



Autoreferat

„Kompleksowanie jonów metali w terapii
antynowotworowej”

Anna Mrozek-Wilczkiewicz

Instytut Fizyki
Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań
Interdyscyplinarnych
Uniwersytet Śląski

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Dyplom **magistra nauk chemicznych** nadany przez Uniwersytet Śląski, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Instytut Chemii w dniu 19.06.2009 r. w Katowicach.

Tytuł pracy magisterskiej: „Synteza i badanie aktywności antyproliferacyjnej pochodnych chinazoliny.”

Dyplom **doktora nauk fizycznych** nadany przez Uniwersytet Śląski, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Instytut Fizyki w dniu 14.10.2013 r. w Katowicach

Tytuł pracy doktorskiej: „Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii przeciwnowotworowych.”

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

listopad 2013 – październik 2014 Asystent w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Śląskiego

listopad 2014 – obecnie Adiunkt w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Śląskiego

3. 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. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

„Kompleksowanie jonów metali w terapii antynowotworowej”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy).

H1. R. Musiol, A. Mrozek-Wilczkiewicz, J. Polanski, 2014, “Synergy against fungal pathogens: Working together is better than working alone”, Curr. Med. Chem., 21(7), 870-893. doi: 10.2174/0929867321666131218094848.

IF₂₀₁₄ = 3,853, MNiSW = 35 pkt.

Mój wkład w powstanie tej przeglądowej pracy polegał na krytycznej analizie oraz opisie dostępnych metod walidacji zjawiska synergii w ujęciu testów przeciwgrzybiczych oraz

stosowanych leków przeciwgrzybiczych, napisaniu rozdziału dotyczącego badań klinicznych oraz edycji końcowej wersji tekstu. Mój wkład polegał również na kierowaniu projektem naukowym (N405/ 068440) obejmującym badania opisane w tej pracy.

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

H2. A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, R. Musiol, G. Malecki, A. Szurko, A. Muchowicz, J. Golab, A. Ratuszna, J. Polanski, 2014, „Iron Chelators in Photodynamic Therapy Revisited: Synergistic Effect by Novel Highly Active Thiosemicarbazones”, ACS Med. Chem. Lett, 5, 336-339. doi: 10.1021/ml400422a.

IF₂₀₁₄ = 3,120, MNiSW = 30 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji oraz zaplanowaniu, wykonaniu, interpretacji i opisie następujących doświadczeń:

- cytotoksyczność na liniach komórkowych HCT 116 p53^{+/+}, HCT 116 p53^{-/-}, NHDF
- pomiary kinetyczne powstawania protoporfiryny IX
- wpływ badanych związków na powstawanie PpIX
- pomiar rodzaju oddziaływania badanych połączeń (badanie synergii)
- pomiar reaktywnych form tlenu

Ponadto mój udział polegał na napisaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz kierowaniu projektem naukowym (N405/ 068440) obejmującym badania opisane w tej pracy.

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

H3. A. Mrozek-Wilczkiewicz, E. Spaczynska, K. Malarz, W. Cieslik, M. Rams-Baron, V. Kryštof, R. Musiol, 2015, „Design, Synthesis and In Vitro Activity of Anticancer Styrylquinolines. The p53 Independent Mechanism of Action”, PLOS One 10(11), e0142678. doi: 10.1371/journal.pone.0142678.

IF₂₀₁₅ = 3,057, MNiSW = 40 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu głównej hipotezy, zaplanowaniu doświadczeń dotyczących części biologicznej oraz analizie uzyskanych danych. Ponadto mój udział polegał na napisaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz kierowaniu projektem naukowym (2014/13/D/NZ7/00322) obejmującym badania opisane w tej pracy.

Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

H4. A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, M. Rams-Baron, M. Serda, D. Bauer, F.-P. Montforts, A. Ratuszna, T. Burley, J. Polanski, R. Musiol, **2017**, „Iron Chelators and Exogenic Photosensitizers. Synergy through Oxidative Stress Gene Expression”, *J. Cancer*, 8, 1979-87. doi: 10.7150/jca.17959.

IF₂₀₁₇ = 3,249, MNiSW = 30 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu głównej hipotezy badawczej, zaplanowaniu doświadczeń i analizie wyników dotyczących części biologicznej oraz wykonaniu eksperymentów dotyczących synergii. Ponadto mój udział polegał na napisaniu końcowej wersji manuskryptu oraz kierowaniu projektem naukowym (2014/13/D/NZ7/00322) obejmującym badania opisane w tej pracy.

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

H5. M. Rejmund, A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, M. Pyrkoż-Bulska, K. Gajcy, M. Sajewicz, R. Musiol and J. Polanski, **2018**, „Piperazynyl fragment improves anticancer activity of Triapine” *PLOS One*, 13(4), e0188767. doi: 10.1371/journal.pone.0188767.

IF₂₀₁₇ = 2,766, MNiSW = 35 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, analizie i opisie eksperymentów związanych z cytotoksycznością, hamowaniem cyklu komórkowego oraz indukcją apoptozy. Testy te wykonywała mgr Malarz, nad którą sprawowałam opiekę naukową jako promotor pomocniczy odpowiedzialny za część biologiczną. Ponadto zaplanowałam, wykonałam i opisałam analizę Western Blot. Dodatkowo mój udział polegał na kierowaniu projektem naukowym (2014/13/D/NZ7/00322) obejmującym badania opisane w tej pracy.

Mój udział procentowy szacuję na **50%**.

H6. K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, M. Rejmund, J. Polanski, and R. Musiol, **2018**, “The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones”, *Oncotarget* 9(25), 17689-17710. doi: 10.18632/oncotarget.24844.

IF₂₀₁₇ = 5,168, MNiSW = 35 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, analizie i opisie wszystkich testów dotyczących części biologicznej. Część z nich wykonała mgr Malarz, nad którą sprawowałam opiekę naukową jako promotor pomocniczy odpowiedzialny za część

biologiczną. Ponadto wykonałam testy określające hamowanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy oraz analizę Western Blot. Dodatkowo mój udział polegał na kierowaniu projektem naukowym (2014/13/D/NZ7/00322) obejmującym badania opisane w tej pracy.

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

H7. A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, M. Rejmund, J. Polanski, R. Musiol, 2019, “Anticancer activity of the thiosemicarbazones that are based on di-2-pyridine ketone and quinoline moiety”, Eur. J. Med. Chem., 171C, 180-194. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.03.027.

IF₂₀₁₇ = 4,816, MNiSW = 40 pkt.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu głównej hipotezy, zaplanowaniu doświadczeń dotyczących części biologicznej oraz analizie uzyskanych danych. Ponadto mój udział polegał na wykonaniu analizy Western Blot, eksperymentów związanych z indukcją apoptozy, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz kierowaniu projektem naukowym (2014/13/D/NZ7/00322) obejmującym badania opisane w tej pracy.

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

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

Głównym celem naukowym moich badań jest zastosowanie związków z grupy chinolin, tiosemikarbazonów, porfiryn, chloryn i innych jako potencjalnych leków w terapii antynowotworowej. Cechą wspólną wszystkich tych pochodnych jest tworzenie kompleksów z jonami metali. Gospodarka metali jest ściśle regulowana przez szereg czynników, dlatego jej zaburzenie w istotny sposób wpływa na odpowiedź komórkową. Związanie jonów metali powoduje zaburzenie proliferacji komórkowej poprzez zablokowanie dostarczania ważnych mikroelementów. Wśród wielu z nich można wyróżnić żelazo biorące udział w syntezie DNA, ATP, hemu, oddychaniu komórkowym czy transporcie tlenu [1]. Podobnie miedź pełni funkcję transportera elektronów, jak również bierze udział w ważnych procesach, takich jak sygnalizacja komórkowa. Komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na wymienione mikroelementy z racji zwiększonego metabolizmu, dlatego zablokowanie źródła kluczowych składników wydaje się być racjonalnym podejściem w terapii antynowotworowej. Ponadto związanie metali ma również wpływ na szereg biomolekuł biorących udział w zasadniczych procesach komórkowych, a sterowanie ich funkcjonalnością, poprzez zastosowanie badanych związków, pozwala decydować o losie komórki. W dalszej części pracy zebrano wyniki dotyczące potencjalnego mechanizmu działania dużej biblioteki związków o właściwościach kompleksujących, z podkreśleniem wkładu jaki ta wiedza wnosi w rozwój farmakologii. Współpraca z zespołami specjalistów z dziedziny chemii leków, syntezy organicznej oraz farmacji (zespół prof. Roberta Musioła oraz prof. Jarosława Polańskiego) zaowocowała przetestowaniem kilkuset pochodnych na panelu linii komórkowych. Ponadto w ramach analizy zależności struktura-aktywność zmodyfikowano ścieżki syntetyczne nowych związków, w celu zaprojektowania i zsyntezowania analogów o lepszych parametrach farmakologicznych. Z dużej grupy przetestowanych pochodnych zostały wybrane najciekawsze przykłady wnoszące istotny wpływ w rozwój wiedzy na temat własności biologicznych i mechanizmu działania danej grupy związków.

Pochodne tiosemikarbazonu

Pochodne tiosemikarbazonu (TSC) charakteryzują się szerokim spektrum własności biologicznych, takich jak właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze [2], przeciwmalaryczne [3] oraz przeciwnowotworowe [4]. Mechanizm działania antynowotworowego, który jest głównym obiektem moich badań, jest złożony i

niejednokrotnie związki te były określane mianem „miecza obosiecznego”, ze względu na fakt, iż działają wielotorowo [5]. Ich wysoka aktywność jest związana z indukcją wielu procesów, jak generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) [6], mobilizacja jonów metali między kompartmentami [7], hamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej [8], zahamowanie cyklu komórkowego i indukcja apoptozy [9]. Związki te mają również istotny wpływ na zmianę ekspresji genów i białek związanych z głównymi szlakami w komórce [10,11]. Obecnie pochodne z grupy TSC cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców, a kilka pochodnych znajduje się w testach klinicznych [12,13] (NCT02688101, NCT00004213, NCT02433626). Wiodący związek, Triapina (**3-AP**) (**Fig.1**), został szeroko przebadany w testach klinicznych I i II fazy, które dowiodły korzyści z jego potencjalnego zastosowania w terapii onkologicznej, również w terapii kombinowanej z gemcytabiną, cisplatyną lub radioterapią (NSC #663249, IND # 68338).

