnętrza komórek zajęłam się rozpoznaniem mechanizmu wywołanej DDS śmierci. W pomiarach cytometrycznych wykazałam, że linie komórkowe nowotworowe HCT 116 i MCF-7/R umierają na drodze indukcji programowanej śmierci apoptotycznej. Wynik ten po raz kolejny pokazał, że zastosowane nośniki, same są neutralne, dopiero sprzęgnięte z lekiem wywołują oczekiwany efekt – wykazują pro-apoptotyczne działanie (**Rys. 9**). Efekt cytotoksyczności był zależny od dawki przyłączonego do nośnika leku, stąd można wysnuć wniosek, że funkcjonalizacja ramion biodegradowalnego rdzenia nośnika polepsza efektywność dostarczenia leku i jego koncentracji na terenie komórki. Dopiero po degradacji wewnątrzkomórkowej rdzenia cukrowego następuje uwolnienie leku i jego stężenie zaczyna gwałtownie wzrastać. Samo kompresowanie i niejako „rozpakowanie” DDS w komórce powoduje uwolnienie i aktywację substancji czynnej. Można powiedzieć, że w tym przypadku mamy do czynienia niejako z maskowaniem/ukrywaniem przed komórką tego co DDS niesie, komórka traktuje taką skompresowaną cząsteczkę jako neutralną, ewentualnie jako źródło cukru i węgla, wobec tego nie uruchamia mechanizmów obronnych. Dopiero w cytoplazmie następuje odkrycie

<sup>16</sup> A Mielńczyk, M Skonieczna, Dorota Neugebauer. Cellular response to star-shaped polyacids. Solution behavior and conjugation advantages. Toxicology Letters Volume 274, 15 May 2017, Pages 42-50.

zawartości, ale w tym momencie komórka nie jest już w stanie uchronić się przed uwolnionym lekiem.



**Rys. 9** Cytometryczna ocena apoptozy za pomocą podwójnego znakowania Anneksyną-V/PI (A/PI) komórek HCT 116; nietraktowana kontrola (a i b), komórki po inkubacji z 250 µg/mL gwiazdzistych polimerów (c i d) i ich pochodnych z fluoresceiną (e i f). Komórki prawidłowe i żywe (A-/PI-); późna apoptoza (A+/PI+); wczesna apoptoza (A+/PI-); nekroza (A-/PI+).

Przeprowadzone przez mnie badania wykazały, że stosowanie funkcjonalizowanych nośników w układzie sytemu dostarczania leku DDS wpływa na polepszenie biodostępności substancji czynnej, przez co końcowy efekt terapeutyczny może być znacznie lepszy, przy jednoczesnej obniżonej dawce. Zmniejsza to niepożądaną cytotoksyczność w tkankach otaczających i prawidłowych, a selekcja zapewniona jest podwyższonym metabolizmem i zapotrzebowaniem na cukry w nowotworach. Po raz kolejny cukrowe rdzenie samych nośników okazały się być wystarczające do zapewnienia wybiórczego oddziaływania na komórki, a zdolność do zmiany konformacji DDS udowodniła, że można efektywnie dostarczać leki do wnętrza wybranych komórek. Apoptotyczna śmierć komórkowa, wynikająca z oddziaływania substancji czynnej dokсорubicyny z DNA komórkowym może być zoptymalizowana poprzez zastosowanie inteligentnego systemu dostarczania leku DDS zaproponowanego w **publikacji nr 5**. Uzyskane wyniki mogą wpływać na modyfikowanie **protokołów terapeutycznych, zwłaszcza w aspekcie doboru dawek skutecznych leku, tak aby zmniejszać toksyczność wobec komórek prawidłowych – ograniczenie efektu cytotoksyczności przy chemioterapii.**

## **6. *Terapia kombinowana substancjami pochodzenia naturalnego, resveratrolem i berberyną, w ludzkiej linii SCC-25 oraz śmierć komórkowa związana ze stresem oksydacyjnym***

Stosowanie substancji czynnych pochodzenia naturalnego przyczynia się do poszerzania panelu terapii wobec opornych nowotworów, a także tych źle rokujących. Spośród wielu aktywnych związków te pochodzenia roślinnego, znajdujące się powszechnie w diecie są ciągle w centrum uwagi badaczy. Stosowanie ich w terapii przeciwnowotworowej wpływa między innymi na procesy osydo-redukcyjne w komórkach. Wybrane do badań resveratrol i berberyna znane są ze swoich właściwości przeciwnowotworowych. Berberyna została przebadana pod kątem cytostatyczności i działa jako czynnik antyproliferacyjny, a zarazem pro-apoptotyczny wobec wielu linii komórkowych<sup>17</sup>. Z kolei resveratrol to dobry zmiatacz wolnych rodników obecny w winogronach czy winie. Z naszych wcześniejszych badań wiemy, że berberyna działa poprzez aktywowanie fali wolnych rodników i efekty śmierci komórkowej obserwowane w SCC-25 wiążą się z indukowaną RFT apoptozą. Zatem na potrzeby **publikacji nr 6** postawiłam pytanie: **czy można obniżyć skuteczną dawkę berberyny w celu wywołania efektu terapeutycznego, i czy dodanie kolejnej substancji czynnej, resveratrolu, wniesie dodatkowe skutki wobec komórek nowotworowych?**

### **Publikacja 6**

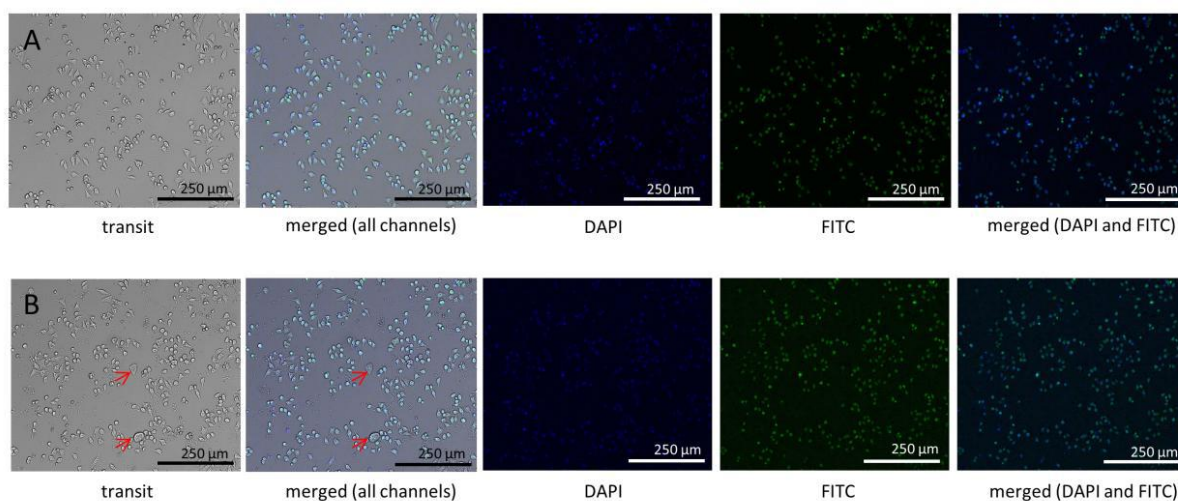
**Magdalena Skonieczna, Dorota Hudy, Aleksandra Poterala-Hejmo, Tomasz Hejmo, Rafal J. Buldak, Arkadiusz Dziedzic.** Effects of Resveratrol, Berberine, and Their Combinations on Reactive Oxygen Species, Survival, and Apoptosis in Human Squamous Carcinoma (SCC-25) Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* DOI : 10.2174/1871520619666190405111151. Impact Factor: **2.556**; Punktacja MNiSW: **35**

W pracy byłam głównym pomysłodawcą, zaplanowałam i wykonałam wszystkie eksperymenty, przeanalizowałam wyniki oraz napisałam manuskrypt, jestem autorem korespondencyjnym - praca została przyjęta do druku.

