Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Ewa Augustin

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

Magister biologii: 1986 rok, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Gdański; praca magisterska pt.: "Polimorfizm esteraz kilku krajowych populacji *Cyprinotus (Heterocypris) incongruens".* Promotor: Prof. dr hab. Tadeusz Sywula

Doktor nauk biologicznych: 1998 rok, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytet Gdański; rozprawa doktorska pt.: "Wpływ związków biologicznie czynnych na cykl życiowy oraz programowaną śmierć (apoptozę) komórek nowotworowych". Promotor: Prof. dr hab. inż. Jerzy Konopa (Politechnika Gdańska), recenzenci: Prof. dr hab. med. Jacek M. Witkowski (Gdański Uniwersytet Medyczny), Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn (Uniwersytet Gdański).

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

1986 – 1998 - chemik na etacie inżynieryjno-technicznym, specjalista na etacie naukowo-technicznym w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

1999 – 2000 - asystent w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

2000 – 2011 - adiunkt w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

2011 – do chwili obecnej - starszy wykładowca w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego przeze mnie wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji dotyczący określenia nowych efektów biologicznych i biochemicznych indukowanych przez przeciwnowotworowe pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych, w aspekcie ich potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej.

A) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Efekty biologiczne i biochemiczne indukowane przez przeciwnowotworowe pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych

B) Autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania.

Impact factor (IF) podano według Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania pracy, za wyjątkiem pracy w poz. 7 (monografia), gdzie podano IF z 2013/2014 roku; punkty MNiSW według wykazu czasopism naukowych (lista A) opublikowanego przez MNiSW 31 grudnia 2014.

Prace oryginalne:

1. **E. Augustin***, A. Moś-Rompa, A. Skwarska, J.M. Witkowski, J. Konopa. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis of human leukemia cells by potent antitumor triazoloacridinone C-1305. *Biochemical Pharmacology,* 72 (12), 1668-1679, 2006.
   IF 3,581; 5-letni IF 4,772; punkty MNiSW 40

2. **E. Augustin*,** B. Borowa-Mazgaj, A. Kikulska, M. Kordalewska, M. Pawłowska. CYP3A4 overexpression enhances the cytotoxicity of the antitumor triazoloacridinone derivative C-1305 in CHO cells. *Acta Pharmacologica Sinica,* 34 (1), 146-156, 2013.
   IF 2,496; 5-letni IF 2,673; punkty MNiSW 30

3. **E. Augustin***, M. Pawłowska, J. Polewska, A. Potęga, Z. Mazerska. Modulation of CYP3A4 activity and induction of apoptosis, necrosis and senescence by the anti-tumour imidazoacridinone C-1311 in human hepatoma cells. *Cell Biology International,* 37(2), 109-120, 2013.
   IF 1,635; 5-letni IF 1,543; punkty MNiSW 15

4. **E. Augustin***, M. Niemira, A. Hołownia, Z. Mazerska. CYP3A4-dependent cellular response does not relate to CYP3A4-catalysed metabolites of C-1748 and C-1305 acridine antitumor agents in HepG2 cells. *Cell Biology International,* 38 (11), 1291 - 1303, 2014.
   IF 1,635; 5-letni IF 1,543; punkty MNiSW 15

5. A. Skwarska, **E. Augustin**, M. Beffinger, A. Wojtczyk, S. Konicz, K. Laskowska, J. Polewska. Targeting of FLT3-ITD kinase contributes to high selectivity of imidazoacridinone C-1311 against FLT3-activated leukemia cells. *Biochemical Pharmacology,* 95(4), 238 - 252, 2015.
   IF 4,650; 5-letni IF 4,772; punkty MNiSW 40

6. **E. Augustin***, A. Skwarska, A. Weryszko, I. Pelikant, E. Sankowska, B. Borowa-Mazgaj. Antitumor triazoloacridinone C-1305 inhibits FLT3 kinase activity and potentiates apoptosis in mutant FLT3-ITD leukemia cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36 (3), 385 - 399, 2015.
   IF 2,496; 5-letni IF 2,673; punkty MNiSW 30

Monografia:

7. Z. Mazerska, **E. Augustin*,** A. Składanowski, M. Bibby, J. A. Double, J. Konopa. C-1311. Antineoplastic. *Drugs of the Future,* 23 (7), 702-706, 1998.
   IF 0,253; 5-letni IF 0,46; punkty MNiSW 15

   ***** autor korespondencyjny.

Sumaryczny Impact factor: 16,746

Sumaryczny 5-letni Impact Factor: 18,436

Łączna liczba punktów MNiSW: 185

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku nr 3 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki). Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku nr 5.

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

W prezentowanych pracach składających się na moje osiągnięcie naukowe podjęłam próbę wyjaśnienia mechanizmu biologicznego i biochemicznego działania przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny, zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, wobec komórek nowotworowych.

Wstęp.

Nowotwory złośliwe w Polsce stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę śmierci, a leczenie chorób nowotworowych to wciąż jeden z najtrudniejszych problemów współczesnej medycyny i największe jej wyzwanie. Niepowodzenia w leczeniu nowotworów wynikają m.in. z nie do końca poznanych przyczyn tej choroby, braku istotnych różnic pomiędzy komórką nowotworową, a prawidłową, jak i ze stosunkowo niskiej skuteczności stosowanych chemoterapeutyków. Stąd też, ciągle poszukuje się związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej, a jednocześnie obniżonej toksyczności, które mogłyby w znaczący sposób przyczynić się do poprawy skuteczności leczenia tych niezwykle skomplikowanych i podstępnych w swej naturze chorób. Do najistotniejszych cech komórek nowotworowych wg R. Weinberga i D. Hanahana należą: niezależność od sygnałów wzrostu, brak wrażliwości na inhibitory wzrostu, unikanie apoptozy, nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność do angiogenezy i inwazji sąsiednich tkanek [1]. 10 lat później, Ci sami autorzy dodali jeszcze kolejne 4 cechy komórek nowotworowych: niestabilność genetyczna, unikanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, zmiany w metabolizmie komórki oraz jako okoliczność sprzyjającą rozwojowi nowotworu, obecność stanów zapalnych w organizmie [2]. W przypadku rozwoju choroby nowotworowej różna jest kolejność pojawiania się tych zmian, ponadto, nie wszystkie z nich muszą się w ogóle ujawnić, aby choroba się rozwinęła. Ponadto, ze względu na polimorfizm i różną ekspresję enzymów metabolizujących ksenobiotyki oraz białek kontrolujących cykl komórkowy, pacjenci reagują w różny sposób na zastosowany chemoterapeutyk. Dlatego też, ciągle nie udało się otrzymać leku, który byłby skuteczny w walce z większością nowotworów. Stąd też celem współczesnej terapii przeciwnowotworowej jest zaprojektowanie leku nie tylko o wysokim potencjale terapeutycznym, ale również o podwyższonej skuteczności poprzez skierowanie bezpośrednio na komórki nowotworowe, z uwzględnieniem różnic osobniczych u poszczególnych pacjentów. Terapia celowana (*ang. targeted therapy)* wykorzystuje nowo poznane mechanizmy proliferujących komórek nowotworowych i polega na selektywnym hamowaniu rozwoju nowotworu, nie uszkadzając zdrowych komórek organizmu.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej od wielu lat prowadzi się badania dotyczące poszukiwania potencjalnych leków przeciwnowotworowych wśród pochodnych akrydyny. Z uwagi na centralną rolę DNA w kontroli struktury i funkcji komórki prawidłowej jak i nowotworowej, szczególnie cenną grupę leków stanowią związki zaburzające jego prawidłowe funkcjonowanie. Związki te mogą oddziaływać z DNA poprzez interkalację, niekowalencyjne wiązanie się w bruzdach lub tworzenie wiązań kowalencyjnych, mono- lub bifunkcyjnych [3, 4]. Badania te doprowadziły do otrzymania pierwszego i jak do tej pory jedynego, oryginalnego polskiego leku przeciwnowotworowego o nazwie Ledakrin (Nitracrine^{R}, C-283) [5, 6], który w 1976 został wprowadzony do kliniki do stosowania u pacjentów z nowotworem jajników, otrzewnej i niektórych typów raka skóry. Jednak ze względu na wysoką toksyczność, mutagenność i skutki uboczne [7, 8], został stosunkowo szybko wycofany z terapii klinicznej. Dalsze badania prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej doprowadziły do otrzymania kolejnych grup pochodnych akrydyny wykazujących aktywność przeciwnowotworową: imidazoakrydonów, triazoloakrydonów oraz 4-metylo-1-nitroakrydyn.

Otrzymanie nowych związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej rodzi pytanie odnośnie ich mechanizmu działania, co jest bardzo ważne dla racjonalnego projektowania terapii indywidualnej, budzącej obecnie duże zainteresowanie. Ponadto, tego typu badania pozwolą na wskazanie możliwości modyfikacji struktury tych związków w celu uzyskania pochodnych o korzystniejszych właściwościach przeciwnowotworowych. Stąd też wybrane pochodne z grupy imidazoakrydonów (C-1311), triazoloakrydonów (C-1305) i 4-metylo-1-nitroakrydyn (C-1748) są przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań, których celem jest poznanie i wyjaśnienie biologicznego i biochemicznego mechanizmu działania tych związków wobec komórek nowotworowych.

Krótka charakterystyka związków będących przedmiotem badań w ramach realizacji w/w celu.

Pochodna oznaczona symbolem C-1311 (5-dietylaminoetyloamino-8-hydroksyimidazoakrydon, Rysunek 1) okazała się związkiem o najwyższej aktywności przeciwnowotworowej spośród imidazoakrydonów. Została ona wyselekcjonowana w ramach rozszerzonych badań przedklinicznych i pod nazwą Symadex^{TM} dotarła do II fazy badań klinicznych i wykazała działanie przeciwnowotworowe wobec przerzutowego raka piersi u pacjentek leczonych uprzednio związkami z grupy antracyklin i taksanów [9, 10]. Wykazano również, że C-1311 interkaluje do DNA i po metabolicznej aktywacji wiąże się z nim kowalencyjnie tworząc międzyłańcuchowe wiązania sieciujące [11]. Ponadto, C-1311 hamuje aktywność topoizomerazy II i stabilizuje kompleksy

rozszczepialne tego enzymu z DNA [12]. W 1998 roku napisaliśmy monografię dotyczącą aktywności biologicznej oraz biochemicznego mechanizmu działania pochodnej C-1311 omówioną poniżej, której jestem współautorką.

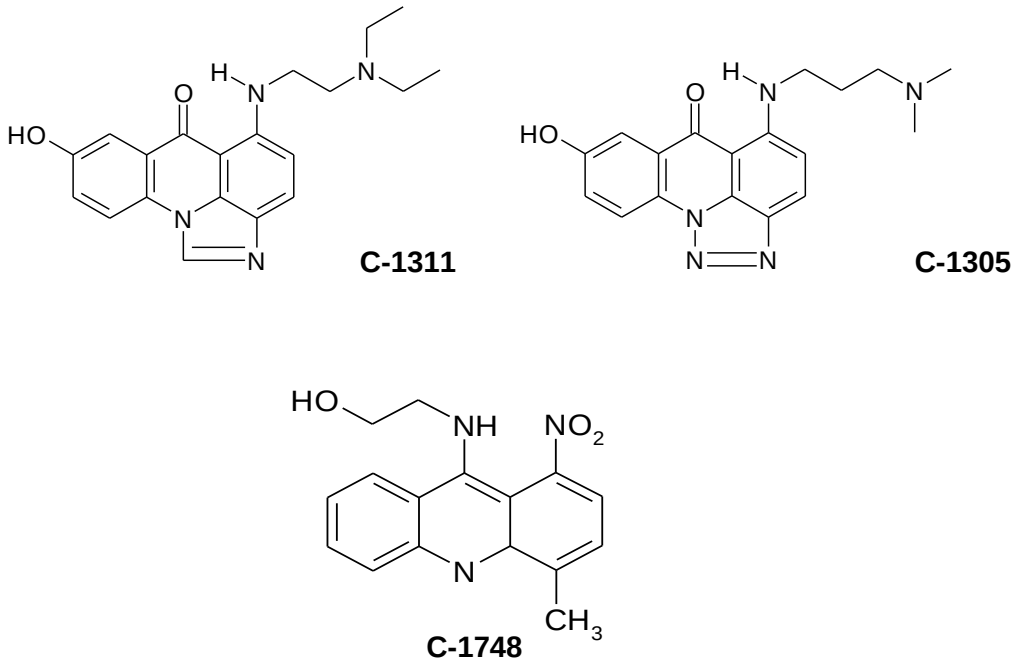
Z. Mazerska, E. Augustin, A. Składanowski, M. Bibby, J. A. Double, J. Konopa. C-1311. Antineoplastic. *Drugs of the Future,* 23 (7), 702-706, 1998.