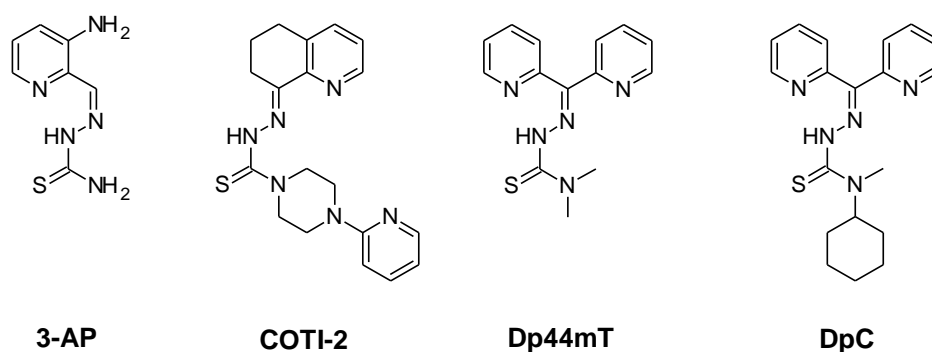


Fig. 1 Pochodne TSC w fazie testów klinicznych. Analogii badanych związków.

W swojej dotychczasowej pracy przebadalam ponad 250 pochodnych TSC zsyntezowanych w grupie prof. Jarosława Polańskiego oraz prof. Roberta Musioła z Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego, opartych na strukturze tiosemikarbazonu, w ujęciu ich aktywności antynowotworowej, testując je na kilkunastu modelach komórkowych. Spośród tej bogatej biblioteki związków wybrałam przykłady przedstawione na **Fig.2**. Badane związki zostały zaprojektowane w oparciu o znane farmakofory, takie jak sama grupa tiosemikarbazonu, ale również inne fragmenty molekularne, jak keton dipirydylowy (obecny w **Dp44mT** oraz **DpC**), aminopirydyna (obecna w **3-AP**) czy tetrahydrochinolina lub piperazyna (obecne w **COTI-2**). Badanie aktywności antyproliferacyjnej oraz mechanizmu działania pozwoliły na uzupełnienie luk w farmakologii tiosemikarbazonów oraz postawienie nowych hipotez badawczych.

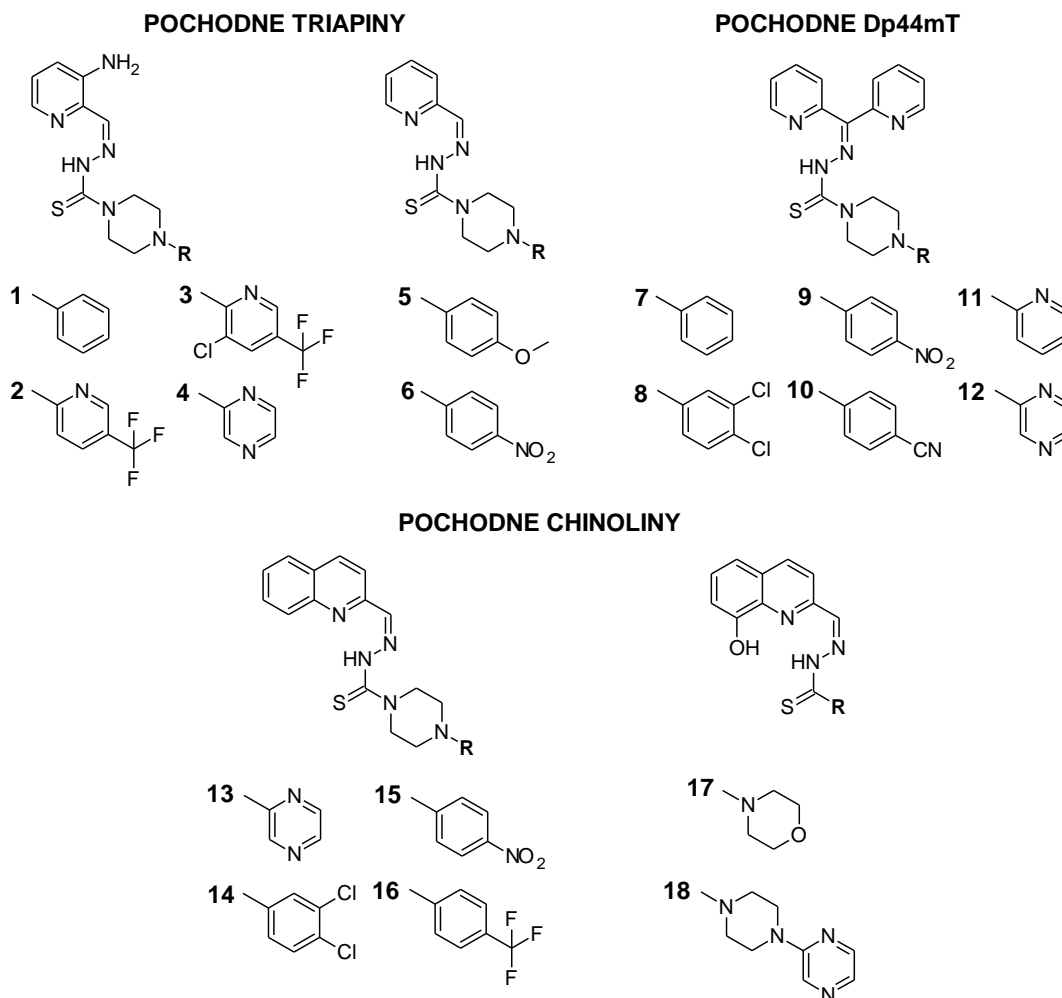


Fig. 2 Wybrane pochodne TSC

Rozpoczęcie dyskusji na temat mechanizmu działania pochodnych TSC należy rozpocząć od ich budowy chemicznej, która warunkuje właściwości chelatujące tych związków. W pracy **H5** zostały opisane właściwości fizykochemiczne analogów Triapiny, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości kompleksujących. Badania te są kontynuacją wcześniejszych prac [14,15] i ich rozszerzeniem w kontekście kompleksowania. Zdolność do tworzenia kompleksów z metalami jest motywem przewodnim wszystkich prac zebranych w cyklu habilitacyjnym. W pracy **H7** przeprowadzono eksperymenty z wpływem niespecyficznego chelatora EDTA na aktywność badanych TSC. Eksperymenty wykazały, że nawet dziesięciokrotnie większe stężenie EDTA nie miało wpływu na aktywność TSC. Jest to niewątpliwym dowodem na tworzenie trwałych kompleksów z metalami oraz znajduje potwierdzenie w pracach innych zespołów [16].

Kontynuując rozważania na temat struktury chemicznej opisywanych związków warto zwrócić uwagę na niektóre zależności struktura-aktywność powtarzające się w wielu analizowanych przypadkach. W **Tabeli 1** przedstawiono przykładowe wyniki aktywności

TSC	IC ₅₀ [μM]					
	HCT 116 p53 ^{+/+}	HCT 116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
3-AP	1.12 ± 0.28	1.34 ± 0.34	2.33 ± 0.43	1.48 ± 0.56	1.76 ± 0.29	>25
1	1.52 ± 0.44	0.13 ± 0.01	0.53 ± 0.14	0.43 ± 0.09	1.44 ± 0.36	>25
2	0.42 ± 0.11	0.12 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.28 ± 0.06	0.84 ± 0.24	>25
4	0.44 ± 0.11	0.34 ± 0.04	2.22 ± 0.64	0.74 ± 0.11	2.60 ± 0.24	>25
5	5.13 ± 1.24	0.23 ± 0.08	0.54 ± 0.10	0.19 ± 0.05	6.95 ± 3.65	>25
8	0.31 ± 0.06	0.015 ± 0.004	0.07 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.03	12.87 ± 0.99
9	3.20 ± 1.32	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.56 ± 0.28	>25
14	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.47 ± 0.05	8.52 ± 2.14	14.74 ± 0.79
15	5.10 ± 1.79	0.22 ± 0.02	0.31 ± 0.09	5.54 ± 1.49	14.81 ± 0.72	3.22 ± 0.77
16	0.14 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.06	12.09 ± 0.61

Tabela 1 Wybrane wartości IC₅₀ dla pochodnych TSC dla panelu linii komórkowych.

antyproliferacyjnej dla wybranych związków stanowiących drugą generację di-podstawionych w terminalnym atomie N4 pochodnych [17,18]. W celu czytelnego zobrazowania obliczonych wartości parametru IC₅₀ (stężenie, przy którym następuje 50% spadek żywotności populacji komórek) kolorem czerwonym zaznaczono wartości poniżej 1 μM, żółtym te z zakresu 1 – 10 μM, natomiast IC₅₀ > 10 μM oznaczono kolorem szarym. Analiza struktury krystalograficznej wskazuje na fakt, iż donorami par elektronowych wiązania koordynacyjnego są atomy – N (z pierścienia pirydynowego) oraz N i S (z grupy tiosemikarbazonu) [19]. Przedstawione wartości IC₅₀ wskazują, iż wszystkie pochodne są bardziej skuteczne w hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych niż Triapina.