Berberyna i resveratrol są obecne w diecie człowieka od tysięcy lat, jednakże do tej pory jednoznaczny mechanizm działania tych substancji na komórki nie został w pełni poznany. Postuluje się, że główny mechanizm oddziaływania polega na pro-oksydacyjnym działaniu, prowadzącym do podniesienia produkcji RFT w kompartmentach i organellach komórkowych. Biomolekuly te używano także w terapiach kombinowanych, gdzie dodanie nanocząsteczek np. nanosrebra miało polepszyć bio-dystrybucję i zwiększyć letalne oddziaływanie związków na komórki<sup>17</sup>. Ostatecznie wygenerowana fala wolnych rodników powinna niszczyć DNA i zaburzać równowagę redoks. Do badań wykorzystałam roztwory wodne berberyny i resveratrolu i stosowałam je w testach oceny cytotoksyczności wobec komórek raka koleczystokomórkowego w modelowej linii komórkowej SCC-25. Testy MTT pozwoliły na wyznaczenie dawek IC<sub>50</sub>, co w kolejnym etapie pozwoliło na łączenie substancji czynnych w dowolnych kombinacjach stężeniowych. Uzyskane izobologramy pokazały, że

<sup>17</sup> A. Dziedzic, R. Kubina, R. J. Buldak, Magdalena Skonieczna, K. Cholewa. Silver nanoparticles exhibit the dose-dependent anti-proliferative effect against human squamous carcinoma cells attenuated in the presence of berberie. *Molecules* 2016 vol. 21 iss. 3, art. no. 365 s. 1-17.

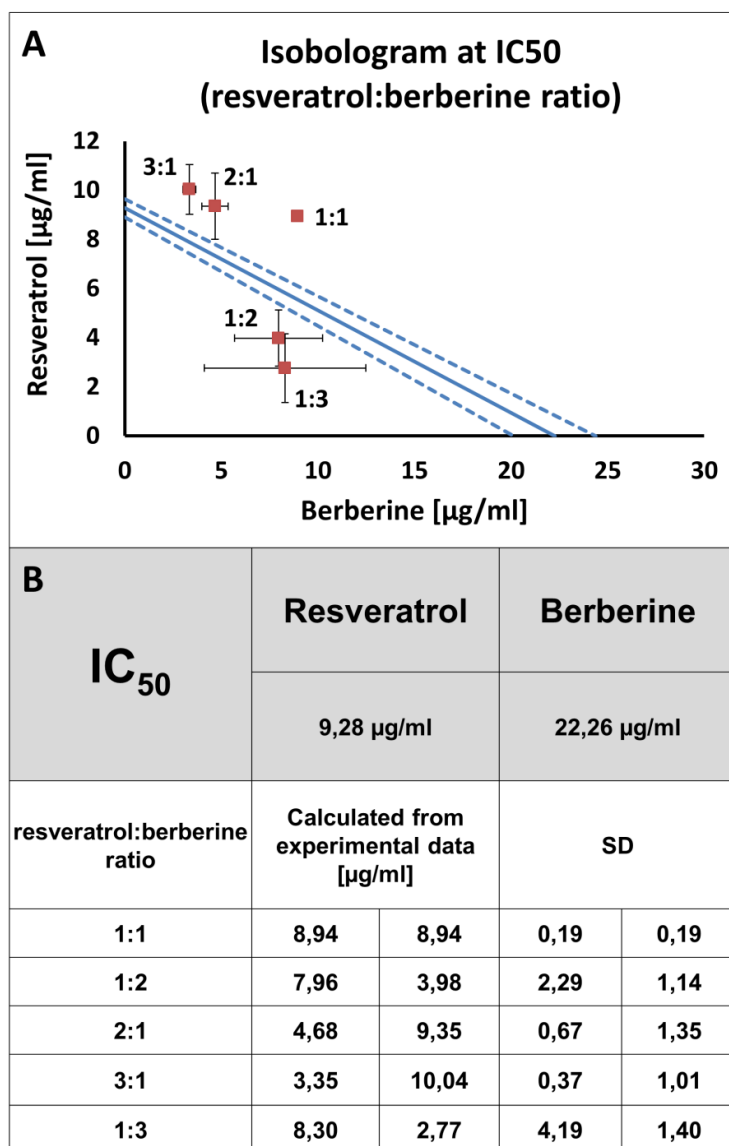
dawkowanie berberyny można obniżyć niemal o połowę, w stosunku do danych znanych z literatury, jeśli będzie ona podawana w kombinacji z resveratolem. Uzyskane efekty biologiczne okazały się być z kolei bi-modalne, a odpowiedzi nieliniowe. Najważniejszym osiągnięciem, poza zmniejszeniem dawkowania, okazało się stwierdzenie, że w traktowaniu kombinowanym zmienia się przede wszystkim profil produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, czyli cząsteczek sygnałowych. Na podstawie pomiarów cytometrycznych wykazałam, że komórki SCC-25 po potraktowaniu berberyną odpowiadają głównie śmiercią nekrotyczną, a nie jak wcześniej sugerowano apoptotyczną, mogło się do tego przyczynić obniżenie dawek dla berberyny, z kolei antyoksydacyjny resveratrol indukował apoptozę. Obydwa związki podane w kombinacji potęgowały niemal 10-krotnie efekty związane ze śmiercią nekrotyczną komórek. Dodatkowe pomiary dla RFT potwierdziły, że tylko w łączonych dawkach następuje wzmocnienie efektu pro-oksydacyjnego berberyny i resveratolu. Synergia działania w obszarze indukcji stresu oksydacyjnego wydaje się tu zatem zaskakującą, ponieważ resveratrol głównie uważany był za substancję o właściwościach antyoksydacyjnych (**Rys. 10**). Znakowanie przyżyciowe specyficznymi do wykrywania RFT barwnikami, pozwala na wizualizację mikroskopową poziomu wolnych rodników w komórkach. Zastosowanie przyżyciowego systemu do akwizycji obrazów i rejestracji zdjęć pozwoliło na długoterminowe śledzenie pojedynczych komórek po potraktowaniu berberyną w kombinacji z resveratolem. Zielony sygnał w kanale FITC odzwierciedlił poziom RFT w komórkach SCC-25.



