

Autoreferat



dr n. med. Anna Piotrowska

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Lekarski

Katedra i Zakład Histologii

Gdańsk 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	4
Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
Wykaz publikacji stanowiących cykl habilitacyjny	4
Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	6
Podsumowanie	30
Bibliografia	31
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	36
5.1. Udział w realizacji projektów we współpracy międzynarodowej	36
5.2. Udział w realizacji projektów we współpracy z naukowcami z ośrodków krajowych.....	39
5.3. Prace badawcze realizowane we współpracy z innymi jednostkami naukowymi Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.....	39
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę, omówienie pozostałych osiągnięć.....	41
6.1. Pozostały dorobek naukowy	41
6.2. Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach.....	41
6.3. Uczestnictwo w programach europejskich, innych programach międzynarodowych.....	44
6.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych	45
6.5. Recenzowanie artykułów w czasopismach naukowych.....	45
6.6. Aktywny udział w konferencjach naukowych po doktoracie	45
6.7. Ukończone kursy i szkolenia.....	47
6.8. Udział w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych.....	48
6.9. Nagrody za działalność naukową	48
6.10. Działalność dydaktyczna.....	49
6.11. Opieka nad studentami.....	51
6.12. Działalność popularyzująca naukę	51
6.13. Plany naukowe.....	52
6.14. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego	52

1. Imię i nazwisko: Anna Piotrowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

2015 – doktor nauk medycznych, Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski,

dyscyplina: biologia medyczna, specjalność: endokrynologia molekularna

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Modulacyjny wpływ witaminy D na działanie reaktywnych form tlenu w keratynocytach”

Promotor: prof. dr hab. Michał Żmijewski

2007 – mgr biologii, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii,

Specjalizacja: biologia molekularna

Tytuł pracy magisterskiej:

„Wpływ IbpA - białka szoku termicznego Escherichia coli na właściwości białka opiekuńczego His-IbpB oraz wpływ IbpB na właściwości His-IbpA w różnych warunkach temperaturowych”

Promotor: prof. dr hab. Barbara Lipińska

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych:

2016 – do chwili obecnej adiunkt w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

2007 – 2016 asystent w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (pierwotnie Akademii Medycznej w Gdańsku);

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„*Hormonalna forma witaminy D oraz jej pochodne w leczeniu skojarzonym czerniaka w modelu przedklinicznym*”

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF = 23.503 i MEiN = 470.

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

1. **Anna Piotrowska**, Justyna Wierzbicka, Sharmin Nadkarni, Geoffrey Brown, Andrzej Kutner, Michał A. Żmijewski.

Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ Against Human Malignant Melanoma Cell Lines. International Journal of Molecular Sciences 2016, 17(1), 76; DOI: 10.3390/ijms17010076

IF = 3.226

MEiN = 30.0

Pierwszy autor, udział w planowaniu doświadczeń, wiodący udział w wykonywaniu doświadczeń, analizie danych, analizie statystycznej, udział w interpretacji wyników. Autor pierwotnej wersji manuskryptu publikacji, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu do publikacji.

2. **Anna Piotrowska**, Justyna Wierzbicka, Kamila Kwiatkowska, Michał Chodyński, Andrzej Kutner, Michał A. Żmijewski.

Antiproliferative activity of side-chain truncated vitamin D analogs (PRI-1203 and PRI -1204) against human malignant melanoma cell lines. European Journal of Pharmacology 881; 2020; 173170; DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173170

IF = 4.432

MEiN = 100.0

Pierwszy autor, udział w planowaniu doświadczeń, wiodący udział w wykonywaniu doświadczeń, analizie statystycznej oraz interpretacji wyników. Autor pierwotnej wersji

manuskryptu publikacji, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu do publikacji, pozyskanie części środków na sfinansowanie badań – projekt finansowany ze środków Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, MN 01–0250/08/280).

3. **Anna Piotrowska**, Justyna Wierzbicka, Agnieszka Rybarczyk, Robert C. Tuckey, Andrzej. T. Słomiński, Michał A. Żmijewski.

Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. International Journal of Oncology; 54: 1481-1495, 2019; DOI: 10.3892/ijo.2019.4725

IF = 3.899

MEiN = 100.0

Pierwszy autor, pomysłodawca projektu, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, nadzór merytoryczny. Wiodący udział w przeprowadzaniu doświadczeń, analizie danych, analizie statystycznej oraz interpretacji wyników. Autor pierwotnej wersji manuskryptu publikacji, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu do publikacji, pozyskanie środków na sfinansowanie badań – projekt finansowany ze środków Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, MN 01-0250/08/280).

4. **Anna Piotrowska**, Fernando Pereira Beserra, Justyna Marta Wierzbicka, Joanna Irena Nowak, Michał A. Żmijewski.

Vitamin D Enhances Anticancer Properties of Cediranib, a VEGFR Inhibitor, by Modulation of VEGFR2 Expression in Melanoma Cells. Frontiers in Oncology; 2021 Dec 24;11:763895; DOI: 10.3389/fonc.2021.763895

IF = 5.738

MEiN = 100.0

Pierwszy autor, pomysłodawca projektu, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, nadzór merytoryczny. Wiodący udział w przeprowadzaniu doświadczeń, analizie danych, analizie statystycznej oraz interpretacji wyników. Autor pierwotnej wersji manuskryptu publikacji, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu do publikacji, pozyskanie środków na sfinansowanie badań – projekt finansowany ze środków Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, MN 01-0250/08/280).

5. **Anna Piotrowska**, Renata Zaucha, Oliwia Król, Michał A. Żmijewski.

Vitamin D modulates the response of patient-derived metastatic melanoma cells to anticancer drugs. International Journal of Molecular Sciences 2023, 24, 8037;

DOI: 10.3390/ijms24098037

IF = 6.208

MEiN = 140.0

Pierwszy autor i autor korespondencyjny, pomysłodawca projektu, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, ich przeprowadzaniu, analizie danych, analizie statystycznej oraz interpretacji wyników, autor pierwotnej wersji manuskryptu, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu do publikacji, nadzór merytoryczny, pozyskanie środków na sfinansowanie badań – projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, 2021/05/X/NZ7/00470.

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

WPROWADZENIE

Według Światowej Organizacji Zdrowia nawet co trzeci obecnie diagnozowany nowotwór to rak skóry [1]. Raki skóry są najczęściej występującymi nowotworami złośliwymi u osób rasy kaukaskiej, ryzyko zachorowania w ciągu życia w tej grupie przekracza 20% [2]. Wśród nowotworów skóry dominuje rak podstawnokomórkowy (ang. *basal cell carcinoma*, BCC), stanowiący 80% raków skóry. Drugim najczęstszym nowotworem skóry jest rak kolczystokomórkowy (rak płaskonabłonkowy) (ang. *squamous cell carcinoma*, SCC), odpowiadający za około 15-20% zachorowań [2]. Czerniak (ang. *malignant melanoma*, MM), który stanowi niewielki odsetek w grupie nowotworów skóry, gdyż odpowiada jedynie za 1-4% zachorowań [3-5], jednocześnie jest odpowiedzialny za zdecydowaną większość zgonów spowodowanych nowotworami tej lokalizacji [6-9], stanowi tym samym istotny problem kliniczny. Co więcej, od 1975 roku liczba przypadków czerniaka systematycznie wzrasta [10]. Wprawdzie ostatnio obserwuje się zahamowanie tego alarmującego trendu [11], jednak zgodnie z prognozami American Cancer Society czerniak plasuje się obecnie na piątym miejscu wśród najczęściej diagnozowanych typów nowotworów u obu płci [12]. W Polsce w latach 1980-2010 liczba zachorowań na czerniaka zwiększyła się blisko trzykrotnie [13,14]. Obecnie standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosi około 6/100 000, a więc rocznie odnotowuje się około 3800 nowych zachorowań [13].

Leczenie czerniaka jest zależne od stopnia zaawansowania wykrytej choroby. W przypadku czerniaków o charakterze zmiany miejscowej leczeniem pierwszego wyboru jest chirurgiczne usunięcie zmiany nowotworowej z uwzględnieniem odpowiedniego marginesu bezpieczeństwa uzupełnione biopsją wartowniczego węzła chłonnego [9,15]. Pięcioletnia przeżywalność pacjentów z czerniakiem o charakterze zmiany miejscowej wynosi 88-100% [12]. W chorobie uogólnionej stosuje się natomiast chemioterapię, radioterapię, terapię fotodynamiczną, terapię ukierunkowaną molekularnie, bądź immunoterapię [15,16]. Pierwszym chemioterapeutyką zarejestrowaną w 1975 roku przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) w leczeniu czerniaka była dakarbazyna [17]. W chemioterapii czerniaka stosuje się również temozolomid, paklitaksel czy cisplatynę [13,15,16]. Skuteczność dakarbazyny stosowanej w monoterapii jest ograniczona, bowiem zaledwie u 15% chorych obserwuje się obiektywną odpowiedź, zaś mediana czasu trwania odpowiedzi to jedynie 4 miesiące [13].

Prawdziwy przełom w leczeniu zaawansowanego czerniaka nastąpił niewątpliwie w 2011 roku, kiedy po latach badań zarejestrowano pierwszy lek ukierunkowany molekularnie, wemurafenib, oraz pierwszy lek z grupy inhibitorów punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej (ang. *immune-checkpoint inhibitors*, ICIs), ipilimumab [15,16]. Terapię ukierunkowaną molekularnie stosuje się u pacjentów, u których, za pomocą zwalidowanego testu, stwierdza się obecność mutacji w szlaku kinaz MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) [13]. Wemurafenib jest selektywnym inhibitorem zmutowanej kinazy BRAF stosowanym u pacjentów z nieoperacyjnym bądź zaawansowanym czerniakiem z mutacją *BRAF* [13,15]. Wyniki badania rejestracyjnego III fazy opublikowane w 2011 roku były bardzo obiecujące, gdyż 48% pacjentów z mutacją *BRAF*^{V600E} odpowiedziało na leczenie wemurafenibem w porównaniu do zaledwie 5% pacjentów leczonych dakarbazyną [18]. W kolejnych latach sukcesywnie rejestrowano nowe inhibitory BRAF, a także inhibitory białka MEK, również należącego do szlaku kinaz MAPK, takie jak dabrafenib, trametynib, kobymetinib czy enkorafenib [15,16]. Obecnie terapia oparta na kombinacjach inhibitorów BRAF/MEK jest standardowo stosowana u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem z potwierdzoną mutacją kinazy BRAF [19]. Drugim powszechnie stosowanym schematem leczenia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem jest immunoterapia nowej generacji, opierająca się na zastosowaniu inhibitorów punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej (ang. *immune checkpoint inhibitors*, ICIs), takich jak przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi CTLA-4 (ang. *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) [9,15,16] czy receptorowi PD-1 (ang. *programmed cell death protein 1*) [9,15,16,20] limfocytów T. Uzupełnieniem schematów

leczenia czerniaka jest terapia z zastosowaniem inhibitorów angiogenezy. Progresja czerniaka z radialnej do wertykalnej fazy wzrostu powiązana jest ze znaczną aktywnością angiogenną tego nowotworu, niezbędną podczas tworzenia przerzutów odległych [21-23]. Uważa się, że receptory VEGFRs (ang. *vascular endothelial growth factor receptors*) należą do najważniejszych regulatorów procesu angiogenezy nowotworowej [23]. W czerniaku obserwuje się nadekspresję zarówno śródbłonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu, jak i jego receptorów, VEGFR1-3, co wiąże się z niekorzystnymi rokowaniami [15,23,24]. Do inhibitorów angiogenezy zalicza się m.in. przeciwciało monoklonalne anty-VEGF, bewacyzumab, przeciwciało przeciwko receptorowi VEGFR2, ramucyrumab, a także szereg inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych o szerokim spektrum działania, takich jak sorafenib, imatynib czy cedyranib [23,25,26]. Dotychczasowe badania wykazały, że terapia antyangiogenna stosowana jako monoterapia w czerniaku nie jest wystarczająco skuteczna [23,25,26], natomiast może wspierać efekty terapeutyczne innych schematów leczenia czerniaka. Uważa się także, że skuteczność leków antyangiogennych w czerniaku może być wzmocniona poprzez stosowanie ich w schemacie skojarzonym z innymi substancjami terapeutycznymi [26].

Dzięki wprowadzeniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu zaawansowanego czerniaka, w latach 2013-2016 odnotowano bezprecedensowy w historii leczenia nowotworów, blisko 18% spadek całkowitej śmiertelności spowodowanej czerniakiem [27]. Całkowita pięcioletnia przeżywalność pacjentów z zaawansowanym czerniakiem wzrosła z 10% [28] do 32% [12]. Nowe formy terapii czerniaka bezsprzecznie zrewolucjonizowały więc leczenie tego nowotworu, są one jednak obarczone pewnymi istotnymi ograniczeniami. Szacuje się, iż u około 50% pacjentów leczonych inhibitorami BRAF w przeciągu 6-10 miesięcy, zaś u pacjentów leczonych kombinacją BRAFi/MEKi w ciągu 11-15 miesięcy, nieuchronnie rozwinię się oporność na stosowane leczenie [29]. Około 40-60% pacjentów nie odpowiada na immunoterapię, zaś u sporej części pacjentów pierwotnie odpowiadających na zastosowane leczenie dochodzi do wznowy nowotworu w ciągu dwóch lat [30]. Dane te wskazują na konieczność poszukiwania wciąż nowych rozwiązań terapeutycznych, bądź nowych schematów skojarzonego leczenia czerniaka. Zważywszy na swe plejotropowe właściwości biologiczne – w ostatnich latach to właśnie witamina D stała się obiektem zainteresowań jako naturalna substancja, która potencjalnie mogłaby wspierać leczenie przeciwnowotworowe.

Witamina D jest związkami sekosteroidowym powstającym w skórze z 7-dehydrocholesterolu pod wpływem promieniowania ultrafioletowego B (UVB) [31,32]. Powstająca w ten sposób witamina D₃ jest w istocie nieaktywnym prohormonem i do nabycia pełnej aktywności biologicznej wymaga dwóch, następujących po sobie, hydroksylacji [33].

Ostatecznym produktem jest hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, czyli kalcytriol [32]. Co ciekawe, niektóre rośliny i grzyby pod wpływem promieniowania UV z ergosterolu wytwarzają witaminę D_2 [34]. Hormonalna forma witaminy D najpowszechniej kojarzona jest z utrzymaniem prawidłowej gospodarki wapniowo-fosforanowej, kluczowej do utrzymania dobrostanu układu kostnego [31]. Począwszy jednak od odkrycia witaminy D w pierwszej połowie XX wieku [35,36] lata badań nad jej rolą dowiodły, że wykazuje ona także szereg właściwości przeciwnowotworowych, polegających m.in. na hamowaniu podziałów komórkowych, hamowaniu angiogenezy, promowaniu procesu różnicowania, uwrażliwianiu komórek nowotworowych na apoptozę, czy wreszcie hamowaniu tzw. przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), co potwierdzono w wielu różnych typach komórek nowotworowych, w tym w komórkach czerniaka [37-40]. Wykazano ponadto, że witamina D oddziałuje nie tylko na komórki nowotworowe, ale także wpływa na komórki podścieliska guza, moduluje bowiem aktywność fibroblastów związanych z nowotworem (ang. *cancer-associated fibroblasts*, CAFs), hamując w ten sposób wzrost guza oraz rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych [38,41]. Wykazano, że zarówno $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jak i nowe pochodne witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, takie jak $20(\text{OH})\text{D}_3$, chronią DNA keratynocytów oraz melanocytów przed uszkodzeniami powstającymi pod wpływem promieniowania UV, które jest najważniejszym środowiskowym czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka [42]. Wykazano, że niedobór witaminy D u pacjentów z czerniakiem powiązany jest z gorszym rokowaniem, wyższym indeksem mitotycznym oraz tworzeniem owrzodzenia [43]. Inne badanie wykazało, iż niedobór witaminy D powiązany jest z czerniakami o większej grubości w skali Breslowa i wyższą śmiertelnością spowodowaną tym nowotworem [44]. Badania dowodzą, że suplementacja witaminą D może obniżać ryzyko rozwoju nowotworów [45,46]. Grupa Harriet Johansson wykazała, że pacjenci, którzy rozpoczęli suplementację witaminą D (100 000 jednostek, co 50 dni) po resekcji czerniaka w stadium II i osiągnęli dwukrotny wzrost poziomu witaminy D w surowicy w porównaniu ze stanem wyjściowym, zaś ich zmiana nowotworowa miała grubość poniżej 3 mm w skali Breslowa, wykazywali dłuższe przeżycie bez objawów choroby w porównaniu z pacjentami, u których stwierdzono zmiany o grubości powyżej 3 mm, zaś suplementacja nie przyniosła wzrostu poziomu witaminy D w surowicy [47]. Warto dodać, że w momencie rozpoczęcia badania 80% pacjentów z czerniakiem cierpiało na niedobór witaminy D [47]. Jedno z najświeższych doniesień wykazało, że wśród chorych z czerniakiem otrzymujących immunoterapię skierowaną przeciwko antygenowi PD-1, w grupie z prawidłowym poziomem witaminy D w surowicy ($>30\text{ng/mL}$), wyjściowym bądź uzyskanym

w trakcie leczenia w wyniku suplementacji, odnotowano większy odsetek pacjentów wykazujących obiektywną odpowiedź na leczenie, a także dłuższy czas bez progresji choroby w porównaniu z chorymi, u których poziom witaminy D pozostawał niski w trakcie leczenia [48]. Obecnie prowadzone badanie III fazy ViDMe ma na celu ocenę ochronnego wpływu suplementacji witaminy D przed nawrotem czerniaka po resekcji pierwotnej zmiany skórnej [49]. Co ciekawe, badania wykazały odwrotną korelację pomiędzy poziomem ekspresji receptora witaminy D, VDR, a także głównego enzymu odpowiadającego za finalną aktywację witaminy D, CYP27B1, a progresją czerniaka oraz rokowaniami pacjentów [50-52]. Analiza transkryptomu pacjentów z czerniakiem wykazała, że wyższa ekspresja receptora witaminy D, VDR, jest niezależnym czynnikiem protekcyjnym przed zgonem spowodowanym czerniakiem, bez względu na stopień zaawansowania nowotworu, jego lokalizację czy indeks mitotyczny [53]. Przy wykorzystaniu modeli komórkowych oraz zwierzęcych wybranych nowotworów wykazano także, że witamina D może wzmacniać przeciwnowotworowe działanie różnych leków, takich jak gemcytabina, cisplatyna, doksorubicyna czy uwrażliwiać komórki nowotworowe na napromieniowanie wiązką protonów [54-56]. Rola witaminy D w modulowaniu odpowiedzi komórek czerniaka na zastosowane leczenie przeciwnowotworowe nie została natomiast dotąd szeroko poznana, co skłoniło mnie do podjęcia badań opisanych w **pracach nr 3, 4 i 5**. Pewnym ograniczeniem możliwości włączenia witaminy D do istniejących schematów terapii przeciwnowotworowej jest potencjalna możliwość wystąpienia intoksykacji powiązanej z rozwojem hiperkalcemii [57,58], a więc zasadne wydaje się także poszukiwanie nowych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, które mogłyby znaleźć zastosowanie m.in. w leczeniu skojarzonym czerniaka. Stało się to przedmiotem badań opisanych w **pracach nr 1, 2 i 3**.