Koordynacja jonu metalu jest kluczowa dla aktywności antynowotworowej tych pochodnych, dlatego wszystkie prezentowane związki posiadają takie cechy strukturalne, które to umożliwiają. Na **Fig. 3.** przedstawiono porównanie analogów Triapiny o różnych własnościach chelatujących (na przykładzie kompleksowania żelaza) i tym samym odmiennych wartościach IC₅₀. Podstawnik na terminalnym atomie azotu N4 ma z kolei istotny wpływ na zasadowość związku i pomimo tego, iż atom ten nie bierze udziału w tworzeniu wiązania koordynacyjnego liganda z metalem, to ma istotny wpływ na lipofilowość

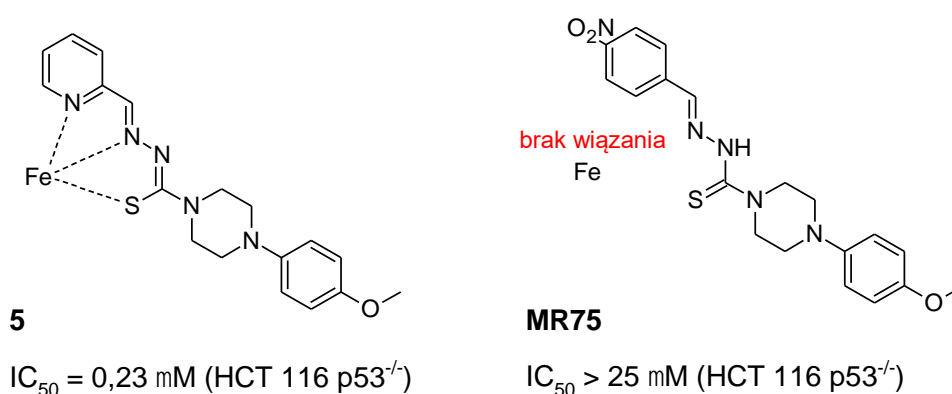


Fig. 3 Porównanie aktywnej pochodnej **5** z jej nieaktywnym analogiem **MR75**.

i aktywność całej molekuly [20,21]. Ponadto charakter grupy (elektrono-akceptorowy czy donorowy) przyłączonej do atomu węgla grupy iminowej również warunkuje lipofilowość oraz aktywność biologiczną molekuly. Przedstawione dane wskazują, iż połączenie fragmentów molekularnych występujących w pochodnych Triapiny, bądź **Dp44mT** z pierścieniem piperazynowym obecnym w **COTI-2**, skutkowało stworzeniem nowych pochodnych TSC o wysokiej aktywności antynowotworowej.

Linie komórkowe z **Tabeli 1** są zróżnicowane pod względem pochodzenia, ekspresji białka p53 oraz innych białek metalozależnych. Jak powszechnie wiadomo białko p53 jest nazywane strażnikiem genomu, dlatego jego prawidłowe funkcjonowanie jest kluczowe do normalnego rozwoju komórki [22]. Białko to w odpowiedzi na uszkodzenia komórkowe uruchamia systemy naprawcze, bądź gdy naprawa jest niemożliwa hamuje wzrost komórkowy i wyzwała procesy degradacji komórki. Obecne dane wskazują, iż w połowie scharakteryzowanych nowotworów gen kodujący białko p53 jest zmutowany, co jest przyczyną lekooporności i słabych prognoz [23]. Dlatego problem ten stanowi interesujący temat badawczy. W większości przypadków badane związki wykazywały większą aktywność na linii z podwójną delecją genu *TP53* (HCT 116 p53^{-/-}) niż na typie dzikim (HCT 116 p53^{+/+}). Linia U-251, która posiada mutację punktową w sekwencji *TP53* również wykazywała podatność na badane związki. Najbardziej oporna na działanie testowanych TSC była linia Hs 683. Zaobserwowana specyficzność badanych TSC była impulsem do przeprowadzenia dalszych analiz.

Tworzenie kompleksów z metalami jest ważnym aspektem warunkującym wysoką aktywność pochodnych z grupy TSC, która z kolei jest związana z generowaniem reaktywnych form tlenu. Udział w reakcjach redoks jest możliwy dzięki skoordynowaniu jonów metali, które mogą występować na różnych stopniach utlenienia jak Fe²⁺/Fe³⁺ czy

$\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$. Specyficzny sposób koordynacji metalu, który umożliwia zmianę położenia elektronu skutkuje generowaniem RFT i tym samym wpływa na zaburzenie komórkowej homeostazy redoks. Istotny wpływ na pozostawienie luk w sferze koordynacji metalu ma atom donorowy liganda, który determinuje udział całego kompleksu w reakcji redoks [24]. Dowodem może być przykład DFO, który tworząc z metalami nietoksyczne kompleksy w pełni wyczerpuje ich sfery koordynacji, uniemożliwiając generowanie RFT [25]. Tak więc wysoka aktywność antynowotworowa pochodnych TSC w dużej mierze jest zależna od generowania RFT, co zostało potwierdzone m.in. w pracy Richardsona i wsp. [26], w której przeprowadzono eksperymenty z wcześniejszą inkubacją z nietoksycznym chelatorem, mającym silne powinowactwo do metali. Rezultatem tego była utrata właściwości cytotoksycznych związku **Dp44mT**. Zdolność do generowania RFT przez badane pochodne została zweryfikowana przez przeprowadzenie szeregu testów z udziałem indykatora RFT, odczynnika CellROX, który po utlenieniu wiąże się z DNA i wykazuje zieloną fluorescencję. W pracy **H6** przeprowadzono również szczegółową analizę kinetyczną powstawania RFT. Wyniki wskazują, iż maksymalne stężenie RFT zostaje osiągnięte po 12 godzinach, po czym następuje spadek. Zdolność do generowania RFT koreluje z aktywnością antyproliferacyjną. Ze względu na podatność komórek nowotworowych na terapię związaną z wywołaniem stresu oksydacyjnego, związki posiadające takie właściwości są atrakcyjnym materiałem do badań nad nowymi lekami. Transformacja nowotworowa oraz zaburzenie metabolizmu powoduje podwyższenie poziomu RFT, a to z kolei ma istotny wpływ na lekooporność [27,28]. W pracy **H6** wykazano, iż pochodne TSC wpływają na regulację genów związanych z systemem antyoksydacyjnym. Analiza ekspresji genów dysmutazy ponadtlenkowej (*MnSOD*) i katalazy (*CAT*) wykazała ich wyraźny spadek. Przeprowadzono również analizę najbardziej znanego przeciwutleniacza glutationu (GSH) i również w tych testach wykazano znaczący spadek jego stężenia. W wyniku generowania RFT, przez badane TSC, następowało całkowite załamanie obrony przeciwutleniającej komórki i uruchomienie szlaków mających na celu zatrzymanie proliferacji, o czym świadczył wzrost ekspresji genu *NDRG1* – głównego indykatora apoptozy (**Fig. 4**).

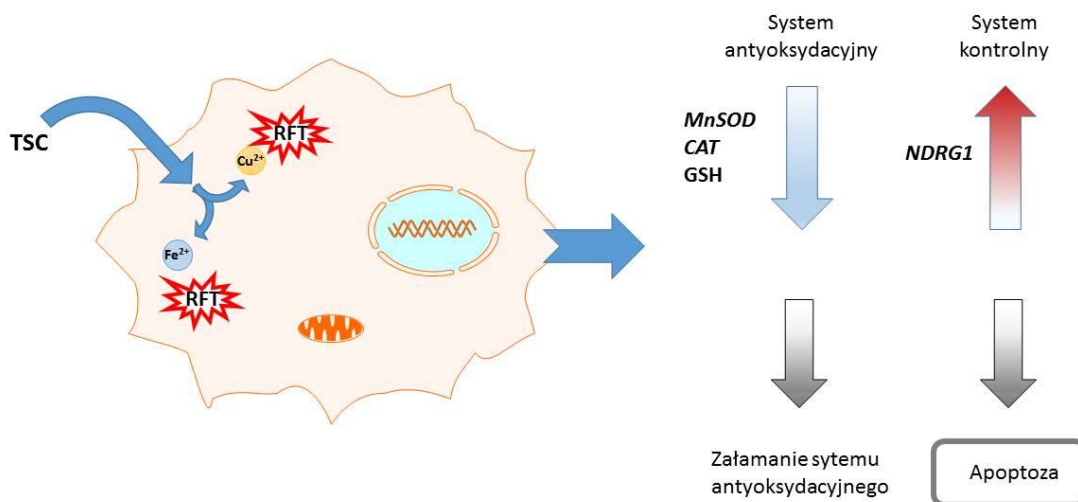


Fig. 4. Wpływ badanych TSC na system antyoksydacyjny komórki.

Oprócz tworzenia chelatów z jonami metali TSC są również rozpatrywane w kontekście działania jonoforycznego, co zostało po raz pierwszy przedstawione w pracy **H6** i niewątpliwie przyczyniło się do wzbogacenia wiedzy na temat mechanizmu działania TSC. Badania z dodatkiem jonów metali wskazywały na wzrost aktywności antyproliferacyjnej pochodnych TSC w stosunku do ich działania w monoterapii [29]. W pracy **H6** oraz **H7** opisane zostały eksperymenty, w których porównano aktywność pochodnych TSC do ich aktywności w połączeniu z jonami Cu^{2+} . Rezultatem połączenia TSC z jonami miedzi był silny efekt synergiczny, którego wytłumaczeniem może być właśnie działanie jonoforyczne. Pochodne TSC jako jonofory przenoszą jony metali do wnętrza komórki, zwiększając tym samym ich stężenie, zaburzając homeostazę i wyzwalając szereg procesów związanych m.in. z generowaniem RFT [30].

Kolejny etap badań nad mechanizmem działania pochodnych TSC polegał na poszukiwaniu zależności pomiędzy wysoką aktywnością, a wpływem na cele molekularne i szlaki komórkowe związane z gospodarką jonami metali. W pracach **H6** oraz **H7** potwierdzono, iż pochodne TSC hamują cykl komórkowy w fazie S i G2/M oraz wpływają na indukcję śmierci komórkowej na drodze apoptozy. Przeprowadzenie analizy zmian ekspresji kluczowych białek komórkowych pozwoliło na szczegółowe zbadanie przyczyn wysokiej aktywności TSC oraz uzupełnienie luk w tej dziedzinie. Zaburzenie homeostazy metali miało istotny wpływ na białka związane z regulacją cyklu komórkowego (cdc2, p21, cykliny) oraz indukcją apoptozy (PARP, kaspazy, p53, cytochrom c). Inkubacja z badanymi TSC

powodowała spadek stężenia cdc2 oraz niektórych cyklin. We wszystkich analizowanych przypadkach wyciągnięto jednoznaczny wniosek, iż indukcja apoptozy zachodzi w sposób niezależny od białka p53. Oprócz przeprowadzenia testów z Aneksyną V za pomocą cytometru przepływowego, w technice Western Blot odnotowano również obecność produktu cięcia przez kaspazy białka PARP o masie cząsteczkowej 89 kDa. Potwierdzeniem był również wpływ cytochromu c do cytozolu. Na **Fig. 5** przedstawiono przykładowe wyniki dla wybranych związków testowanych na linii MCF-7.