**Fig. 10** Zdjęcia komórek kontrolnych SCC-25 (A) i po 24 h traktowaniu berberyną z resveratolem [10  $\mu\text{g/ml}$ ] (B). Złożenie zdjęć z kanałów w świetle przechodzącym, niebieskim (jądra komórkowe znakowane barwnikiem Hoechst 33342) i zielonym (RFT znakowane barwnikiem CellROX Green). Skala 250 $\mu\text{m}$ . Czerwona strzałka wskazuje komórki nekrotyczne.

Zastosowanie możliwości łączenia różnych substancji czynnych, o raportowanych różnych właściwościach i mechanizmach działania, pokazały, że w zależności od dawki i dodatkowego czynnika działania te można wzmocnić, osłabić lub odwrócić. Efekty takie znane są dla wielu leków z testów farmakologicznych, gdzie taka interakcja przy podawaniu wielu leków naraz jest powszechna. Z kolei istnieje niebezpieczeństwo, że podanie kilku substancji czynnych przy chociażby suplementowaniu diety pacjenta może przynieść

dodatkowe, albo niepożądane skutki. Badania *in vitro* przeprowadzone na linii komórkowej SCC-25 wykazały, że addycja, synergia lub antagonizm berberyny i resweratrolu są trudne do uchwycenia. Niemniej jednak udało się w testach MTT, przy konstruowaniu izobologramów wyznaczyć optymalne dawki obydwu związków, przy których dochodzi do addycji efektów toksycznych wobec komórek nowotworowych SCC-25 i tym samym skutecznie obniżyć dawkę berberyny, przy traktowaniu kombinowanym (**Rys. 11**).



**Rys. 11** Izobologramy dla kombinacji berberyna + resweratrol (A) i wartość IC<sub>50</sub> (B) wyliczona na podstawie matrycy kombinacji stężeń w teście żywotności MTS.

Uzyskane przez mnie wyniki pokazują, że zarówno berberyna jak i resweratrol mają dodatkowe oblicza, w zależności od zastosowanej dawki i kombinacji substancji czynnych. Berberyna działa na SCC-25, jako pro-nekrotyczny czynnik, podczas, gdy resweratrol równolegle wzmacnia w traktowanych komórkach efekt pro-oksydacyjny. Wzmoczona fala wolnych rodników jest na tyle skuteczna, że komórki nowotworowe umierają nagle na drodze nieprogramowanej nekrozy, a nie apoptozy jak wcześniej donoszono. Zatem uzyskałam nową



informację, co do możliwości zastosowania razem, toksycznej berberyny w połączeniu, w tej sytuacji, z pro-oksydacyjnym resveratrolem. **Sugeruje to możliwość projektowania diety dla wspomagania pacjentów leczonych chemioterapią tak, aby uzyskiwać efekty letalne w komórkach nowotworowych poprzez dodawanie do posiłków berberyny i resveratolu w odpowiednich dawkach.** Wyniki uzyskane z badań wstępnych powinny być potwierdzone w dalszych badaniach *in vitro*, na szerszym panelu komórek prawidłowych i nowotworowych spoza obszaru głowy i szyi, a także w przyszłości na modelach zwierzęcych.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W prezentowanym cyklu 6 publikacji wykazałam mój udział w planowaniu, wykonaniu badań, a także w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników. W publikacjach mój wkład polegał głównie na koncepcji zastosowania i testowania potencjalnych leków wobec znanych nowotworów, i chociaż badania wykonane były na modelowych liniach komórkowych prawidłowych (NHDF) i nowotworowych (K562, HCT 116, MCF7/R, Me45, SCC-25) *in vitro*. Uzyskane wyniki znacznie poszerzają wiedzę w zakresie medycyny oksydacyjnej i pokazują mechanizmy związane z powstaniem stresu oksydacyjnego, który ostatecznie prowadzi do śmierci komórkowej, programowanej apoptozy lub nieprogramowanej nekrozy. Komórki nowotworowe, a także macierzyste nowotworowe (CSC), skutecznie mogą mechanizmy produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) modulować, co wcale nie znaczy, że po zastosowaniu wobec nich radio- czy chemioterapii na tyle skutecznie zaburzy w nich równowagę redoks, że zostanie uzyskany w nich efekt letalny. Sygnalizacja międzykomórkowa wykorzystująca RFT i RFA może przynosić w trakcie terapii niepożądane efekty, objawiające się np. rekrutację CSC, migracją i metastazą komórek nowotworowych. Obserwować można też efekty uboczne (uszkodzenia w sąsiadujących komórkach – efekt bystander lub abskopowy w odległych tkankach), gdy terapia nie działa lokalnie. Wykorzystanie terapii fotodynamicznej (PDT) znosi efektywnie toksyczność promieniowania w tkankach zdrowych. Układ fotouczulacz, światło i RFT skutecznie może zabijać komórki nowotworowe skóry na drodze apoptozy indukowanej stresem oksydacyjnym. Podjęłam się także zbadania nośników o potencjale selektywnego działania wobec wybranych linii nowotworowych, co pokazało, że można skutecznie wykorzystywać systemy dostarczania leków DDS do kierowania i uwalniania substancji czynnych w wybranych komórkach nowotworowych, obniżając przy tym toksyczne działanie w tkankach zdrowych. Badania podstawowe molekularnych mechanizmów wnikania nośników, leków i substancji naturalnych pokazują jak złożone mogą one być. Zwłaszcza, jeśli badania koncentrują się na powszechnie stosowanych i znanych już od lat naturalnych substancji, takich jak berberyna czy resveratrol. Ostatecznie celem wykonanych badań było wykazanie jak można optymalizować strategie podawania różnych czynników fizyko-chemicznych, substancji czynnych pochodzenia roślinnego czy leków tak, aby ostatecznie wygenerować w komórkach regulowaną RFT apoptozę. Podsumowując, otrzymane wyniki badań w ramach niniejszego osiągnięcia przedstawionego do oceny, znacznie poszerzyły wiedzę o działaniu biologicznym czynników fizyko-chemicznych i związków o właściwościach przeciwnowotworowych, która może być wykorzystana w projektowaniu terapii z ich zastosowaniem. Uzyskane wyniki wskazują, że substancje i zaproponowane protokoły mogą

być interesującymi do dalszych badań m.in. na zwierzętach, a następnie być może również badań klinicznych. Potencjalnie, w przyszłości wydaje się możliwe zastosowanie uzyskanej wiedzy w terapii zindywidualizowanej, jako integralnej części klasycznej terapii skierowanej przeciwko nowotworom. Uzyskane wyniki skłaniają mnie do kontynuowania badań nad nowymi sposobami aktywacji śmierci komórkowej w nowotworach – w tym ferroptozy, autofagii czy nekroptozy pod wpływem zastosowanych czynników. Precyzyjne wyjaśnienie molekularnych mechanizmów śmierci jest istotne w rozwijaniu nowych strategii przeciwnowotworowych.