CEL NAUKOWY PREZENTOWANEGO OSIĄGNIĘCIA

Celem naukowym prezentowanego osiągnięcia była ocena biologicznej aktywności nowych pochodnych witaminy D oraz ocena wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, i jej wybranych pochodnych, na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, leków antyangiogennych oraz leków ukierunkowanych molekularnie wobec komórek czerniaka.

Szczegółowe cele, rozpatrywane w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, obejmowały:

1. Ocenę przeciwnowotworowych właściwości nowych analogów witaminy D w monoterapii czerniaka. Analiza wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na właściwości biologiczne nowych analogów (**Prace nr 1 i 2**).
- 1a. Ocenę wybranych właściwości biologicznych nowych, punktowo modyfikowanych, analogów $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ w komórkach czerniaka. Analiza wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na przeciwnowotworowe właściwości nowych analogów; rola indukowanej pigmentacji komórek czerniaka oraz ekspresji receptora VDR (**Praca nr 1**);
- 1b. Ocenę właściwości biologicznych nowych analogów witaminy D o skróconym łańcuchu bocznym w komórkach czerniaka – analiza wpływu skrócenia łańcucha bocznego oraz modyfikacji geometrii pierścienia A na właściwości przeciwnowotworowe nowych analogów witaminy D; ocena translokacji receptora VDR do jądra komórkowego (**Praca nr 2**);
2. Analizę możliwości zastosowania hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oraz wybranych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, w leczeniu skojarzonym czerniaka (**Prace nr 3, 4 i 5**).
- 2a. Analizę wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oraz nowych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny (**Praca nr 3**);
- 2b. Analizę wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oraz analogu witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, kalcyotropolu, na działanie antyangiogenego leku, cedyranibu, w komórkach czerniaka; ocena ekspresji receptora VEGFR2 (**Praca nr 4**);
- 2c. Opracowanie modelu badawczego opierającego się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio z materiału biopsyjnego pobranego od pacjentów chorych na zaawansowanego czerniaka. Analiza wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na działanie cedyranibu bądź wemurafenibu (inhibitora kinazy BRAF) w opracowanym modelu badawczym; ocena bioenergetyki mitochondriów (**Praca nr 5**).

Cel 1. Ocena przeciwnowotworowych właściwości nowych analogów witaminy D w monoterapii czerniaka. Analiza wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na właściwości biologiczne nowych analogów.

Cel 1a. Ocena wybranych właściwości biologicznych nowych, punktowo modyfikowanych, analogów 1,25(OH)₂D₂ w komórkach czerniaka. Analiza wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na przeciwnowotworowe właściwości nowych analogów; rola indukowanej pigmentacji komórek czerniaka oraz ekspresji receptora VDR.

“Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ Against Human Malignant Melanoma Cell Lines.”

Celem **pracy nr 1** była ocena właściwości biologicznych pięciu nowych, punktowo modyfikowanych, analogów 1,25(OH)₂D₂, PRI-1730 – PRI-1734, w komórkach czerniaka. Analogi witaminy D syntetyzowane były przez grupę Profesora Andrzeja Kutnera (Instytut Farmaceutyczny w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny). Właściwości biologiczne tych pochodnych były porównywane z aktywną formą witaminy D₂ (związek wyjściowy do modyfikacji), czyli 1,25(OH)₂D₂, a także z hormonalną formą witaminy D, 1,25(OH)₂D₃. Analizowany był wpływ modyfikacji strukturalnych, takich jak dodanie grupy hydroksylowej, bądź saturacja węgla w łańcuchu bocznym, na aktywność przeciwnowotworową syntetyzowanych analogów witaminy D. Badania prowadzono w dwóch liniach komórkowych czerniaka, linii A375 oraz linii SK-MEL188b, będącej spontanicznym subklonem wyjściowej linii SK-MEL188. Wybrane do badań linie czerniaka różnią się między sobą m. in. w dwóch kluczowych aspektach. Pierwsza z różnic dotyczy ekspresji receptora witaminy D, VDR, który jest aktywowany przez 1,25(OH)₂D₃ w tzw. ścieżce genomowej działania witaminy D, regulującej szereg procesów wewnątrzkomórkowych. Ekspresja VDR w trakcie realizowanych badań została potwierdzona metodą real-time PCR w linii A375, natomiast w linii SK-MEL188b wykazano brak mRNA VDR, niezależnie od stymulacji 1,25(OH)₂D₃, bądź jej braku. Ta istotna różnica pomiędzy dwiema badanymi liniami czerniaka pozwoliła odpowiedzieć na pytanie, czy obserwowane właściwości biologiczne nowych analogów witaminy D są zależne od obecności jej klasycznego receptora. Druga z istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami czerniaka dotyczyła syntezy melaniny. Linia A375 jest linią amelanotyczną, nie produkującą melaniny, zaś w linii SK-MEL188b możliwa jest indukcja pigmentacji poprzez zmianę stężenia tyrozyny, będącej prekursorem melaniny, w pożywce

hodowlanej (zmieszanie pożywek DMEM i F10 (50:50, v/v) pozwala na zwiększenie stężenia tyrozyny z 11 do 217 μM). Dzięki temu możliwe było określenie czy zahamowanie wzrostu komórek czerniaka przez nowe analogi witaminy D zależne jest od pigmentacji tych komórek.

Przeprowadzone badania wykazały, że nowe analogi witaminy D_2 stosowane w stężeniu 100 nM efektywnie hamowały wzrost komórek czerniaka linii A375. Obserwowano maksymalne zahamowanie wzrostu komórek o 20-30% pod wpływem nowych analogów w porównaniu z 10-15% pod wpływem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bądź $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ w czasie 24 godzinnej inkubacji. Wartość IC_{50} wyliczona dla badanych związków oscylowała pomiędzy 1.5 nM dla PRI-1730 a 0.028 nM dla analogu PRI-1733. Analiza cytometryczna cyklu komórkowego wykazała, że wszystkie badane analogi witaminy D z wyjątkiem PRI-1734, zwiększały odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, czemu towarzyszył proporcjonalny spadek odsetka komórek w fazach S oraz G2/M.

W kolejnym etapie badań analogiczne doświadczenia zostały przeprowadzone w komórkach czerniaka linii SK-MEL188b, niewykazującej ekspresji receptora VDR. Na podstawie wyników testu SRB wykazano, że badane związki, włączając w to zarówno $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jak i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, nie hamowały proliferacji komórek SK-MEL188b, które nie produkowały istotnych ilości barwnika melaniny. Jedynym wyjątkiem był analog PRI-1731, który o około 10% zahamował wzrost badanych komórek, zaś wyliczona wartość IC_{50} wynosiła dla tego związku 0.408 nM. Analiza cyklu komórkowego wykazała spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost odsetka komórek w fazie S, bądź G2/M cyklu komórkowego pod wpływem działania nowych analogów, z wyjątkiem PRI-1734. Co ciekawe, zwiększenie stężenia badanych analogów do 1000 nM nie zwiększało ich efektywności.

Ponieważ badania wykazały [50,59], że proces pigmentacji komórek czerniaka może negatywnie wpływać zarówno na metabolizm, jak i aktywność witaminy D, z drugiej zaś strony, doniesienia wykazywały także, że pigmentacja komórek może paradoksalnie uwrażliwiać komórki czerniaka na działanie niektórych analogów witaminy D [60], prowadzone badania zostały więc rozszerzone o indukcję pigmentacji komórek czerniaka linii SK-MEL188b. Zaobserwowano, że w zastosowanych warunkach doświadczalnych, indukowana pigmentacja komórek czerniaka linii SK-MEL188b znacząco uwrażliwiła je na działanie badanych analogów witaminy D. Wartości IC_{50} obliczone dla badanych analogów oscylowały pomiędzy 0.04 nM dla PRI-1732 a 0.0004 nM dla analogu PRI-1731.

Podsumowanie Pracy 1:

Zgodnie z zaplanowanym celem zbadano właściwości biologiczne pięciu nowych, punktowo modyfikowanych, analogów $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, PRI-1730 – PRI-1734, w komórkach czerniaka. Przeprowadzone badania wykazały, że badane analogi witaminy D_2 efektywnie hamowały wzrost komórek czerniaka linii A375, najefektywniejszy okazał się analog PRI-1733. Wprowadzenie modyfikacji strukturalnych, a mianowicie dodanie grupy hydroksylowej w pozycji C-22 oraz wysycenie wiązania w łańcuchu bocznym, obniżało aktywność analogu PRI-1730 w porównaniu do wyjściowego związku, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Korzystna natomiast okazała się modyfikacja 5,6-*trans*, bowiem analog PRI-1732 dużo efektywniej hamował wzrost komórek A375 w porównaniu ze związkiem PRI-1730. Hamowanie proliferacji komórek czerniaka przez nowe analogi witaminy D_2 wydaje się zależeć od ekspresji klasycznego receptora witaminy D, VDR, ponieważ badane związki nie hamowały podziałów komórek SK-MEL188b pozbawionych ekspresji VDR. Co ciekawe, indukcja pigmentacji uwrażliwiała komórki SK-MEL188b na działanie badanych analogów witaminy D. Badane analogi witaminy D_2 wydają się być obiecującą alternatywą dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a ich właściwości hamujące proliferację komórek wydają się być szczególnie cenne, co istotne z klinicznego punktu widzenia, w przypadku komórek czerniaka produkujących barwnik, melaninę, co z reguły powiązane jest ze zwiększoną opornością na działanie leków [61].

Przeprowadzone badania wykazały zależność aktywności badanych analogów witaminy D od wprowadzanych modyfikacji strukturalnych. Wprawdzie badane analogi witaminy D hamowały wzrost komórek czerniaka linii A375, jednak w linii SK-MEL188b ich aktywność była dużo słabsza i zależna od pigmentacji komórek. Obserwacja ta skłoniła mnie do poszukiwania innych modyfikacji strukturalnych witaminy D, potencjalnie zwiększających aktywność powstających nowych analogów witaminy D. Wyniki tej analizy opisano w kolejnych publikacjach (**prace 2 i 3**), składających się na omawiane osiągnięcie naukowe.

Cel 1b. Ocena właściwości biologicznych nowych analogów witaminy D o skróconym łańcuchu bocznym w komórkach czerniaka – analiza wpływu skrócenia łańcucha bocznego oraz modyfikacji geometrii pierścienia A na właściwości przeciwnowotworowe nowych analogów witaminy D; ocena translokacji receptora VDR do jądra komórkowego.

“Antiproliferative activity of side-chain truncated vitamin D analogs (PRI-1203 and PRI-1204) against human malignant melanoma cell lines.”

Powyższa praca składała się na cykl publikacji nagrodzonych Zespołową Nagrodą Naukową I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2022 roku (p. 6.9.1, str. 48).

Celem **pracy nr 2** była ocena właściwości biologicznych dwóch nowych analogów witaminy D₃, PRI-1203 oraz PRI-1204, w komórkach czerniaka. Właściwości biologiczne tych pochodnych były porównywane z hormonalną formą witaminy D, czyli 1,25(OH)₂D₃. Analizowany był wpływ modyfikacji strukturalnej, polegającej na skróceniu łańcucha bocznego, na aktywność przeciwnowotworową syntetyzowanych analogów witaminy D. Badane analogi są geometrycznymi izomerami. W PRI-1203 grupa metylenowa przy węglu C-19 odzwierciedla jej naturalne położenie w cząsteczce kalcytriolu, podczas gdy PRI-1204 jest geometrycznym izomerem w pozycji 5,6-*trans*. Analogi witaminy D syntetyzowane były pod kierunkiem Profesora Andrzeja Kutnera (Instytut Farmaceutyczny w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny). Badania prowadzono w dwóch liniach komórkowych czerniaka, linii A375 oraz linii RPMI7951, dzięki czemu możliwa była weryfikacja odpowiedzi komórek czerniaka na badane analogi witaminy D w kontekście progresji choroby. Linia czerniaka A375 została wyprowadzona z pierwotnej zmiany skórnej, zaś jej komórki niosą mutację w genach *BRAF* oraz *CDKN2A* zgodnie z informacją podawaną przez American Type Culture Collection. Z kolei linia RPMI7951 wyprowadzona została z przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych i poza wspomnianymi mutacjami obecnymi w komórkach czerniaka linii A375, komórki linii RPMI7951 niosą także mutację w genach *PTEN* oraz *TP53*, odzwierciedlają zatem bardziej agresywny model czerniaka.

Przeprowadzone badania z zastosowaniem kolorymetrycznego testu SRB wykazały, że badane analogi, szczególnie PRI-1203, efektywnie hamowały wzrost zarówno komórek czerniaka linii A375, jak i RPMI7951. Obserwowano obniżenie żywotności komórek o około 20% dla analogu PRI-1203 i o około 10% dla analogu PRI-1204, zaś wyliczone wartości IC₅₀ dla badanych związków wynosiły <2 nM. Warto podkreślić, że ocenę żywotności komórek linii A375 poszerzono o analizę tempa proliferacji tych komórek w czasie rzeczywistym (obserwacja wzrostu komórek przez 72 h), przy zastosowaniu innowacyjnego mikroskopu Olympus cell Vivo IX 83, wyposażonego w komorę do inkubacji komórek, zapewniającą utrzymanie stałych, kontrolowanych warunków hodowli komórek w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Dzięki temu możliwa była nie tylko ocena końcowego efektu działania badanych analogów witaminy D, ale również analiza dynamiki podziałów komórkowych. Wykazano, że hormonalna forma witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, najefektywniej hamowała

proliferaację komórek czerniaka linii A375 ($p=0.0392$). Podobny trend obserwowano także dla badanych analogów, jednak bez wykazania istotności statystycznej w przeprowadzonych obliczeniach. Cytometryczna analiza cyklu komórkowego wykazała, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz analog PRI-1203 zwiększały odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1 cyklu komórkowego.

Przeprowadzono także ocenę ekspresji wybranych genów kodujących białkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin, p21 oraz p27, białka receptorowe dla witaminy D, bądź białka zaangażowane w jej metabolizm na poziomie mRNA metodą real-time PCR. Co ciekawe, mimo obserwowanego zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G0/G1 spowodowanego działaniem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bądź analogu PRI-1203, żaden z badanych nowych analogów witaminy D nie wpływał na ekspresję genów *CDKN1A* oraz *CDKN1B*, kodujących odpowiednio białka p21 i p27, na poziomie mRNA w zastosowanych warunkach doświadczalnych. Jedynie w komórkach czerniaka linii RPMI7951 obserwowano niewielki wzrost poziomu mRNA genu *CDKN1A* pod wpływem inkubacji komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Może to sugerować oddziaływanie nowych analogów witaminy D z genami kodującymi inne inhibitory kinaz zależnych od cyklin, bądź modyfikacje aktywności inhibitorów kinaz zależnych od cyklin na poziomie potranslacyjnym. PRI-1203 obniżał poziom mRNA genu *VDR* w komórkach czerniaka linii A375, zaś PRI-1204 w komórkach linii RPMI7951. Oba związki dużo słabiej indukowały także ekspresję genu kodującego *CYP24A1*.

Biorąc pod uwagę, iż modyfikacja łańcucha bocznego w strukturze witaminy D może wpływać na jej wiązanie do receptora VDR, w kolejnym kroku oceniono czy nowe analogi witaminy D będą indukować translokację VDR do jądra komórkowego. Obserwowano translokację receptora VDR do jądra komórkowego jedynie pod wpływem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w zastosowanych warunkach doświadczalnych, zaś żaden z badanych nowych analogów witaminy D nie indukował tego procesu. Oznacza to, że mechanizm działania tych związków jest niezależny od aktywacji ścieżki genomowej. Zważywszy, że wraz z progresją czerniaka obserwuje się stopniową utratę ekspresji receptora VDR, co powiązane jest ze złym rokowaniem [50,52], właściwości przeciwnowotworowe analogu PRI-1203 wydają się mieć szczególnie istotne znaczenie kliniczne, gdyż może on potencjalnie znaleźć zastosowanie na przykład w leczeniu skojarzonym zaawansowanych czerniaków pozbawionych ekspresji tego receptora.