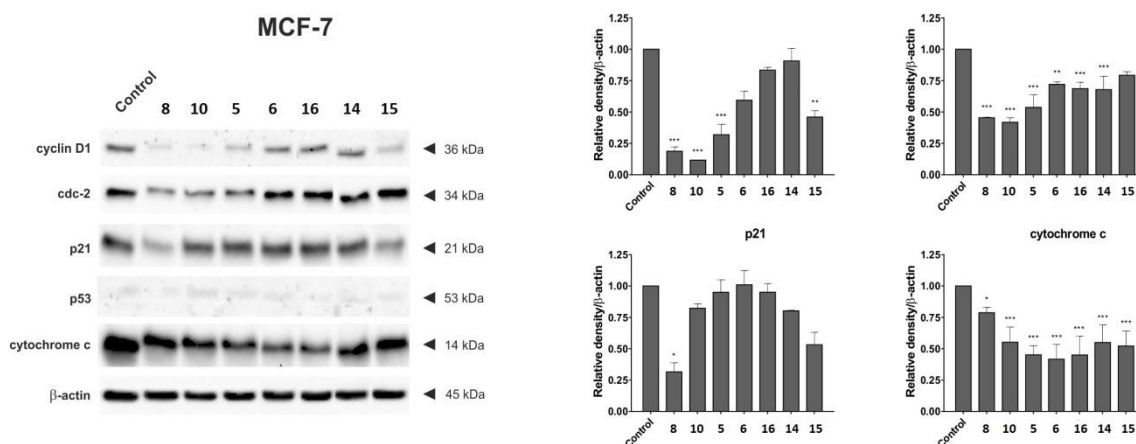


Fig. 5. Wpływ badanych TSC na regulację białek w linii MCF-7 [H7].

Pochodne tiosemikarbazonu w terapii fotodynamicznej

Wiele ze stosowanych obecnie schematów leczenia chorób nowotworowych, jak również innych schorzeń, opiera się na tzw. terapii kombinowanej. Takie podejście ma na celu zwiększenie skuteczności terapii poprzez skierowanie działania na więcej niż jeden cel molekularny (np. receptor czy DNA) lub zwiększenie liczby różnych czynników wymierzonych w ów cel. Tym sposobem jednocześnie można uderzyć w kilka „punktów zapalnych”, bądź zwiększyć stężenie i rodzaj atakujących go czynników. Innymi słowy istnieje możliwość wykorzystania różnych mechanizmów działania poszczególnych leków, a nawet możliwość leczenia kilku chorób jednocześnie. Przykładem może być połączenie inhibitorów konwertazy angiotensyny stosowanych w leczeniu nadciśnienia z diuretykami, które poprzez działanie moczopędne zmniejszają stężenie sodu w organizmie, wzmagając działanie leków nasercowych. Jeśli taki atak jest skuteczny i efekt terapeutyczny ulega znacznemu zwiększeniu, mówimy wówczas o zjawisku synergii. Z definicji efekt ten może zostać określony jako zwiększenie efektu farmakologicznego, który nie jest wynikiem sumarycznych efektów działania pojedynczych składowych terapii. Zwiększona skuteczność terapeutyczna pozwala niejednokrotnie na zmniejszenie dawki leku, a tym samym jego

toksyczności i skutków ubocznych, bądź też na zmniejszenie lub spowolnienie lekooporności. Zjawiskiem przeciwnym do synergii jest antagonizm, który dotyczy wzajemnego znoszenia się efektów działania danych leków. Jak na przykład podczas podawania naloksonu, będącego blokerem receptorów opioidowych, przy przedawkowaniu opioidów lub leczeniu uzależnień. Efekty terapii kombinowanej można scharakteryzować w sposób ilościowy dysponując danymi takimi jak dawka stosowanego leku oraz efekt jaki ten lek wywołuje. W pracy Chou została przedstawiona szczegółowa matematyczna analiza tych zagadnień wraz z omówieniem metody pozwalającej na kalkulację współczynnika kombinacji (*ang. combination index CI*) [31,32].

W swoich badaniach dużą część uwagi poświęcałam zagadnieniom związanym ze zjawiskiem synergii. W przeglądowej pracy **H1** opisałam metody eksperymentalne pozwalające na zweryfikowanie rodzaju oddziaływań terapii kombinowanej. Głównym tematem tej pracy są zakażenia grzybicze, jednak metody ewaluacji, sposoby wyznaczania współczynnika CI oraz podstawy matematyczne są uniwersalne dla wszystkich rodzajów leków. Prześledzenie podstaw teoretycznych oraz metod doświadczalnych pozwoliło na znalezienie najlepszej metody weryfikacji zjawiska synergii.

Terapia kombinowana została opisana w pracy **H2**, w której badałam połączenie pochodnych z grupy tiosemikarbazonu z wewnątrzkomórkowym fotouczulaczem; protoporfiryną IX (PpIX), stosowaną w terapii fotodynamicznej (PDT, *ang. photodynamic therapy*). Sama terapia PDT opiera się na stosowaniu fotouczulaczy, które po naświetleniu światłem o odpowiedniej długości fali ulegają wzbudzeniu, a następnie po reakcji z rozpuszczonym w tkance tlenem wpływają na generowanie RFT [33]. Niewątpliwą zaletą wspomnianej terapii jest wysoka selektywność w stosunku do zdrowych komórek [34]. Modyfikacją klasycznej PDT jest terapia ALA-PDT, w której egzogeny fotouczulacz zostaje zastąpiony prolekiem – kwasem 5-aminolewulinowym (ALA) [35]. Tak więc pacjentowi podaje się prekursor właściwego fotouczulacza (PpIX), który zostaje samoistnie wytworzony przez sieć enzymów w mitochondriach. Dzięki zastosowaniu naturalnie występującego substratu jakim jest ALA, terapia ta jest bezpieczna dla pacjenta. Dodatkowo zewnętrzne podanie ALA pozwala na ominięcie negatywnego sprzężenia zwrotnego występującego w normalnych warunkach fizjologicznych podczas zwiększonej produkcji hemu [36].

Wstępną hipotezą pracy **H2** było założenie, że pochodne TSC jako związki wykazujące własności chelatujące mogą wpływać na wzrost akumulacji PpIX. Zjawisko to zostało szeroko opisane w literaturze [37–39]. Pochodne TSC, poprzez skompleksowanie jonów Fe^{2+} biorących udział w ostatnim etapie syntezy hemu, powodują zahamowanie tego

procesu, zwiększając tym samym stężenie PpIX. Jednak przeprowadzenie eksperymentów, w których połączyłam działanie aktywnych TSC z naświetlaną (a więc aktywowaną) PpIX przyniosło efekt synergii, jednakże mechanizm działania okazał się zupełnie inny niż zakładano. Temat ten został opisany w mojej pracy doktorskiej jako wstępne wyniki, których wówczas nie udało się wyjaśnić w sposób wyczerpujący. Dopiero dogłębna analiza poparta przeprowadzeniem dalszych eksperymentów związanych z wywołaniem stresu oksydacyjnego przez badane związki, pozwoliła na wyjaśnienie zarejestrowanych zjawisk. Dodatkowe eksperymenty dowiodły, iż chelatory nie miały wpływu na wzrost stężenia PpIX, miały natomiast duży wpływ na wzmożenie efektu cytotoksycznego poprzez wspólne generowanie RFT.

Temat okazał się na tyle interesujący aby kontynuować go w kolejnej pracy **H4**. Odkrycie zjawiska wzajemnego współdziałania pochodnych TSC i fotouczulaczy, w kontekście ich wpływu na zaburzenie równowagi redoks, skłoniło mnie do przetestowania egzogenego fotouczulacza, jakim była pochodna chloryny nowszej generacji zsyntezowana w zespole prof. Franza Petera Montfortsa z Uniwersytetu w Bremen [40]. W przypadku użycia egzogenego fotouczulacza, bazalny poziom komórkowego żelaza nie ma większego znaczenia, co czyni tę terapię bardziej uniwersalną. W pracy **H4** kontynuowano badania nad pochodną **17** i również w tym przypadku zaobserwowałam efekt synergii (współczynnik CI wynosił 0,82). W celu szerszej analizy wpływu badanego połączenia na generowanie reaktywnych form tlenu przeprowadzono eksperymenty związane z generowaniem tlenu singletowego, który jest głównym oksydantem wyzwalanym w reakcji fotouczulacza ze światłem. Przebrałam również wpływ opisywanej terapii kombinowanej na ekspresję genów związanych z systemem antyoksydacyjnym oraz peroksydację lipidów. Doświadczenia potwierdziły wcześniejsze badania i dowiodły, iż terapia kombinowana całkowicie zaburza antyoksydacyjne systemy obronne komórki i prowadzi do znaczącego wzrostu stresu oksydacyjnego, co ma bezpośredni wpływ na efekt toksyczny. Dodatkowo zostały przeprowadzone badania lokalizacji komórkowej, ze względu na fakt, iż procesy z udziałem rodników są procesami ultraszybkimi, dlatego umiejscowienie składników terapii wydaje się być kluczowe. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii konfokalnej potwierdziły, że zarówno pochodna TSC jak i fotouczulacz gromadziły się w mitochondriach, co niewątpliwie miało wpływ na wzmożenie stresu oksydacyjnego.

Pochodne styrylochinolin

Kolejną grupą związków wykazujących własności chelatujące są pochodne styrylochinolin zsyntezowane w zespole prof. Roberta Musioła z Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego. Ta grupa analogów chinoliny jest od lat badana w tym zespole. Początki mojej kariery naukowej miały źródło właśnie w tej tematyce. Jednak ówczesne badania związane z aktywnością antyproliferacyjną tych związków pozwoliły jedynie na dość powierzchowny wniosek, iż pochodne te posiadają aktywność o wskaźnikach IC_{50} rzędu kilku μM . Dlatego podczas samodzielnej pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora postanowiłam dokładniej zgłębić tę tematykę, szukając odpowiedzi na pytanie co jest przyczyną tej dość dużej aktywności. Swoje rozważania oparłam na zbadaniu mechanizmu działania opierając się na idei kompleksowania jonów metali, która jest dobrze potwierdzona w przypadku pochodnych chinoliny. W pracy **H3** opisałam analogi związku **CP-31398**, który posiada zdolność do stabilizowania, aktywacji oraz przywracania prawidłowej funkcji zmutowanemu białku p53 [41,42] (**Fig. 6**).