Do cennych farmakologicznych własności C-1311 opisanych wówczas w tej pracy należały: 1) wysoka aktywność cytotoksyczna i przeciwnowotworowa wobec komórek nowotworów litych, w tym ksenoprzeszczepów raka jelita grubego HT29 pochodzenia ludzkiego na nagie myszy; 2) niezdolność do indukcji ROS, co mogło wskazywać na brak wywoływania efektów kardiotoksycznych; 3) szybka akumulacja związku w komórkach nowotworowych, zwłaszcza w jądrze komórkowym; 4) indukcja apoptozy w komórkach niektórych linii nowotworowych (L1210, Hela) bez hamowania syntezy DNA; 5) wysoka aktywność wobec komórek wykazujących ekspresję MDR; 7) niski potencjał mutagenny.

Znaczną aktywność przeciwnowotworową wykazują również analogi strukturalne imidazoakrydonów - triazoloakrydony. Pochodna oznaczona symbolem C-1305 (5-dimetyloaminopropyloamino-8-hydroksytriazoloakrydon, Rysunek 1) okazała się związkiem najbardziej aktywnym spośród triazoloakrydonów i kwalifikuje się do rozszerzonych badań przedklinicznych. Podobnie jak imidazoakrydony, triazoloakrydony zwierają w łańcuchu bocznym farmakoforowe ugrupowanie 5-dwuaminoalkilowe oraz grupę hydroksylową w pozycji 8 pierścienia heterocyklicznego, których obecność jest kluczowa dla wysokiej aktywności biologicznej tychże pochodnych [13, 14]. Triazoloakrydony wykazują silne działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek szeregu linii nowotworowych *in vitro* (w systemie NCI screening, Bethesda, USA) [dane niepublikowane], a także wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec eksperymentalnych nowotworów przeszczepialnych u myszy, takich jak białaczki czy nowotwory jelita grubego [14]. Triazolakrydony, podobnie jak imidazoakrydony interkalują do DNA i wiążą się z nim kowalencyjnie tworząc międzyłańcuchowe wiązania sieciujące [15]. Podobnie jak C-1311, C-1305 stabilizuje kompleksy rozszczepialne topoizomerazy II z DNA, lecz w przeciwieństwie do klasycznych inhibitorów tego enzymu, związek ten jest aktywny w stosunku do komórek pozbawionych polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP1), zaangażowanej w naprawę pęknięć DNA [16, 17]. Ponadto, C-1305 wiążąc się do DNA indukuje unikalne zmiany strukturalne w obrębie sekwencji DNA zawierających triplety guaninowe [16, 17] co prowadzi do obniżenia powinowactwa białek TRF1 i TRF2 do telomerowego DNA [18].

Trzecią grupą związków przeciwnowotworowych otrzymanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii są pochodne 4-metylo-1-nitroakrydyny [19]. Pochodna oznaczona symbolem C-1748 (9-

[(2'-hydroksyetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna] (Rysunek 1) wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów raków prostaty, jelita grubego, płuc, nerki oraz czerniaka na myszy bezgrasicze [20,21] oraz obniżoną toksyczność w stosunku do innych pochodnych 1-nitroakrydyny [22, 23, 24]. Związek C-1748 wiąże się kowalencyjnie do DNA [25] i po uprzedniej aktywacji metabolicznej, wykazuje istotną dla jego aktywności biologicznej zdolność do międzyłańcuchowego sieciowania jądrowego DNA w komórkach ludzkiego raka prostaty, jajnika, okrężnicy oraz białaczki [26]. Obecnie związek ten jest przygotowywany do pierwszej fazy badań klinicznych i przechodzi intensywne badania przedkliniczne prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, jak i w innych laboratoriach.



Rysunek 1 Struktury chemiczne badanych pochodnych: imidazoakrydonu, C-1311 [27], triazoloakrydonu, C-1305 [28] oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny, C-1748 [19].

Celem moich badań było określenie biologicznego i biochemicznego mechanizmu działania przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny, wybranych i przedstawionych powyżej, wobec komórek nowotworowych. Dla realizacji tego celu prowadziłam badania w trzech kierunkach zmierzających do:

1. Poznania wpływu wybranych pochodnych akrydyn na cykl życiowy komórek nowotworowych oraz określenia zdolności badanych związków do indukcji apoptozy z uwzględnieniem wzajemnych powiązań pomiędzy hamowaniem cyklu komórkowego, a apoptozą.
2. Zbadania, czy ekspresja genów izoenzymów cytochromu P450 ma wpływ na przebieg cyklu komórkowego oraz końcową odpowiedź biologiczną (apoptozę, nekrozę, katastrofę mitotyczną, starzenie komórkowe) indukowaną przez wybrane pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych.
3. Określenia, czy badane pochodne akrydyny mają zdolność do hamowania receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach ostrych białaczek szpikowych i czy ma to znaczenie dla aktywności biologicznej badanych związków.

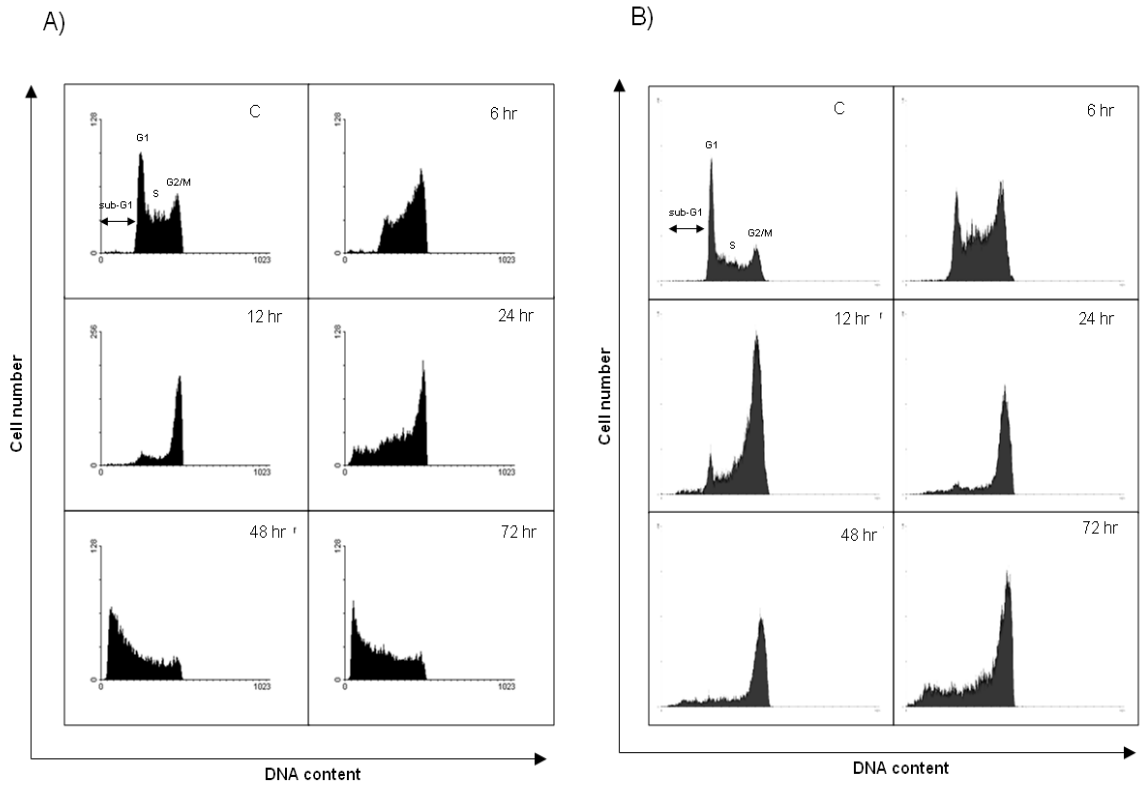
W niniejszym opracowaniu przedstawiam wyniki moich badań składających się na realizację wymienionych powyżej zadań badawczych, służących wyjaśnieniu biologicznego i biochemicznego mechanizmu działania wybranych pochodnych akrydyny o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek nowotworowych.

Pierwszy z proponowanych kierunków badań dotyczył wpływu pochodnych akrydyny, reprezentowanych przez triazoloakrydon C-1305, na cykl życiowy komórek białaczek ludzkich oraz jego zdolności do indukcji apoptozy w tych komórkach.

Wykazano wcześniej, że aktywność biologiczna zsyntetyzowanych pochodnych akrydyny wiąże się z ich uszkadzającym oddziaływaniem z DNA. Uszkodzenia DNA mogą być pierwszym etapem prowadzącym do śmierci komórek, która w znacznym stopniu zależy od rodzaju chemoterapeutyku, jego dawki, czasu działania czy rodzaju komórek [11, 15, 25, 26]. Należy również wziąć pod uwagę fakt, że ostateczny wynik działania chemoterapeutyku będzie zależał nie tylko od tego czy w komórkach traktowanych danym chemoterapeutykiem dojdzie do indukcji śmierci czy też nie. Niezwykle istotne są również relacje czasowe czy też progresja komórek w ich cyklu życiowym. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, postawiłam pytanie czy i jakie zmiany w cyklu życiowym komórek białaczek ludzkich indukuje pochodna triazoloakrydonu C-1305 i jakie będą tego konsekwencje dla końcowego efektu biologicznego wywoływanego przez ten związek. Badania te realizowałam w ramach projektu własnego KBN, którego byłam kierownikiem (patrz. Załącznik nr 3), a wyniki tych badań przedstawiłam w wymienionej poniżej publikacji.

<u>E. Augustin</u>, A. Moś-Rompa, A. Skwarska, J.M. Witkowski, J. Konopa. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis of human leukemia cells by potent antitumor triazoloacridinone C-1305. *Biochemical Pharmacology,* 72 (12), 1668-1679, 2006.

Wykazaliśmy, że pochodna C-1305 w stężeniach biologicznie istotnych odpowiadających wartościom EC_{90} (takie stężenie badanego związku, przy którym proliferacja komórek jest zahamowana w 90%), indukuje przejściową akumulację komórek ludzkich białaczek MOLT4 i HL60 w fazie G2/M, która to populacja po dłuższych czasach inkubacji ze związkiem zaczynała stopniowo się zmniejszać i pojawiała się frakcja komórek o hypodiploidalnej zawartości DNA (tzw. frakcja sub-G1), świadcząca o degradacji DNA w wyniku uruchomienia procesu apoptozy (Rysunek 2). Należy podkreślić, że populacja komórek tzw. frakcji sub-G1 była znacznie większa w przypadku komórek MOLT4 (52% po 72 godzinach inkubacji z C-1305) niż komórek HL60 (15% po 72 godzinach traktowania C-1305).