Ponieważ proces przerzutowania nowotworów zależny jest m. in. od mobilności komórek nowotworowych [62,63], w kolejnym etapie badań oceniono czy badane analogi witaminy D hamują migrację komórek czerniaka. W tym celu przeprowadzono test „gojenia

rany”, także z zastosowaniem monitorowania komórek w czasie rzeczywistym w mikroskopie Olympus cell Vivo IX 83. Wykazano, że zarówno $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jak i badane analogi, PRI-1203 oraz PRI-1204, istotnie hamowały migrację komórek czerniaka linii A375 ($p < 0.001$ vs kontrola, dla każdego z badanych związków).

Podsumowanie Pracy 2:

Zgodnie z zaplanowanym celem zbadano właściwości biologiczne dwóch nowych analogów witaminy D o skróconym łańcuchu bocznym. Przeprowadzone badania wykazały, że badane analogi witaminy D_3 , PRI-1203 oraz PRI-1204, hamowały wzrost komórek czerniaka zarówno linii A375, jak i RPMI7951. Analog PRI-1203 wykazywał silniejszy efekt cytostatyczny wobec komórek czerniaka, a także powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1, w przeciwieństwie do analogu PRI-1204, co wskazuje na rolę naturalnej geometrii grupy metylenowej przy węglu C-19 pierścienia A w aspekcie aktywności badanych związków. Mechanizm działania tego związku jest niezależny od klasycznego receptora witaminy D, VDR, a więc jest niezależny od aktywacji ścieżki genomowej działania witaminy D, co jest istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż wraz z progresją czerniaka dochodzi do stopniowej utraty ekspresji receptora VDR [50,52]. Analog PRI-1203 o skróconym łańcuchu bocznym, a więc o potencjalnie niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, może stanowić w przyszłości obiecującą alternatywę dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do stosowania u pacjentów z czerniakiem.

Badania nad właściwościami pochodnych witaminy D przyczyniają się do lepszego zrozumienia zależności strukturalno-funkcjonalnych, a ponadto umożliwiają selekcję związków o wysokiej aktywności biologicznej przy zmniejszonym wpływie na gospodarkę wapniową. Wyselekcjonowane pochodne witaminy D hamują proliferację i stymulują różnicowanie komórek nowotworowych (**prace nr 1 i 2**), co jest wysoce pożądaną cechą, jednak ich działanie jedynie w ograniczonym stopniu prowadzi do śmierci komórek nowotworowych, nie mogą one zatem znaleźć zastosowania w monoterapii czerniaka. Wykazano jednak w modelach komórkowych oraz zwierzęcych wybranych nowotworów [54,55], że witamina D może wzmacniać cytotoksyczne działanie niektórych leków przeciwnowotworowych, co stało się inspiracją do podjęcia badań w tym kierunku w modelu ludzkiego czerniaka (**prace nr 3, 4 i 5**).

Przeprowadzone badania potwierdziły wnioski płynące z badań opisanych w **pracy nr 1**, a mianowicie wykazały zależność aktywności badanych analogów witaminy D od wprowadzanych modyfikacji strukturalnych. Ponieważ analog PRI-1203 o skróconym łańcuchu bocznym efektywnie hamował proliferację komórek czerniaka badanych linii, nasunął się więc pomysł podjęcia badań nad biologiczną aktywnością innego analogu witaminy D z podobną modyfikacją strukturalną, czyli o skróconym łańcuchu bocznym, 21(OH)_pD. Badaniami objęto także analog kalcypotriol, do tej pory z powodzeniem stosowany w dermatologii, a także analog 20(OH)D₃, który, podobnie jak hormonalna forma witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, jest związkiem naturalnie syntetyzowanym w ludzkim organizmie. **Praca ta realizowana była we współpracy międzynarodowej z naukowcami z dwóch ośrodków naukowych – Profesorem Andrzejem T. Słomińskim (Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, USA) oraz Profesorem Robertem Tuckey’em (School of Molecular Sciences, Faculty of Science, The University of Western Australia).**

Ponieważ aktywność wybranych do dalszych badań analogów witaminy D potwierdzona była w komórkach skóry o wysokim potencjale proliferacyjnym, co opisałam w swojej wcześniejszej pracy [64], stąd w kolejnych badaniach (**praca nr 3**) postanowiono zbadać nie tylko aktywność biologiczną badanych analogów, ale również ocenić ich wpływ na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny, w komórkach czerniaka. Klasyczna chemioterapia nadal jest bowiem stosowana w leczeniu zaawansowanego czerniaka, jednak głównie w sytuacjach ratunkowych po niepowodzeniu leczenia ukierunkowanego molekularnie bądź immunoterapii, z uwagi na niezadowalającą odpowiedź na ten schemat leczenia [13,15,16]. Wykazanie zatem nasilenia cytotoksycznego działania chemioterapeutyków w komórkach czerniaka pod wpływem analogów witaminy D byłoby wysoce korzystne. Analogi witaminy D wybrane do kolejnego etapu badań łączą niewielki wpływ na gospodarkę wapniowo-fosforanową, a zatem potencjalne ich zastosowanie w terapii skojarzonej czerniaka ograniczałoby możliwość intoksykacji witaminą D, związanej z rozwojem hyperkalcemii.

Cel 2. Analiza możliwości zastosowania hormonalnej formy witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, oraz wybranych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, w leczeniu skojarzonym czerniaka.

Cel 2a. Analiza wpływu hormonalnej formy witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, oraz nowych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny.

“Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line.”

Celem **pracy nr 3** była ocena wpływu hormonalnej formy witaminy D, a także jej nowych analogów, 20(OH)D₃, 21OHpD, oraz kalcypotriolu, o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową [60,65-68], na działanie wybranych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny, w komórkach czerniaka linii A375. Badania prowadzone przeze mnie podczas realizacji pracy doktorskiej wykazały, że analogi witaminy D uwrażliwiają keratynocyty na działanie reaktywnych form tlenu [64]. Wobec tych przesłanek zaplanowano doświadczenia, które miały wykazać czy podobna zależność, tj. wzmocnienie pod wpływem analogów witaminy D cytotoksycznego wpływu wybranych chemioterapeutyków, których mechanizm działania opiera się m. in. na generowaniu stresu oksydacyjnego [69,70], będzie obserwowana również w komórkach czerniaka linii A375. Komórki linii czerniaka A375 niosą mutacje w genach *BRAF* oraz *CDKN2*, typowe dla czerniaków powstających w konsekwencji oparzeń słonecznych [71]. Jak wiadomo, promieniowanie UV jest głównym środowiskowym czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka [40], a więc linia A375 została uznana za szczególnie trafny model do zaplanowanych badań.

W pierwszym etapie badań za pomocą testu kolorymetrycznego SRB oceniono wpływ 1,25(OH)₂D₃ oraz badanych analogów witaminy D na żywotność komórek czerniaka linii A375. Zaobserwowano spadek żywotności komórek czerniaka maksymalnie o około 20% pod wpływem badanych związków. Najefektywniejszy okazał się kalcypotriol, dla którego wyliczona wartość IC₅₀ wyniosła 0.038 nM, najsłabsze zaś działanie odnotowano w przypadku 20(OH)D₃, z wyliczoną wartością IC₅₀=5.3 nM.

Następnie oceniono żywotność komórek czerniaka linii A375 pod wpływem działania cisplatyny lub dakarbazyny oraz ich kombinacji z analogami witaminy D stosowanymi w stężeniu 10 nM. Wartość IC₅₀ obliczona dla cisplatyny w ciągu 48 godzinnej inkubacji wyniosła 2.57 μM, zaś jednoczesne jej zastosowanie z badanymi analogami witaminy D nie miało istotnego wpływu na zahamowanie proliferacji komórek. W toku analogicznych doświadczeń obliczono wartość IC₅₀ dla dakarbazyny, która wyniosła 1.07 μM. Jednocześnie

wykazano, że wartość IC₅₀ obliczana dla dakarbazyny zastosowanej w skojarzeniu z 1,25(OH)₂D₃ uległa istotnemu obniżeniu do 0.45 μM (p<0.05). Nie stwierdzono jednak podobnej zależności dla pozostałych badanych analogów witaminy D.

Analizowano także wpływ preinkubacji komórek czerniaka z analogami witaminy D na przebieg cyklu komórkowego pod wpływem cisplatyny lub dakarbazyny podczas 48 h inkubacji. Ponieważ obserwowano *plateau* w zahamowaniu żywotności komórek czerniaka pod wpływem działania analogów witaminy w stężeniach powyżej 10 nM, zaś wiele doniesień wykazuje korzyść z zastosowania witaminy D w wyższych stężeniach (100 – 1000 nM) [72-74], w kolejnych doświadczeniach zastosowano badane analogi witaminy D w stężeniu 100 nM. Zaobserwowano, że w komórkach czerniaka pod wpływem inkubacji z cisplatyną wzrastał odsetek komórek frakcji SubG1 (p<0.001), wskazując na potencjalną indukcję procesu apoptozy, zaś żaden z zastosowanych analogów witaminy D nie wpływał istotnie na obserwowany proces. Inkubacja z dakarbazyną powodowała wzrost odsetka komórek czerniaka frakcji G0/G1, zaś w skojarzeniu z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem, odnotowany wzrost był istotnie większy niż w przypadku zastosowania samego chemioterapeutyku (p<0.001; dakarbazyna vs 1,25(OH)₂D₃ + dakarbazyna).

Przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej analizowano także zmianę potencjału błony mitochondrialnej ΔΨ_m (barwienie JC-1) oraz wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu (RFT, barwienie H₂DCFDA). Do najważniejszych obserwacji zaliczono istotne obniżenie potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem cisplatyny w komórkach preinkubowanych przez 24h z dwoma analogami witaminy D, 21OHpD, bądź kalcypotriolem (p<0.01 i p<0.05, odpowiednio), mimo, iż sama cisplatyna nie wpływała na ten parametr. Zaobserwowano także zależny od czasu wpływ 1,25(OH)₂D₃ na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach czerniaka pod wpływem cisplatyny. Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach poddawanych przez 1 h działaniu cisplatyny wyraźnie wzrastał (p<0.01), zaś efekt ten znosiła preinkubacja z 1,25(OH)₂D₃. Z kolei 24 h inkubacja komórek z cisplatyną przynosiła wyraźny spadek poziomu RFT, choć w komórkach preinkubowanych z 1,25(OH)₂D₃ był on istotnie wyższy. Potencjał błony mitochondrialnej wzrastał pod wpływem inkubacji komórek z dakarbazyną (p<0.001). 24 h preinkubacja komórek czerniaka z 1,25(OH)₂D₃, 20(OH)D₃, bądź z kalcypotriolem powodowała natomiast obniżenie potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem działania dakarbazyny w porównaniu do komórek poddawanych działaniu samej dakarbazyny (p<0.01 dla 1,25(OH)₂D₃ oraz p<0.001 dla 20(OH)D₃ oraz kalcypotriolu). Podobnie jak w przypadku cisplatyny, poziom reaktywnych form tlenu w komórkach poddawanych działaniu dakarbazyny przez 1 h wyraźnie

wzrastał ($p < 0.001$), zaś efekt ten częściowo znosiła preinkubacja z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, choć nadal był od wyższy w porównaniu z kontrolą ($p < 0.001$).

W ostatnim etapie prowadzonych badań analizowano zmiany w ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w obronę organizmu przed stresem oksydacyjnym, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (*SOD1-2*) czy katalaza (*CAT*), oraz genów kodujących białkowe receptory witaminy D, bądź białka zaangażowane w jej metabolizm. Oznaczenia wykonano techniką real-time PCR. Badane chemioterapeutyki w niewielkim stopniu wpływały na ekspresję genów stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA genu *SOD2* pod wpływem działania cisplatyny ($p < 0.05$), oraz genów *SOD1* i *CAT* ($p < 0.05$) pod wpływem działania dakarbazyny. Efekt obniżenia poziomu mRNA dla *CAT* pod wpływem dakarbazyny był częściowo zniesiony w komórkach preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Obserwowano także modulacyjny wpływ badanych leków na poziom mRNA genów kodujących klasyczny oraz alternatywny receptor witaminy D, *VDR* oraz *PDIA3*, a także genu kodującego białko *CYP24A1*, które pełni funkcję kluczowego enzymu dezaktywującego witaminę D. W komórkach czerniaka poddawanych działaniu cisplatyny obserwowano obniżenie poziomu mRNA dla genu klasycznego receptora witaminy D, *VDR* ($p < 0.05$), zaś w komórkach poddawanych działaniu dakarbazyny – jej alternatywnego receptora, *PDIA3* ($p < 0.05$). W ostatnim przypadku efekt ten znoszony był w komórkach preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($p < 0.05$). Co ciekawe, w komórkach preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ obserwowano obniżenie poziomu mRNA *VDR* pod wpływem inkubacji z dakarbazyną ($p < 0.01$), choć sam chemioterapeutyk nie wpływał na zmianę ekspresji genu kodującego klasyczny receptor witaminy D. Poziom mRNA genu *CYP24A1* istotnie wzrastał w komórkach czerniaka zarówno pod wpływem cisplatyny ($p < 0.05$), jak i dakarbazyny ($p < 0.05$). Najwyższy jednak poziom mRNA genu *CYP24A1* obserwowano w komórkach czerniaka preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a następnie eksponowanych na działanie cisplatyny, bądź dakarbazyny ($p < 0.05$).

Podsumowanie Pracy nr 3:

Zgodnie z zaplanowanym celem zbadano wpływ hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oraz nowych analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny. Przeprowadzone badania wykazały, że dwa spośród badanych analogów witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i kalcypotriol, modulowały odpowiedź komórek czerniaka linii A375 na działanie klasycznego chemioterapeutyku, stosowanego w

leczeniu czerniaka, dakarbazyny. Odnotowane obniżenie wartości IC₅₀ pod wpływem 1,25(OH)₂D₃ wskazuje na pożądane nasilenie właściwości cytotoksycznych dakarbazyny wobec komórek czerniaka, a jednocześnie implikuje możliwość zmniejszenia dawki dakarbazyny stosowanej u pacjentów, co z kolei pozwalałoby na zmniejszenie nasilenia efektów ubocznych stosowanego chemioterapeutyku. W zastosowanych warunkach doświadczalnych obserwowano korzystny wpływ preinkubacji komórek czerniaka z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁, a także spadek potencjału błony mitochondrialnej w porównaniu do działania samej dakarbazyny. W przypadku cisplatyny uzyskano dużo mniej jednoznaczne wyniki wpływu analogów witaminy D na jej działanie w komórkach czerniaka. Korzyść z zastosowania preinkubacji komórek czerniaka z kalcypotriolem odnosiła się głównie do obserwowanego obniżenia potencjału błony mitochondrialnej w komórkach poddawanych następnie działaniu tego chemioterapeutyku. Podsumowując, wyniki prowadzonych badań wykazały korzyść ze stosowania dakarbazyny w skojarzeniu z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem.

Ponieważ w badaniach opisanych w **pracy nr 3** udało się potwierdzić, że analog o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, kalcypotriol, wykazywał podobną aktywność cytostatyczną wobec komórek czerniaka do hormonalnej formy witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, a ponadto oba wymienione analogi korzystnie modulowały działanie chemioterapeutyku, dakarbazyny, postanowiłam także ocenić czy wymienione analogi witaminy D będą nasilać działanie leku antyangiogennego, cedyranibu (AZD2171), drobnocząsteczkowego inhibitora m. in. receptorów czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego, VEGFR1-3, w komórkach czerniaka. Byłoby to szczególnie cenne, zważywszy na fakt, że w czerniaku obserwuje się nadekspresję właśnie receptorów VEGFR1-3 [15,23,24], co wiąże się z niekorzystnymi rokowaniami, zaś stosowanie cedyranibu w monoterapii zaawansowanego czerniaka jest nieskuteczne [26]. W ramach zaplanowanych badań podjęłam współpracę z dr Fernando Pereira Beserra z Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

Cel 2b. Analiza wpływu hormonalnej formy witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, oraz analogu witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, kalcypotriolu, na działanie antyangiogennego leku, cedyranibu, w komórkach czerniaka; ocena ekspresji receptora VEGFR2.

“Vitamin D Enhances Anticancer Properties of Cediranib, a VEGFR Inhibitor, by Modulation of VEGFR2 Expression in Melanoma Cells.”

Powyższa praca składała się na cykl publikacji nagrodzonych Zespołową Nagrodą Naukową I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2022 roku (p. 6.9.1, str. 48).

Celem **pracy nr 4** była ocena wpływu hormonalnej formy witaminy D, a także jej analogu o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, kalcypotriolu, na działanie leku antyangiogennego, cedyranibu (AZD2171), który jest drobnocząsteczkowym inhibitorem receptorów czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, VEGFR1-3 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*), receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu, PDGF, PDGFR (ang. *platelet-derived growth factor receptor*), oraz kinazy tyrozynowej c-KIT [75]. Kluczowe doświadczenia zostały przeprowadzone równolegle na czterech liniach czerniaka: A375, SK-MEL-28, RPMI7951 oraz MNT-1, co potencjalnie umożliwiło ocenę zależności pomiędzy odpowiedzią komórek na zaplanowane schematy inkubacji z badanymi związkami a tłem genetycznym, czy cechami fenotypowymi, takimi jak np. nagromadzenie barwnika melaniny, bowiem linia A375 jest linią amelanotyczną, a linia MNT-1 silnie pigmentowaną.