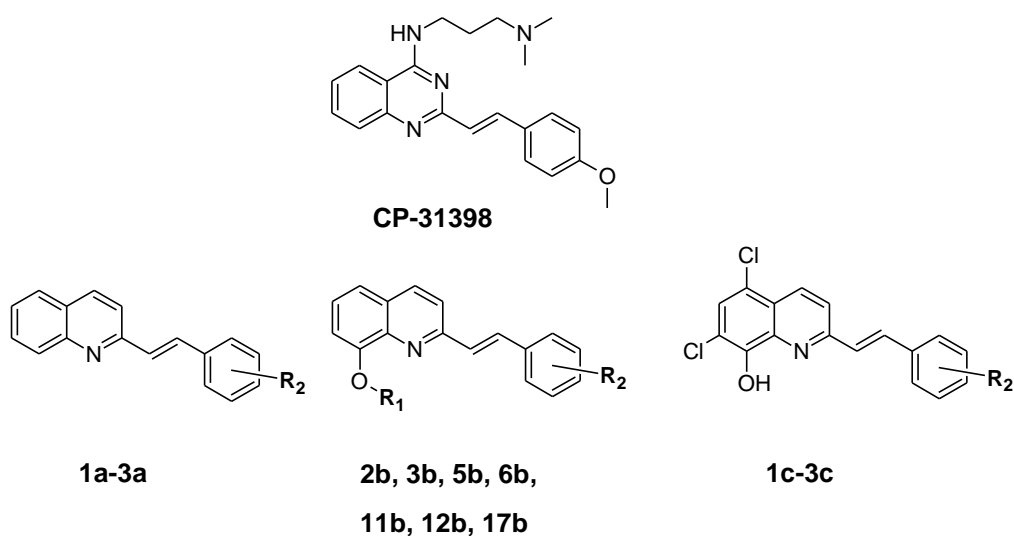


Fig. 6 Wybrane pochodne styrylochinoliny jako analogi związku **CP-31398**.

Podobieństwo strukturalne badanych pochodnych styrylochinoliny pozwoliło na wnioskowanie o analogii ich działania do mechanizmu działania **CP-31398**. Dlatego model badawczy stanowiły dwie linie komórkowe nowotworu jelita grubego typu dzikiego o prawidłowej ekspresji białka p53 (linia HCT 116 p53^{+/+}) i komórki z podwójną delecją genu *TP53* (linia HCT 116 p53^{-/-}). W pracach [43,44] wykazano, iż **CP-31398** hamuje proliferację komórek typu dzikiego oraz tych z mutacją *TP53*, natomiast nie wykazuje aktywności wobec komórek z delecją wspomnianego genu. Zespół Luu w wyniku przeprowadzonych

eksperymentów dowiódł, że związek ten jest kilkakrotnie mniej aktywny wobec komórek HCT 116 p53^{-/-}, niż wobec ich dzikich odpowiedników (p53^{+/+}) [45]. Wyniki te zostały potwierdzone w pracy **H3**. W **Tabeli 2** zostały zaprezentowane przykładowe wartości IC₅₀ dla **CP-31398** oraz jego analogów przedstawionych na **Fig. 6**. Analiza relacji struktura-aktywność pozwala na wysunięcie wniosku, iż najbardziej aktywne pochodne należą do grupy C, zawierającej podstawniki halogenowe oraz grupę OH. Warto zauważyć, że elektronoakceptorowy charakter atomów chloru w pozycjach rezonansowych zwiększa polarność grupy hydroksylowej i jednocześnie jej zdolność do wiązania jonów metali. Tak więc struktura dichlorowych analogów 8-hydroksychinoliny stanowi szkielet o dobrych właściwościach farmakologicznych i może zostać uznana za strukturę wiodącą, w celu zaplanowania dalszych syntez. Acetylacja grupy 8-OH nie miała negatywnego wpływu na aktywność badanych związków (**2b-3b** oraz **11b-12b**). Zaobserwowano również pozytywny wpływ podstawników halogenowych w styrylowej części cząsteczki na aktywność molekuly (**5b** a **17b**). Dodatkowym atutem badanych pochodnych, w kontekście potencjalnego zastosowania w terapii onkologicznej, jest brak toksyczności w stosunku do prawidłowych komórek linii GM 07492.

Styrylochinolina	Podstawnik	IC ₅₀ [μM]		
		HCT 116 p53 ^{+/+}	HCT 116 p53 ^{-/-}	GM 07492
CP-31398	-	18.63 ± 0.92	26.28 ± 1.41	12.26 ± 0.54
1a	-/2-OH	17.45 ± 2.20	14.05 ± 2.24	>25
2a	-/4-OEt	>25	>25	ND
3a	-/4-OBu	>25	>25	ND
2b	Ac/2-OAc	8.08 ± 0.56	14.71 ± 1.74	6.92 ± 1.72
3b	H/2-OAc	7.32 ± 1.01	13.53 ± 0.81	>25
5b	H/2,3-Cl	5.13 ± 1.41	2.99 ± 0.61	>25
6b	H/3,4-Cl	9.41 ± 2.17	3.34 ± 0.58	>25
11b	H/2-F	15.43 ± 2.46	8.38 ± 1.12	>25
12b	Ac/2-F	12.07 ± 3.02	5.78 ± 0.78	>25
17b	H/2-Cl	9.84 ± 1.79	7.97 ± 3.24	20.17 ± 6.52
1c	-/2-OEt	5.93 ± 0.97	3.25 ± 1.81	>25
2c	-/2-Cl	1.88 ± 0.85	2.86 ± 1.00	12.57 ± 2.88
3c	-/4-OEt	2.23 ± 0.81	3.53 ± 0.83	>25

Tabela 2 Wybrane wartości IC₅₀ dla pochodnych styrylochinoliny dla panelu linii komórkowych.

Wyniki aktywności wskazują na ciekawą zależność aktywności antynowotworowej od statusu białka p53. Mianowicie, pochodne zawierające podstawniki halogenowe w pierścieniu fenylowym (**5b**, **6b**, **11b** oraz **12b** – wyróżnione w tabeli czerwoną ramką) były 2-3 razy bardziej aktywne na linii HCT 116 p53^{-/-}, niż wobec linii typu dzikiego. Tak więc związki te wykazywały zupełnie odmienny model aktywności, niż pochodna **CP-31398**. Z kolei występowanie grupy acetoksy wpływało negatywnie na aktywność wobec linii z delecją *TP53* (**2b-3b** – wyróżnione w tabeli zieloną ramką), wykazując analogię do **CP-31398**. Badania były o tyle ciekawe, iż wśród tak niewielkiej grupy związków udało się znaleźć związki o różnym modelu aktywności w stosunku do związku **CP-31398** oraz takie, które hamowały w równym stopniu proliferację obu linii (najbardziej aktywne pochodne z grupy C).

Dalsze badania określające dokładny mechanizm działania pochodnych styrylochinoliny pozwoliły na stwierdzenie, iż związki te uruchamiają procesy komórkowe prowadzące do apoptozy, jednak w zależności od zaobserwowanych powyżej zależności zachodzi ona na drodze p53 zależnej (dla związków działających podobnie do **CP-31398**) lub niezależnej. Analiza poziomu kaspaz 3/7 jednoznacznie wskazuje, iż pochodne działające na drodze p53-niezależnej powodują wzrost aktywności kaspaz 3/7 w linii z delecją *TP53*. Dodatkowo ich parametry fizykochemiczne, takie jak lipofilowość, pozwalają na łatwą penetrację w głąb komórki i wpływ na indukcję szlaków związanych z wypływem cytochromu c z mitochondrium uruchamiającego kaskadę kaspaz. Obrazy z mikroskopu konfokalnego wskazują na lokalizację badanych związków w obrębie mitochondrium, co potwierdziło hipotezę o wyzwaniu apoptozy na drodze p53 niezależnej.

Motyw przewodni niniejszej pracy jakim jest kompleksowanie jonów metali został przeze mnie zbadany w kontekście generowania RFT przez pochodne styrylochinoliny. Wyniki prezentowane na **Fig. 7** dowodzą, iż badane związki wpływają na wywołanie stresu oksydacyjnego poprzez podwyższenie stężenia RFT. Ponadto analiza ekspresji białek wskazuje na znaczne podwyższenie poziomu oksygenazy hemowej 1 (HO-1), będącej czynnikiem antyoksydacyjnym aktywowanym w odpowiedzi na zaburzenie równowagi redoks. Wyniki są opisane w pracy A. Mrozek-Wilczkiewicz, et al. „The synthesis and anticancer activity of 2-styrylquinoline derivatives. A p53 independent mechanism of action”, która została skierowana obecnie do recenzji w czasopiśmie Eur. J. Med. Chem.