Reasumując w cyklu 6 publikacji dokonałam:

**Oceny stresu oksydacyjnego i indukcji śmierci komórkowej (programowanej i nieprogramowanej) w komórkach prawidłowych i nowotworowych pod wpływem fizycznych, chemicznych i naturalnych czynników (promieniowanie jonizacyjne IR, daleka czerwień FR, ftalocyjaniny PDT, fluorescencyjne nośniki leków, resveratrol i berberyna) w warunkach *in vitro*.**

Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

1. scharakteryzowanie molekularnego mechanizmu powstawania stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych i macierzystych komórkach nowotworowych CSC;
2. wyjaśnienie mechanizmu śmierci apoptotycznej w komórkach K562 na drodze mitochondrialnej produkcji RFT i RFA pod wpływem promieniowania jonizującego (IR) i inhibitora DIDS wobec mitochondrialnych kanałów jonowych VDAC;
3. wykazanie pro-apoptotycznego i selektywnego działania ftalocyjanin do zastosowanie w terapii fotodynamicznej (PDT) wobec linii nowotworu skóry Me45;
4. potwierdzenie selektywnego wnikania nośników znakowanych fluorescencyjnie do nowotworowej linii HCT 116 w inteligentnym układzie nośników polimerowych dla dostarczenia leków (DDS);
5. określenie właściwości biologicznych kationowych nośników ko-polimerowych do dostarczania leku DDS i optymalizacji koncentracji leku we wnętrzu komórek nowotworowych HCT 116 i MCF7/R;
6. zbadanie właściwości naturalnych substancji przeciwnowotworowych resveratrolu i berberyny wobec linii nowotworowej SCC-25 i wykazanie ich nowych aktywności w kombinowanym protokole ich podawania, co skutkowało zwiększona produkcja RFT i śmiercią komórkową.

Osiągnięcie składa się z serii 6 publikacji – całkowita wartość wskaźników wynosi odpowiednio:

**Impact Factor = 20,294**

**Punktacja MNiSW: 185**

W trzech publikacjach jestem pierwszym autorem; w jednej trzecim, ale o współudziale równorzędnym z pierwszym; w trzech publikacjach jestem autorem korespondencyjnym; w dwóch publikacjach jestem drugim autorem (odpowiadającym za główne badania biologiczne). Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.



Otrzymane rezultaty opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z listy Journal Citation Reports (Thomson Reuters).

#### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

I A) Poza przedstawionym cyklem 6 publikacji moje zainteresowania i badania pozostają skupione w obszarze badań podstawowych biologii komórki. Główne trendy badawcze obejmują:

- badanie sygnalizacji komórkowej w warunkach stresu oksydacyjnego pod wpływem różnych czynników fizyko-chemicznych w komórkach nowotworowych i macierzystych komórkach nowotworowych:

1. M Widel, A Krzywon, K Gajda, **M Skonieczna**, J Rzeszowska-Wolny (2014). Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 68, 278-287.

Impact Factor: **5.736**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu eksperymentów biologicznych, w tym pomiarów cytometrycznych, analizie uzyskanych wyników i ich biologicznej interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **15%**.

2. RJ Bułdak, R Polaniak, Ł Bułdak, K Żwirska-Korczała, **M Skonieczna**, Aleksandra Monsiol, Michał Kukla, Anna Duława-Bułdak, Ewa Birkner (2012). Short-term exposure to 50 Hz ELF- EMF alters the cisplatin- induced oxidative response in AT478 murine squamous cell carcinoma cells. *Bioelectromagnetics* 33 (8), 641-651.

Impact Factor: **2.021**; Punktacja MNiSW: **25**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części badań biologicznych związanych z określeniem stresu oksydacyjnego w komórkach, analizie wyników i ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

3. Y Saenko, A Cieslar-Pobuda, **M Skonieczna**, J Rzeszowska-Wolny (2013). Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation. *Radiation research* 180 (4), 360-366.

Impact Factor: **3.099**; Punktacja MNiSW: **35**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu eksperymentów, wykonaniu części badań biologicznych związanych z określeniem stresu oksydacyjnego w komórkach, wykonaniu pomiarów cytometrycznych i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **25%**.

4. Artur Cieślak-Pobuda, Jianbo Yue, Hsin-Chen Lee, **Magdalena Skonieczna**, Yau-Huei Wei (2017). ROS and oxidative stress in stem cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.

Impact Factor: **5.061**; Punktacja MNiSW: **35**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu tematu oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

5. A Cieślak-Pobuda, M Rafat, V Knoflach, M Skonieczna, A Hudecki, Andrzej Małecki, Elżbieta Uraśńska, Seaid Ghavami, Marek J Łos (2016). Human induced pluripotent stem cell differentiation and direct transdifferentiation into corneal epithelial-like cells. *Oncotarget* 7 (27), 42314.

Impact Factor: **5.168**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **5%**.

6 R Jaksik, A Lalik, **M Skonieczna**, A Cieslar-Pobuda, S Student, Joanna Rzeszowska-Wolny (2104). MicroRNAs and reactive oxygen species: are they in the same regulatory circuit? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 764, 64-71

Impact Factor: **2.415**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów biologicznych, wykonaniu pomiarów cytometrycznych i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

7. Rafał J Bułdak, Renata Polaniak, Michał Kukla, Robert Kubina, **Magdalena Skonieczna**, Magdalena Bułdak, Dominika Stygar, Tomasz Sawczyn, Marcin Gowarzewski, Krystyna Żwirski-Korzala (2011). Wpływ karboplatyny na aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px), reduktazy glutationu (GR) oraz stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w mediach hodowlanych ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45 in vitro. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, Tom 3, Wydanie 65, Strony 7–15.

Impact Factor: **0**; Punktacja MNiSW: **4**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych związanych ze stresem oksydacyjnym, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

8. A. Krzywón, M Widel, K Fajarewicz, **M Skonieczna**, J Rzeszowska-Wolny (2018). Modulation by neighboring cells of the responses and fate of melanoma cells irradiated with UVA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 178, 505-511.

Impact Factor: **3.165**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, wykonaniu pomiarów cytometrycznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

- badanie stresu oksydacyjnego i śmierci komórkowej pod wpływem czynników pochodzenia naturalnego (hormony, witaminy) oraz ocena ich roli w komórkach i procesach komórkowych:

9. RJ Buldak, R Polaniak, L Buldak, L Mielanczyk, M Kukła, **M Skonieczna**, A Dulawa-Buldak, N Matysiak, K Zwirska-Korczała (2013). Exogenous administration of visfatin affects cytokine secretion and increases oxidative stress in human malignant melanoma Me45 cells. *J Physiol Pharmacol* 64 (3), 377-85. Impact Factor: **2.478**; Punktacja MNiSW: **25**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu eksperymentów, wykonaniu części badań biologicznych związanych z określeniem stresu oksydacyjnego w komórkach, i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **15%**.

10. RJ Buldak, M Gowarzewski, L Buldak, **M Skonieczna**, M Kukła, R Polaniak, K Zwirska-Korczała (2015). Viability and oxidative response of human colorectal HCT-116 cancer cells treated with visfatin/eNamt in vitro. *J Physiol Pharmacol* 66 (4), 557-66.

Impact Factor: **2.804**; Punktacja MNiSW: **25**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu eksperymentów, wykonaniu części badań biologicznych związanych z określeniem stresu oksydacyjnego w komórkach, wykonaniu pomiarów cytometrycznych i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

11. RJ Bułdak, **M Skonieczna**, N Matysiak Bułdak, G Wyrobiec Mielanczyk, M Kukła, M Michalski, K Żwirski-Korczała (2014). Changes in subcellular localization of visfatin in human colorectal HCT-116 carcinoma cell line after cytochalasin-B treatment. *European Journal of Histochemistry: EJH* 58 (3).