W pierwszym etapie dokonano oceny żywotności komórek czterech linii czerniaka A375, SK-MEL-28, RPMI7951 oraz MNT-1, pod wpływem jednoczesnego działania cedyranibu skojarzonego z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem w czasie 72 h inkubacji. Analiza wyników kolorymetrycznego testu SRB wykazała, że sam cedyranib jedynie w niewielkim stopniu obniżał żywotność komórek czerniaka linii A375. Odnotowano jedynie około 6% spadek żywotności komórek czerniaka tej linii pod wpływem działania cedyranibu w najwyższym badanym stężeniu, 1000 nM. Natomiast skojarzenie cedyranibu z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem spowodowało znaczne obniżenie żywotności komórek czerniaka A375 odpowiednio o około 30% i 43% (p<0.0001; cedyranib vs cedyranib + 1,25(OH)₂D₃/kalcypotriol). Podobną zależność zaobserwowano także w komórkach czerniaka linii SK-MEL-28. Sam cedyranib w stężeniu 1000 nM obniżał żywotność komórek o około 12%, zaś w połączeniu z 1,25(OH)₂D₃ albo kalcypotriolem uzyskiwano dalszy spadek żywotności komórek na poziomie 26% dla 1,25(OH)₂D₃ (p<0.05 cedyranib vs cedyranib + 1,25(OH)₂D₃), bądź 22% dla kalcypotriolu (p<0.05 cedyranib vs cedyranib + kalcypotriol). Co ciekawe, żaden z badanych analogów witaminy D nie nasilał cytotoksycznego działania cedyranibu w komórkach czerniaka dwóch pozostałych linii, MNT-1 oraz RPMI7951.

Ponieważ cytotoksyczne działanie cedyranibu w największym stopniu nasilone zostało pod wpływem działania analogów witaminy D w komórkach czerniaka linii A375, kolejne doświadczenia przeprowadzono właśnie na komórkach tej linii. Przy wykorzystaniu analizy cytometrycznej zbadano dystrybucję komórek czerniaka w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki preinkubowane były przez 24 h z badanymi analogami witaminy D w stężeniu 100 nM, a następnie poddawane zostały działaniu cedyranibu w ciągu kolejnych 72 h. Odnotowano wzrost odsetka komórek fazy G0/G1 zarówno pod wpływem 1,25(OH)₂D₃ (p<0.05), bądź kalcypotriolu (p<0.01), jak i pod wpływem samego cedyranibu stosowanego w stężeniach 500 i 1000 nM (p<0.0001). Obserwowano także wzrost odsetka komórek frakcji subG1 pod wpływem działania cedyranibu (p<0.0001), co implikuje potencjalną indukcję procesu apoptozy. Preinkubacja komórek czerniaka z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem, poddawanych następnie działaniu cedyranibu związana była z istotnym wzrostem odsetka komórek fazy G2/M cyklu komórkowego (p<0.05, cedyranib 1000 nM vs cedyranib + 1,25(OH)₂D₃; p<0.0001, cedyranib 1000 nM vs cedyranib + kalcypotriol).

Przeprowadzono także analizę wpływu badanych analogów witaminy D na mobilność komórek czerniaka poddawanych działaniu cedyranibu. W tym celu przeprowadzono test „gojenia rany” z zastosowaniem monitorowania komórek w czasie rzeczywistym w mikroskopie Olympus cell Vivo IX 83. Dynamikę migracji komórek oszacowano z zastosowaniem modeli opracowanych przy wykorzystaniu sztucznej inteligencji – moduł TrueAI oprogramowania Olympus cellSens. Mobilność komórek czerniaka linii A375 preinkubowanych z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem, a następnie poddawanych działaniu cedyranibu, była istotnie mniejsza w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym cedyranibem (p<0.0001, cedyranib vs cedyranib + 1,25(OH)₂D₃/kalcypotriol).

Cedyranib jest drobnocząsteczkowym inhibitorem m. in. receptorowych kinaz tyrozynowych VEGFR1-3, spośród których VEGFR2 wydaje się być dominującym receptorem inicjującym kaskadę sygnalizacyjną w odpowiedzi na działanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, VEGF [76,77]. W kolejnym etapie badań oceniono zatem wpływ badanych analogów witaminy D na zewnątrzkomórkową ekspresję receptora VEGFR2 w komórkach czerniaka A375 inkubowanych z cedyranibem. Analiza cytometryczna wykazała, że ekspresja receptora VEGFR2 nie zmieniała się pod wpływem działania samego cedyranibu w stężeniu 1000 nM, jednak zaobserwowano istotny wzrost ekspresji receptora VEGFR2 na powierzchni preinkubowanych z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem komórek czerniaka poddawanych działaniu cedyranibu, (p<0.0001; cedyranib vs cedyranib + 1,25(OH)₂D₃; p<0.01; cedyranib vs cedyranib + kalcypotriol).

Oceniono także ekspresję VEGFR1-2, PDGFR α/β oraz VDR na poziomie białka w omówionych warunkach doświadczalnych z zastosowaniem metody Western blot. Do najważniejszych obserwacji płynących z przeprowadzonych doświadczeń zaliczono wzrost poziomu białka receptora VEGFR2 w komórkach preinkubowanych z analogami witaminy D, które następnie eksponowane były na cedyranib ($p < 0.05$), choć ani sam cedyranib, ani żaden z badanych analogów witaminy D nie wpływały na ekspresję tego receptora. Wzrost ten potwierdzono w kolejnym etapie badań także na poziomie mRNA.

W zastosowanych warunkach doświadczalnych wzrost zewnątrzkomórkowej ekspresji receptora VEGFR2 oraz wzrost całkowitej ekspresji VEGFR2 na poziomie białka towarzyszył pożądanemu nasileniu cytotoksycznych oraz hamujących mobilność właściwości cedyranibu w komórkach A375 preinkubowanych z analogami witaminy D. Wziąwszy to pod uwagę postawiono ocenić, czy podobna zależność dotyczy też komórek pozostałych badanych linii komórkowych czerniaka, tj. SK-MEL-28, RPMI7951 oraz MNT-1. W tym celu dokonano oceny ekspresji m.in. białka VEGFR2 w komórkach wymienionych linii czerniaka, które preinkubowano z 1,25(OH) $_2$ D $_3$, a następnie z cedyranibem. Co ciekawe, w komórkach czerniaka linii MNT-1 oraz RPMI7951, w których wcześniej nie zaobserwowano wzmocnienia cytotoksycznego działania cedyranibu przez analogi witaminy D, nie wykryto także obecności białka VEGFR2 w zastosowanych warunkach doświadczalnych. Z kolei w komórkach czerniaka linii SK-MEL-28, wobec których analogi witaminy D nasilały cytotoksyczne działanie cedyranibu, wykazano obecność białka VEGFR2 tylko w komórkach poddanych działaniu samego cedyranibu, bądź jego kombinacji z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ($p < 0.01$ i $p < 0.05$, odpowiednio), ale nie w komórkach kontrolnych.

Zbadano także możliwość sekwestracji białka VEGFR2 we wczesnych endosomach w celu potencjalnego recyklingu bądź degradacji. W tym celu immunofluorescencyjnie oceniono potencjalną ko-lokalizację białka VEGFR2 z białkiem EEA1 (ang. *early endosome antigen 1*), markerem wczesnych endosomów. Nie zaobserwowano jednak ko-lokalizacji białek VEGFR2 i EEA1 w zastosowanych warunkach doświadczalnych, co wskazuje na stabilną ekspresję zewnątrzkomórkową tego receptora.

Podsumowanie Pracy nr 4:

Zgodnie z zaplanowanym celem zbadano wpływ hormonalnej formy witaminy D, 1,25(OH) $_2$ D $_3$, oraz analogu witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, kalcyotropiolu, wyselekcjonowanego na podstawie wcześniejszych badań (**praca nr 3**), na działanie antyangiogennego leku, cedyranibu, w komórkach czerniaka. Przeprowadzone

badania wykazały, że analogi witaminy D nasilały cytotoksyczne działanie cedyranibu, drobnocząsteczkowego inhibitora m.in. receptorów czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, VEGFR1-3, w dwóch, A375 oraz SK-MEL-28, spośród czterech linii komórkowych czerniaka włączonych do badań. Zaobserwowano istotne korzyści płynące ze skojarzenia działania cedyranibu z analogami witaminy D, a mianowicie zahamowanie proliferacji komórek czerniaka, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, a także zmniejszoną mobilność komórek. Co ciekawe, towarzyszył temu wzrost ekspresji VEGFR2, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Zależności tej nie obserwowano natomiast w komórkach czerniaka linii MNT-1 oraz RPMI7951. Wydaje się zatem, że obserwowane wzmocnienie działania cedyranibu w komórkach czerniaka pod wpływem analogów witaminy D polega na modulacji ekspresji VEGFR2. Jest to ważne z klinicznego punktu widzenia odkrycie, ponieważ wykazano, że czerniaki charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji zarówno czynnika VEGF, jak i jego receptorów, VEGFR1-3, co z kolei wiąże się z niekorzystnym rokowaniem pacjentów [15,24]. Podsumowując, wyniki prowadzonych badań wykazały korzyść ze stosowania cedyranibu w skojarzeniu z 1,25(OH)₂D₃, bądź kalcypotriolem.

Obserwowane wzmocnienie cytotoksycznego działania cedyranibu wobec komórek czerniaka pod wpływem analogów witaminy D (**praca nr 4**) wydaje się być istotne z klinicznego punktu widzenia, co skłoniło mnie do podjęcia analogicznych badań na dużo bardziej zaawansowanym modelu badawczym, czyli na komórkach czerniaka izolowanych z materiału biopsyjnego pacjentów chorujących na czerniaka. Aby zrealizować zaplanowany **cel dodatkowy nr 2c**, nawiązałam współpracę z Panią Profesor Renatą Zauchą z Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego, UCK, w Gdańsku. Model badawczy opierający się na komórkach nowotworowych izolowanych bezpośrednio od pacjentów jest, oprócz organoidów i ksenograftów, niezwykle cennym narzędziem badawczym, gdyż lepiej odzwierciedla potencjalne działanie leków w organizmie pacjentów, niż badania prowadzone na komercyjnych liniach nowotworowych. Warto podkreślić, że wyprowadzanie linii komórkowych z większości nowotworów litych jest zadaniem bardzo wymagającym, obarczonym sporym ryzykiem niepowodzenia, co na przestrzeni lat potwierdzają dane literaturowe [78-81], podjęta próba stworzenia takiego modelu, opisana w **pracy nr 5**, stanowiła tym samym znaczne poszerzenie mojego warsztatu badawczego. Ponieważ u części pacjentów rekrutowanych do udziału w zaplanowanym badaniu w czasie diagnostyki stwierdzano mutację

w szlaku kinaz MAPK, stworzony model badawczy umożliwił także zbadanie wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na działanie wemurafenibu, inhibitora zmutowanej kinazy BRAF.

Cel 2c. Opracowanie modelu badawczego opierającego się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio z materiału biopsyjnego pobranego od pacjentów chorych na zaawansowanego czerniaka. Analiza wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na działanie cedyranibu bądź wemurafenibu (inhibitora kinazy BRAF) w opracowanym modelu badawczym; ocena bioenergetyki mitochondriów.

„Vitamin D modulates the response of patient-derived metastatic melanoma cells to anticancer drugs.”

Dopełnieniem mojego cyklu habilitacyjnego jest **praca nr 5**, będąca wynikiem realizacji działania naukowego Miniatura 2021/05/X/NZ7/00470, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Celem tej publikacji było, po pierwsze, opracowanie modelu badawczego, w oparciu o dostępne dane literaturowe, opierającego się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio z biopsji przerzutów nowotworowych pacjentów chorych na zaawansowanego czerniaka. Na przeprowadzenie badań uzyskano pozwolenie Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych (NKBBN/405/2019). Pacjenci rekrutowani byli w ramach współpracy z Panią Profesor Renatą Zauchą (Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, UCK, w Gdańsku). Każdy z pacjentów podpisał dobrowolną zgodę na udział w prowadzonych badaniach. Drugim celem była ocena wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na działanie cedyranibu (jak w **pracy nr 4**) lub wemurafenibu, inhibitora zmutowanej kinazy BRAF, w opracowanym uprzednio nowym modelu badawczym. Dobór badanego leku w prowadzonych doświadczeniach zależał od obecności bądź braku mutacji *BRAF* w komórkach czerniaka poszczególnych pacjentów, co stwierdzane było podczas diagnostyki pacjentów w UCK.

W toku prowadzonych badań wyprowadzono linie komórkowe od sześciu nieleczonych dotąd pacjentów Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii UCK z nieresekcyjnym czerniakiem. Grupę badaną utworzyło pięciu mężczyzn i jedna kobieta w wieku od 29 do 81 lat. U dwóch pacjentów potwierdzono mutację *BRAF*. Komórki nowotworowe izolowano enzymatycznie z zastosowaniem kolagenazy bezpośrednio po pobraniu biopsji od pacjentów w oparciu o metody opisane w literaturze [82-84]. Czystość izolacji komórek czerniaka

potwierdzano immunofluorescencyjnie z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko markerom czerniaka HMB45 i Melan-A, i monitorowano także po kolejnych pasażach. Mimo zastosowania genetycyny (G-418) [85-87] obserwowano postępującą kontaminację hodowli pierwotnej komórek czerniaka fibroblastami powiązanych z nowotworem (ang. *cancer associated fibroblasts*, CAFs), dlatego też doświadczenia wykonywano na komórkach pochodzących z wczesnych pasażów.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ skojarzonego działania $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz cedyranibu na proliferację izolowanych od pacjentów komórek czerniaka z zastosowaniem monitorowania komórek w czasie rzeczywistym w mikroskopie Olympus cell Vivo IX 83. Dynamikę proliferacji komórek oszacowano z zastosowaniem modeli opracowanych przy wykorzystaniu sztucznej inteligencji – moduł TrueAI oprogramowania Olympus cellSens. Proliferacja izolowanych komórek czerniaka była istotnie zahamowana zarówno pod wpływem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jak i cedyranibu, a także kombinacji tych dwóch substancji ($p < 0.0001$ dla każdego z nich).

W kolejnym etapie badań przeprowadzono także analizę wpływu 24 h preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na mobilność izolowanych komórek czerniaka poddawanych działaniu cedyranibu. W tym celu przeprowadzono test „gojenia rany” z zastosowaniem monitorowania komórek w czasie rzeczywistym w mikroskopie Olympus cell Vivo IX 83. Dynamikę migracji komórek oszacowano z zastosowaniem modeli opracowanych przy wykorzystaniu sztucznej inteligencji – moduł TrueAI oprogramowania Olympus cellSens. Mobilność izolowanych od pacjentów komórek czerniaka preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ była istotnie silniej hamowana pod wpływem działania cedyranibu w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym cedyranibem ($p < 0.0001$; cedyranib vs cedyranib + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

Następnie oceniono wpływ cedyranibu na zmianę potencjału błony mitochondrialnej w komórkach preinkubowanych uprzednio z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. W tym celu izolowane komórki czerniaka barwiono MitoTrackerem™ Red CM-H₂Xros i monitorowano w czasie rzeczywistym w mikroskopie Olympus cell Vivo IX 83. Wykazano, że cedyranib obniżał potencjał błony mitochondrialnej w komórkach czerniaka izolowanych od pacjentów niezależnie od preinkubacji tych komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bądź jej braku ($p < 0.001$ w obu przypadkach). Pragnąc jednak zgłębić potencjalny wpływ preinkubacji komórek czerniaka z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na homeostazę mitochondrialną komórek poddawanych działaniu cedyranibu dokonano także oceny parametrów bioenergetyki mitochondriów z wykorzystaniem Agilent Seahorse XFp Analyzer. Zaobserwowano zmniejszenie szybkości konsumpcji tlenu (ang. *oxygen consumption rate*, OCR), odzwierciedlającej oddychanie mitochondrialne, pod

wpływem cedyranibu w komórkach czerniaka izolowanych od pacjentów preinkubowanych z 1,25(OH)₂D₃. Oprócz tego w zastosowanych warunkach doświadczalnych obserwowano także spadek poza-mitochondrialnego zużycia tlenu ($p < 0.05$), oddychania podstawowego ($p < 0.001$) i oddychania zależnego od ATP ($p < 0.001$).

Wybrane doświadczenia na komórkach izolowanych od pacjenta z potwierdzoną mutacją kinazy BRAF wykonano także z zastosowaniem wemurafenibu, inhibitora kinazy BRAF. Wykazały one wzmocnienie cytotoksycznej aktywności wemurafenibu, udokumentowane około 42% spadkiem wartości IC₅₀ wyliczonej dla wemurafenibu, z 85,90 nM do 50,17 nM, w czasie 72 h inkubacji w przypadku zastosowania leku jednocześnie z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, bądź nawet 74% spadkiem tej wartości, do 22,21 nM, przy zastosowaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 1 μM. Zastosowanie 1,25(OH)₂D₃ jednocześnie z wemurafenibem istotnie ograniczało mobilność komórek czerniaka w porównaniu z działaniem samego wemurafenibu ($p < 0.001$).