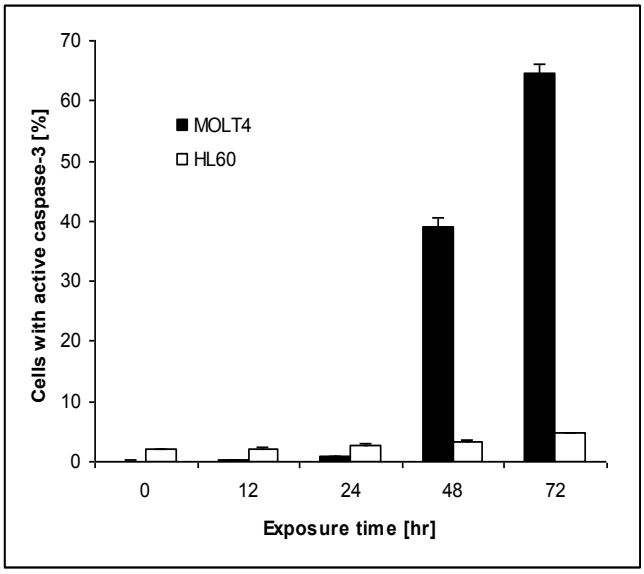


Rysunek 2 Zmiany w dystrybucji komórek MOLT4 (A) i HL60 (B) w cyklu życiowym traktowanych pochodną C-1305 w stężeniu EC_{90} przez określony czas [Augustin et al., *Biochemical Pharmacology,* 72 (12), 1668-1679, 2006].

Indukcję procesu apoptozy przez pochodną C-1305 potwierdziliśmy w oparciu o inne testy. Uzyskane wyniki pokazały po raz pierwszy, że komórki obu linii białaczek ludzkich ulegały apoptozie pod wpływem pochodnej triazoloakrydonu C-1305 w stężeniu EC_{90} i apoptoza przebiegała według

klasycznej mitochondrialnej drogi aktywacji kaspaz (Rysunek 3). Jednocześnie, komórki białaczki limfoblastycznej MOLT4 okazały się bardziej wrażliwe na działanie związku i proces apoptozy przebiegał w nich z większą intensywnością niż w komórkach białaczki mieloblastycznej HL60.

Podsumowując wykazałam po raz pierwszy, że badany triazoloakrydon w komórkach białaczek MOLT4 i HL60 indukował blok w fazie G2/M cyklu życiowego, po którym następowała śmierć komórek na drodze apoptozy, co pozwala rozważać ten związek jako nowy, potencjalny lek przeciwnowotworowy. Uzyskane wyniki uczyniły zasadnym dalsze, szersze badanie mechanizmów działania tych związków.



Rysunek 3 Wykres przedstawiający ilość komórek białaczek MOLT4 i HL60 z aktywną kaspazą 3 po traktowaniu C-1305 w stężeniu EC_{90} przez określony czas [Augustin et al., *Biochemical Pharmacology,* 72 (12), 1668-1679, 2006].

Istotnym aspektem terapii celowanej jest uwzględnienie indywidualnej ekspresji białek ważnych dla fizjologii komórek nowotworowych. Z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej każdy pacjent ma różną zdolność do przemian metabolicznych leków stosowanych w terapii.

Stąd, **drugi kierunek badań miał na celu zbadanie wpływu ekspresji izoenzymu CYP3A4 na przebieg cyklu komórkowego oraz końcową odpowiedź biologiczną indukowaną przez badane pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych.**

Większość stosowanych leków ulega w organizmie przemianom metabolicznym prowadzącym do jego aktywacji lub detoksykacji. Metabolizm aktywacyjny może być odpowiedzialny za przeprowadzanie pro-leku do jego aktywnej formy terapeutycznej lub za wywołanie lub

podwyższenie efektu toksycznego. Z kolei przemiany detoksykacyjne mogą być odpowiedzialne za obniżenie efektów toksycznych, ale też za osłabienie działania terapeutycznego. Dlatego badanie metabolizmu leków oraz aktywności i ekspresji enzymów metabolizujących leki pełni kluczową rolę w określeniu ich właściwości terapeutycznych. Głównymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm leków, zarówno aktywacyjny jak i detoksykacyjny, są białka cytochromu P450 [29, 30, 31]. Ekspresja genów cytochromu P450 jest różna w tkance prawidłowej i nowotworowej tego samego organizmu. Fakty te mają konsekwencje w efektach terapii lekami, szczególnie w przypadku leków przeciwnowotworowych, których stosowanie charakteryzuje się szczególnie wąskim „oknem terapeutycznym". Dlatego obecnie priorytetowym kierunkiem chemoterapii jest tzw. terapia ukierunkowana (*ang. directed therapy*), uwzględniająca metaboliczne różnice międzyosobnicze oraz różnice w ekspresji genów enzymów metabolizujących pomiędzy tkanką prawidłową i nowotworową. Wiele danych literaturowych wskazuje, że zmiana ekspresji genów cytochromu P450 może mieć wpływ na odpowiedź komórkową indukowaną w komórkach nowotworowych przez ksenobiotyki, w tym związki kancerogenne oraz leki przeciwnowotworowe [32, 33]. Wyniki badań dotyczą głównie wpływu zmienionej ekspresji białek cytochromu P450 na proces apoptozy. Co ciekawe, wykazano, że ekspresja tych enzymów może zarówno hamować, jak i wzmacniać efekt apoptozy w zależności od stosowanego związku cytostatycznego [34, 35, 36]. Z uwagi na powyższe fakty, podjęłam próbę zbadania, czy podwyższony poziom izoenzymów cytochromu P450 może mieć wpływ na rodzaj odpowiedzi komórkowej indukowanej przez badane pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych. Wyniki uzyskane na podstawie tych badań zaowocowały 3 publikacjami, w których jestem pierwszym autorem i które omawiam poniżej.

Przedmiotem pierwszej z trzech publikacji było zbadanie wpływu nadekspresji CYP3A4 na cytotoksyczność i odpowiedź komórkową indukowaną przez triazolaokrydon C-1305 w modelowym układzie komórek jajnika chomika chińskiego CHO.

E. Augustin, B. Borowa-Mazgaj, A. Kikulska, M. Kordalewska, M. Pawłowska. CYP3A4 overexpression enhances the cytotoxicity of the antitumor triazoloacridinone derivative C-1305 in CHO cells. *Acta Pharmacologica Sinica,* 34 (1), 146-156, 2013.

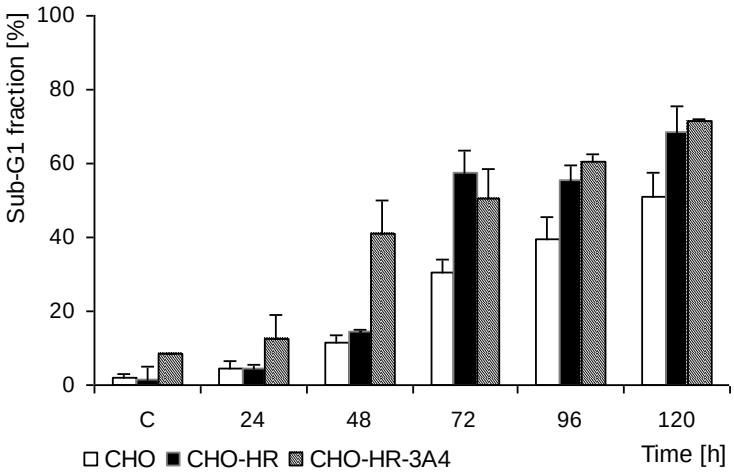
Jak do tej pory opracowano niewiele linii komórkowych o nadekspresji enzymów z grupy P450. Stąd do badań swoich wybrałam unieśmiertelnione komórki jajnika chomika chińskiego CHO. Komórki te są łatwe w hodowli i okazały się wrażliwe na badany przeze mnie triazoloakrydon C-1305. Badania prowadziliśmy w następującym układzie komórkowym: linii dzikiej, CHO-WT oraz dwóch rekombinantowych: CHO-HR z nadekspresją reduktazy cytochromu P450 i CHO-HR-3A4 wykazującej koekspresję reduktazy i izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450. Linie komórkowe zostały opracowane i

przekazane nam do badań przez dr Thomasa Friedberga (Biomedical Research Centre, Dundee, UK) [37]. Na podstawie badań przeprowadzonych wraz z dyplomantami wykazałam, że komórki z nadekspresją reduktazy cytochromu P450 okazały się najbardziej wrażliwe na badany związek, a komórki typu dzikiego były najmniej wrażliwe (Tabela 1).

Cell line	**EC_{50} [μM]**	**EC_{80} [μM]**
CHO	**0.032** ± 0.006	**0.087** ± 0.005
CHO-HR	**0.012** ± 0.0008	**0.032** ± 0.0001
CHO-HR-3A4	**0.0099** ± 0.0041	**0.064** ± 0.0095

Tabela 1 Aktywność cytotoksyczna pochodnej C-1305 wobec komórek badanych linii CHO oznaczona po 72 godzinnej ciągłej inkubacji ze związkiem [Augustin et al., *Acta Pharmacologica Sinica,* 34 (1), 146-156, 2013].

Ponadto, nadekspresja enzymów systemu cytochromu P450 miała istotny wpływ na rodzaj odpowiedzi komórkowej indukowanej przez pochodną C-1305 w modelowym układzie komórek CHO. Komórki linii dzikiej CHO prezentowały cechy morfologiczne typowe dla katastrofy mitotycznej oraz nekrozy. Komórki CHO-HR z nadekspresją reduktazy cytochromu P450 ulegały również katastrofie mitotycznej, ale i apoptozie. Natomiast komórki CHO-HR-3A4 z nadekspresją reduktazy i CYP3A4 ulegały w głównej mierze apoptozie (Rysunek 4).



Rysunek 4 Ilość komórek CHO typu dzikiego i rekombinantowych w fazie sub-G1, określanych jako apoptotyczne po inkubacji z pochodną C-1305 w stężeniu IC_{80} przez określony czas [Augustin et al., *Acta Pharmacologica Sinica,* 34 (1), 146-156, 2013].

Ponadto wykazaliśmy, że komórki CHO i CHO-HR, które nie uległy apoptozie, nekrozie bądź katastrofie mitotycznej, ulegały pod wpływem działania pochodnej C-1305 procesowi

przyspieszonego starzenia komórkowego. W komórkach linii CHO-HR-3A4 z koekspresją genów reduktazy i CYP3A4 nie dochodziło do indukcji procesu starzenia komórkowego. W wyniku traktowania C-1305 komórki tej linii ulegały śmierci w wyniku apoptozy.

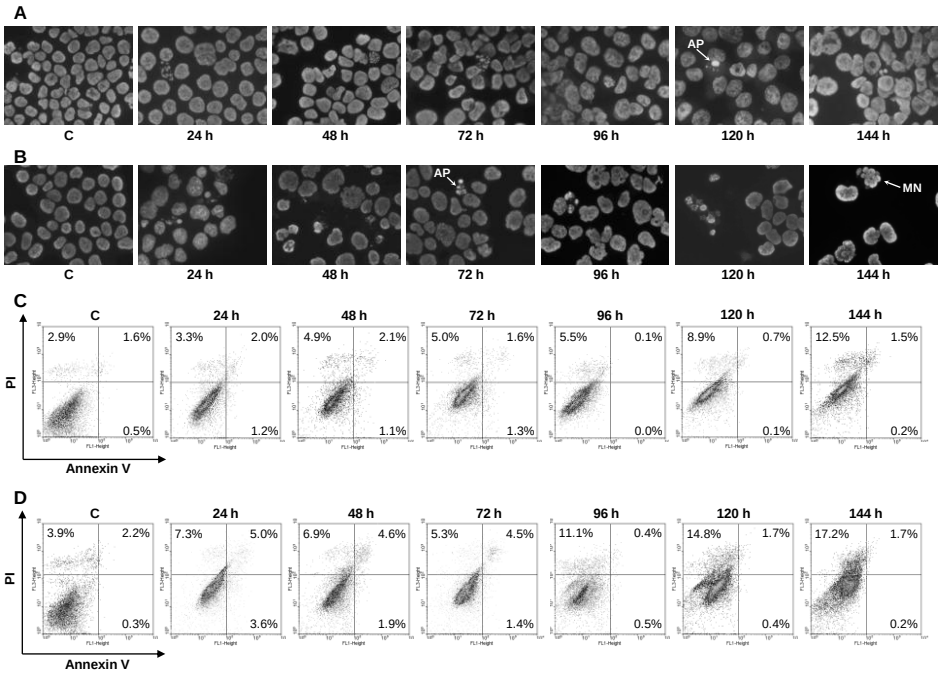
Podsumowując wykazaliśmy, że różny poziom enzymów metabolizujących z grupy cytochromu P450 ma istotny wpływ na rodzaj i kinetykę odpowiedzi biologicznej indukowanej przez pochodną triazoloakrydonu C-1305 w modelowym układzie komórek CHO.