Impact Factor: **2.042**; Punktacja MNiSW: **15**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu wstępnych pomiarów cytometrycznych, przygotowaniu materiału do oznaczeń mikroskopowych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

12. M Foksinski, E Zarakowska, D Gackowski, **M Skonieczna**, K Gajda, D Hudy, A Szpila, K Bialkowski, M Starczak, A Labejszo, J Czyz, J Rzeszowska-Wolny, R Olinski (2017). Profiles of a broad spectrum of epigenetic DNA modifications in normal and malignant human cell lines: Proliferation rate is not the major factor responsible for the for the 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine level in cultured cancerous cell lines. *PloS one* 12 (11), e0188856.

Impact Factor: **2.766**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, przygotowaniu materiału do oznaczeń ekspresji genów, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

13. M Modrzejewska, M Gawronski, **M Skonieczna**, E Zarakowska, Marta Starczak, Marek Foksinski, Joanna Rzeszowska-Wolny, Daniel Gackowski, Ryszard Olinski (2016). Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 101, 378-383.

Impact Factor: **5.606**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu wstępnych pomiarów cytometrycznych, przygotowaniu materiału do oznaczeń, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

14. D Stygar, T Sawczyn, B Skrzep-Poloczek, J Poloczek, M Kłosok, I Karcz-Socha, JM Fink, **M Skonieczna**, M Elsner, B Doleżych, K Żwirska-Korczala, W Konrad Karcz (2015). Metabolic surgery in Zucker rats influenced miRNA, caveolin-1 expression and lipid metabolism. *Open Life Sciences*, 2015; 10: 451–460, DOI: 10.1515/biol-2015-0047.

Impact Factor: **0.814**; Punktacja MNiSW: **15**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych związanych z ekspresją miRNA i genów targetowych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

15. **Magdalena Skonieczna**, Dorota Hudy, Patryk Bil, Malgorzata Adamiec, Marta Stachowska, Krzysztof Biernacki. Role of let-7 family miRNAs in migration of colorectal cancer HCT 116 and Caco-2 cells after stimulation by the adipokine vaspin. Time-lapse live-cell microscopic observations. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*

Artykuł po recenzji - w oczekiwaniu na końcową decyzję Edytora.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie publikacji, jestem autorem korespondencyjnym.

Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

16. **Magdalena Skonieczna**, Dorota Hudy; Tomasz Hejmo; Rafal J Buldak; Malgorzata Adamiec; Michal Kukla. The adipokine vaspin reduces apoptosis in human hepatocellular carcinoma (Hep-3B) cells, associated with lower levels of NO and superoxide anion. *BMC Pharmacology and Toxicology*.

Artykuł po recenzji - w oczekiwaniu na końcową decyzję Edytora.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie publikacji, jestem autorem korespondencyjnym.

Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

17. **Magdalena Skonieczna**, Malgorzata Adamiec, Dorota Hudy, Patrycja Nieslon, Daniel Fochtman, Patryk Bil. Live cell impedance measurements and time-lapse microscopy observations for ionizing radiation stimulated cellular proliferation, adhesion and migration. *Advances in Intelligent Systems and Computing*.

Artykuł w recenzji - w oczekiwaniu na końcową decyzję Edytora.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie publikacji, jestem autorem korespondencyjnym.

Mój udział procentowy szacuję na **70%**.

- badanie nowych nanocząsteczek i związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym oraz ocena ich roli w komórkach i procesach komórkowych:

18. A Mielanczyk, **M Skonieczna**, Ł Mielanczyk, D Neugebauer (2016). In vitro evaluation of doxorubicin conjugates based on sugar core nonlinear polymethacrylates toward anticancer drug delivery. *Bioconjugate chemistry* 27 (4), 893-904.

Impact Factor: **4.818**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów biologicznych, wykonaniu pomiarów cytometrycznych i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

19. A. Dziedzic, R. Kubina, R. J. Bułdak, Magdalena Skonieczna, K. Cholewa. Silver nanoparticles exhibit the dose-dependent anti-proliferative effect against human squamous carcinoma cells attenuated in the presence of berberie. *Molecules* 2016 vol. 21 iss. 3, art. no. 365 s. 1-17.

Impact Factor: **2.861**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych, pomiarów cytometrycznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

20. K Czerwińska, M Golec, **M Skonieczna**, J Palion-Gazda, D Zygadło, A Szłapa-Kula, S Krompiec, B Machura, A Szurko (2017). Cytotoxic gold (iii) complexes incorporating a 2, 2': 6', 2''-terpyridine ligand framework—the impact of the substituent in the 4'-position of a terpy ring. *Dalton Transactions* 46 (10), 3381-3392.

Impact Factor: **4.099**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu wstępnych pomiarów cytometrycznych, przygotowaniu materiału do dalszych oznaczeń, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

21. S Boncel, A Pluta, **M Skonieczna**, A Gondela, B Maciejewska, AP Herman, RG Jędrzyak, S Budniok, K Komędera, A Błachowski, KZ Walczak (2017). Hybrids of Iron-Filled Multiwall Carbon Nanotubes and Anticancer Agents as Potential Magnetic Drug Delivery Systems: In Vitro Studies against Human Melanoma, Colon Carcinoma and Colon Adenocarcinoma. *Journal of Nanomaterials* 2017 Volume 2017, Article ID 1262309, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/1262309>.

Impact Factor: **2.207**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu pomiarów cytometrycznych, cytotoksyczności i mikroskopowych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

22. M Krawczyk, G Pastuch-Gawolek, A Mrozek-Wilczkiewicz, M Kuczak, **M Skonieczna**, R Musiol (2019). Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their  $\beta$ 1, 4-GalT inhibitory and anti-cancer properties. *Bioorganic chemistry* 84, 326-338.

Impact Factor: **3.929**; Punktacja MNiSW: **25**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu przebiegu eksperymentów biologicznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

23. A Byczek-Wyrostek, R Kitel, K Rumak, **M Skonieczna**, A Kasprzycka, K Walczak (2018). Simple 2 (5H)-furanone derivatives with selective cytotoxicity towards non-small cell lung cancer cell line A549–Synthesis, structure-activity relationship and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry* 150, 687-697.

Impact Factor: **4.816**; Punktacja MNiSW: **40**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu przebiegu części eksperymentów biologicznych, pomiarów cytometrycznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

24. R Bielas, A Siewniak, **M Skonieczna**, M Adamiec, Ł Mielańczyk, D Neugebauer (2019). Choline based polymethacrylate matrix with pharmaceutical cations as co-delivery system for antibacterial and anti-inflammatory combined therapy. *Journal of Molecular Liquids*, Available online 16 April 2019, In Press, Accepted Manuscript, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.082>.