Podsumowanie Pracy nr 5:

Zgodnie z zaplanowanym celem badania prowadzone w czasie realizacji działania naukowego Miniatura 2021/05/X/NZ7/00470 pozwoliły na stworzenie i optymalizację cennego, unikalnego modelu badawczego opierającego się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio z przerzutów nowotworowych pacjentów chorych na zaawansowanego czerniaka. Warto podkreślić, że podczas prowadzonych doświadczeń dysponowano ograniczoną ilością komórek o niskim potencjale proliferacyjnym, co wymagało daleko posuniętej optymalizacji prowadzonych eksperymentów. W toku prowadzonych badań wykazano, że preinkubacja izolowanych od pacjentów komórek czerniaka z 1,25(OH)₂D₃ uwrażliwiała te komórki na działanie inhibitora VEGFR1-3, cedyranibu. W zastosowanych warunkach doświadczalnych obserwowano ograniczenie mobilności komórek, a także zmiany w bioenergetyce mitochondriów. Badania wykazały również, że 1,25(OH)₂D₃ nasilał cytotoksyczne właściwości wemurafenibu, inhibitora zmutowanej kinazy BRAF, wobec komórek czerniaka izolowanych od pacjenta z potwierdzoną mutacją *BRAF*. Zatem obserwacje płynące z doświadczeń prowadzonych na komercyjnie dostępnych liniach komórkowych czerniaka, opisanych w **pracy nr 4**, znalazły także swoje potwierdzenie w opracowanym nowym modelu badawczym, opierającym się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio z przerzutów nowotworowych pacjentów, co pozwala przypuszczać, że także na poziomie klinicznym, u pacjentów leczonych cedyranibem jego przeciwnowotworowe działanie mogłoby zostać wzmocnione w skojarzeniu z 1,25(OH)₂D₃.

PODSUMOWANIE

Reasumując, w opisanym powyżej cyklu publikacji zrealizowałam zaplanowany cel, którym była ocena biologicznej aktywności nowych pochodnych witaminy D oraz ocena wpływu hormonalnej formy witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, i jej wybranych pochodnych, na działanie leków przeciwnowotworowych z grupy klasycznych chemioterapeutyków, leków antyangiogennych oraz leków ukierunkowanych molekularnie wobec komórek czerniaka. Przeprowadzone badania doprowadziły do wytypowania nowych, obiecujących analogów witaminy D, takich jak analog PRI-1733 lub PRI-1203, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu skojarzonym czerniaka. Omówione badania wskazały na istotną rolę naturalnej geometrii grupy metylenowej przy węglu C-19 w utrzymaniu prawidłowego działania witaminy D, natomiast skrócenie łańcucha bocznego powoduje, że efekty biologiczne analogu PRI-1203 nie są związane z aktywacją genomowej ścieżki odpowiedzi na witaminę D, zależnej od receptora VDR, co jest istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż wraz z progresją czerniaka dochodzi do stopniowej utraty ekspresji tego receptora. Na podstawie przeprowadzonych badań do leczenia skojarzonego czerniaka mógłby zostać włączony również kalcypotriol, analog witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, który obecnie z powodzeniem stosowany jest w dermatologii, co byłoby podejściem innowacyjnym.

Czerniak w postaci uogólnionej jest nowotworem o złym rokowaniu. Mimo wprowadzenia w ostatnich latach nowych form terapii w dalszym ciągu spora część pacjentów nie odpowiada na leczenie, bądź też bardzo szybko dochodzi do rozwoju oporności. Konieczne wydaje się zatem poszukiwanie nowych schematów leczenia tego nowotworu. Omówione badania wykazały, że hormonalna forma witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bądź inne analogi witaminy D, a szczególnie kalcypotriol, wpływają korzystnie na działanie leków przeciwnowotworowych. Zaobserwowano m. in. wzmocnienie cytotoksycznego działania: dakarbazyny, klasycznego chemioterapeutyku, nadal stosowanego w terapii zaawansowanego czerniaka; cedyranibu, drobnocząsteczkowego inhibitora receptorowych kinaz tyrozynowych, takich jak VEGFR1-3, który w monoterapii czerniaka okazał się niewystarczająco skuteczny; czy wreszcie wemurafenibu, czyli leku ukierunkowanego molekularnie, będącego inhibitorem zmutowanej kinazy BRAF.

Wnioski płynące z prowadzonych badań mają istotne implikacje kliniczne, ponieważ niedobór witaminy D nadal jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym, szczególnie w populacji naszego kraju, a ponadto stwierdzany jest u większości pacjentów w momencie diagnozy czerniaka. Dodatkowo ekspozycja na światło słoneczne, które jest niezbędne do

skórnej syntezy witaminy D, jest niewskazana u chorych na nowotwory skóry, co z kolei może pogłębiać deficyt witaminy D. Monitorowanie zatem poziomu witaminy D w surowicy pacjentów chorych na czerniaka wydaje się być ze wszech miar zasadne. Co więcej, odpowiednia suplementacja witaminą D mogłaby potencjalnie przynieść korzyści kliniczne, uwrażliwiając komórki guza na stosowane leczenie przeciwnowotworowe. Potencjalna możliwość obniżenia dawek leków stosowanych u pacjentów pozwalałaby z kolei na zmniejszenie nasilenia efektów ubocznych stosowanej terapii, przy utrzymaniu pożądanego efektu terapeutycznego. Warto podkreślić, że witamina D, jako związek naturalnie syntetyzowany w ludzkim organizmie, posiada korzystny profil biologiczny, zaś jej zastosowanie w terapii skojarzonej czerniaka pozwoliłoby na ograniczenie stosowania substancji negatywnie oddziałujących na nasze środowisko.

Opracowany nowy model badawczy, opisany w ostatniej publikacji z cyklu, opierający się na komórkach czerniaka izolowanych bezpośrednio od pacjentów, stanowi niezwykle cenne narzędzie badawcze, ponieważ nie tylko lepiej odzwierciedla potencjalne działanie leków w organizmie pacjentów, niż badania prowadzone na komercyjnych liniach nowotworowych, ale umożliwia także badania uwzględniające rolę komórek tworzących mikrośrodowisko guzów nowotworowych, takich jak fibroblasty.

Podsumowując, wyniki prowadzonych badań, opisane w pięciu oryginalnych publikacjach, stanowią przesłankę do potencjalnego włączenia witaminy D, bądź jej analogów, do leczenia skojarzonego czerniaka.

Bibliografia

1. <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>.
2. Rutkowski, P.; Owczarek, W.; Nejc, D.; Jeziorski, A.; Wysocki, W.M.; Słowińska, M.; Dudzisz-Śledź, M.; Wiśniewski, P.; Koseła-Paterczyk, H.; Kiprian, D.; et al. Skin carcinomas. *Oncology in Clinical Practice* **2018**, *14*, 129–147, doi:10.5603/OCP.2018.0019.
3. Khan, N.H.; Mir, M.; Qian, L.; Baloch, M.; Ali Khan, M.F.; Rehman, A.U.; Ngowi, E.E.; Wu, D.D.; Ji, X.Y. Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. *J Adv Res* **2022**, *36*, 223-247, doi:10.1016/j.jare.2021.06.014.
4. Eddy, K.; Shah, R.; Chen, S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Front Oncol* **2020**, *10*, 626129, doi:10.3389/fonc.2020.626129.
5. Shah, D.J.; Dronca, R.S. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clin Proc* **2014**, *89*, 504-519, doi:10.1016/j.mayocp.2014.02.002.
6. Schadendorf, D.; van Akkooi, A.C.J.; Berking, C.; Griewank, K.G.; Gutzmer, R.; Hauschild, A.; Stang, A.; Roesch, A.; Ugurel, S. Melanoma. *Lancet* **2018**, *392*, 971-984, doi:10.1016/s0140-6736(18)31559-9.
7. Switzer, B.; Puzanov, I.; Skitzki, J.J.; Hamad, L.; Ernstoff, M.S. Managing Metastatic Melanoma in 2022: A Clinical Review. *JCO Oncol Pract* **2022**, *18*, 335-351, doi:10.1200/op.21.00686.
8. Thomas, D.; Bello, D.M. Adjuvant immunotherapy for melanoma. *J Surg Oncol* **2021**, *123*, 789-797, doi:10.1002/jso.26329.

9. Davis, L.E.; Shalin, S.C.; Tackett, A.J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther* **2019**, *20*, 1366-1379, doi:10.1080/15384047.2019.1640032.
10. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 7-33, doi:10.3322/caac.21654.
11. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* **2022**, *72*, 7-33, doi:10.3322/caac.21708.
12. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Wagle, N.S.; Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* **2023**, *73*, 17-48, doi:10.3322/caac.21763.
13. Rutkowski, P.; Wysocki, P.J.; Nasierowska-Guttmejer, A.; Jeziorski, A.; Wysocki, W.M.; Kalinka, E.; Świtaj, T.; Kozak, K.; Kamińska-Winciorek, G.; Czarnecka, A.M.; et al. Cutaneous melanoma. *Oncology in clinical practice* **2020**, *16*, 163-182, doi:10.5603/OCP.2020.0021.
14. Szatkowska, L.; Siczek, J.; Tekiel, K.; Ziętek, M.; Stachyra-Strawa, P.; Cisek, P.; Matkowski, R. Outcomes of Patients with Metastatic Melanoma-A Single-Institution Retrospective Analysis. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14071672.
15. Domingues, B.; Lopes, J.M.; Soares, P.; Populo, H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther* **2018**, *7*, 35-49, doi:10.2147/itt.s134842.
16. Ernst, M.; Giubellino, A. The Current State of Treatment and Future Directions in Cutaneous Malignant Melanoma. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:10.3390/biomedicines10040822.
17. Lee, C.; Collichio, F.; Ollila, D.; Moschos, S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol* **2013**, *31*, 141-147, doi:10.1016/j.clindermatol.2012.08.015.
18. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **2011**, *364*, 2507-2516, doi:10.1056/NEJMoa1103782.
19. Jung, T.; Haist, M.; Kuske, M.; Grabbe, S.; Bros, M. Immunomodulatory Properties of BRAF and MEK Inhibitors Used for Melanoma Therapy-Paradoxical ERK Activation and Beyond. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22189890.
20. Król, A.; Gawlik, T.; Jarząb, B. Endocrine complications of cancer immunotherapy. *Endokrynol Pol* **2018**, *69*, 722-733, doi:10.5603/EP.a2018.0073.
21. Jour, G.; Ivan, D.; Aung, P.P. Angiogenesis in melanoma: an update with a focus on current targeted therapies. *J Clin Pathol* **2016**, *69*, 472-483, doi:10.1136/jclinpath-2015-203482.
22. Mabeta, P. Paradigms of vascularization in melanoma: Clinical significance and potential for therapeutic targeting. *Biomed Pharmacother* **2020**, *127*, 110135, doi:10.1016/j.biopha.2020.110135.
23. Wu, Z.; Bian, Y.; Chu, T.; Wang, Y.; Man, S.; Song, Y.; Wang, Z. The role of angiogenesis in melanoma: Clinical treatments and future expectations. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 1028647, doi:10.3389/fphar.2022.1028647.
24. Mehnert, J.M.; McCarthy, M.M.; Jilaveanu, L.; Flaherty, K.T.; Aziz, S.; Camp, R.L.; Rimm, D.L.; Kluger, H.M. Quantitative expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 in melanoma tissue microarrays. *Hum Pathol* **2010**, *41*, 375-384, doi:10.1016/j.humpath.2009.08.016.
25. Hashemi, G.; Dight, J.; Khosrotehrani, K.; Sormani, L. Melanoma Tumour Vascularization and Tissue-Resident Endothelial Progenitor Cells. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14174216.
26. McWhirter, E.; Quirt, I.; Gajewski, T.; Pond, G.; Wang, L.; Hui, J.; Oza, A. A phase II study of cediranib, an oral VEGF inhibitor, in previously untreated patients with metastatic or recurrent malignant melanoma. *Invest New Drugs* **2016**, *34*, 231-235, doi:10.1007/s10637-016-0324-0.
27. Berk-Krauss, J.; Stein, J.A.; Weber, J.; Polsky, D.; Geller, A.C. New Systematic Therapies and Trends in Cutaneous Melanoma Deaths Among US Whites, 1986-2016. *Am J Public Health* **2020**, *110*, 731-733, doi:10.2105/ajph.2020.305567.
28. Patton, E.E.; Mueller, K.L.; Adams, D.J.; Anandasabapathy, N.; Aplin, A.E.; Bertolotto, C.; Bosenberg, M.; Ceol, C.J.; Burd, C.E.; Chi, P.; et al. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* **2021**, doi:10.1016/j.ccell.2021.01.011.
29. LoRusso, P.M.; Schalper, K.; Sosman, J. Targeted therapy and immunotherapy: Emerging biomarkers in metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **2020**, *33*, 390-402, doi:10.1111/pcmr.12847.
30. Imbert, C.; Montfort, A.; Fraise, M.; Marcheteau, E.; Gilhodes, J.; Martin, E.; Bertrand, F.; Marcellin, M.; Burlet-Schiltz, O.; Peredo, A.G.; et al. Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat Commun* **2020**, *11*, 437, doi:10.1038/s41467-019-14218-7.
31. Żmijewski, M.A. Nongenomic Activities of Vitamin D. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14235104.

32. Piotrowska, A.; Wierzbicka, J.; Zmijewski, M.A. Vitamin D in the skin physiology and pathology. *Acta Biochim Pol* **2016**, *63*, 17-29, doi:10.18388/abp.2015_1104.
33. Slominski, A.T.; Brozyna, A.A.; Skobowiat, C.; Zmijewski, M.A.; Kim, T.K.; Janjetovic, Z.; Oak, A.S.; Jozwicki, W.; Jetten, A.M.; Mason, R.S.; et al. On the role of classical and novel forms of vitamin D in melanoma progression and management. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2018**, *177*, 159-170, doi:10.1016/j.jsbmb.2017.06.013.
34. Bikle, D.D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* **2014**, *21*, 319-329, doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.016.
35. Deluca, H.F. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* **2014**, *3*, 479, doi:10.1038/bonekey.2013.213.
36. McCollum, E.; Simmonds, N.; Becker, J.; Shipley, P. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *The journal of biological chemistry* **1922**, *53*, 293–298.
37. Chen, J.; Tang, Z.; Slominski, A.T.; Li, W.; Zmijewski, M.A.; Liu, Y. Vitamin D and its analogs as anticancer and anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* **2020**, *207*, 112738, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112738.
38. Muñoz, A.; Grant, W.B. Vitamin D and Cancer: An Historical Overview of the Epidemiology and Mechanisms. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14071448.
39. Fathi, N.; Ahmadian, E.; Shahi, S.; Roshangar, L.; Khan, H.; Kouhsoltani, M.; Maleki Dizaj, S.; Sharifi, S. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed Pharmacother* **2019**, *109*, 391-401, doi:10.1016/j.biopha.2018.10.102.
40. Brozyna, A.A.; Hoffman, R.M.; Slominski, A.T. Relevance of Vitamin D in Melanoma Development, Progression and Therapy. *Anticancer Res* **2020**, *40*, 473-489, doi:10.21873/anticancer.13976.
41. Ferrer-Mayorga, G.; Gómez-López, G.; Barbáchano, A.; Fernández-Barral, A.; Peña, C.; Pisano, D.G.; Cantero, R.; Rojo, F.; Muñoz, A.; Larriba, M.J. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut* **2017**, *66*, 1449-1462, doi:10.1136/gutjnl-2015-310977.
42. Slominski, A.T.; Janjetovic, Z.; Kim, T.K.; Wasilewski, P.; Rosas, S.; Hanna, S.; Sayre, R.M.; Dowdy, J.C.; Li, W.; Tuckey, R.C. Novel non-calcemic secosteroids that are produced by human epidermal keratinocytes protect against solar radiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2015**, *148*, 52-63, doi:10.1016/j.jsbmb.2015.01.014.
43. Timerman, D.; McEnery-Stonelake, M.; Joyce, C.J.; Nambudiri, V.E.; Hodi, F.S.; Claus, E.B.; Ibrahim, N.; Lin, J.Y. Vitamin D deficiency is associated with a worse prognosis in metastatic melanoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6873-6882, doi:10.18632/oncotarget.14316.
44. Tsai, T.Y.; Kuo, C.Y.; Huang, Y.C. The association between serum vitamin D level and risk and prognosis of melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2020**, doi:10.1111/jdv.16189.
45. Chandler, P.D.; Chen, W.Y.; Ajala, O.N.; Hazra, A.; Cook, N.; Bubes, V.; Lee, I.M.; Giovannucci, E.L.; Willett, W.; Buring, J.E.; et al. Effect of Vitamin D3 Supplements on Development of Advanced Cancer: A Secondary Analysis of the VITAL Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* **2020**, *3*, e2025850, doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.25850.
46. Lappe, J.M.; Travers-Gustafson, D.; Davies, K.M.; Recker, R.R.; Heaney, R.P. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* **2007**, *85*, 1586-1591, doi:10.1093/ajcn/85.6.1586.
47. Johansson, H.; Spadola, G.; Tosti, G.; Mandalà, M.; Minisini, A.M.; Queirolo, P.; Aristarco, V.; Baldini, F.; Coccorocchio, E.; Albertazzi, E.; et al. Vitamin D Supplementation and Disease-Free Survival in Stage II Melanoma: A Randomized Placebo Controlled Trial. *Nutrients* **2021**, *13*, doi:10.3390/nu13061931.
48. Galus, Ł.; Michalak, M.; Lorenz, M.; Stoińska-Swiniarek, R.; Tusień Małecka, D.; Galus, A.; Kolenda, T.; Leporowska, E.; Mackiewicz, J. Vitamin D supplementation increases objective response rate and prolongs progression-free time in patients with advanced melanoma undergoing anti-PD1 therapy. *Cancer* **2023**, doi:10.1002/cncr.34718.
49. De Smedt, J.; Van Kelst, S.; Boecxstaens, V.; Stas, M.; Bogaerts, K.; Vanderschueren, D.; Aura, C.; Vandenberghe, K.; Lambrechts, D.; Wolter, P.; et al. Vitamin D supplementation in cutaneous malignant melanoma outcome (ViDMe): a randomized controlled trial. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 562, doi:10.1186/s12885-017-3538-4.
50. Brozyna, A.A.; Jozwicki, W.; Janjetovic, Z.; Slominski, A.T. Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. *Hum Pathol* **2011**, *42*, 618-631, doi:10.1016/j.humpath.2010.09.014.