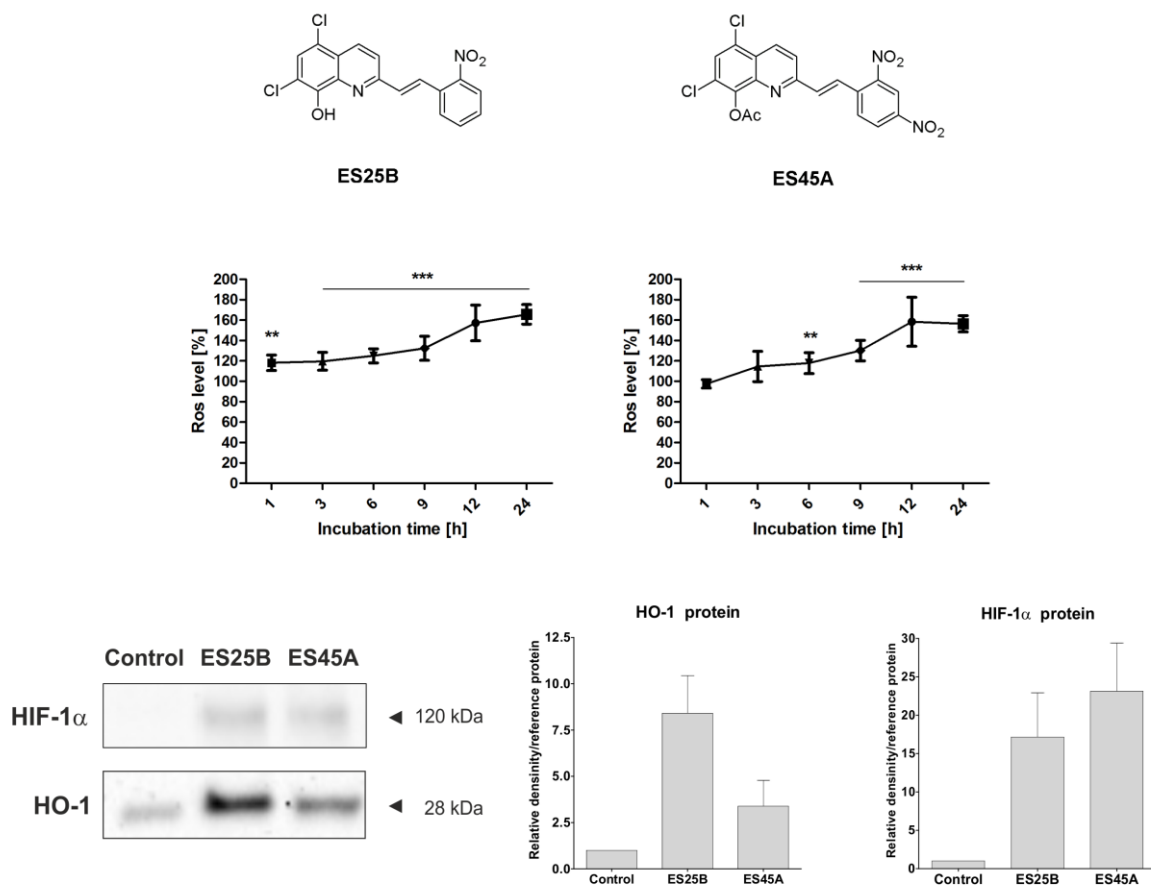


Fig. 7 Wpływ pochodnych styrylochinoliny na wywołanie stresu oksydacyjnego w linii HCT 116.

Przedstawione badania dotyczące antynowotworowego działania pochodnych z grupy styrylochinolin wniosły istotny wkład w zrozumienie mechanizmów działania tej rodziny związków. Dodatkowo z punktu widzenia lekooporności badanie związków działających na lekoopornym modelu HCT 116 p53^{-/-} niesie duży potencjał aplikacyjny. Nawiązując do rozdziału dotyczącego pochodnych tiosemikarbazonu, zebrane w niniejszej pracy wyniki dowodzą, iż kompleksowanie jonów metali ma istotny wpływ na mechanizmy związane z działaniem antynowotworowym wielu grup związków aktywnych biologicznie.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moja ścieżka naukowa rozpoczęła się od realizacji pracy magisterskiej w zespole prof. Polańskiego w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego dotyczącej syntezy i badania aktywności antyproliferacyjnej pochodnych chinazoliny. W czasie jej realizacji podjęłam staż naukowy w Instytucie Onkologii w Gliwicach w zespole prof. Joanny Rzeszowskiej-Wolny, w ramach zrealizowania części dotyczącej badań antynowotworowych. W wyniku tej współpracy moja kariera naukowa ewoluowała w stronę badań farmakologicznych, a rezultaty zostały opisane w pracy [46].

Studia doktoranckie podjęłam w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w zespole prof. Alicji Ratusznej, która poszukiwała kadry do nowopowstałego Śląskiego Międzyuczelnianego Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie, ukierunkowanego na prowadzenie badań z zakresu biofizyki. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej kontynuowałam staż w Instytucie Onkologii rozwijając swoje zainteresowania dotyczące testowania nowych substancji w kontekście ich właściwości antynowotworowych. W tym czasie podjęłam również nową tematykę związaną z terapią fotodynamiczną i odbyłam miesięczny staż na Uniwersytecie w Coimbrze w zespole prof. Luisa Arnaut, specjalisty z dziedziny PDT. Nawiązałam również współpracę z prof. Jakubem Gołębem z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego realizując wspólny projekt dotyczących zastosowania badanych związków w terapii PDT.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk fizycznych moje zainteresowania naukowe skupiły się wokół poszukiwania nowych celów molekularnych związanych m.in. z chelatacją metali. Współpraca z dr hab. Gabrielą Pastuch-Gawołek, specjalistą z dziedziny chemii cukrów, zaowocowała powstaniem dwóch prac na temat antynowotworowego działania związków z grupy glikokoniugatów [47,48]. Komórki nowotworowe ze względu na przyspieszoną proliferację wykazują zwiększone zapotrzebowanie na czynniki wzrostu. Zwiększona szybkość glikolizy prowadzi do beztlenowego metabolizmu i zwiększonej szybkości fermentacji kwasu mlekowego. Zjawisko to nosi nazwę efektu Warburga [49]. W pracach dotyczących własności antynowotworowych pochodnych chinoliny wykazano, iż związki te posiadają potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów. Dlatego zrodził się pomysł na połączenie tych pochodnych z częścią cukrową, w celu polepszenia ich farmakokinetyki. Do badań nad połączeniami tego typu wybrano komórki nowotworu jelita grubego (HCT 116) ze względu na fakt, iż charakteryzują się zwiększoną liczbą receptorów glukozy (GLUT) na powierzchni komórki [50]. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że aktywność antynowotworowa badanych związków jest związana głównie z chelatacją jonów metali, a co

za tym idzie generowaniem RFT. Własności strukturalne warunkowały również interkalację z DNA. Dość nieoczekiwanie okazało się, że połączenie z cząsteczkami cukrowymi nie zmienia głównego mechanizmu działania oraz nie uzależnia działania tych połączeń od transportu aktywnego przez białka GLUT. Warto zauważyć, że pozwoliło to zweryfikować pojawiającą się w literaturze hipotezę o charakterze proleku takich glikokoniugatów [51].

Oprócz opisywanych powyżej własności antynowotworowych pochodnych chinolin, związki te posiadają również interesujące własności spektralne (zwłaszcza styrylochinoliny), w tym wysoką kwantową wydajność fluorescencji oraz trwałość (niskie fotowysbielenie), umożliwiające ich zastosowanie w obrazowaniu struktur komórkowych. W pracach [52,53] przedstawiono serię nietoksycznych pochodnych mających wysokie powinowactwo do takich organelli jak mitochondria czy jądra komórkowe. W rozdziale dotyczącym antynowotworowego działania tych pochodnych obrazowanie tych związków było możliwe dzięki korzystnym właściwościom spektralnym (str. 18). Taka różnorodność zastosowań tych pochodnych czyni je atrakcyjnym materiałem do badań.

Pozostając w tematyce obrazowania kolejna praca [54] powstała w wyniku współpracy z prof. Gabriellą Kramer-Marek, u której odbyłam dwa miesięczne staże w the Institute of Cancer Research w Londynie. Projekt dotyczył fotoimmunoterapii, w której połączenie aktywnego po naświetleniu fotouczulacza najnowszej generacji (grupa ftalocyjanin) z cząsteczką Affibody będącą niskocząsteczkowym białkiem specyficznie rozpoznającym receptor EGFR, daje silny efekt terapeutyczny. Kombinacja małoinwazyjnej terapii fotodynamicznej z celowaną immunoterapią daje bardzo skuteczny efekt terapeutyczny oraz niski poziom toksyczności w stosunku do zdrowych tkanek. Wykorzystanie małej cząsteczki Affibody (masa molowa 25 krotnie mniejsza niż masa przeciwciała EGFR) pozwala na łatwiejsze dostarczanie do miejsca docelowego oraz szybszy metabolizm [55]. Badania zostały przeprowadzone na mysim modelu glejaka wielopostaciowego, dla którego cechą charakterystyczną jest nadekspresja receptora EGFR wraz z występowaniem mutacji EGFRvIII [56]. Nowotwory mózgu charakteryzują się niskim odsetkiem wyleczalności oraz słabymi wskaźnikami przeżycia. Umieszczenie guza niejednokrotnie uniemożliwia resekcję chirurgiczną, a dostępne metody leczenia niosą wiele ograniczeń m.in. słaba przepuszczalność bariery krew-mózg ogranicza stosowanie wielu cytostatyków. Dlatego poszukiwanie nowych metod leczenia glejaków jest istotnym wyzwaniem współczesnej nauki. Kolejnym problemem związanym z testowaniem nowych leków jest dobranie odpowiedniego modelu, który w sposób rzetelny odzwierciedlałby rzeczywiste środowisko guza. Dlatego też w ramach projektu „Fotoimmunoterapia - nowa strategia leczenia glejaka wielopostaciowego.”

(2017/25/B/NZ5/00039), którego kierownikiem jest prof. Kramer-Marek, realizowanego m.in. we współpracy z dr. hab. Wojciechem Kasperą ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, prowadzimy badania na komórkach wyprowadzanych od pacjentów. Takie podejście, pomimo sporej trudności w pracy z liniami komórkowymi wyprowadzanymi z tkanki, pozwala na wybór najbardziej odpowiedniego modelu badawczego.

Badania komórkowe przeprowadzane w celu określenia toksyczności związku mogą być również rozszerzone na testowanie materiałów o innym zastosowaniu niż lek. Moje doświadczenie zawodowe obejmuje również projekty dotyczące toksyczności nanokompozytów zawierających jony metali. W pracach [57,58] przeprowadziłam eksperymenty z użyciem prawidłowych komórek, w celu określenia bezpieczeństwa stosowania badanych materiałów. Testowane nanokompozyty mogą być wykorzystywane m.in. do produkcji ceramiki o właściwościach antyseptycznych, czy implantów.

Brak cytotoksyczności ma również kluczowe znaczenie we wdrażaniu nowych technologii związanych z wykorzystaniem cieczy jonowych. Temat ten jest obecnie przedmiotem zainteresowania zarówno naukowców, ale również firm przemysłowych o profilu nastawionym na rozwój nowych technologii. Współczesne problemy zużycia i magazynowania energii wymagają nowych rozwiązań, a użycie cieczy jonowych, o bardzo dobrych parametrach termicznych, wychodzi naprzeciw wspomnianym wyżej problemom. Współpraca z prof. Marzeną Dzidą z Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego zaowocowała powstaniem kilku prac [59–61], w których brałam udział w badaniu toksyczności cieczy jonowych o potencjalnym zastosowaniu jako cieczy chłodzące lub cieczy hydrauliczne. Bazując na doświadczeniu zdobytym w trakcie badań nad potencjalnymi cytostatykami, podczas tych prac udało się również wysunąć wstępne wnioski dotyczące mechanizmu działania. Wyniki wskazują na generowanie reaktywnych form tlenu, dlatego pochodne o takich właściwościach zostaną zmodyfikowane w celu otrzymania nietoksycznych analogów.