Celem kolejnej publikacji było określenie czy podwyższona ekspresja izoenzymu CYP3A4 będzie miała wpływ na cytotoksyczność i rodzaj odpowiedzi komórkowej indukowanej przez przeciwnowotworowy imidazoakrydon C-1311 w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2.

E. Augustin, M. Pawłowska, J. Polewska, A. Potęga, Z. Mazerska. Modulation of CYP3A4 activity and induction of apoptosis, necrosis and senescence by the anti-tumour imidazoacridinone C-1311 in human hepatoma cells. *Cell Biology International,* 37(2), 109-120, 2013.

Linia komórkowa HepG2 jest bardzo często stosowana w badaniu metabolizmu leków, szczególnie w badaniach dotyczących regulacji ekspresji enzymów metabolizujących leki [38, 39]. Komórki tej linii charakteryzują się jednak niskim poziomem izoenzymu CYP3A4. Stąd do swoich badań zastosowałam komórki nowotworu wątroby HepG2 z konstytutywną ekspresją izoenzymu CYP3A4 – linia komórkowa Hep3A4. Wykazaliśmy, że pochodna C-1311 hamuje proliferację komórek obu linii nowotworu wątroby w sposób zależny od dawki, przy czym komórki HepG2 okazały się bardziej wrażliwe na badany związek niż komórki z nadekspresją CYP3A4. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że C-1311 indukuje przejściowy blok w fazie G2/M, zarówno w komórkach HepG2, jak i Hep3A4, przy czym populacja komórek HepG2 była wyższa w tej fazie niż komórek Hep3A4. Temu efektowi komórkowemu towarzyszyło pojawianie się populacji o ilości DNA mniejszej niż 2N, tzw. frakcji sub-G1, która była nieco wyższa w komórkach Hep3A4 i świadczyła o obecności komórek ze zdegradowanym DNA, głównie apoptotycznych. Indukcja apoptozy przez C-1311 w komórkach nowotworu wątroby została przez nas potwierdzona w kolejnych testach (Rysunek 5). Ponieważ proces apoptozy był indukowany tylko w części populacji badanych komórek i to na bardzo niskim poziomie i część komórek ulegała również nekrozie i katastrofie mitotycznej, podobnie jak to miało miejsce w przypadku komórek CHO, postawiłam hipotezę, że komórki które pozostawały żywe, mogły ulegać procesowi przyspieszonego starzenia pod wpływem C-1311. Mikroskopia świetlna pozwoliła na wykrycie specyficznego niebieskiego zabarwienia cytoplazmy komórek starzejących się

pochodzącego od cytozolowej SA-β-galaktozydazy rozkładanej przez X-Gal. Proces ten indukowany był zarówno w komórkach HepG2, jak i Hep3A4, ale w tych ostatnich znacznie wcześniej i obejmował większą część populacji komórek niż w przypadku linii HepG2.



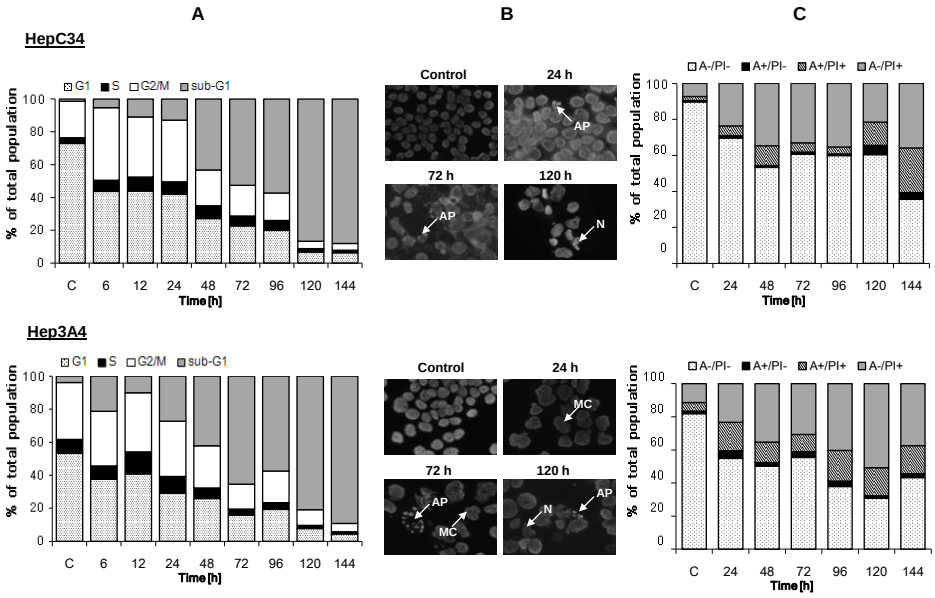
Rysunek 5 Analiza morfologii komórek HepG2 (A) i Hep3A4 (B) traktowanych pochodną C-1311 przez określony czas. AP – komórki apoptotyczne; MN – komórki wielojądrzaste. (C) komórki HepG2, (D) komórki Hep3A4 – analiza zmian w budowie błony cytoplazmatycznej, barwienie AneksynaV/PI. Lewy dolny kwadrant – komórki żywe (A-/PI-); prawy dolny kwadrant – komórki wczesnoapoptotyczne (A+/PI-); prawy górny kwadrant – komórki późnoapoptotyczne i nekrotyczne (A+/PI+); lewy górny kwadrant – komórki nekrotyczne (A-/PI+) [Augustin et al., *Cell Biology International,* 37(2), 109-120, 2013].

Podsumowując, wykazaliśmy po raz pierwszy dla pochodnej C-1311, że podwyższona ekspresja izoenzymu CYP3A4 w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 moduluje odpowiedź komórkową indukowaną przez ten związek. Komórki HepG2 z prawidłową i podwyższoną ekspresją CYP3A4 ulegały apoptozie i nekrozie, ale procesy te obejmowały tylko niewielką część populacji komórek obu linii. Po dłuższych czasach inkubacji z badanym związkiem komórki obu linii ulegały procesowi przyspieszonego starzenia komórkowego, który indukowany był szybciej w komórkach z nadekspresją izoenzymu CYP3A4.

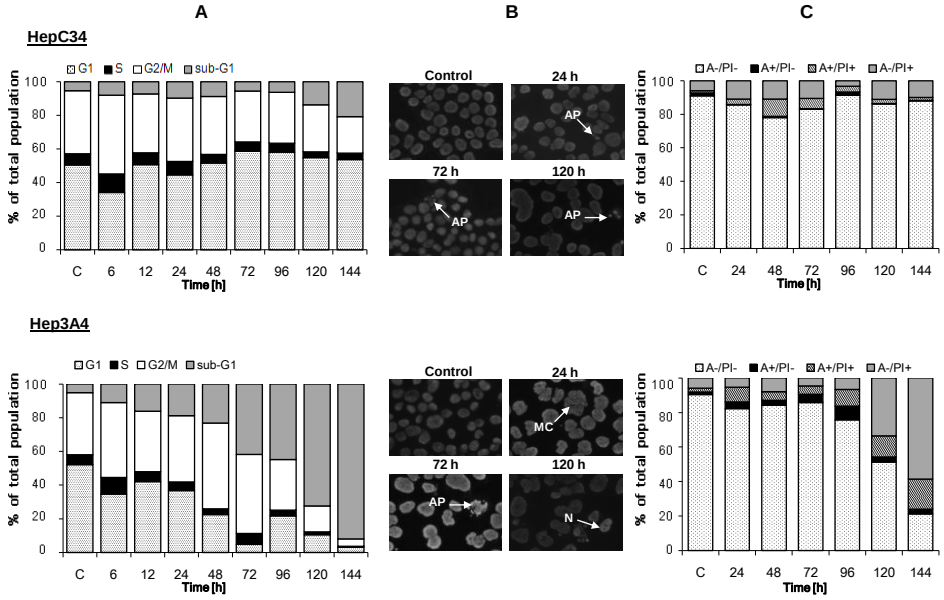
W kolejnej publikacji, stosując ten sam model komórkowy, poszerzyliśmy badania dotyczące zbadania wpływu izoenzymu CYP3A4 na odpowiedź komórkową o kolejne pochodne akrydyny: związek C-1748 i C-1305.

E. Augustin, M. Niemira, A. Hołownia, Z. Mazerska. CYP3A4-dependent cellular response does not relate to CYP3A4-catalysed metabolites of C-1748 and C-1305 acridine antitumor agents in HepG2 cells. *Cell Biology International,* 38 (11), 1291 - 1303, 2014.

Wybór do badań tych dwóch związków podyktowany był m.in. faktem, że związki te charakteryzują się odmienną strukturą chemiczną oraz różnym metabolizmem w mikrosomach pochodzących z wątroby szczurów [40, 41]. Do badań efektów komórkowych indukowanych przez te związki w zależności od poziomu izoenzymu CYP3A4 wybrałam komórki HepG2 stabilnie transfekowane enzymem CYP3A4 (linia Hep3A4) oraz komórki HepG2 stabilnie stransfekowane tzw. pustym wektorem (linia HepC34). Komórki te stanowiły linię kontrolną dla Hep3A4, co pozwoliło wyeliminować wpływ transfekcji na wzrost komórek oraz na odpowiedź biologiczną komórek po ekspozycji na badane związki. Analizując wpływ badanych pochodnych akrydyny na progresję komórek nowotworu wątroby w cyklu życiowym wykazałam, że C-1748 indukuje przejściową akumulację komórek HepC34 w fazie G2/M, ale po krótkich czasach ekspozycji (do 24 godzin), a następnie począwszy od 48 godzinnej inkubacji ze związkiem ilość komórek w tej fazie znacząco się obniża. Efekt ten był nieco słabszy dla komórek z nadekspresją CYP3A4. Jednocześnie, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek obu linii z pochodną C-1748, wzrastała populacja tzw. sub-G1, co świadczyło o indukcji procesu apoptozy w tych komórkach (Rysunek 6A). Pochodna triazoloakrydonu C-1305 indukowała przejściową akumulację komórek obu linii w fazie G2/M już po 12 godzinach inkubacji, a po dłuższej ekspozycji (do 144 godzin) wzrastała populacja komórek ze zdegradowanym DNA (sub-G1), osiągając 90%, ale tylko w przypadku linii z nadekspresją CYP3A4 (Rysunek 7A). W komórkach kontrolnych HepC34 populacja ta osiągnęła zaledwie 18%. Analiza cytometryczna zmian w budowie błony cytoplazmatycznej oraz mikroskopia fluorescencyjna potwierdziły obecność populacji komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych w wyniku działania pochodnych C-1748 i C-1305 (Rysunek 6 i 7B i C).



Rysunek 6 Efekty komórkowe indukowane przez pochodną C-1748 w komórkach nowotworu wątroby. A) Dystrybucja komórek w cyklu życiowym. B) Analiza morfologii jąder komórkowych barwionych DAPI. C) Analiza zmian w budowie błony cytoplazmatycznej (barwienie Aneksyna V/PI) [Augustin et al., *Cell Biology International,* 38 (11), 1291 - 1303, 2014].



Rysunek 7 Efekty komórkowe indukowane przez pochodną C-1305 w komórkach nowotworu wątroby. A) Dystrybucja komórek w cyklu życiowym. B) Analiza morfologii jąder komórkowych barwionych DAPI. C) Analiza zmian w budowie błony cytoplazmatycznej (barwienie Aneksyna V/PI) [Augustin et al., *Cell Biology International,* 38 (11), 1291 - 1303, 2014].

Podsumowując wykazałam, że nadekspresja izoenzymu CYP3A4 moduluje odpowiedź komórkową indukowaną przez pochodną triazoloakrydonu w komórkach nowotworu wątroby.