51. Brożyna, A.A.; Jozwicki, W.; Janjetovic, Z.; Slominski, A.T. Expression of the vitamin D-activating enzyme 1 α -hydroxylase (CYP27B1) decreases during melanoma progression. *Hum Pathol* **2013**, *44*, 374-387, doi:10.1016/j.humpath.2012.03.031.
52. Brożyna, A.A.; Jozwicki, W.; Slominski, A.T. Decreased VDR expression in cutaneous melanomas as marker of tumor progression: new data and analyses. *Anticancer Res* **2014**, *34*, 2735-2743.
53. Muralidhar, S.; Fila, A.; Nsengimana, J.; Poźniak, J.; O'Shea, S.J.; Diaz, J.M.; Harland, M.; Randerson-Moor, J.A.; Reichrath, J.; Laye, J.P.; et al. Vitamin D-VDR Signaling Inhibits Wnt/ β -Catenin-Mediated Melanoma Progression and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Res* **2019**, *79*, 5986-5998, doi:10.1158/0008-5472.can-18-3927.
54. Ma, Y.; Yu, W.D.; Trump, D.L.; Johnson, C.S. 1,25D3 enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models. *Cancer* **2010**, *116*, 3294-3303, doi:10.1002/cncr.25059.
55. Wietrzyk, J.; Nevozhay, D.; Filip, B.; Milczarek, M.; Kutner, A. The antitumor effect of lowered doses of cytostatics combined with new analogs of vitamin D in mice. *Anticancer Res* **2007**, *27*, 3387-3398.
56. Podgórska, E.; Drzał, A.; Matuszak, Z.; Swakon, J.; Slominski, A.; Elas, M.; Urbanska, K. Calcitriol and Calcidiol Can Sensitize Melanoma Cells to Low(-)LET Proton Beam Irradiation. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19082236.
57. Marcinowska-Suchowierska, E.; Kupisz-Urbańska, M.; Łukaszewicz, J.; Płudowski, P.; Jones, G. Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 550, doi:10.3389/fendo.2018.00550.
58. Koul, P.A.; Ahmad, S.H.; Ahmad, F.; Jan, R.A.; Shah, S.U.; Khan, U.H. Vitamin d toxicity in adults: a case series from an area with endemic hypovitaminosis d. *Oman Med J* **2011**, *26*, 201-204, doi:10.5001/omj.2011.49.
59. Janjetovic, Z.; Brożyna, A.A.; Tuckey, R.C.; Kim, T.K.; Nguyen, M.N.; Jozwicki, W.; Pfeffer, S.R.; Pfeffer, L.M.; Slominski, A.T. High basal NF-kappaB activity in nonpigmented melanoma cells is associated with an enhanced sensitivity to vitamin D3 derivatives. *Br J Cancer* **2011**, *105*, 1874-1884, doi:10.1038/bjc.2011.458.
60. Zmijewski, M.A.; Li, W.; Chen, J.; Kim, T.K.; Zjawiony, J.K.; Sweatman, T.W.; Miller, D.D.; Slominski, A.T. Synthesis and photochemical transformation of 3 β ,21-dihydroxypregna-5,7-dien-20-one to novel secosteroids that show anti-melanoma activity. *Steroids* **2011**, *76*, 193-203, doi:10.1016/j.steroids.2010.10.009.
61. Pawlikowska, M.; Jędrzejewski, T.; Slominski, A.T.; Brożyna, A.A.; Wrotek, S. Pigmentation Levels Affect Melanoma Responses to Coriolus versicolor Extract and Play a Crucial Role in Melanoma-Mononuclear Cell Crosstalk. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22115735.
62. Katunaric, M.; Zamolo, G.; Jonjic, N. EGFR activated cell mobility - A link to melanoma ulceration. *Med Hypotheses* **2015**, *85*, 498-499, doi:10.1016/j.mehy.2015.07.007.
63. Mumford, B.S.; Robertson, G.P. Circulating melanoma cells in the diagnosis and monitoring of melanoma: an appraisal of clinical potential. *Mol Diagn Ther* **2014**, *18*, 175-183, doi:10.1007/s40291-013-0071-2.
64. Piotrowska, A.; Wierzbicka, J.; Slebioda, T.; Wozniak, M.; Tuckey, R.C.; Slominski, A.T.; Zmijewski, M.A. Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H2O2 or cisplatin on human keratinocytes. *Steroids* **2016**, *110*, 49-61, doi:10.1016/j.steroids.2016.04.002.
65. Slominski, A.T.; Janjetovic, Z.; Fuller, B.E.; Zmijewski, M.A.; Tuckey, R.C.; Nguyen, M.N.; Sweatman, T.; Li, W.; Zjawiony, J.; Miller, D.; et al. Products of vitamin D3 or 7-dehydrocholesterol metabolism by cytochrome P450scc show anti-leukemia effects, having low or absent calcemic activity. *PLoS One* **2010**, *5*, e9907, doi:10.1371/journal.pone.0009907.
66. Wang, J.; Slominski, A.; Tuckey, R.C.; Janjetovic, Z.; Kulkarni, A.; Chen, J.; Postlethwaite, A.E.; Miller, D.; Li, W. 20-hydroxyvitamin D(3) inhibits proliferation of cancer cells with high efficacy while being non-toxic. *Anticancer Res* **2012**, *32*, 739-746.
67. Wasiewicz, T.; Szyszka, P.; Cichorek, M.; Janjetovic, Z.; Tuckey, R.C.; Slominski, A.T.; Zmijewski, M.A. Antitumor effects of vitamin d analogs on hamster and mouse melanoma cell lines in relation to melanin pigmentation. In *Int J Mol Sci*; Switzerland, 2015; Volume 16, pp. 6645-6667.
68. Binderup, L. Comparison of calcipotriol with selected metabolites and analogues of vitamin D3: effects on cell growth regulation in vitro and calcium metabolism in vivo. *Pharmacol Toxicol* **1993**, *72*, 240-244.
69. Marullo, R.; Werner, E.; Degtyareva, N.; Moore, B.; Altavilla, G.; Ramalingam, S.S.; Doetsch, P.W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* **2013**, *8*, e81162, doi:10.1371/journal.pone.0081162.

70. Pourahmad, J.; Amirmostofian, M.; Kobarfard, F.; Shahraki, J. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **2009**, *65*, 89-96, doi:10.1007/s00280-009-1007-8.
71. Avram, S.; Coricovac, D.E.; Pavel, I.Z.; Pinzaru, I.; Ghiulai, R.; Baderca, F.; Soica, C.; Muntean, D.; Branisteanu, D.E.; Spandidos, D.A.; et al. Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncol Rep* **2017**, *38*, 89-99, doi:10.3892/or.2017.5658.
72. Le, T.Y.L.; Ogawa, M.; Kizana, E.; Gunton, J.E.; Chong, J.J.H. Vitamin D Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction Through Modulation of Resident Cardiac Progenitor Cells. *Heart Lung Circ* **2018**, *27*, 967-975, doi:10.1016/j.hlc.2018.01.006.
73. Corachan, A.; Ferrero, H.; Aguilar, A.; Garcia, N.; Monleon, J.; Faus, A.; Cervello, I.; Pellicer, A. Inhibition of tumor cell proliferation in human uterine leiomyomas by vitamin D via Wnt/beta-catenin pathway. *Fertil Steril* **2018**, doi:10.1016/j.fertnstert.2018.10.008.
74. Cai, L.; Luo, L.; Tang, Z.; Meng, X. Combined antitumor effects of 1,25dihydroxy vitamin D3 and Notch inhibitor in liver cancer. *Oncol Rep* **2018**, *40*, 1515-1524, doi:10.3892/or.2018.6549.
75. Tsao, A.S.; Moon, J.; Wistuba, II; Vogelzang, N.J.; Kalemkerian, G.P.; Redman, M.W.; Gandara, D.R.; Kelly, K. Phase I Trial of Cediranib in Combination with Cisplatin and Pemetrexed in Chemonaive Patients with Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (SWOG S0905). *J Thorac Oncol* **2017**, *12*, 1299-1308, doi:10.1016/j.jtho.2017.05.021.
76. Bogusławska-Duch, J.; Ducher, M.; Małeckki, M. Resistance of melanoma cells to anticancer treatment: a role of vascular endothelial growth factor. *Postepy Dermatol Alergol* **2020**, *37*, 11-18, doi:10.5114/ada.2020.93378.
77. Pisacane, A.M.; Risio, M. VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Res* **2005**, *15*, 39-43, doi:10.1097/00008390-200502000-00007.
78. Bhadury, J.; Einarsdottir, B.O.; Podraza, A.; Bagge, R.O.; Stierner, U.; Ny, L.; Davila Lopez, M.; Nilsson, J.A. Hypoxia-regulated gene expression explains differences between melanoma cell line-derived xenografts and patient-derived xenografts. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23801-23811, doi:10.18632/oncotarget.8181.
79. Gazdar, A.F.; Kurvari, V.; Virmani, A.; Gollahon, L.; Sakaguchi, M.; Westerfield, M.; Kodagoda, D.; Stasny, V.; Cunningham, H.T.; Wistuba, II; et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer* **1998**, *78*, 766-774, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19981209)78:6<766::aid-ijc15>3.0.co;2-l.
80. Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **1978**, *14*, 911-915, doi:10.1007/bf02616120.
81. McCallum, H.M.; Lowther, G.W. Long-term culture of primary breast cancer in defined medium. *Breast Cancer Res Treat* **1996**, *39*, 247-259, doi:10.1007/bf01806153.
82. Segaula, Z.; Primot, A.; Lepretre, F.; Hedan, B.; Bouchaert, E.; Minier, K.; Marescaux, L.; Serres, F.; Galieue-Zouitina, S.; Andre, C.; et al. Isolation and characterization of two canine melanoma cell lines: new models for comparative oncology. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1219, doi:10.1186/s12885-018-5114-y.
83. Einarsdottir, B.O.; Bagge, R.O.; Bhadury, J.; Jespersen, H.; Mattsson, J.; Nilsson, L.M.; Truve, K.; Lopez, M.D.; Naredi, P.; Nilsson, O.; et al. Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions. *Oncotarget* **2014**, *5*, 9609-9618, doi:10.18632/oncotarget.2445.
84. Kovacs, D.; Migliano, E.; Muscardin, L.; Silipo, V.; Catricalà, C.; Picardo, M.; Bellei, B. The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43295-43314, doi:10.18632/oncotarget.9232.
85. Sobiepanek, A.; Kowalska, P.D.; Soszyńska, M.; Ścieżyńska, A. Implementation of Geneticin in the in vitro cell culture and in vivo studies. **2020**, *6*, 79-87.
86. Sobiepanek, A.; Kowalska, P.D.; Soszyńska, M.; Kobiela, T.; Ścieżyńska, A. A short guide on the selection of melanocytes and melanoma cells' isolation procedures for cancer research. **2020**, *6*, 67-78.
87. Chapman, S.W.; Metzger, N.; Grest, P.; Feige, K.; von Rechenberg, B.; Auer, J.A.; Hottiger, M.O. Isolation, establishment, and characterization of ex vivo equine melanoma cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2009**, *45*, 152-162, doi:10.1007/s11626-008-9156-3.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Udział w realizacji projektów we współpracy międzynarodowej:

a) Ocena aktywności biologicznej nowych analogów witaminy D w zależności od aktywacji mechanizmu genomowego oraz ich wpływu na działanie chemioterapeutyków w komórkach czerniaka:

Badania prowadzone wspólnie z zespołem Profesora Andrzeja Słomińskiego (Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, USA) miały na celu ocenę właściwości biologicznych nowych analogów witaminy D w zależności od aktywacji klasycznego receptora witaminy D oraz aktywacji tzw. genomowego mechanizmu działania witaminy D. Na podstawie prowadzonych badań wytypowano analog 21(OH)pD jako obiecującą alternatywę dla klasycznej formy witaminy D, 1,25(OH)₂D₃, ponieważ hamował on wzrost wszystkich badanych linii czerniaka w mechanizmie niezależnym od aktywacji receptora witaminy D, VDR. Właściwości biologiczne tego właśnie analogu witaminy D mogą zatem znaleźć w przyszłości zastosowanie w leczeniu czerniaka, co jest szczególnie cenne z klinicznego punktu widzenia, gdyż wraz z progresją czerniaka dochodzi do spadku ekspresji receptora VDR. W ramach badań, we współpracy z Profesorem Robertem Tuckeyem ze School of Molecular Sciences, Faculty of Science, The University of Western Australia, oceniono także wpływ nowych analogów witaminy D na działanie klasycznych chemioterapeutyków, dakarbazyny i cisplatyny, w modelu ludzkiego czerniaka. Wynikiem nawiązanej współpracy jest **praca oryginalna nr 3**, składająca się na moje osiągnięcie naukowe, w której jestem pierwszym autorem, a także kolejna publikacja oryginalna, której jestem współautorem:

Wąsiewicz T, **Piotrowska A**, Wierzbicka J, Słominski AT, Żmijewski MA. *Antiproliferative Activity of Non-Calcemic Vitamin D Analogs on Human Melanoma Lines in Relation to VDR and PDIA3 Receptors*. Int J Mol Sci. 2018 Aug 31;19(9):2583. doi: 10.3390/ijms19092583.

b) Ocena wpływu analogów witaminy D na działanie leku antyangiogenego, cedyranibu, w czerniaku:

Inspiracją do podjęcia badań nad wpływem analogów witaminy D na działanie cedyranibu w komórkach czerniaka była praca kliniczna, wykazująca nieskuteczność tego leku stosowanego w monoterapii czerniaka [26]. Podjęte badania wykazały, że analogi witaminy D nasilają

działanie cytotoksyczne cedyranibu wobec komórek czerniaka, stanowią zatem przesłankę do potencjalnego włączenia analogów witaminy D do leczenia skojarzonego czerniaka. Wynikiem realizacji badań prowadzonych w ramach współpracy z Fernando Pereira Bessera z Institute of Biosciences, São Paulo State University, Brazil jest publikacja oryginalna, której jestem pierwszym autorem (**praca nr 4** z cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe).

c) Badania dotyczące wpływu witaminy D oraz jej analogów na odpowiedź komórek skóry na stres.

We współpracy z zespołem Profesora Andrzeja Słomińskiego (Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, USA) oraz Profesorem Robertem Tuckey (School of Molecular Sciences, Faculty of Science, The University of Western Australia) wzięłam udział w badaniach dotyczących różnych aspektów odpowiedzi komórek skóry na stres. Prace badawcze finansowane były z grantów N 405 623238 oraz N 402 662840 finansowanych przez MNSiW. Promieniowanie UV – poza indukcją skórnej syntezy witaminy D, odpowiada także za aktywację skórnego analogu osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA). Należy podkreślić, że aktywacja skórnego analogu osi HPA związana jest z modulacją skórnej odpowiedzi na stres, a więc może mieć znaczenie w rozwoju różnych schorzeń skóry. Ponieważ jak dotąd niewiele wiadomo o regulacyjnej roli witaminy D w odniesieniu do skórnego analogu osi HPA, prowadzone badania miały na celu ocenę wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz dwóch analogów witaminy D o niewielkim wpływie na gospodarkę wapniową, $21(\text{OH})\text{pD}$ oraz $20(\text{OH})\text{D}_3$, na oś HPA w ludzkich keratynocytach. Na podstawie wykonanych badań wykazano, iż zarówno $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jak i badane analogi witaminy D, $21(\text{OH})\text{pD}$ oraz $20(\text{OH})\text{D}_3$, stymulowały ekspresję badanych neuropeptydów w tym, CRF (ang. *corticotropin releasing factor*), urokortyny, proopiomelanokortyny oraz ich receptorów CRFR1, CRFR2, MC1R, MC2R, MC3R i MC4R. Prowadzone badania miały także na celu ocenę roli $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a także analogów $21(\text{OH})\text{pD}$, $20(\text{OH})\text{D}_3$ oraz dodatkowo kalcypotriolu, w modulowaniu odpowiedzi komórek naskórka na stres oksydacyjny. Co ciekawe, wykazano, że witamina D działa ochronnie na keratynocyty w przypadku krótkotrwałego stresu oksydacyjnego, zaś w przypadku przedłużającej się ekspozycji komórek na stres oksydacyjny – nasila działanie reaktywnych form tlenu. Przeprowadzone badania wykazały także, że analogi witaminy D nasilają działanie cisplatyny, której mechanizm działania opiera się m. in. na generowaniu stresu oksydacyjnego, co sugeruje istotną rolę utrzymywania odpowiedniego poziomu witaminy D u pacjentów leczonych tym

chemioterapeutykiem. Wynikiem realizacji badań prowadzonych w ramach współpracy międzynarodowej są publikacje oryginalne, których jestem współautorem:

1. **Piotrowska A**, Wierzbicka J, Ślebioda T, Woźniak M, Tuckey RC, Slominski AT, Żmijewski MA. *Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H₂O₂ or cisplatin on human keratinocytes.* Steroids. 2016 Jun;110:49-61. doi: 10.1016/j.steroids.2016.04.002.
2. Wierzbicka JM, Żmijewski MA, **Piotrowska A**, Nedoszytko B, Lange M, Tuckey RC, Slominski AT. *Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human epidermal keratinocytes.* Mol Cell Endocrinol. 2016 Dec 5;437:312-322. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.006.

d) Ocena przeciwnowotworowych właściwości melatoniny i jej pochodnych w komórkach czerniaka:

Realizowany projekt wielośrodkowy, finansowany przez Deutsche Forschungsgemeinschaft (projekt KL2900/2-1) miał na celu m. in. ocenę przeciwnowotworowych właściwości melatoniny, jej prekursora, serotoniny, oraz jej pochodnych w ludzkim modelu czerniaka. W toku badań wykazano, że badane związki prowadziły do rozprzęgnięcia fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), zahamowania procesu glikolizy, rozproszenia potencjału błony mitochondrialnej, czemu towarzyszyło generowanie znacznej ilości reaktywnych form tlenu w komórkach czerniaka. Z przeprowadzonych badań wypłynął zatem wniosek, że melatonina oraz jej pochodne mogą znaleźć w przyszłości swe zastosowanie w terapii pacjentów cierpiących na czerniaka. Projekt realizowany był w ramach wielośrodkowych badań naukowych (Department of Dermatology, University of Münster, Germany; Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego; Katedra Onkologii Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika; Department of Dermatology, Comprehensive Cancer Center, University of Alabama at Birmingham, USA; Department of Cellular and Structural Biology, UT Health, San Antonio, USA; Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice, France) dotyczących wpływu melatoniny i jej metabolitów na fizjologię komórek czerniaka. Wynikiem nawiązanej współpracy wielośrodkowej jest publikacja oryginalna, której jestem współautorem:

Bilska B, Schedel F, **Piotrowska A**, Stefan J, Żmijewski M, Pyza E, Reiter RJ., Steinbrink K, Slominski AT., Tulic MK., Kleszczyński K. *Mitochondrial function is controlled by melatonin and its metabolites in vitro in human melanoma cells.* J Pineal Res. 2021 Apr;70(3):e12728. doi: 10.1111/jpi.12728.