Mój całkowity dorobek naukowy zawiera **28 publikacji o sumarycznym IF = 94,638** oraz **liczbie punktów MNiSW = 849**.

5. Plany badawcze.

Związki wykazujące właściwości chelatujące są interesującym przedmiotem badań ze względu na ich znaczący wpływ na wiele ważnych szlaków sygnałowych w komórce. Jony metali biorą udział w procesach komórkowych, takich jak proliferacja, kontrola cyklu, indukcja śmierci, angiogeneza, czy odpowiedź immunologiczna. Dlatego związki o specyficznych właściwościach molekularnych, które pozwalają na regulację aktywności jonów metali i związanych z nimi białek i szlaków w komórce, są obiecującymi kandydatami na leki. Bazując na dotychczasowym doświadczeniu moje obecne plany badawcze są skoncentrowane na następujących pytaniach:

- W jaki sposób zastosowanie chelatorów zmienia ekspresję biomolekuł zależnych od metali w komórce?
- Jaki chelator jest najlepszy dla specyficznego rodzaju nowotworu?
- Który chelator będzie miał najlepsze właściwości ze szczególnym uwzględnieniem przenikania bariery krew-mózg i rozpoznawania receptorów transferyny?

Plany badawcze uwzględniają przeprowadzenie testów cytotoxyczności dla nowych pochodnych chinoliny, terpirydiny i tiosemikarbazonu. Synteza zostanie przeprowadzona w grupie współpracujących syntetyków, a jej głównym celem jest poprawa zdolności chelatowania jonów metali, penetracji bariery krew-mózg oraz rozpoznawania receptorów transferyny, których nadekspresją charakteryzują się komórki nowotworowe. Główna część badań dotyczących aktywności antynowotworowej oraz mechanizmu działania *in vitro* zostanie wykonana w moim zespole. Wstępne badania cytotoxyczności będą przeprowadzone na kilku liniach komórkowych różniących się pod względem pochodzenia, ekspresji receptorów transferyny oraz białek metalozależnych. Najbardziej aktywne pochodne zostaną poddane dalszym modyfikacjom w celu poprawy w/w własności. Szczególną uwagę pragnę poświęcić liniom glejakowym, dlatego przeprowadzenie testów determinujących przepuszczalność bariery krew-mózg będzie istotnym punktem badań. W dalszej kolejności zostanie zbadany specyficzny mechanizm działania, w celu ustalenia w jaki sposób kompleksowanie metali wpływa na zmiany w ekspresji genów, ścieżki komórkowe, oraz zmiany na poziomie białka. W ramach badań planuję określenie wpływu badanych związków na generowanie reaktywnych form tlenu, inhibicję aktywności reduktazy rybonukleotydowej, zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukcję śmierci komórkowej wraz z określeniem jej rodzaju. Przykładowe cele molekularne (na poziomie genów oraz białek) to p53, p21, p27, cykliny, cdc2, GADD45, NDRG1, HIF-1 α , EGFR, MAPK; kaspazy, Bcl-2, Bax, PARP, LC3. Najbardziej interesujące pochodne zostaną poddane dalszym badaniom na modelu 3D oraz

liniach komórkowych wyprowadzanych od pacjentów. Takie podejście ma na celu zarówno weryfikację uzyskanych wcześniej wyników, jak i zbadanie wpływu modelu badawczego na rezultaty badań. W ramach współpracy planuje się również przeprowadzenie testów *in vivo*. Opisywane badania są przedmiotem złożonego przeze mnie wniosku grantowego (OPUS), będącego obecnie w recenzjach. Schematyczny plan moich badań został przedstawiony na **Fig. 8**.

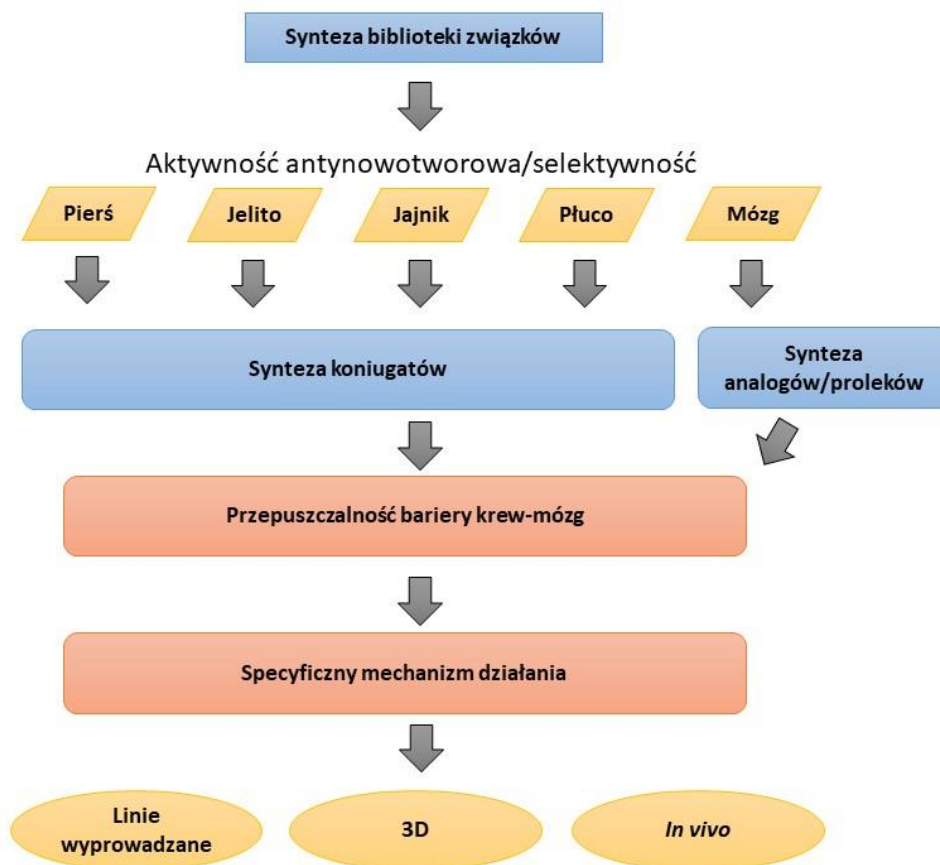


Fig. 8 Plan badań.

Bibliografia

- [1] D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of iron overload disease and cancer, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 547–583. doi:10.1124/pr.57.4.2.547.
- [2] N.D. Thanh, N.T.K. Giang, T.H. Quyen, D.T. Huong, V.N. Toan, Synthesis and evaluation of in vivo antioxidant, in vitro antibacterial, MRSA and antifungal activity of novel substituted isatin N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 532–543. doi:10.1016/j.ejmech.2016.07.074.
- [3] P. Chellan, S. Nasser, L. Vivas, K. Chibale, G.S. Smith, Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity, *J. Organomet. Chem.* 695 (2010) 2225–2232. doi:10.1016/j.jorganchem.2010.06.010.
- [4] T.B. Chaston, D.B. Lovejoy, R.N. Watts, D.R. Richardson, Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311., *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 402–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538494>.
- [5] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, et al., Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5271–94. doi:10.1021/jm900552r.
- [6] K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, M. Rejmund, J. Polanski, R. Musiol, The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones, *Oncotarget.* 9 (2018) 17689–17710. doi:10.18632/oncotarget.24844.
- [7] A.E. Stacy, D. Palanimuthu, P. V. Bernhardt, D.S. Kalinowski, P.J. Jansson, D.R. Richardson, Structure-Activity Relationships of Di-2-pyridylketone, 2-Benzoylpyridine, and 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones for Overcoming Pgp-Mediated Drug Resistance, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8601–8620. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01050.
- [8] Y. Yu, Y.S. Rahmanto, C.L. Hawkins, D.R. Richardson, The Potent and Novel Thiosemicarbazone Chelators Di-2- Crucial Thiol Systems Required for Ribonucleotide Reductase, (2011). doi:10.1124/mol.111.071324.
- [9] V.A. Rao, S.R. Klein, K.K. Agama, E. Toyoda, N. Adachi, Y. Pommier, et al., The iron

- chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase II α in breast cancer cells., *Cancer Res.* 69 (2009) 948–57. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1437.
- [10] M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D.R. Richardson, A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (2006) 14901–6. doi:10.1073/pnas.0604979103.
- [11] D.B. Lovejoy, Novel “hybrid” iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells, *Blood.* 100 (2002) 666–676. doi:10.1182/blood.V100.2.666.
- [12] Y. Aye, M.J.C. Long, J. Stubbe, Mechanistic studies of semicarbazone triapine targeting human ribonucleotide reductase in vitro and in mammalian cells: tyrosyl radical quenching not involving reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 35768–78. doi:10.1074/jbc.M112.396911.
- [13] K.Y. Salim, S.M. Vareki, W.R. Danter, S. San-Marina, J. Koropatnick, COTI-2, a novel small molecule that is active against multiple human cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*, *Oncotarget.* 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.9133.
- [14] M. Serda, D.S. Kalinowski, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, A. Szurko, A. Ratuszna, et al., Synthesis and characterization of quinoline-based thiosemicarbazones and correlation of cellular iron-binding efficacy to anti-tumor efficacy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5527–5531. doi:10.1016/j.bmcl.2012.07.030.
- [15] M. Serda, D.S. Kalinowski, N. Rasko, E. Potůčková, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, et al., Exploring the Anti-Cancer Activity of Novel Thiosemicarbazones Generated through the Combination of Retro-Fragments: Dissection of Critical Structure-Activity Relationships., *PLoS One.* 9 (2014) e110291. doi:10.1371/journal.pone.0110291.
- [16] P. V Bernhardt, M. Martínez, C. Rodríguez, M. Vazquez, Biologically active thiosemicarbazone Fe chelators and their reactions with ferrioxamine B and ferric EDTA; a kinetic study., *Dalton Trans.* 41 (2012) 2122–30. doi:10.1039/c1dt11685a.
- [17] D.S. Kalinowski, P.C. Sharpe, P. V Bernhardt, D.R. Richardson, Structure-activity relationships of novel iron chelators for the treatment of iron overload disease: the methyl pyrazinylketone isonicotinoyl hydrazone series., *J. Med. Chem.* 51 (2008) 331–44. doi:10.1021/jm7012562.
- [18] C. Stefani, G. Punnia-Moorthy, D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, P.C.