Komórki Hep3A4 ulegały śmierci w wyniku apoptozy i nekrozy, w znacznie większym stopniu niż komórki kontrolne HepC34. Komórki, które nie uległy śmierci pod wpływem C-1305, ulegały starzeniu komórkowemu. Z kolei pochodna C-1748 indukowała śmierć na drodze apoptozy i nekrozy na tym samym poziomie zarówno w komórkach z podwyższoną ekspresją CYP3A4, jak i w komórkach kontrolnych. Wykazałam więc, że pomimo iż pochodna C-1305 nie jest metabolizowana przez enzymy cytochromu P450, to poziom izoenzymu CYP3A4 moduluje końcową odpowiedź komórkową indukowaną przez ten związek w komórkach nowotworu wątroby. Natomiast pochodna C-1748 ulega metabolizmowi przez CYP3A4, ale poziom tego enzymu nie wpływa w znaczący sposób na indukowaną przez ten związek odpowiedź biologiczną w komórkach HepG2. Wynik ten wskazuje, że nadekspresja CYP3A4 wpływa na odpowiedź komórkową w sposób inny niż bezpośrednio poprzez metabolizm.

W trzecim etapie badań powróciłam do komórek białaczek ludzkich, aby określić zdolność badanych pochodnych akrydyny do hamowania aktywności receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3. Wcześniejsze badania przeprowadzone w układzie bezkomórkowym wykazały bowiem, że imidazoakrydon C-1311 w stężeniach nanomolarnych (8-15 nM) ma zdolność do hamowania autofosforylacji rekombinantowej kinazy FLT3 [45]. Stąd też postawiłam hipotezę, że kinaza FLT3 może stanowić nowy cel molekularny dla badanych przeze mnie związków.

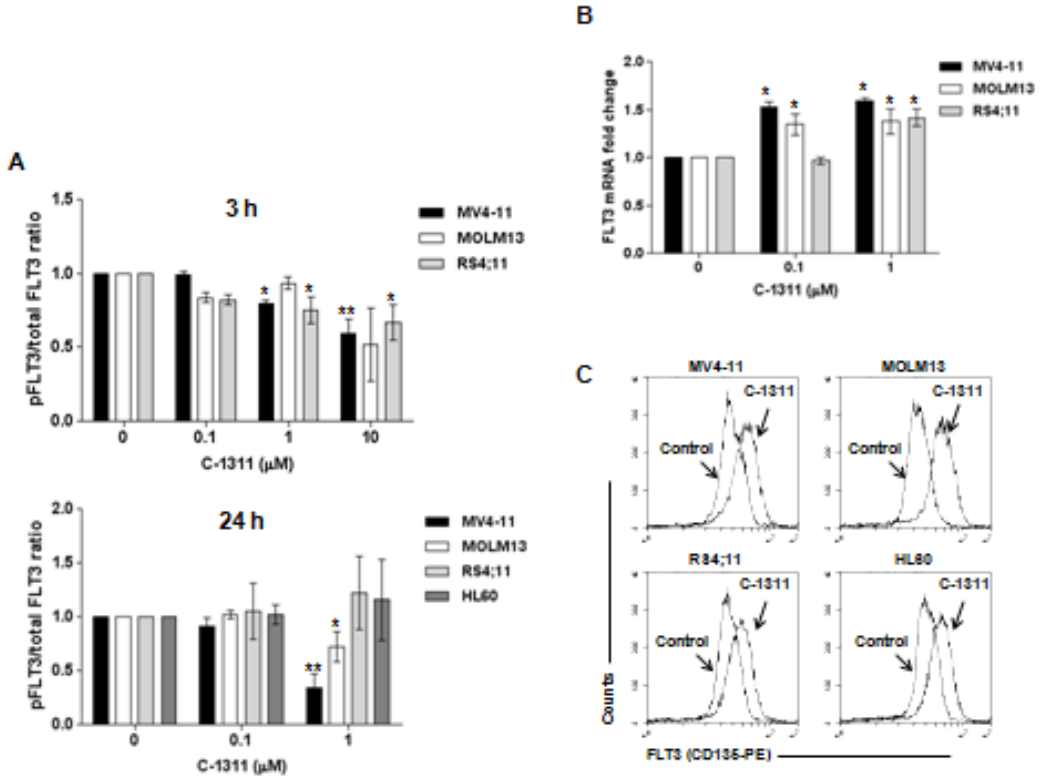
Zatem **trzeci kierunek badań to określenie zdolności związków C-1311 i C-1305 do hamowania aktywności receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach wybranych linii ostrych białaczek szpikowych i ewentualnej roli tego procesu dla aktywności biologicznej badanych pochodnych.**

Receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK) pełnią centralną rolę w przenoszeniu sygnałów zewnątrzkomórkowych poprzez uruchamianie wieloenzymatycznych kaskad sygnałowych. Regulacja aktywności tych kinaz jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek organizmu. Onkogenna aktywacja RTKs, spowodowana mutacją, delecją lub translokacją w genach kinaz tyrozynowych może skutkować konstytutywną aktywacją tych enzymów, czego efektem jest niekontrolowana proliferacja i wzrost komórkowy. Szacuje się, że jedna trzecia pacjentów z ostrą białaczką szpikową AML (*ang. acute myeloid leukemia*) posiada konstytutywnie aktywną, zmutowaną formę receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 (*ang. FMS-like tyrosine kinase-3*), co wiąże się z niskimi prognozami przeżycia w leczeniu tego typu schorzeń [42]. Kinaza FLT3 należy do III klasy receptorowych kinaz tyrozynowych. Ekspresję genu *FLT3* stwierdza się w prawidłowych, progenitorowych komórkach hematopoetycznych szpiku oraz w komórkach limfopoetycznych grasicy i węzłów chłonnych [43, 44]. Najczęstszą mutacją genu kodującego receptor FLT3 jest wewnętrzna tandemowa duplikacja ITD (*ang. internal tandem duplication*) we fragmencie genu kodującego

domenę około błonową receptora (*ang. juxtamembrane domain of FLT3*) i jak nadmieniłam powyżej, występuje ona w około 20-30% przypadków spośród wszystkich pacjentów AML [42]. Drugi typ mutacji w obrębie genu kodującego receptor FLT3 to już stosunkowo rzadziej występujące mutacje punktowe np. w drugiej domenie kinazowej receptora FLT3, mutacja prowadząca do zamiany asparaginianu na tyrozynę (D835Y), która dotyczy 5-10% pacjentów z AML [43]. W świetle powyższych informacji, receptorowa kinaza tyrozynowa FLT3 stała się niewątpliwie obiecującym celem molekularnym, szczególnie wobec obserwowanej w badaniach klinicznych oporności białaczek AML na dotychczas dostępne inhibitory FLT3. Stąd też cel badań, które realizowałam w ramach projektu własnego KBN, którego byłam kierownikiem (patrz. Załącznik nr 3), obejmował odpowiedź na pytanie czy imidazoakrydon C-1311 i triazoloakrydon C-1305 mają zdolność do hamowania aktywności receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach wybranych linii białaczek szpikowych oraz w jaki sposób inhibicja ta wpływa na proliferację, sygnalizację wewnątrzkomórkową i indukcję śmierci komórek ostrych białaczek szpikowych z prawidłową i konstytutywnie aktywną formą kinazy FLT3. Uzyskane wyniki są przedmiotem 2 publikacji, w których jestem pierwszym lub drugim autorem i które przedstawię poniżej.

A. Skwarska, E. Augustin, M. Beffinger, A. Wojtczyk, S. Konicz, K. Laskowska, J. Polewska. Targeting of FLT3-ITD kinase contributes to high selectivity of imidazoacridinone C-1311 against FLT3-activated leukemia cells. *Biochemical Pharmacology,* 95(4), 238 – 252, 2015.

W celu określenia wpływu mutacji kinazy FLT3 na zdolność C-1311 do jej blokowania, zastosowaliśmy dwie linie: MV-4-11 i MOLM13 (FLT3-ITD) z konstytutywnie aktywną zmutowaną formą FLT3 oraz komórki RS-4-11 i HL60 (wt-FLT3) z prawidłową formą kinazy FLT3. Wykazaliśmy, że po krótkich czasach inkubacji (3 h) pochodna C-1311 hamowała aktywność kinazy FLT3, zarówno w komórkach z prawidłową, jak i zmutowaną formą FLT3. Wydłużenie czasu ekspozycji ze związkiem do 24 godzin spowodowało, że C-1311 dużo skuteczniej hamował aktywność FLT3 w przypadku mutantów ITD, zwłaszcza w przypadku homozygotycznej białaczki MV-4-11 (IC_{50} ~0.6 μM), w porównaniu do białaczki heterozygotycznej MOLM13 (IC_{50} 1 μM). Ponadto, wykazaliśmy, że hamowanie aktywności FLT3 przez C-1311 wynika z blokowania fosforylacji FLT3, a nie spadku ekspresji genu *FLT3,* czy zmniejszonej ekspresji białka na powierzchni komórki (Rysunek 8).

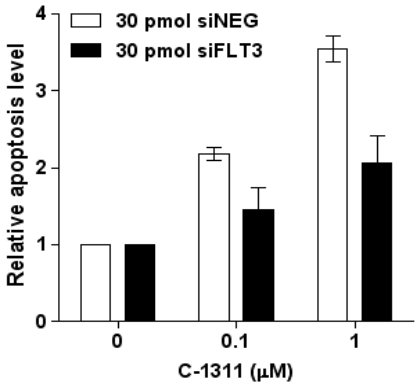


Rysunek 8 Zahamowanie autofosforylacji FLT3 przez pochodną C-1311 w komórkach białaczek ludzkich AML. A) Poziom phospho-FLT3 (pTyr591) był oznaczony testem ELISA i normalizowany w stosunku do całkowitego poziomu białka FLT3. Poziom fosforylacji FLT3 w komórkach kontrolnych (nietraktowanych związkiem) przyjeto za 1. B) Poziom *FLT3* mRNA w komórkach MV-4-11, MOLM13 i RS-4-11 po traktowaniu C-1311 przez 24 h. RT-PCR, normalizowane do poziomu *GDPH* mRNA. C) Cytometryczna analiza ekspresji receptora FLT3 na powierzchni komórek [Skwarska et al., *Biochemical Pharmacology,* 95(4), 238 – 252, 2015].

Aktywna (ufosforylowana) forma kinazy FLT3 pośredniczy w przekazywaniu przyżyciowych sygnałów na poziomie m.in. szlaku aktywowanej mitogenem kinazy białkowej MAPK (*ang. mitogen-activated protein kinase),* którego uruchomienie inicjuje proliferację hematopoetycznych komórek progenitorowych. Poza tym pośredniczy w szlaku kinazy serynowo-treoninowej Akt (*ang. protein kinase B)*, który prowadzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych FOXO, co tym samym hamuje ich pro-apoptotyczną aktywność transkrypcyjną, skutkując niezdolnością komórki do zatrzymania progresji w cyklu życiowym i uruchomieniu apoptozy. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, w dalszej części badań określiliśmy w jaki sposób obserwowane zahamowanie aktywności kinazy FLT3 w komórkach białaczek AML jest skorelowane z blokowaniem przekazywania sygnałów na poziomie opisanych powyżej szlaków sygnalizacyjnych. Dodatkowo, do badań dołączyliśmy komórki białaczek U937 i CEM pozbawione kinazy FLT3 (FLT3-negative). Wykazaliśmy, że niezależnie od statusu kinazy FLT3, w komórkach białaczek AML traktowanych C-1311 dochodziło do zahamowania aktywującej fosforylacji MAPK przy braku wpływu na ekspresję tego białka. Z kolei w wyniku działania C-1311 dochodziło do spadku poziomu zarówno ufosforylowanej, jak i całkowitej formy kinazy Akt. Co

więcej, w przypadku białaczek ze zmutowaną kinazą FLT3-ITD efekt hamujący był bardziej wyraźny. Można zatem przypuszczać, że o ile inhibicja sygnalizacji komórkowej poprzez szlak Akt wynika z hamującego działania C-1311 na FLT3, to w przypadku ścieżki sygnałowej z udziałem MAPK hamujący wpływ C-1311 na ekspresję tego białka ma podłoże molekularne. Co ważne, inhibicja sygnalizacji komórkowej poprzez szlak Akt i MAPK miała miejsce przy stężeniach C-1311, przy których związek hamował autofosforylację FLT3.