Powyższa praca składała się na cykl publikacji nagrodzonych Zespołową Nagrodą Naukową I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2022 roku (p. 6.9.1, str. 48).

5.2. Udział w realizacji projektów we współpracy z naukowcami z ośrodków krajowych:

a) Ocena właściwości biologicznych nowych analogów witaminy D z uwzględnieniem wpływu wprowadzanych modyfikacji strukturalnych na aktywność badanych związków:

W ramach współpracy nawiązanej z Panem Profesorem Andrzejem Kutnerem z Zakładu Bioanalizy i Analizy Leków, Wydziału Farmaceutycznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, zbadałam właściwości biologiczne szeregu nowych pochodnych witaminy D₂ i D₃ na modelach komórkowych ludzkiego czerniaka. Prowadzone badania pozwoliły na wytypowanie nowych, obiecujących analogów witaminy D, które mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w terapii skojarzonej czerniaka. Wynikiem nawiązanej współpracy są dwie publikacje oryginalne, w każdej z nich jestem pierwszym autorem, obie też wchodzi w skład cyklu publikacji składających się na moje osiągnięcie naukowe (**prace nr 1 i 2**).

5.3. Prace badawcze realizowane we współpracy z innymi jednostkami naukowymi Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

a) Ocena wpływu witaminy D na działanie leków przeciwnowotworowych w czerniaku:

Celem badań podjętych w ramach realizacji działania naukowego Miniatura 2021/05/X/NZ7/00470 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki było stworzenie modelu badawczego czerniaka opierającego się na komórkach czerniaka izolowanych od pacjentów chorujących na ten nowotwór. Opracowany model badawczy pozwolił następnie na ocenę wpływu witaminy D na działanie leków przeciwnowotworowych. Aby zrealizować tak zaplanowane badania nawiązałam współpracę z dwiema jednostkami GUMed, a mianowicie Katedrą i Kliniką Onkologii i Radioterapii GUMed (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne) oraz Katedrą Biochemii GUMed. Prowadzone badania wykazały, że witamina D uwrażliwia komórki czerniaka na leki antyangiogenne oraz terapię ukierunkowaną molekularnie. Współpraca ta zaowocowała dotychczas powstaniem jednej publikacji oryginalnej, w której

jestem pierwszym autorem, i która wchodzi w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego (**praca nr 5**).

b) Badania dotyczące roli wybranych cytokin, IL-16 oraz IL-33, w patogenezie łuszczycy:

Patogeneza łuszczycy do tej pory nie została w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że jest to przewlekła choroba skóry, której towarzyszy stan zapalny. Wśród złożonego repertuaru cytokin, które mogą przyczyniać się do zaostrzenia przebiegu łuszczycy postanowiono ocenić rolę dwóch wybranych, IL-16 oraz IL-33, ponieważ wiadomo, że te cytokiny stymulują chemotaksję limfocytów T. Badaniami objęto pacjentów Katedry i Kliniki Dermatologii GUMed (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne). Wykazano, że poziom IL-16 w surowicy chorych na łuszczycę był istotnie wyższy i korelował ze stopniem zaostrzenia choroby wyrażanym indeksem PASI (ang. psoriasis area and severity index), a zatem poziom IL-16 w surowicy pacjentów cierpiących na łuszczycę może służyć jako potencjalny wskaźnik służący do oceny zaawansowania choroby. Badania wykazały także, że IL-33 powiązana jest z patogenezą łuszczycy, bowiem odnotowano wzrost poziomu jej mRNA w skórnych zmianach łuszczycowych pacjentów, a ponadto wykazano, że 1,25(OH)₂D₃ może modulować ekspresję IL-33, co stwarza nowe przesłanki do badań nad ochronną rolą witaminy D w łuszczycy. Wynikiem współpracy są dwie publikacje oryginalne, których jestem współautorem:

1. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Purzycka-Bohdan D., Olszewska A., Nowak J. I., Szczerkowska-Dobosz A., Nedoszytko B., Nowicki R.J., Żmijewski M. A. *The effects of vitamin D on the expression of IL-33 and its receptor ST2 in skin cells: potential implication for psoriasis*. Int. J. Mol. Sci. 2021 : vol. 22, nr 23, art. ID 12907, s. 1-17.
2. Purzycka-Bohdan D., Szczerkowska-Dobosz A., Zabłotna M., Wierzbicka J., **Piotrowska A.**, Żmijewski M. A., Nedoszytko B., Nowicki R. *Assessment of interleukin 16 serum levels and skin expression in psoriasis patients in correlation with clinical severity of the disease*. PLoS ONE 2016: vol. 11, nr 10, art. ID e0165577, s. 1-12.

c) Rola stresu nitro- i oksydacyjnego w hodowlach 3D kostniakomięsaka:

Trójwymiarowe hodowle (3D) komórkowe stanowią nieocenione narzędzie badawcze, ponieważ w dużo większym stopniu odzwierciedlają naturalne środowisko wzrostu komórek. Realizowany projekt, finansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej Homing Plus/2012-5/11, miał na celu ocenę wpływu zmniejszonej penetracji tlenu w środowisku hodowlanym trójwymiarowej hodowli (kolagen, matrigel) ludzkiego kostniakomięsaka na

ekspresję wybranych markerów stresu nitro- i oksydacyjnego oraz ich porównanie do klasycznej hodowli dwuwymiarowej. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że trójwymiarowa hodowla kostniakomięśaka linii 143B nie jest dobrym modelem badawczym ze względu na wrażliwość tych komórek na hipoksję oraz stres nitro- i oksydacyjny. Wynikiem badań prowadzonych we współpracy z Katedrą Chemii Medycznej GUMed jest publikacja oryginalna, której jestem współautorem:

Górska M., Bieniasz Krzywiec P., Kuban-Jankowska A., Żmijewski M., Woźniak M., Wierzbicka J., **Piotrowska A.**, Siwicka K. *Growth inhibition of osteosarcoma cell lines in 3D cultures: role of nitrosative and oxidative stress*. Anticancer Res. 2016: vol. 36, nr 1, s. 221-229.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę = omówienie pozostałych osiągnięć

6.1. Omówienie publikacji, która składa się na mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, a nie została dotąd wymieniona w punkcie 5:

Pleiotropowe właściwości biologiczne witaminy D ze szczególnym uwzględnieniem jej fizjologicznej roli pełnionej w skórze:

W wyniku realizacji swoich zainteresowań badawczych napisałam także pracę pogładową podsumowującą ówczesny (rok 2016) stan wiedzy na temat pleiotropowych właściwości biologicznych witaminy D ze szczególnym uwzględnieniem jej fizjologicznej roli pełnionej w skórze. Praca omawia sposób skórnej syntezy witaminy D, kolejne etapy jej aktywacji, a także mechanizm działania witaminy D. Porusza także rolę tej witaminy w fizjologii skóry oraz jej właściwości w szeregu patologii skórnych, takich jak nowotwory skóry, łuszczyca, atopowe zapalenie skóry czy bielactwo. Praca ta wypełniła lukę w ówczesnym piśmiennictwie na temat witaminy D, była bowiem wielokrotnie cytowana – wg bazy Scopus aż 58 razy (bez autocytowań, dane na dzień 07.06.2023).

“*Vitamin D in the skin physiology and pathology.*” **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Żmijewski Michał A.. Acta Biochim. Pol. 2016: vol. 63, nr 1, s. 17-29.

6.2. Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach:

1. Udział w projekcie finansowanym przez MNiSW o numerze N 405 623238 „*Określenie aktywności biologicznej nowych pochodnych witaminy D₃ hamujących wzrost komórek nowotworowych skóry*”, którego kierownikiem był prof. dr hab. Michał A. Żmijewski, Katedra

Histologii GUMed. Projekt był realizowany w latach 2010-2013. Jestem współautorem dwóch publikacji oryginalnych będących wynikiem realizacji projektu. Część wyników uzyskanych w czasie realizacji projektu stała się podstawą mojej rozprawy doktorskiej:

1. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Ślebioda T., Woźniak M., Tuckey R. C., Słomiński A. T., Żmijewski M. A. *Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H₂O₂ or cisplatin on human keratinocytes*. Steroids 2016: vol. 110, s. 49-61.
2. Wąsiewicz T., **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Słominski A. T., Żmijewski M.A. *Antiproliferative activity of non-calcemic vitamin D analogs on human melanoma lines in relation to VDR and PDIA3 receptors*. Int. J. Mol. Sci. 2018: vol. 19, nr 9, art. ID 2583, s. 1-16.

2. Wykonawca w projekcie finansowanym przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej Homing Plus/2012-5/11 „*Novel three-dimensional osteosarcoma and osteoblast cultures influence oxidative and nitrosative stress and regulate changes in expression of growth factors receptors in cultures supplemented with growth factors*”, którego kierownikiem była dr Karolina Siwicka, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny. Projekt realizowany był w latach 2012-2014. Jestem współautorem jednej publikacji oryginalnej będącej wynikiem realizacji projektu:

1. Górńska M., Bieniasz Krzywiec P., Kuban-Jankowska A., Żmijewski M., Woźniak M., Wierzbicka J., **Piotrowska A.**, Siwicka K. *Growth inhibition of osteosarcoma cell lines in 3D cultures: role of nitrosative and oxidative stress*. Anticancer Res. 2016: vol. 36, nr 1, s. 221-229.

3. Udział w projekcie finansowanym przez MNiSW o numerze N 402 662840 „*Wpływ neuropeptydów oraz ich receptorów na różnicowanie się i wzrost komórek macierzystych naskórka*”, którego kierownikiem był prof. dr hab. Michał A. Żmijewski, Katedra Histologii GUMed. Projekt był realizowany w latach 2011-2014. Jestem współautorem jednej publikacji oryginalnej będącej wynikiem realizacji projektu:

1. Wierzbicka J. M., Żmijewski M. A., **Piotrowska A.**, Nedoszytko B., Tuckey R. C., Lange M., Słominski A. T. *Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human epidermal keratinocytes*. Mol. Cell. Endocrinol. 2016: vol. 437, s. 312-322

4. Kierownik zadania badawczego, finansowanego ze środków Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przeznaczonych na rozwój młodych naukowców „*Modulacyjny wpływ nowych analogów witaminy D na działanie leków przeciwnowotworowych w komórkach czerniaka*” o numerze MN 01-0250/08/280. Projekt był realizowany w latach 2016-2020. Jestem współautorem trzech publikacji oryginalnych będących wynikiem realizacji projektu, wszystkie wchodzą w skład mojego dzieła habilitacyjnego:

1. **Piotrowska A.**, Beserra F.P., Wierzbicka J.M., Nowak J.I., Żmijewski M.A. *Vitamin D Enhances Anticancer Properties of Cediranib, a VEGFR Inhibitor, by Modulation of VEGFR2 Expression in Melanoma Cells*. *Front. Oncol.*; 2021;11:763895.
2. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Kwiatkowska K., Chodyński M, Kutner A., Żmijewski M.A. *Antiproliferative activity of side-chain truncated vitamin D analogs (PRI-1203 and PRI-1204) against human malignant melanoma cell lines*. *Eur. J. Pharm.*; 881; 2020; 173170.
3. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Rybarczyk A., Tuckey R.C., Słomiński A.T., Żmijewski M.A. *Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line*. *Int. J. Oncol.*; 54: 1481-1495, 2019.

5. Udział w projekcie finansowanym przez NCN o numerze 2017/25/B/NZ3/00431 „*Alternatywne szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez witaminę D*”, którego kierownikiem był prof. Michał A. Żmijewski, Katedra Histologii GUMed. Projekt realizowany w latach 2018-2023. Jestem współautorem dwóch publikacji oryginalnych będących wynikiem realizacji projektu:

1. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Purzycka-Bohdan D., Olszewska A., Nowak J. I., Szczerkowska-Dobosz A., Nedoszytko B., Nowicki R. J., Żmijewski M. A. *The effects of vitamin D on the expression of IL-33 and its receptor ST2 in skin cells: potential implication for psoriasis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 : vol. 22, nr 23, art. ID 12907, s. 1-17.
2. Nowak J. I., Olszewska A. M., **Piotrowska A.**, Myszczyński K., Domżański P., Żmijewski M. A. *PDIA3 modulates genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in squamous cell carcinoma of the skin*. *Steroids*; artykuł dostępny online od 05. 08. 2023; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109288>.

6. Kierownik działania naukowego Miniatura 5 finansowanego przez NCN o numerze 2021/05/X/NZ7/00470 „*Wpływ witaminy D na działanie leków ukierunkowanych molekularnie*

na modelu ludzkiego czerniaka”, Katedra Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny. Projekt realizowany w latach 2021-2022. Publikacja będąca wynikiem realizacji działania naukowego wchodzi w skład mojego dzieła habilitacyjnego:

1. **Piotrowska A.**, Zaucha R., Król O., Żmijewski M.A. *Vitamin D modulates the response of patient-derived metastatic melanoma cells to anticancer drugs*. *Int. J. Mol. Sci.*; 2023, 24, 8037.
7. Kierownik projektu badawczego przyznanego w II edycji konkursu „Młody Twórca Nauki”, realizowanego w ramach Programu „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza” „Ocena wpływu optymalnego stężenia witaminy D w komórkach czerniaka na ekspresję cząsteczki PD-1 komórek T CD8+ mikrośrodowiska nowotworowego oraz biologiczne właściwości tych komórek”. Projekt w trakcie realizacji (od 11. 2022, planowana data ukończenia 11. 2023).

6.3. Uczestnictwo w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

1. Projekt „Wielomodułowy program poprawy efektywności i jakości funkcjonowania Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowany ze środków unijnych z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014 – 2020 (PO WER 3.5). Wykonawca projektu w ramach zadania – Dostosowanie i realizacja zmodyfikowanych programów kształcenia na wybranych kierunkach studiów (moduł I; Narodowe Centrum Badań i Rozwoju).
2. Grant dydaktyczny Erasmus+ finansowany przez Komisję Europejską w dziedzinie KA220 HED Cooperation partnerships in higher education, nr 2022 1 RO01 KA220 HED 000089017 „Digital transformation of Histology and Histopathology by Virtual Microscopy (VM) for an innovative medical school curriculum”, realizowany w latach 2022-2024, (nr rejestracyjny GUMed: 12-00004). Grant ten realizowany jest we współpracy z zespołem Uniwersytetu Medycznego i Farmaceutycznego w Jassy, Rumunia (lider grantu) oraz Meditcinsky Universitet Plovdiv, Bulgaria, Universidad de Alicante, Spain, University of Peloponnese, Greece, Fundatia Euroed, Romania (instytucja koordynatora). Wykonawca projektu, który ma na celu stworzenie wspólnej bazy wirtualnego nauczania histologii i histopatologii w ośrodkach dydaktycznych Unii Europejskiej.

6.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych:

Od 2008 – członek Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (PTHiC)

W latach 2013-2016 – pełniłam funkcję sekretarza Oddziału Gdańskiego PTHiC.