- Sharpe, et al., Halogenated 2'-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone (XBpT) Chelators with Potent and Selective Anti-Neoplastic Activity: Relationship to Intracellular Redox Activity, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 6936–6948. doi:10.1021/jm200924c.
- [19] P.J. Jansson, P.C. Sharpe, P. V Bernhardt, D.R. Richardson, Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity., *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5759–69. doi:10.1021/jm100561b.
- [20] D.B. Lovejoy, D.M. Sharp, N. Seebacher, P. Obeidy, T. Prichard, C. Stefani, et al., Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7230–44. doi:10.1021/jm300768u.
- [21] D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, Novel “hybrid” iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells, *Blood.* 100 (2002) 666–676. doi:10.1182/blood.V100.2.666.
- [22] P.A.J. Muller, K.H. Vousden, P53 Mutations in Cancer, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 2–8. doi:10.1038/ncb2641.
- [23] O.D. Staples, R.J.C. Steele, S. Lain, p53 as a therapeutic target., *Surgeon.* 6 (2008) 240–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697367>.
- [24] P. Heffeter, V.F.S.S. Pape, É.A. Enyedy, B.K. Keppler, G. Szakacs, C.R. Kowol, et al., Anticancer thiosemicarbazones: chemical properties, interaction with iron metabolism, and resistance development, *Antioxid. Redox Signal.* 30 (2018) ars.2017.7487. doi:10.1089/ars.2017.7487.
- [25] R.T. Dean, P. Nicholson, The Action of Nine Chelators on Iron-Dependent Radical Damage, *Free Radic. Res.* 20 (1994) 83–101. doi:10.3109/10715769409147506.
- [26] D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, U.T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D.R. Richardson, Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes, *Cancer Res.* 71 (2011) 5871–5880. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1218.
- [27] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 931–947. doi:10.1038/nrd4002.
- [28] M. Polimeni, E. Gazzano, Is redox signaling a feasible target for overcoming multidrug resistance in cancer chemotherapy?, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 286.

doi:10.3389/fphar.2014.00286.

- [29] F.N. Akladios, S.D. Andrew, C.J. Parkinson, Improved cytotoxicity of pyridyl-substituted thiosemicarbazones against MCF-7 when used as metal ionophores, *BioMetals*. 29 (2016) 157–170. doi:10.1007/s10534-015-9905-1.
- [30] S. Tardito, I. Bassanetti, C. Bignardi, L. Elviri, M. Tegoni, C. Mucchino, et al., Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6235–6242. doi:10.1021/ja109413c.
- [31] T.-C. Chou, Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method, *Cancer Res.* 70 (2010) 440–446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [32] T. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
- [33] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, et al., Photodynamic Therapy, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905. doi:10.1093/jnci/90.12.889.
- [34] Z. Huang, A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy, *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (2005) 283–293. doi:10.1177/153303460500400308.
- [35] M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wańczyk, et al., Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer, *Molecules*. 16 (2011) 4140–4164. doi:10.3390/molecules16054140.
- [36] R. Ma, C. Watts, Selective 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in Gliomas, *Acta Neurochir. (Wien)*. 158 (2016) 1935–1941. doi:10.1007/s00701-016-2897-y.
- [37] P. Uehlinger, J.P. Ballini, H. Van den Bergh, G. Wagnières, On the Role of Iron and one of its Chelating Agents in the Production of Protoporphyrin IX Generated by 5-Aminolevulinic Acid and its Hexyl Ester Derivative Tested on an Epidermal Equivalent of Human Skin, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1069. doi:10.1562/2005-12-04-RA-745.
- [38] O. Bech, D. Phillips, J. Moan, a J. MacRobert, A hydroxypyridinone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolaevulinic acid treated cells, *J. Photochem. Photobiol. B.* 41 (1997) 136–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440321>.
- [39] J.L. Buss, F.M. Torti, S. V Torti, The role of iron chelation in cancer therapy., *Curr.*

- Med. Chem. 10 (2003) 1021–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678674>.
- [40] D. Bauer, F.-P. Montforts, A. Losi, H. Görner, Photoprocesses of chlorin e6 glucose derivatives, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 925. doi:10.1039/c1pp05303e.
- [41] R. Takimoto, W. Wang, D.T. Dicker, F. Rastinejad, J. Lyssikatos, W.S. El-Deiry, The Mutant p53-Conformation Modifying Drug, CP-31398, Can Induce Apoptosis, *Cancer Biol. Ther.* 1 (2002) 47–55. doi:10.4161/cbt.1.1.41.
- [42] C.J. Brown, C.F. Cheok, C.S. Verma, D.P. Lane, Reactivation of p53: from peptides to small molecules, *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (2011) 53–62. doi:10.1016/j.tips.2010.11.004.
- [43] H.S. Sutherland, I.Y. Hwang, E.S. Marshall, B.S. Lindsay, W.A. Denny, C. Gilchrist, et al., Therapeutic reactivation of mutant p53 protein by quinazoline derivatives., *Invest. New Drugs.* 30 (2012) 2035–45. doi:10.1007/s10637-011-9744-z.
- [44] J. Wischhusen, U. Naumann, H. Ohgaki, F. Rastinejad, M. Weller, CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death., *Oncogene.* 22 (2003) 8233–45. doi:10.1038/sj.onc.1207198.
- [45] Y. Luu, J. Bush, K.-J. Cheung, G. Li, The p53 stabilizing compound CP-31398 induces apoptosis by activating the intrinsic Bax/mitochondrial/caspase-9 pathway., *Exp. Cell Res.* 276 (2002) 214–22. doi:10.1006/excr.2002.5526.
- [46] A. Mrozek-Wilczkiewicz, D.S. Kalinowski, R. Musiol, J. Finster, A. Szurko, K. Serafin, et al., Investigating the anti-proliferative activity of styrylzanaphthalenes and azanaphthalenediones., *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 2664–71. doi:10.1016/j.bmc.2010.02.025.
- [47] G. Pastuch-Gawolek, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Musioł, M. Serda, B. Czaplinska, et al., Small molecule glycoconjugates with anticancer activity., *Eur. J. Med. Chem.* 112 (2016) 130–144. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.061.
- [48] M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawolek, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Kuczak, M. Skonieczna, R. Musiol, Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their β 1,4-GalT inhibitory and anti-cancer properties, *Bioorg. Chem.* 84 (2019) 326–338. doi:10.1016/j.bioorg.2018.11.047.
- [49] O. WARBURG, On the origin of cancer cells., *Science.* 123 (1956) 309–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>.
- [50] D. Prabakaran, B. Wang, J.D. Feuerstein, J.A. Sinclair, P. Bijpuria, L.I. Jepeal, et al., Regulatory Peptides Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates the proliferation of colorectal cancer cells, *Regul. Pept.* 163 (2010) 74–80.

- doi:10.1016/j.regpep.2010.04.005.
- [51] V. Oliveri, M.L. Giuffrida, G. Vecchio, C. Aiello, M. Viale, Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs., *Dalton Trans.* 41 (2012) 4530–5. doi:10.1039/c2dt12371a.
- [52] M. Rams-Baron, M. Dulski, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Korzec, W. Cieslik, E. Spaczyńska, et al., Synthesis of New Styrylquinoline Cellular Dyes, Fluorescent Properties, Cellular Localization and Cytotoxic Behavior, *PLoS One.* 10 (2015) e0131210. doi:10.1371/journal.pone.0131210.
- [53] B. Czaplinska, A. Maron, J.G. Malecki, G. Szafraniec-Gorol, M. Matussek, K. Malarz, et al., Comprehensive exploration of the optical and biological properties of new quinoline based cellular probes, *Dye. Pigment.* 144 (2017) 119–132. doi:10.1016/j.dyepig.2017.05.029.
- [54] T.A. Burley, J. Mączczyńska, A. Shah, W. Szopa, K.J. Harrington, J.K.R. Boulton, et al., Near-infrared photoimmunotherapy targeting EGFR-Shedding new light on glioblastoma treatment, *Int. J. Cancer.* 00 (2018) 1–12. doi:10.1002/ijc.31246.
- [55] D.O. Kiesewetter, G. Krämer-Marek, Y. Ma, J. Capala, Radiolabeling of HER2 specific Affibody(R) molecule with F-18., *J. Fluor. Chem.* 129 (2008) 799–805. doi:10.1016/j.jfluchem.2008.06.021.
- [56] F.B. Furnari, T.F. Cloughesy, W.K. Cavenee, P.S. Mischel, Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma., *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 302–10. doi:10.1038/nrc3918.
- [57] J. Peszke, M. Dulski, A. Nowak, K. Balin, M. Zubko, S. Sułowicz, et al., Unique properties of silver and copper silica-based nanocomposites as antimicrobial agents, *RSC Adv.* 7 (2017) 28092–28104. doi:10.1039/C7RA00720E.
- [58] M. Dulski, K. Dudek, D. Chalou, J. Kubacki, S. Sulowicz, Z. Piotrowska-Seget, et al., Toward the Development of an Innovative Implant: NiTi Alloy Functionalized by Multifunctional β -TCP+Ag/SiO₂ Coatings, *ACS Appl. Bio Mater.* (2019) acsabm.8b00510. doi:10.1021/acsabm.8b00510.
- [59] M. Musiał, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, E. Zorębski, M. Dzida, Pyrrolidinium-Based Ionic Liquids as Sustainable Media in Heat-Transfer Processes, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 11024–11033. doi:10.1021/acssuschemeng.7b02918.
- [60] M. Dzida, M. Musiał, E. Zorebski, S. Jęzak, J. Skowronek, K. Malarz, et al., Comparative study of the high pressure thermophysical properties of 1-ethyl-3-

methylimidazolium and 1,3-diethylimidazolium ethyl sulfates for use as sustainable and efficient hydraulic fluids, ACS Sustain. Chem. Eng. (2018)

acsuschemeng.8b02318. doi:10.1021/acssuschemeng.8b02318.

- [61] M. Musiał, M. Kuczak, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, E. Zorębski, M. Dzida, Trisubstituted Imidazolium-Based Ionic Liquids as Innovative Heat Transfer Media in Sustainable Energy Systems, ACS Sustain. Chem. Eng. (2018)

acsuschemeng.8b01317. doi:10.1021/acssuschemeng.8b01317.

Alex Mrozek-Wilczkiewicz