Impact Factor: **4.513**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, pomiarów cytotoksyczności i ekspresji genów, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

- badanie bio-kompatybilności nowych materiałów inżynierskich do potencjalnego zastosowania w medycynie regeneracyjnej i implementacji oraz ocena ich wpływu na procesy komórkowe:

25. A Hudecki, J Gola, S Ghavami, **M Skonieczna**, J Markowski, W Likus, M Lewandowska, W Maziarz, M J Los (2017). Structure and properties of slow-resorbing nanofibers obtained by (co-axial) electrospinning as tissue scaffolds in regenerative medicine. PeerJ 5, e4125.

Impact Factor: **2.118**; Punktacja MNiSW: **35**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, hodowli komórkowej i wykonaniu oznaczeń cytotoksyczności, przygotowaniu materiału do dalszych oznaczeń mikroskopowych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

26. M Mrówka, T Machoczek, P Jureczko, M Szymiczek, **M Skonieczna**, Ł Marcoll (2019). Study of selected physical, chemical and biological properties of selected materials intended for contact with human body. Polish Journal of Chemical Technology, 21, 1, 1—8, 10.2478/pjct-2019-0001.

Impact Factor: **0.550**; Punktacja MNiSW: **15**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, pomiarów cytotoksyczności, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **10%**.

27. A Hudecki, D Łyko-Morawska, W Likus, **M Skonieczna**, J Markowski, R Wilk, A Kolano-Burian, W Maziarz, J Adamska, M Łos (2019).. Composite Nanofibers Containing Multiwall Carbon Nanotubes as Biodegradable Membranes in Reconstructive Medicine. Nanomaterials 9 (1), 63.

Impact Factor: **2.207**; Punktacja MNiSW: **30**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, pomiarów cytotoksyczności, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji, a także poprawie manuskryptu, tabel i figur po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

- ocena oddziaływań czynników egzogennych na organizmy i badania biologiczne z zastosowaniem modelowych bioindykatorów środowiskowych:

28. K Widziewicz, J Kalka, **M Skonieczna**, P Madej (2012). The comet assay for the evaluation of genotoxic potential of landfill leachate. The Scientific World Journal 2012.

Impact Factor: **1.730**; Punktacja MNiSW: **35**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów biologicznych na organizmach indykatorowych i komórkach eukariotycznych, wykonaniu części eksperymentów i analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

29. Krzysztof Rajczykowski, Dorota Marciocha, **Magdalena Skonieczna** (2016). The impact of gasification wastewater on soil microorganisms and the growth of oat and red clover. Environmental Progress & Sustainable Energy. Tom 35. Wydanie 1. Strony 56-59.

Impact Factor: **1.672**; Punktacja MNiSW: **25**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów biologicznych, pomiarów cytometrycznych, analizie wyników, ich interpretacji oraz merytorycznym opisie części publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **20%**.

Sumaryczna punktacja dla przedstawianych publikacji poza cyklem wynosi:

Impact Factor: **65,61**

Punktacja MNiSW: **749**

W przedstawianych publikacjach zazwyczaj jestem wykonawcą badań biologicznych, ich planowanie, wykonanie oraz analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także współautorem przygotowywanych manuskryptów w części biologicznej. Wymienione prace powstały po uzyskaniu przez mnie stopnia doktora nauk biologicznych. Wykaz nie obejmuje wszystkich publikacji wchodzących w ocenę bibliometryczną za lata 2006-2019, ponieważ pominęłam publikacje niezwiązane za zakresem moich bieżących zainteresowań oraz będące poza przedstawianym we wniosku zakresem tematycznym.

B) Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe

1. Twórca/twórcy, rok udzielenia patentu, tytuł patentu, zakres terytorialny ochrony patentowej (np. Polska, Unia Europejska, USA, itp.), nazwa urzędu udzielającego patent

**Brak**

C) Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach

1. Autor/autorzy, daty uzyskania ochrony lub wystawienia, tytuł, nazwa i miejsce odbycia wystawy lub targów.

**Brak**

D) Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt II A:



1. **M Skonieczna**, D Hudy (2018). Biological Activity of Silver Nanoparticles and Their Applications in Anticancer Therapy. Silver Nanoparticles-Fabrication, Characterization and Applications. IntechOpen.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na koncepcyjnym ujęciu tematu i napisaniu publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na **90%** (**jestem pomysłodawcą i autorem korespondencyjnym**).

E) Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych:

1. Special Issue: ROS and Oxidative Stress in Stem Cells

Lead Guest Editor: Artur Cieślak-Pobuda

Guest Editors: Jianbo Yue, Hsin-chen Lee, **Magdalena Skonieczna**, and Yau-Huei Wei

In Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Hindawi 2017

F) Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **120.135**.

G) Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): **231**.

H) Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **9**.

I) Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach:

1. Rola w projekcie: wykonawca

Tytuł: Selectively degradable polymeric nanoparticles for transdermal transport

ID projektu: DEC-2016/23/D/ST5/01312

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki

Kwota finansowania: 508 150,00 PLN

Instytucja: Politechnika Śląska

Początek: 2017-08-01 Koniec: projekt w trakcie

2. Rola w projekcie: wykonawca

Tytuł: Modeling and experimental studies to understand the effects of irradiation on RNA interference.

ID projektu: Opus UMO-2015/19/B/ST7/02984

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki

Kwota finansowania: 899 700,00 PLN

Instytucja: Politechnika Śląska

Początek: 2016-07-13 Koniec: projekt w trakcie

Lista najważniejszych publikacji:

**Skonieczna M**, Cieślak-Pobuda A, Saenko Y, Foksiński M, Oliński R, Rzeszowska-Wolny J, Wiechec E. The impact of DIDS-induced inhibition of voltage-dependent anion channels

(VDAC) on cellular response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Med Chem.* 2017 Apr 21. doi:10.2174/1573406413666170421102353;

### 3. Rola w projekcie: wykonawca

Tytuł: A search for a link between epigenetical changes - active DNA demethylation and oxidative stress based on cell culture studiem.

ID projektu: DEC-2012/07/B/NZ1/00008

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki

Kwota finansowania: 684 575,00 PLN

Instytucja: Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Początek: 2013-07-09 Koniec: 2016-12-08

Lista najważniejszych publikacji:

**Skonieczna, Magdalena;** Hejmo, Tomasz; Poterala-Hejmo, Aleksandra et al. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2017 (2017), Article ID 9420539, doi:10.1155/2017/9420539;

**Skonieczna M,** Ciešlar-Pobuda A, Saenko Y, Foksiński M, Oliński R, Rzeszowska-Wolny J, Wiechec E. The impact of DIDS-induced inhibition of voltage-dependent anion channels (VDAC) on cellular response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Med Chem.* 2017 Apr 21. doi:10.2174/1573406413666170421102353;

Modrzejewska, Martyna; Gawronski, Maciej; **Skonieczna, Magdalena** et al. Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 2016 Dec;101:378-383. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.535;

### 4. Rola w projekcie: wykonawca

Tytuł: Research on synthesis of new polymeric carriers containing sugar derivatives in the core

ID projektu: DEC-2012/07/N/ST5/01875

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki

Kwota finansowania: 74 500,00 PLN

Instytucja: Politechnika Śląska

Początek: 2013-01-08 Koniec: 2015-01-31

Lista najważniejszych publikacji:

Mielanczyk, Anna; **Skonieczna, Magdalena;** Neugebauer, Dorota, Cellular response to star-shaped polyacids. Solution behavior and conjugation advantages. *Toxicol Lett.* 2017 May 15;274:42-50. doi:10.1016/j.toxlet.2017.03.022;

Mielanczyk, A.; **Skonieczna, M.;** Mielanczyk, L.; Neugebauer, D. In Vitro Evaluation of Doxorubicin Conjugates Based on Sugar Core Nonlinear Polymethacrylates toward Anticancer Drug Delivery. *Bioconjug Chem.* 2016 Apr 20;27(4):893-904. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00671;

Mielanczyk A, **Skonieczna M,** Bernaczek K, Neugebauer D: Fluorescein nanocarriers based on cationic star copolymers with acetal linked sugar cores. *Synthesis and biochemical characterization.* *Rsc Advances*, 2014, 4(60), p. 31904–31913;

## 5. Grant habilitacyjny Rektora Politechniki Śląskiej

ID projektu: No. 02/010/RGH17/0092;

Kwota: 15 000 PLN;

Początek: 2017-10-01; Koniec: w trakcie

Lista najważniejszych publikacji:

**Magdalena Skonieczna**, Dorota Hudy, Aleksandra Poterala-Hejmo, Tomasz Hejmo, Rafal J. Buldak, Arkadiusz Dziedzic. Effects of Resveratrol, Berberine, and Their Combinations on Reactive Oxygen Species, Survival, and Apoptosis in Human Squamous Carcinoma (SCC-25) Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* DOI : 10.2174/1871520619666190405111151.

(praca przyjęta do publikacji).

J) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną:

**2011 r.** "Awards for Young Investigators" from Japanis Physiological Society J. Bułdak, R. Polaniak, **M. Skonieczna**, A. Monsiol, E. Birkner, M. Kukla, K. Żwirska-Korczała The influence of cisplatin combined with extremely lowfrequency electromagnetic field (ELF-EMF) on antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in megacolonies of squamous cell carcinoma. 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB 2011) in Nagoya, Japan.

**2017 r.** nagroda III stopnia Rektora Politechniki Śląskiej za indywidualne osiągnięcia naukowe;

**2012, 2013; 2014; 2015; 2016; 2017** – nagroda I stopnia Rektora Politechniki Śląskiej za zespołowe osiągnięcia naukowe;

**2014; 2015; 2016; 2017** – nagroda I stopnia Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego za zespołowe osiągnięcia naukowe;

K) Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

1. **Magdalena Skonieczna**, Artur Cieślak-Pobuda, Y. Saenko, Joanna Rzeszowska-Wolny. Inhibition of voltage-dependent anion channels and their influence on cell functioning. XIXth Gliwice Scientific Meetings 2015, Gliwice, November 20-21, 2015 s. 47.

2. Skonieczna M, Cieslar-Pobuda A, Ochab M, Buldak R, Rzeszowska-Wolny J: Nitric oxide in control and irradiated K562 cells. *Acta Biochimica Polonica*, **2013**, p. 68 XLVIII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO TORUŃ, 2–5 WRZEŚNIA 2013 R.

II. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta

A) Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych:

1. POWR.03.01.00-IP.08-00-SP2/17

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

od: 2018-03-01 do: 2019-09-30

Wspieranie konkurencyjności absolwentów kierunku Biotechnologia na rynku pracy poprzez wysokiej jakości staże zawodowe – BIOSTART

**koordynator wydziałowy** na kierunku Biotechnologia z ramienia AEiI Politechniki Śląskiej.

B) Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:

1. Krzysztof Rajczykowski, Dorota Marciocha, **Magdalena Skonieczna**. Impact of wastewater generated during gasification processes on the chlorophyll concentration and the overall condition of oat and red clover. Sbornik z III. Workshpu Młodych vedeckovyzkumnych pracovníku VSB-TUO, 20. března 2014. Hornicko-geologická fakulta, Fakulta metalurgie a materialového inženýrství, Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Ostrava : VSB - Technical University of Ostrava, 2014, dysk optyczny (CD-ROM) s. 25-32, bibliogr. 10 poz.

2. Aleksandra Krzywoń, Maria Wideł, **Magdalena Skonieczna**, Joanna Rzeszowska-Wolny. DNA damage induced by UVC radiation and bystander signals in cancer and normal cells. W: 6th DNA Repair Workshop, Smolenice Castle, Slovak Republic, June 3-7, 2012. Abstrakt book. 2012, s. 49

3. Sławomir Boncel, Andrzej Gondela, K. Muller, J. Skepper, **M. Skonieczna**, M. Łakota, Artur Herman, A. Kubica, Julita Mrowiec-Białoń, G. Łabojko, Sebastian Budniok, K. Koziół, Krzysztof Walczak. Magnetically controlled hybrids of novel cytostatics and multi-wall carbon nanotubes. Interfacing chemical biology and drug discovery. RICT 2012. 48th International Conference on Medicinal Chemistry, Poitiers, France, July 4-6, 2012. s. 120, bibliogr. 4 poz.

4. **Magdalena Skonieczna**, Artur Cieślak-Pobuda, Aleksandra Krzywoń, Krzysztof Biernacki, Dorota Hudy, Sebastian Student, Maria Wideł Reactive oxygen and nitrogen species mediate DNA damage in irradiation exposed and non-exposed bystander cells. 6th DNA Repair Workshop, Smolenice Castle, Slovak Republic, June 3-7, 2012. Abstrakt book. 2012, s. 35

5. R. Bułdak, R. Polaniak, M. Górzewski, **Magdalena Skonieczna**, A. Monsiol, E. Birkner, M. Kukła, K. Żwirska-Korczala. The influence of cisplatin combined with extremely low-frequency electromagnetic field on antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in megacolonies of squamous cell carcinoma. : ICCPB 2011, Nagoya, May 31 - June 5, 2011. Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry : Fukuoka, 2011, s. 162 (Comparative Physiology and Biochemistry ; vol. 28, suppl. 0916-3786)

6. K. Żwirska-Korczala, T. Brzozowski, M. Kukła, R. Bułdak, D. Stygar, T. Sawczyn, **Magdalena Skonieczna**, S. Konsturek. Mechanisms of obesity-related diabetes-2 and metabolic syndrome as related to the brain-viscera axis. 5th Symposium on Brain-Viscera Axis. Basic and clinical aspects, Cracow, Poland, September 25th. Abstracts book. Smithtown

: International Scientific Literature, 2010, s. SP32-SP33 (Medical Science Monitor ; vol. 16, suppl. 2 1234-1010)

7. Joanna Rzeszowska, J. Łanuszewska, A. Gdowicz, **Magdalena Skonieczna**, Roman Jaksik. Can blood cells be important in bystander effects?. Bystander effects in lymphoblastoid cells. XIIIth Gliwice Scientific Meetings 2009, Gliwice, November 20-21, 2009, (plik pdf) s. 49 [http://gsn.io.gliwice.pl/materials/GSN\\_2009.pdf](http://gsn.io.gliwice.pl/materials/GSN_2009.pdf)