6.5. Recenzowanie artykułów w czasopismach naukowych:

- Oncology Reports IF = 4.136
- Frontiers in Nutrition IF = 6.59
- International Journal of Molecular Medicine IF = 5.314

6.6. Aktywny udział w konferencjach naukowych PO DOKTORACIE:

a) ze zjazdów krajowych:

1. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Tuckey R. C., Słominski A. T., Zieliński J., Żmijewski M. A. *Analogi witaminy D selektywnie modelują ekspresję neuropeptydów w skórze ludzkiej*. Standardy Med. Pediatria 2015: t. 12, nr 5, s. 895. EVIDAS 2015: 2 Międzynarodowa konferencja: Witamina D: minimum, maximum, optimum, Warszawa, 16-17 października 2015.
2. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Purzycka-Bohdan D., Szczerkowska-Dobosz A., Sobjanek M., Nedoszytko B., Żmijewski M. A. *Witamina D moduluje poziom IL-16 w keratynocytach oraz w naskórku*. Standardy Med. Pediatria 2015: t. 12, nr 5, s. 901. EVIDAS 2015: 2 Międzynarodowa konferencja: Witamina D: minimum, maximum, optimum, Warszawa, 16-17 października 2015.
3. Żmijewski M. A., Wierzbicka J., **Piotrowska A.**, Antoniewicz J., Zieliński J., Słominski A. *Vitamin D modulates the in expression of neuropeptides and their receptors in the skin*. XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików: Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Międzyzdroje, 9-12 września 2015.
4. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Ślebioda T., Woźniak M., Żmijewski Michał A. Wykład. *Vitamin D enhances toxic effects of H₂O₂ on human HaCaT keratinocytes: model for the interaction of vitamin D with common anticancer drugs*. XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików: Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Międzyzdroje, 9-12 września 2015. Wystąpienie w formie wykładu.

5. Purzycka-Bohdan D., Zabłotna M., Wierzbicka J., Szczerkowska-Dobosz A., **Piotrowska A.**, Żmijewski M., Nedoszytko B., Nowicki R. *Ocena poziomu interleukiny 16 w surowicy krwi i skórze chorych na łuszczycę*. Przegł. Dermatol. 2016: t. 103, supl. 1, s. S184. 31 Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, Wrocław, 11-14.05.2016.
6. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Żmijewski M. A., Słomiński Andrzej T. *Antyproliferacyjne właściwości nowych analogów witaminy D wobec ludzkiej linii czerniaka złośliwego*. 50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików: Od przeszłości do terażniejszości..., Wojanów, 5-8 września 2016.
7. Żmijewski M., Wierzbicka J., **Piotrowska A.**, Stanisławowski M., Purzycka-Bohdan D., Szczerkowska-Dobosz A. *Interleukina 33 w łuszczycy*. 50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików: Od przeszłości do terażniejszości..., Wojanów, 5-8 września 2016.
8. Wierzbicka J., Purzycka-Bohdan D., **Piotrowska A.**, Szczerkowska-Dobosz A., Zieliński J., Żmijewski M. A. *Potential new protective mechanisms for vitamin D in psoriasis*. EVIDAS 2017: 3 Międzynarodowa konferencja: Witamina D: minimum, maximum, optimum, Warszawa, 22-23 września 2017.
9. **Piotrowska A.**, Wierzbicka J., Rybarczyk A., Tuckey Robert C., Słominski A. T., Żmijewski M. *Biological activity of new vitamin D analogs in melanoma cells*. 53rd Symposium of Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: From ultrastructure to in vivo imaging: progress in microscopical techniques, Gdańsk, 15-18 September 2019. **Wystąpienie w formie wykładu.**
10. **Piotrowska A.** *Vitamin D in melanoma therapy, coincidence?* EVIDAS 2019; 4th International Conference: Vitamin D: minimum, maximum, optimum, 11-12.10. 2019, Warszawa, EVIDAS 2019. **Wykład na zaproszenie organizatorów.**

b) ze zjazdów zagranicznych:

1. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Tuckey R. C., Słominski A. T., Żmijewski M. A. *Vitamin D analogues selectively modulate the expression of neuropeptides in skin*. J. Invest. Dermatol. 2015: vol. 135, suppl. 2, s. S48. 45th Annual ESDR Meeting, Rotterdam, The Netherlands, September 9-12, 2015.
2. Purzycka-Bohdan D., Zabłotna M., **Piotrowska A.**, Antoniewicz J., Heyka A., Żmijewski M., Szczerkowska-Dobosz A., Nedoszytko B., Lange M., Nowicki R.

- Increased serum and skin levels of interleukin-16 in psoriatic patients: correlation with disease intensity.* W: 12th EADV Spring Symposium, Valencia, Spain, 5-8 March 2015.
3. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Slominski A., Żmijewski M. A. *Vitamin D enhances skin HPA signalling.* J. Invest. Dermatol. 2016: vol. 136, nr 9, suppl. 2, s. S181. 46th Annual ESDR Meeting, Munich, Germany, September 7-10, 2016.
 4. Wierzbicka J. M., **Piotrowska A.**, Żmijewski M. A. *The potential role of VDR and its coactivators in the regulation of skin analogue HPA axis expression in keratinocytes.* J. Invest. Dermatol. 2019: vol. 139, nr 9S, suppl. 9, s. S254. 49th Annual ESDR Meeting, Bordeaux, France, September, 18-21, 2019.
 5. **Piotrowska A.**, Beserra F. P., Wierzbicka J., Żmijewski M. *Vitamin D enhances anticancer properties of cediranib, a VEGFR inhibitor, by modulation of VEGFR2 expression in human melanoma cells.* J. Invest. Dermatol. 2021: vol. 141, nr 10, suppl., s. S199. 50th Annual ESDR Meeting, virtual, 22-25 September 2021.
 6. Schedel F., Bilska B., **Piotrowska A.**, Żmijewski M., Pyza E., Steinbrink K., Böhm M., Slominski T., Tulic M. K., Kleszczynski K. *Melatonin and its metabolites regulate mitochondrial function in human melanoma cells.* Exp. Dermatol. 2021: vol. 30, nr 3, s. E30. 47th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), virtual, 04-06 March 2021.

6.7. Ukończone kursy i szkolenia

1. **2020:** Ukończenie kursu doskonalącego „*Szkolenie dla osób wykonujących procedury, uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach, uczestniczących w wykonywaniu procedur i sprawujących opiekę nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku*” (nr kursu: 2020-3528-140) zrealizowanego zgodnie z programem określonym w załącznikach nr 2, 3, 4 i 5 do Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 maja 2015 r. w sprawie szkoleń, praktyk i staży dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych z późniejszymi zmianami (Dz.U. poz. 628 z dnia 08. 05. 2015; Dz.U. poz. 2540 z dnia 30. 12. 2019). Zaświadczenie nr 2020-3528-140-033.
Szkolenie organizowane przez Katedrę i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział farmaceutyczny GUMed, Kolegium Kształcenia Podyplomowego w dniach 03.02.2020 - 07.02.2020.
2. **2020:** Ukończenie kursu doskonalącego „*Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie*” (nr kursu:

2020-3573-139) zrealizowanego zgodnie z programem określonym w załączniku nr 1 do Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 maja 2015 r. w sprawie szkoleń, praktyk i staży dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystywaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. poz 628 z dnia 08. 05. 2015). Zaświadczenie nr 2020-3573-139-034.

Szkolenie organizowane przez Katedrę i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział farmaceutyczny GUMed, Kolegium Kształcenia Podyplomowego w dniach 03.02.2020 - 07.02.2020.

3. **2021:** Szkolenie „*Kompensacja i kontrole kompensacji w cytometrii przepływowej*”. Szkolenie organizowane przez BD Biosciences, Becton Dickinson Polska sp. z o.o. odbyło się 22. 06. 2021. Prowadzący szkolenie: Marzena Biernacka, Application Specialist.
4. **2021:** Kurs dla Kadry Dydaktycznej GUMed „*Pedagogika Dorosłych*” w ramach projektu „*Poprawa jakości kształcenia studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego poprzez rozwój infrastruktury dydaktycznej i wsparcie procesu nauczania o metody symulacji medycznej*” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020.

6.8. Udział w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych

1. Członek Komitetu Organizacyjnego The 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry - The ICHC 2008: 'Imaging of Cell Dynamics'; 23-27.08.2008, Gdańsk
2. Członek Komitetu Organizacyjnego 53rd Symposium of Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: From ultrastructure to in vivo imaging: progress in microscopical techniques; 15-18.09.2019, Gdańsk
3. Członek Komitetu Naukowego 4th International Conference: Vitamin D: minimum, maximum, optimum, 11-12.10. 2019, Warszawa, EVIDAS 2019

6.9. Nagrody za działalność naukową

1. **2022:** Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za „*Analizę w modelach komórkowych in vitro czerniaka ludzkiego przeciwnowotworowych właściwości witaminy D, melatoniny oraz ich pochodnych*”.

2. **2021:** Nagroda specjalna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za publikację „*The effects of vitamin D on the expression of IL-33 and its receptor ST2 in skin cells : potential implication for psoriasis*”. Wierzbicka J. M., Piotrowska A., Purzycka-Bohdan D., Olszewska A., Nowak J.I., Szczerkowska-Dobosz A., Nedoszytko B., Nowicki R. J., Żmijewski M.A. Int. J. Mol. Sci. 2021: vol. 22, nr 23, art. ID 12907, s. 1-17.
3. **2021:** Nagroda za plakat „*Vitamin D enhances anticancer properties of cediranib, a VEGFR inhibitor, by modulation of VEGFR2 expression in human melanoma cells*” (Piotrowska A., Beserra F. P., Wierzbicka J., Żmijewski M.) prezentowany podczas międzynarodowej konferencji 50TH ANNUAL ESDR MEETING 2021 (European Society for Dermatological Research), virtual, 22 – 25. 09.2021.
4. **2020:** Nagroda zespołowa II stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za „*Badania molekularnych mechanizmów działania naturalnych związków przeciwnowotworowych w modelach komórkowych in vitro*”.
5. **2016:** Nagroda za najlepszy plakat w sesji „Nowotwory” prezentowany podczas 50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (PTHC) „Od przeszłości do terażniejszości” 5 – 8. 09. 2016, Wojanów. „*Antyproliferacyjne właściwości nowych analogów witaminy D wobec ludzkiej linii czerniaka złośliwego*”. Piotrowska A., Wierzbicka J., Żmijewski M. A., Słomiński Andrzej T.
6. **2016:** Nagroda indywidualna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za wyróżnioną rozprawę doktorską.

6.10. Działalność dydaktyczna

1. Od roku **2007** należę do kadry dydaktycznej Katedry i Zakładu Histologii GUMed. Biorę aktywny udział w organizacji dydaktyki, w przygotowywaniu prezentacji na prowadzone zajęcia, w układaniu pytań stanowiących treść testów przeprowadzanych na początku każdego zajęcia ze studentami, treść kolokwium oraz pytań egzaminacyjnych. Na przestrzeni lat 2007-2023 prowadziłam następujące zajęcia:
 - Histologia z cytofizjologią – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (pierwotnie Akademia Medyczna w Gdańsku, AMG);

- Histology with Cell Physiology – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku English Division Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
 - Histologia z cytofizjologią – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku kierunku lekarsko-dentystycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
 - Metody barwienia komórek i tkanek. Teoria i praktyka – zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
 - Mikroskopowa diagnostyka różnicowa prawidłowych i patologicznych komórek i tkanek – zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed;
 - Microscopic differential diagnosis of normal and pathological cells and tissues – zajęcia fakultatywne dla studentów English Division GUMed;
 - Wprowadzenie do biologii komórki nowotworowej – zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed;
 - Introduction to Cancer Cytobiology – zajęcia fakultatywne dla studentów English Division GUMed;
 - Rola witaminy D w zdrowiu i chorobie – zajęcia dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed;
 - The role of vitamin D in health and disease – zajęcia fakultatywne dla studentów English Division GUMed;
2. Wykonawca w projekcie „Wielomodułowy program poprawy efektywności i jakości funkcjonowania Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowany ze środków unijnych z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014 – 2020 (PO WER 3.5) w ramach zadania „Dostosowanie i realizacja zmodyfikowanych programów kształcenia na wybranych kierunkach studiów” (moduł I; Narodowe Centrum Badań i Rozwoju). – omówiono wcześniej w punkcie 6.3.1.
3. Tłumaczenie podręcznika Junqueira’s Basic Histology: Text and Atlas – rozdział 17, układ oddechowy (Histologia Junqueira: podręcznik i atlas / Anthony L. Mescher ; red. nauk. 1 wyd. pol. Z. Kmiec, R. Wiaderkiewicz. Wrocław, 2020).

4. Otrzymane nagrody dydaktyczne:

- **2021:** Nagroda zespołowa dydaktyczna II stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za przygotowanie polskiego wydania podręcznika *Histologia Junqueira*;
- **2022:** Dyplom uznania dla najlepiej ocenianego nauczyciela w ankiecie dydaktycznej podpisany przez: Prorektora ds. jakości kształcenia, Prorektora ds. rozwoju i organizacji kształcenia, Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

6.11. Opieka nad studentami

Opiekun pracy magisterskiej wykonanej w Katedrze i Zakładzie Histologii GUMed przez studentkę Alicję Wyszowską (kierunek analityka medyczna) pt. „*Badanie wrażliwości komórek czerniaka na analogi witaminy D i lumisterolu*”.

6.12. Działalność popularyzująca naukę

1. 2021: Udział w projekcie „Nauka to ludzie. Promocja osiągnięć naukowych oraz kariery naukowej na przykładzie pracowników GUMed”, który został sfinansowany ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu „Społeczna odpowiedzialność nauki”.

Udział w filmie o tytule: „Suplement czy lek? Badania mechanizmów molekularnych witaminy D”, zespół badawczy prof. Michała Żmijewskiego z Katedry i Zakładu Histologii GUMed.

<https://naukatoludzie.gumed.edu.pl/suplement-czy-lek/>

2. Udział w organizacji Dnia Otwartego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego 2023, który odbył się 31 marca 2023 r. Organizacja stoiska Katedry i Zakładu Histologii GUMed: nadzór nad studentami Koła Naukowego przy Katedrze Histologii GUMed zaangażowanymi w Dzień Otwarty GUMed 2023, przygotowanie plakatu promującego Katedrę Histologii, obsługa multimedialnego stoiska mikroskopowego, prezentacja i omawianie wybranych preparatów histologicznych uczniom szkół ponadpodstawowych zainteresowanych studiami w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, dyskusje z uczniami.

6.13. Plany naukowe

W kolejnych latach pragnę kontynuować badania dotyczące modulacyjnego wpływu witaminy D oraz jej analogów na działanie leków przeciwnowotworowych w komórkach czerniaka. We współpracy z Panią Profesor Renatą Zauchą z Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii GUMed chciałabym objąć swymi badaniami większą niż dotychczas grupę pacjentów onkologicznych chorych na czerniaka złośliwego. Wyniki moich dotychczasowych badań przedklinicznych nad możliwością zastosowania witaminy D w leczeniu skojarzonym czerniaka wydają się być obiecujące, dlatego też chciałabym je kontynuować, aby dogłębnie poznać molekularny mechanizm współdziałania witaminy D z lekami przeciwnowotworowymi. Interesuje mnie nie tylko oddziaływanie witaminy D na komórki czerniaka, ale także na fibroblasty powiązane z guzem (ang. *cancer associated fibroblasts, CAFs*), ponieważ ich wpływ na powodzenie leczenia przeciwnowotworowego wydaje się ogromnie ważny.

Immunoterapia czerniaka, obok terapii ukierunkowanej molekularnie, stanowi jedną z dwóch innowacyjnych metod leczenia tego nowotworu, dynamicznie rozwijanych w ostatniej dekadzie. Dlatego też w 2022 roku rozpoczęłam także badania dotyczące oceny wpływu witaminy D na ekspresję receptora PD-1 na powierzchni komórek T CD8+, należących do mikrośrodowiska czerniaka, oraz biologiczne właściwości tych komórek (projekt badawczy „Młody Twórca Nauki” realizowany w ramach Programu „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza”). Uważa się, że w immunoterapii czerniaka, wśród złożonego repertuaru komórek odpowiedzi immunologicznej kluczową rolę pełnią właśnie limfocyty T CD8+. Ponieważ ponad połowa leczonych pacjentów nie odpowiada na blokady punktów kontrolnych układu immunologicznego, nawet w połączeniu z innymi metodami leczenia, identyfikacja nowych biomarkerów pozwalających na zwiększenie skuteczności klinicznej jest palącą kwestią. Zważywszy, iż do tej pory nie poznano wpływu witaminy D na populację komórek CD8+ w czerniaku, chciałabym w najbliższej przyszłości zgłębić tę kwestię.

6.14. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego (07. 06. 2023):

Wykaz dorobku naukowego przedstawiono szczegółowo w załącznikach „Analiza bibliometryczna publikacji dr Anny Piotrowskiej w postępowaniu o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego” oraz „Wskaźniki bibliometryczne publikacji autorstwa dr Anny Piotrowskiej stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 219 ust. 2 pkt b Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.)”.

Summaryczna wartość Impact Factor = 59.269

Summaryczna wartość Impact Factor po uzyskaniu stopnia doktora IF = 57.913

Summaryczna wartość Impact Factor po uzyskaniu stopnia doktora z wyłączeniem dzieła
IF = 34.410

Summaryczna wartość punktów MEiN = 1001

Summaryczna wartość punktów MEiN po uzyskaniu stopnia doktora: MEiN = 965

Summaryczna wartość punktów MEiN po uzyskaniu stopnia doktora z wyłączeniem dzieła:
MEiN = 495

Indeks Hirscha:

- Według bazy Scopus: 9
- Według bazy Web of Science: 9

Ilość cytowań:

- Według bazy Scopus: 254, w tym 222 bez autocytowań
- Według bazy Web of Science: 232, w tym 200 bez autocytowań

Oświadczam, iż nie ubiegałam się dotychczas o nadanie stopnia doktora habilitowanego.