W dalszym etapie zbadaliśmy wpły C-1311 na dystrybucję komórek AML w ich cyklu życiowym, w zakresie steżeń związku przy których dochodziło do zahamowania autofsoforylacji kinazy FLT3. Komórki MV-4-11 ulegały akumulacji w fazie G0/G1 przez pierwsze 24 godziny traktowania C-1311, natomiast MOLM13 akumulowały się w fazie G2/M. Przejściowej akumulacji w fazie G2/M ulegały też komórki RS-4-11 (FLT3-wild type). Natomiast 24 godzinna inkubacja z pochodną C-1311 nie wpłynęła znacząco na zmianę w dystrybucji komórek HL60 (FLT3 wild-type) i U937 (null FLT3) w ich cyklu życiowym. Następnie wykazaliśmy, że C-1311 indukował typowe dla apoptozy zmiany w morfologii komórek MV-4-11 FLT3-ITD i MOLM13 i w mniejszym stopniu w komórkach RS-4-11 i HL60 FLT3 wild- type oraz U937 i CEM (null-FLT3). Co więcej, komórki HL60 wykazywały cechy typowe dla katastrofy mitotycznej. Wykazaliśmy ponadto, że apoptoza indukowana przez C-1311 jest zależna od kaspazy 3 i przebiega z udziałem mitochondriów. Ponadto wykazaliśmy, że C-1311 obniża ekspresję genu *bcl-2* i *surwiwiny* w komórkach MV-4-11 i MOLM13 (FLT3-ITD), nie mając wpływu na transkrypcję tych genów w komórkach białaczek z dziką formą kinazy FLT3 i w komórkach pozbawionych FLT3. Co więcej, wyciszenie genu *FLT3-ITD* prowadzi do istotnego wzrostu przeżywalności komórek MV-4-11 i spadku ilości komórek ulegających apoptozie (Rysunek 9). Wyniki te mocno potwierdzają, iż hamowanie aktywności kinazy FLT3 przez C-1311 jest kluczowe dla wysokiej aktywności tego związku wobec komórek białaczek AML z mutacją FLT3-ITD.



Rysunek 9 Wpływ wyciszenia FLT3 przez siRNA na apoptozę indukowaną przez C-1311 w komórkach MV-4-11 (FLT3-ITD.) [Skwarska et al., *Biochemical Pharmacology,* 95(4), 238 – 252, 2015].

Jak wykazały badania prowadzone w róznych ośrodkach, wydłużona ekspozycja na niskocząsteczkowe inhibitory receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 prowadzi niestety do selekcji opornych mutantów. Obecnie większość badaczy skłania się ku koncepcji, iż aby zmniejszyć ryzyko rozwoju oporności, należy stosować je np. w kombinacji z klasycznymi cytostatykami [46]. Stąd też w badaniach naszych sprawdziliśmy czy użycie C-1311 jako inhibitora FLT3, w połączeniu z antymetabolitem cytydyny – cytarabiną (Ara-C) czy doksorubicyną, wpływa na zwiększenie efektu cytotoksycznego. W celu określenia roli kinazy FLT3 na efekty kombinacji C-1311 z cytarabiną i doksorubicyną, oprócz komórek MV-4-11 i RS-4-11, przeprowadziliśmy badania również na komórkach linii U937, pozbawionej kinazy FLT3. Analiza indeksów terapeutycznych oraz izobologramów wykazała, że najsilniejsze interakcje w postaci synergizmu C-1311 i cytarabiny występują w komórkach MV-4-11. Znacznie słabszy synergizm obserwowany był w komórkach RS-4-11 i U937. Jednocześnie, C-1311 w połączeniu z doksorubicyną okazał się mniej skuteczny niż podawany z cytarabiną i też najsilniejsze interakcje zaobserwowaliśmy dla komórek MV-4-11. Zatem, o ile C-1311 jako inhibitor kinazy FLT3 miałby być stosowany w terapii, to największe korzyści przyniesie kombinacja tego związku z cytarabiną u pacjentów z onkogenną aktywacją FLT3.

Podsumowując, przeciwnowotworowy imidazoakrydon C-1311 okazał się skutecznym inhibitorem receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach ludzkich białaczek szpikowych AML. Co więcej, dużo skuteczniej hamował aktywność FLT3 w przypadku mutantów ITD i co ważne, komórki te były bardziej wrażliwe na działanie C-1311 niż komórki z prawidłową formą kinazy FLT3 lub jej pozbawione. Uzyskane wyniki wskazują, że potencjalnie nowym celem molekularnym dla C-1311 jest zmutowana forma kinazy FLT3-ITD.

Kolejna praca poświęcona była badaniom zmierzającym do określenia zdolności pochodnej triazoloakrydonu C-1305, będącej analogiem strukturalnym C-1311, do inhibicji receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3, a ich opis przedstawiam poniżej.

E. Augustin, A. Skwarska, A. Weryszko, I. Pelikant, E. Sankowska, B. Borowa-Mazgaj. Antitumor triazoloacridinone C-1305 inhibits FLT3 kinase activity and potentiates apoptosis in mutant FLT3-ITD leukemia cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36 (3), 385 - 399, 2015.

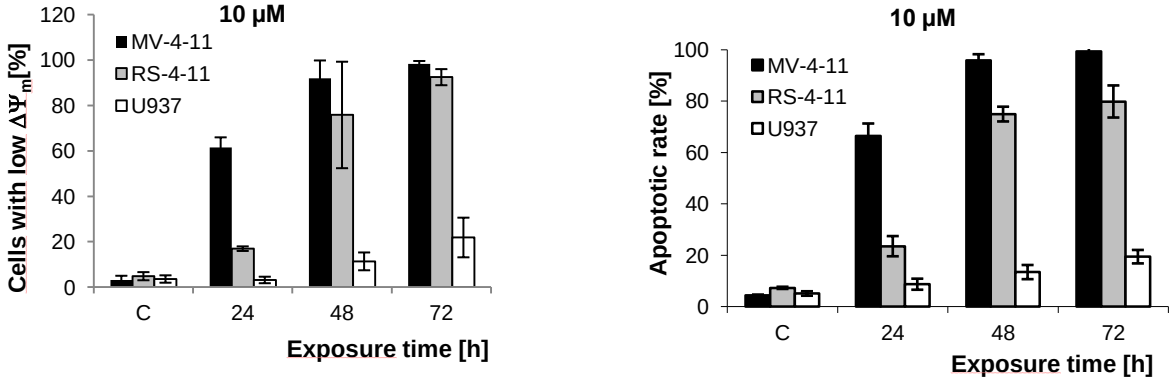
Badania prowadzone na komórkach ludzkiej białaczki szpikowej z mutacją FLT3-ITD – linia MV-4-11, z dziką formą tej kinazy – linia RS-4-11 oraz na komórkach pozbawionych kinazy FLT3 – linia U937 wykazały, że komórki FLT3-ITD okazały się najbardziej wrażliwe na działanie C-1305 (Tabela 2).

Cell line \ Incubation time		24 h	48 h	72 h
MV-4-11	IC_{50} [μM] ±SD*	1.2 ± 0.17[c]	0.19 ± 0.03[b,e]	0.07 ± 0.011[c,e]
RS-4-11	IC_{50} [μM] ±SD*	2.0 ± 0.9[c]	0.38 ± 0.06[b]	0.30 ± 0.074[c]
U937	IC_{50} [μM] ±SD*	7.6 ± 1.6	1.90 ± 0.29	0.35 ± 0.11

Tabela 2 Aktywność cytotoksyczna C-1305 wobec komórek białaczek AML [Augustin et al., *Acta Pharmacologica Sinica*, 36 (3), 385 - 399, 2015].

W toku badań z zastosowaniem testu ELISA wykazaliśmy, że C-1305 hamował aktywność kinazy FLT3 w sposób zależny od dawki, zarówno w komórkach RS-4-11 (FLT3 wild-type), jak i w komórkach MV-4-11, ze zmutowaną wersją kinazy FLT3. Co ciekawe, przy niskich dawkach (1μM) efekt ten był widoczny tylko dla komórek RS-4-11, a przy wyższych dawkach (10 μM), związek znacznie silniej hamował aktywność tego enzymu w komórkach FLT3-ITD. Co istotne, o ile C-1311 hamował FLT3 w zakresie stężeń 0.1 μM – 1 μM, to w przypadku C-1305 porównywalny efekt obserwowany był przy stężeniach dziesięciokrotnie wyższych. W toku dalszych badań wykazaliśmy, że C-1305 w sposób zależny od dawki hamował fosforylację kinaz MAPK, Akt oraz czynnika transkrypcyjnego STAT5 – białek odpowiedzialnych za uruchomienie przyżyciowych szlaków sygnalizacyjnych w komórkach. Dodatkowo pokazaliśmy, że C-1305 obniża fosforylację pro-apoptotycznego białka Bad, które jest jednym z białek sygnałowych w przyżyciowej ścieżce sygnałowej uruchamianej za pośrednictwem FLT3-ITD [47]. Efekt hamujący był obserwowany zarówno w komórkach MV-4-11, jak i RS-4-11, ale nie w komórkach pozbawionych kinazy FLT3. Następnie wykazaliśmy, że pod wpływem C-1305 dochodziło do spadku ilości komórek MV-4-11 w fazie G1 czemu towarzyszyło pojawienie się populacji komórek z hypodiploidalną ilością DNA (frakcja sub-G1). Jednocześnie zahamowanie aktywności FLT3-ITD przez C-1305 prowadziło do obniżenia poziomu MAPK, STAT5 czy Bad oraz aktywacji kaspazy 3, spadku mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ i translokacji fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej, co świadczy o indukcji procesu apoptozy w tych komórkach. Co więcej, wyciszenie ekpsresji genu *FLT3-ITD* zwiększyło przeżywalność komórek MV-4-11 traktowanych C-1305. Wskazuje to na istotną rolę kinazy FLT3 w aktywności C-1305 w komórkach białaczki AML z konstytutywnie aktywną kinazą FLT3. Z kolei komórki RS-4-11 z dziką formą FLT3 ulegały przejściowej akumulacji w fazie G2/M pod wpływem C-1305, a populacja komórek w tzw. frakcji sub-G1 była znacznie niższa w porównaniu do komórek MV-4-11. Obserwowana inhibicja szlaków sygnałowych za pośrednictwem MAPK czy Akt przez C-1305 przebiegała w tych komórkach znacznie słabiej niż w MV-4-11. Natomiast komórki U937 pozbawione kinazy FLT3 ulegały przejściowej akumulacji w fazie G2/M w wyniku działania pochodnej C-1305, czemu towarzyszył tylko niewielki wzrost ilości komórek w fazie sub-G1. Poza spadkiem poziomu

MAPK w tych komórkach, poziom STAT5, Bad czy Akt nie zmieniał się pod wpływem działania związku.



Rysunek 10 Indukcja apoptozy przez pochodną C-1305 w komórkach białaczek AML. Lewy panel: spadek potencjału mitochondrialnego; prawy panel: ilość komórek wczesno- i późnoapoptotycznych na podstawie testu Aneksyna V/PI [Augustin et al., *Acta Pharmacologica Sinica*, 36 (3), 385 - 399, 2015].

Podsumowując poszerzyliśmy wniosek, że receptorowa kinaza tyrozynowa może być celem molekularnym nie tylko dla C-1311, ale również dla pochodnej triazoloakrydonu C-1305. Związek ten hamował autofosforylację zarówno zmutowanej formy FLT3, jak i dzikiej, chociaż bardziej efektywnie w przypadku komórek FLT3-ITD. Blokowanie kinazy FLT3-ITD skutkowało indukcją apoptozy, która obejmowała znacznie większą populację komórek MV-4-11 w porównaniu do komórek RS-4-11. Niezależnie od statusu genu *FLT3,* zarówno apoptoza, jak i zahamowanie przyżyciowych szlaków sygnalizacyjnych następowało w zakresie stężeń C-1305 odpowiadających za jego aktywność cytotoksyczną.