8. R. Bułdak, R. Polaniak, **Magdalena Skonieczna**, K. Żwirska-Korczala, E. Birkner, T. Sawczyn, M. Kukla. In vitro study of the effects of different doses of visfatin on antioxidant enzymes activities with oxidative DNA damage relation in human melanoma Me45 media cells. The renaissance of environmental mutagenesis. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM). 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA), Firenze, Italy, August 20-25, 2009. Scientific program and abstract book, 2009, s. 174

#### Podsumowanie: konferencje zagraniczne

	łączna liczba prac	liczba prac kraj.	liczba prac zagr.	liczba prac z IF	liczba prac kraj. z IF	łączna wartość IF	łączna wartość IF kraj.
<b>ogółem</b>	8	0	8	0	0	0	0
<a href="#">komunikat konferencyjny</a>	7	0	7	0	0	0	0
<a href="#">referat konferencyjny</a>	1	0	1	0	0	0	0

#### Podsumowanie: konferencje krajowe\*

	łączna liczba prac	liczba prac kraj.	liczba prac zagr.	liczba prac z IF	liczba prac kraj. z IF	łączna wartość IF	łączna wartość IF kraj.
<b>ogółem</b>	64	64	0	7	7	5.221	5.221
<a href="#">komunikat konferencyjny</a>	57	57	0	7	7	5.221	5.221
<a href="#">referat konferencyjny</a>	7	7	0	0	0	0.000	0.0

\*Wykaz w załączniku III B

C) Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych:

1. Gliwice Scientific Meetings, konferencja międzynarodowa, cyklicznie co roku w Gliwicach,  
od 2007 roku – obecnie, **członek komitetu organizacyjnego;**
2. Śląskie Spotkania Naukowe, konferencja krajowa, cyklicznie co roku na Śląsku  
od 2014 roku – obecnie, **członek komitetu organizacyjnego;**

D) Otrzymane nagrody i wyróżnienia inne niż wymienione w pkt II J

**Brak**

E) Udział w konsorcjach i sieciach badawczych

1. Nazwa konsorcjum lub sieci, nazwa organu finansującego działalność konsorcjum lub sieci, okres trwania, tytuł projektu (jeśli dotyczy), charakter uczestnictwa habilitanta

**Brak**

F) Kierowanie projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych oraz we współpracy z przedsiębiorcami, innymi niż wymienione w pkt II - I

**Brak**

G) Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

**Brak**

H) Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych:

- 2017 – obecnie; członek z wyboru: Polskie Towarzystwo Badań Radiacyjnych (PTBR);  
2010 – obecnie; członek z wyboru European Association for Cancer Research;  
2010 – obecnie; członek zarządu: Stowarzyszenie na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem;  
2009 – obecnie; członek z wyboru: Polskie Towarzystwo Fizjologiczne;

I) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki:

1. Wykład zapraszany: „DNA księga Życia” – Bakcyl Politechnika Śląska; czerwiec 2016;
2. Wymiana Akademicka: Kazachstan Almaty; grudzień 2011 „Molecular Biology”;

J) Opieka naukowa nad studentami i lekarzami w toku specjalizacji:

Od roku 2007 byłam promotorem ponad 80 praktycznych prac dyplomowych inżynierskich i magisterskich studentów Politechniki Śląskiej w Gliwicach, w ramach międzywydziałowego kierunku Biotechnologia i Biotechnologia Medyczna (kierunek zamawiany).

Wykaz dostępny w bibliotece Politechniki Śląskiej:

<https://www.polsl.pl/Jednostki/RJO1-BG/Strony/witamy.aspx>

K) Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego:

1. dr inż. Aleksandra Krzywoń: 2014 – 2016; Politechnika Śląska w Gliwicach, „Rola sygnalizacji międzykomórkowej w odpowiedzi na promieniowanie ultrafioletowe.” Rozprawa doktorska - **promotor pomocniczy**;
2. mgr Daria Witkowska: 2017 - w trakcie; Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach „Wpływ wisfatyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz apoptozę ludzkich komórek raka okrężnicy linii CACO-2 *in vitro*.”- **promotor pomocniczy**;
3. mgr inż. Łukasz Mielańczyk: 2017 - w trakcie; Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. „Ocena aktywności biologicznej pH-czułych gwiazdzistych polimerów jako potencjalnych nośników leków”. - **promotor pomocniczy**;
4. mgr inż. Tomasz Hejmo: 2016 - w trakcie, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach – **opiekun naukowy**;
5. mgr inż. Małgorzata Adamiec: 2018 - w trakcie, Politechnika Śląska w Gliwicach – **opiekun naukowy**;

L) Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich:

1. Uniwersytet w Linkoping, Szwecja, 27-31 lipiec 2015; IGEN Summer-school in practical cytometry, part-I – szkolenie w zakresie cystometrii obrazowej i przepływowej;
2. Algarve, Portugalia, 12-16 października 2015; EurocanPlatform Summer School 2015, szkolenie z genomiki;
3. Varlose University Nicea, Francja, sierpień-wrzesień 2013, FUCCI cell cycle progression system training, szkolenie cytologiczne;
4. Centre de Recherche de L’Hôtel-Dieu, Centre Hospitalier Laval University, Quebec Kanada, lipiec-wrzesień 2011 – staż podoktorski i szkolenie w zakresie badań nad miRNA;
5. Uniwersytet im M. Kopernika w Bydgoszczy, czerwiec 2009 "A biological meaning of oxidatively damaged DNA"; szkolenie w zakresie markerów stresu oksydacyjnego;
6. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 9-12 lipiec 2007 r.; Microarray Workshop, szkolenie w zakresie badań ekspresji genów;
7. Instytut Onkologii w Gliwicach, grudzień 2006 - styczeń 2007: staż doktorski i szkolenie w zakresie cystometrii przepływowej;

M) Wykonane ekspertyzy lub inne opracowania na zamówienie

**Brak**

N) Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

**Brak**

O) Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych

**Brak**

P) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych:

1. Polimery w Medycynie (2014) - 2 recenzje;
2. Hepatitis (2014) – 1 recenzja;
3. Advances in Microbiology (2016) – 1 recenzja;
4. Environmental Progress & Sustainable Energy (2015) – 1 recenzja;
5. Environmental Progress & Sustainable Energy (2016) – 1 recenzja;
6. International Journal of Nanomedicine (2017) – 1 recenzja;
7. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology (2018) -1 recenzja;
8. OncoTargets and Therapy (2018) – 1 recenzja;
9. Plant Physiology and Biochemistry (2018) – 1 recenzja;
10. Cellular Physiology and Biochemistry (2018) – 1 recenzja;
11. Wydawnictwo Tygiel (2018) – 4 recenzje;
12. Journal of Food Science & Technology (2018) – 1 recenzja;
13. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology (2019) – 1 recenzja.
14. International Journal of Nanomedicine (2019) – 1 recenzja;
15. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (2019) – 1 recenzja;
16. ACS Biomaterials Science & Engineering (2019) – 1 recenzja;

Q) Inne osiągnięcia, niewymienione w pkt II A – II P

**Członek międzywydziałowej komisji dydaktycznej (od 30.08.2013) ds. kierunku Biotechnologia Politechniki Śląskiej.**

*Magdalena Skonieczna  
Glinice, 29.04.2020*