Podsumowanie wyników przeprowadzonych badań w 3 zaproponowanych kierunkach badań.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na sformuowanie następujących wniosków:

1. Pochodna triazoloakrydonu C-1305 indukowała blok w fazie G2/M cyklu życiowego białaczek ludzkich MOLT4 i HL60, w następstwie którego komórki ulegały apoptozie, która przebiegała w tych komórkach według tzw. mitochondrialnej drogi aktywacji kaspaz i dotyczyła większej populacji komórek w przypadku białaczki MOLT4 niż HL60.

2. Poziom izoenzymu cytochromu P450 (CYP3A4) miał istotny wpływ na rodzaj odpowiedzi komórkowej indukowanej przez pochodną triazoloakrydonu C-1305 w modelowym układzie komórek CHO. Komórki linii dzikiej CHO ulegały katastrofie mitotycznej, nekrozie oraz starzeniu

komórkowemu. Komórki CHO-HR z nadekspresją reduktazy cytochromu P450 ulegały również katastrofie mitotycznej, ale i apoptozie oraz starzeniu komórkowemu. Natomiast komórki CHO-HR-3A4 z nadekspresją reduktazy i CYP3A4 ulegały w głównej mierze apoptozie i brak było u nich cech charakterystycznych dla komórek starzejących się.

W komórkach nowotworu wątroby HepG2 poziom izoenzymu CYP3A4 modulował odpowiedź komórkową indukowaną przez pochodną triazoloakrydonu C-1305, pomimo, iż pochodna ta nie jest metabolizowana przez enzymy cytochromu P450. Z kolei poziom izoenzymu CYP3A4 nie wpływał w znaczący sposób na rodzaj końcowej odpowiedzi biologicznej indukowanej przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, chociaż enzym CYP3A4 uczestniczy w metabolizmie tego związku. Wskazuje to na "niemetaboliczną" rolę ekspresji CYP3A4 w odpowiedzi komórkowej.

3. Pochodna imidazoakrydonu C-1311 okazała się efektywnym inhibitorem receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach ludzkich białaczek szpikowych AML. Co więcej, związek ten dużo bardziej skutecznie hamował aktywność FLT3 w przypadku mutantów FLT3-ITD. Zahamowanie aktywności FLT3 przez C-1311 było skorelowane z jego aktywnością cytotoksyczną. Ponadto, komórki białaczki z mutacją FLT3-ITD były dwukrotnie bardziej wrażliwe na działanie C-1311 niż komórki z natywną formą kinazy FLT3 lub jej pozbawione.

Triazoloakrydon C-1305 okazał się również inhibitorem kinazy tyrozynowej FLT3, jednak w porównaniu do imidazoakrydonu C-1311, hamował autofosforylację tej kinazy przy znacznie wyższych stężeniach. Blokowanie aktywności kinazy FLT3 potęgowało proapoptotyczne działanie C-1305, bardziej masowo w przypadku komórek białaczek AML z mutacją FLT3-ITD. Zatem wykazaliśmy, że receptorowa kinaza tyrozynowa FLT3 może stanowić nowy cel molekularny w poszukiwaniach nowych, aktywnych pochodnych akrydyny.

Znaczenie otrzymanych wyników.

Jak wspomniałam powyżej, związek C-1311 po intensywnych badaniach przedklinicznych dotarł do II fazy badań klinicznych i wykazał aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkiego raka piersi. Pochodna triazoloakrydonu, C-1305 oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 kwalifikują się do rozszerzonych badań przedklinicznych. Poznany dotychczas mechanizm działania badanych związków wskazywał na ich uszkadzające oddziaływanie z komórkowym DNA, a więc mechanizm podobny do obserwowanego dla stosowanych już w leczeniu cytostatyków. Stąd wskazanie, w ramach niniejszego osiągnięcia, molekularnych i biochemicznych mechanizmów inhibicji kinazy tyrozynowej FLT3 przez

imidazoakrydon C-1311 i triazoloakrydon C-1305 wskazało na nowy, bardziej selektywny mechanizm działania obydwu pochodnych, co niewątpliwie podniesie ich atrakcyjność wśród potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Poza tym, przynajmniej w przypadku już testowanego klinicznie imidazoakrydonu C-1311, uzyskane wyniki mogą dostarczyć istotnych przesłanek do rozpoczęcia badań klinicznych z udziałem pacjentów z ostrą białaczką szpikową, a jednocześnie wykazujących nadekspresję kinazy FLT3.

Z kolei badania zmierzające do poznania mechanizmu działania pochodnych akrydyny w komórkach nowotworowych w zależności od ekspresji genów cytochromów P450, mogą być również kluczowe dla poszerzenia wiedzy o potencjalnych lekach. Wskazały one m.in., jak efekt biologiczny badanych związków może zmieniać się u poszczególnych pacjentów, którzy charakteryzują się różną ekspresją genów enzymów z rodziny cytochromu P450. Poza tym, dzięki coraz szerszej wiedzy o zróżnicowanej ekspresji tych enzymów w komórce prawidłowej i nowotworowej, mogą pomóc w opracowania nowych metod terapii przeciwnowotworowej, ukierunkowanej selektywnie na komórkę nowotworową.

Podsumowując, otrzymane wyniki badań w ramach niniejszego osiągnięcia przedstawionego do oceny, poszerzyły wiedzę o mechanizmach działania nowych związków przeciwnowotworowych, która może być wykorzystana w projektowaniu terapii z ich zastosowaniem. Ma to szczególne znaczenie ze względu na najnowsze kierunki chemoterapii skojarzonej z innymi metodami terapeutycznymi, które powinny być opracowywane indywidualnie dla każdego pacjenta. Terapia indywidualna (ukierunkowana na danego pacjenta) uwzględnia bowiem nie tylko kondycję obarczonego chorobą pacjenta, ale również indywidualne cechy jego genomu sterujące jego własną, specyficzną odpowiedzią na stosowane leki. Uzyskane wyniki badań mechanizmu działania wybranych pochodnych akrydyny mogą być pomocne w projektowaniu związków z tej grupy o korzystniejszych właściwościach przeciwnowotworowych.

Literatura.

1. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer. The next generation. *Cell* 144:646-674.
3. Pulmann B (1989) Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumour drug interactions. *Advances Drug Research* 18:1-113.
4. Martinez R, Chacon-Garcia L (2005) The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what is work and what did not work. *Current Medical Chemistry* 12:127-151.
5. Ledochowski A (1976) Ledakrin – a new polish anticancerous medicine 1-nitro-9(3-dimethylaminopropyloamino)-acridine-2HCl-H_2O. *Materia Medica Polona* 8:237-251.
6. Radzikowski C (1976) Ledakrin – a new polish antitumor drug. *Materia Medica Polona* 8:56-57.

7. Mazerska Z, Łukowicz J, Konopa J (1990) Antitumor activity of 1-nitroacridines including nitracrine against some ascites experimental tumors. *Drug Research* 40:472-477.
8. Ferguson LR, Turner PM, Denny WA (1987) Mutagenicity of nitracrine analogues in Salmonella typhimurium: mutational specificity and activation by bacterial enzymes and rat-liver S9. *Mutation Research* 187:1-9.
9. Thomas AL, Anthoney A, Scott E, Ahmed S, Lundberg AS, Major A, Capizzi RL, Twelves CJ (2008) C-1311, a novel inhibitor of FLT3 and topoisomerase II: A phase 1 trial of once every three week schedule in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 26: S2576.
10. Capizzi RL, Roman LA, Tjulandin S, Smirnova I, Manikhas A, Paterson S, Major A, Lundberg AS, Fumoleau P (2008) Phase II trial of C-1311, a novel inhibitor of topoisomerase II in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26:1055.
11. Dzięgielewski J, Konopa J (1998) Characterization of covalent binding to DNA of antitumor imidazoacridinone C-1311, after metabolic activation. *Annual Oncology* 9(Suppl.1):137.
12. Składanowski A, Plisov SY, Konopa J, Larsen AK (1996) Inhibition of DNA topoisomerase II by imidazoacridinones, new antineoplastic agents with strong activity against solid tumors. *Molecular Pharmacology* 49:772-780.
13. Mazerska Z, Augustin E, Dzięgielewski J, Chołody MW, Konopa J (1996) QSAR of acridines, III. Structure-activity relationship for antitumor imidazoacridinones and intercorrelations between in vivo and in vitro tests. *Anti-Cancer Drug Design* 11:73-88.
14. Kusnierczyk H, Cholody MW, Paradziej-Lukowicz J, Radzikowski C, Konopa J (1994) Experimental antitumor activity and toxicity of selected triazolo- and imidazoacridinones. *Archivum Immunologiae et Therapiae and Experimentalis* 42:414-423.
15. Koba M, Konopa J (2007) Interactions of antitumor triazoloacridinones with DNA. *Acta Biochimica Polonica* 54:297-306.
16. Lemke K, Poindessous V, Składanowski A, Larsen AK (2004) The antitumor triazoloacridinone C-1305 is topoisomerase II poison with unusual properties. *Molecular Pharmacology* 66:1035-1042
17. Lemke K, Wojciechowski M, Laine W, Bailly C, Colson P, Baginski M, Larsen AK, Skladanowski A (2005) Induction of unique structural changes in guanine-rich DNA regions by the triazoloacridone C-1305, a topoisomerase II inhibitor with antitumor activities. *Nucleic Acids Research* 33:6034-6047.
18. Bidzińska J, Cimino-Reale G, Zafforini N, Składanowski A (2012) Triazoloacridinone C-1305 targets Shelterin-DNA complexes and induced tumor cells growth arrest/apoptosis depending on the type of telomere maintenance mechanism. 33rd EORTC-PAMM Group Winter Meeting, Puerto de la Cruz, Tenerife.
19. Konopa J, Wysocka-Skrzela B, Tiwari RK (2003) 9-Alkiloamino-1-nitroacridine derivatives. European patent, 01910914.9-2101-US0105199, American patent, 6.589.961.
20. Chen Y, Ashok BT, Garikapaty VPS, Szostek A, Wysocka-Skrzela B, Banergi D, Konopa J, Miller D, Tiwari RT (2002) Preclinical studies of 1-nitroacridines derivatives: effective anti-tumor agents for prostate cancer cell. *Proceeding of American Association of Cancer Research* 45:390.
21. Tadi K, Ashok BT, Chen YT, Banjerjee D, Wysocka-Skrzela B, Konopa J (2007) Preclinical evaluation of 1-nitroacridine derived chemotherapeutic agent that has preferential cytotoxic activity towards prostate cancer. *Cancer Biology and Therapy* 6:1632-1637.
22. Narayann R, Tiwari RK, Inoa D, Ashok BT (2005) Comperative analysis of mutagenic Potency of 1-nitro-acridine derivatives. *Life Science* 77:2312-2323.
23. Ashok BT, Tadi K, Banjerjee D, Konopa J, Iatropolus M, Tiwari RK (2006) Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethyloamino)-4-methyl-1-nitroacridine (C-1748), a novel anti-cancer agent In male Beagle dogs. *Life Science* 79:1334-1342.

24. Ashok BT, Tadi K, Garikaputy VP, Chen Y, Huang Q, Banjerjee D, Konopa J, Tiwari RK (2007) Preclinical toxicological examination of putative prostate cancer specific 4-methyl-1-nitroacridine derivative in rodents. *Anti-Cancer Drugs* 18:87-94.

25. Konopa J, Wysocka-Skrzela B, Szostek A, Tiwari RK (2003) Potent antitumor 4-substituted-1-nitroacridines DNA crosslinking agents. *Proceedings of EORTC-NCI-AACR* p.66.

26. Szostek A, Wysocka-Skrzela B, Tiwari RK, Konopa J (2002) Interstrand crosslinking of DNA In tumor cells by a new group of antitumor 1-nitroacridines. *International Journal of Cancer* 13:441.

27. Cholody WM, Martelli S, Paradziej-Lukowicz J, Konopa J (1990b) 5-[(Aminoalkyl)amino]imidazo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *Journal of Medical Chemistry* 33:49-52.

28. Cholody WM, Martelli S, Konopa J (1990a) 8-Substituted 5-[(Aminoalkyl)amino]-6H-v-triazolo[4,5,1-de] acridin-6-ones as potential antineoplastic agents. Synthesis and Biological Activity. *Journal of Medical Chemistry* 33:2852-2856.

29. Guengerich FP (1988) Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Research* 48:2946-2954.

30. Kivosto KT, Kroemer HK, Eichelbaum M (1995) The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology* 40:523-530.

31. Guengerich FP (1999) Cytochrome P450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 139:1-17.

32. Goetz MP, Knox SK, Suman KJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Weinshilboum RM, Fritcher EG, Nibbe AM, Desta Z, Nguyen A, Flockhart DA, Perez EA, Ingle JN (2007) The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment* 101:113-121.

33. Poljakova J, Eckschlager T, Hrabeta J, Hrebackova J, Smutny S, Frei E, Martınek V, Kizek R, Stiborova M (2009) The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 77:1466-1479.

34. Wang YJ, Yu CF, Chen LC, Chen CH, Lin JK, Liang YC, Lin CH, Lin SY, Chen CF, Ho YS (2002) Ketoconazole potentiates terfenadine-induced apoptosis in human HepG2 cells through inhibition of cytochrome P450 3A4 activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 87:147-159.

35. Hołownia A, Braszko J (2004) Tamoxifen cytotoxicity in hepatoblastoma cells stably transfected with human CYP3A4. *Biochemical Pharmacology* 67:1057-1064.

36. Lu X, Wan J, Cheng H, Li Y, Ao Y, Peng R (2008) Cytochrome P450 ω-hydroxylase inhibition reduces cardiomyocyte apoptosis via activation of ERK1/2 signaling in rat myocardial ischemia-reperfusion. *European Journal of Pharmacology* 596:118-126.

37. Ding S, Yao D, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T (1997) High levels of recombinant CYP3A4 expression in chinese hamster ovary cells are modulated by coexpressed human P450 reductase and hemin supplementation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 348:403-410.

38. Wilkening S, Stahl F, Baderi A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition* 31:1035-1042.

39. Westerink W, Schoonen W (2007) Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology In Vitro* 21:1581-1591.

40. Fedejko-Kap B, Niemira M, Radominska-Pandya A, Mazerska Z (2011) Flavin monooxygenases, FMO1 and FMO3, not cytochrome P450 isoenzymes, contribute to metabolism of anti-tumour triazoloacridinone, C-1305, in liver microsomes and HepG2 cells. *Xenobiotica* 41:1044-1055.

41. Wiśniewska A, Niemira M, Jagiełło K, Potęga A, Świst M, Henderson C, Skwarska A, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z (2012) Diminished toxicity of C-1748, 4-methyl-9-hydroxyethylamino-1-nitroacridine,

compared with demethyl analog, C-857, corresponds to its resistance to metabolism in HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 84:30-42.

42. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC (2003) FLT3 mutations and leukaemia. *British Journal of Hematology* 122:523-538.
43. Stirewald D, Radich J (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *National Cancer Review* 3:650-665.
44. McKenzie SB (2005) Advances in understanding the biology and genetics of acute myeloid leukemia. *Clinical Lab Sciences* 18:28-37.
45. Chau M, Otake Y, Christensen JL, Fernandes DJ, Ajami AM (2006) The imidazoacridinone C-1311 (Symadex^{TM}): the first of a potent new class of FLT3 inhibitors. In: *AACR Meeting Abstracts*, p. B35.
46. Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL (2002) SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 100:2941-2949.
47. Kim KT, Levis M, Small D (2006) Constitutively activated FLT3 phosphorylates Bad partially through Pim-1. *British Journal of Haematology* 134:500-509.
48. Potęga A, Dąbrowska E, Niemira M, Kot-Wasik A, Ronseaux S, Henderson CJ, Wolf CR, Mazerska Z (2011) The imidazoacridinone antitumor drug, C-1311, is metabolized by flavin monooxygenases but not by cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition* 39:1423-1432.
49. Fedejko-Kap B, Bratton SM, Finel M, Radominska-Pandya A, and Mazerska Z (2012) Role of human UDP-glucuronosyltransferases in the biotransformation of the imidazo- and triazoloacridinone antitumor agents C-1305 and C-1311: Highly selective substrates for UGT1A10. *Drug Metabolism and Disposition* 40:1736-1743.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Po uzyskaniu tytułu magistra biologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Gdańskiego, w 1986 roku rozpoczęłam pracę w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, początkowo jako chemik na etacie inżynieryjno – technicznym, potem naukowo – technicznym, a od 1999 roku jako asystent, a potem adiunkt naukowo-dydaktyczny, a obecnie starszy wykładowca. Od początku swojej drogi naukowej zaangażowana byłam w badania dotyczące mechanizmów działania na poziomie komórkowym, syntetyzowanych w naszym zespole nowych pochodnych akrydyny o właściwościach przeciwnowotworowych. W zespole Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych kierowanym przez Pana prof. Jerzego Konopę w którym pracuję, od kilkudziesięciu lat trwają poszukiwania związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej wśród pochodnych akrydyny. O czym już wspominałam powyżej, pierwszy polski oryginalny lek przeciwnowotworowy – Ledakrin (Nitracrine^{R}) został zsyntetyzowany w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, wówczas w zespole kierowanym przez profesora Andrzeja Ledochowskiego. Z kolei badania kierowane przez profesora Jerzego Konopę doprowadziły do zsyntetyzowania m.in. pochodnych imidazoakrydonów, spośród których pochodna o symbolu C-1311 (Symadex), dotarła do II fazy badań klinicznych i wykazała działanie hamujące rozwój przerzutowego raka piersi. Związek ten stał się pierwszym obiektem moich badań naukowych związanych z mechanizmem działania

pochodnych akrydyny, a w szczególności, badań dotyczących wpływu pochodnych imidazoakrydonu na przebieg cyklu życiowego komórek nowotworowych oraz na indukcję apoptozy w tych komórkach. W 1992 roku wyjechałam na 3 miesięczny staż naukowy do Szkocji, gdzie na Uniwersytecie w Aberdeen, w Zakładzie Patologii Komórki, pod kierunkiem prof. Denysa Whealtley'a prowadziłam badania w wymienionej powyżej tematyce, efektem których powstała publikacja, której jestem współautorką (pkt. 5.1, poz. 1). W 1995 roku odbyłam z kolei 1 miesięczny staż naukowy w Instytucie Gustave Rousssy w Villejiuf we Francji, gdzie pod kierunkiem Dr. Annette Larsen prowadziłam badania dotyczące indukcji apoptozy przez pochodne imidazoakrydonu w komórkach nowotworowych. W tym samym czasie prowadziłam badania wspólnie z prof. Zofią Mazerską dotyczące ilościowej zależności struktura – aktywność w grupie pochodnych imidazoakrydonu (publikacja pkt. 5.1, poz. 2). W 1998 roku na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego obroniłam pracę doktorską dotyczącą wpływu pochodnych imidazoakrydonu oraz wybranych leków przeciwnowotworowych (melfalan, mitoksantron, mitomycyna C, CCNU) na progresję komórek białaczki mysiej L1210 oraz raka jelita grubego HT29 w cyklu życiowym oraz na indukcję apoptozy w tych komórkach i uzyskałam tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. Promotorem mojej rozprawy doktorskiej był prof. Jerzy Konopa.

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam badania związane z mechanizmem działania pochodnych akrydyny w aspekcie indukcji przez te związki procesów śmierci komórkowej. W 1999 roku otrzymałam grant na badania dotyczące komórkowych efektów indukowanych przez kolejną grupę pochodnych akrydyny zsyntetyzowanych w zespole prof. Jerzego Konopy – triazolakrydonów (KBN 1999 – 2001), a w 2002 roku grant z Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny, założonej przez Polpharmę, na badania mechanizmów śmierci komórkowej indukowanej przez triazoloakrydony II generacji – acyloksytriazoloakrydony. Realizacja tych projektów zaowocowała dwoma publikacjami (pkt. 5.1, poz. 6 i pkt. 4, poz. 1 w pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny, szczegółowo opisana w rozdziale 4, pkt. C). W przypadku acyloksytriazoloakrydonów wykazałam, że podobnie jak triazoloakrydony, indukowały one apoptozę w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 i przebiegała ona tzw. ścieżką mitochondrialną z udziałem kaspazy 3. W trakcie realizacji w/w projektów uzyskane wyniki prezentowałam na 3 konferencjach zagranicznych i 4 konferencjach krajowych. Jednocześnie cały czas brałam aktywny udział w badaniach dotyczących mechanizmów działania pochodnych akrydyny na poziomie komórkowym prowadzonych w naszym zespole. Współpracowałam przy realizacji projektu grantowego finansowanego przez firmę Xanthus z USA, dotyczącego losów komórek nowotworowych zablokowanych w fazie G2 cyklu życiowego przez imidazoakrydon C-1311. Jestem współautorką pracy dotyczącej indukcji apoptozy, poprzedzonej katastrofą mitotyczną przez

imidazoakrydon C-1311 w komórkach białaczki ludzkiej MOLT4 (pkt. 5.1, poz. 3). Najważniejszym osiągnięciem w tej pracy było wykazanie, że katastrofa mitotyczna indukowana przez C-1311 w komórkach białaczki MOLT4 nie jest śmiercią samą w sobie, a prowadzi do apoptozy, zarówno kaspazo-zależnej, jaki niezależnej od tego enzymu. Badania nad mechanizmem działania pochodnej C-1311 wobec komórek nowotworowych, w aspekcie indukcji różnych rodzajów śmierci komórkowej, były i są kontynuowane w naszym zespole. W roku 2013 opublikowaliśmy kolejną pracę, której jestem współautorką (pkt.5.1, poz. 11), w której wskazaliśmy na wysoką aktywność cytotoksyczną tej pochodnej wobec komórek ludzkich niedrobnokomórkowych raków płuc A549 i H460. W toku dalszych badań wykazaliśmy jako pierwsi, że związek uszkadzający DNA jakim jest C-1311 indukuje równolegle autofagię i starzenie komórkowe w komórkach A549 i H460. Ponadto wykazaliśmy, że zahamowanie autofagii przez 3-metyloadeninę, redukowało znacząco ilość komórek ulegających starzeniu komórkowemu i wzmacniało indukowaną przez C-1311 apoptozę, co wskazywało na protekcyjną rolę autofagii w komórkach badanych linii niedrobnokomórkowych raków płuc. Wyniki prac dotyczące komórkowych efektów wywoływanych przez imidazoakrydony, w tym C-1311 były licznie prezentowane przeze mnie i pozostałych członków naszego zespołu na 5 konferencjach zagranicznych i 8 krajowych. Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących indukcji różnych rodzajów śmierci komórkowej oraz starzenia komórkowego przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29. W pracy opublikowanej w 2010 roku (pkt.5.1, poz. 4) wykazaliśmy, że związek C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (odpowiadających wartościom EC_{90}) indukował różną odpowiedź biologiczną w komórkach ludzkich raków jelita grubego. Komórki HCT8 ulegały przejściowej akumulacji w fazie G1 i G2/M cyklu komórkowego, a następnie apoptozie. Te komórki, które nie uległy śmierci pod wpływem C-1748 wchodziły w stan senescencji. Natomiast w komórkach HT29 C-1748 nie indukował starzenia komórkowego, apoptozę tylko w niewielkim stopniu, a komórki umierały masowo w wyniku nekrozy. Wyniki te były prezentowane również na 1 konferencji zagranicznej i 3 krajowych.

W toku dalszych badań podjęłam nowe zagadnienie badawcze, wiążące się z badaniami opisanymi powyżej, a mianowicie dotyczące wpływu ekspresji enzymów metabolizujących w komórkach nowotworowych na progresję komórek w cyklu życiowym oraz na rodzaj końcowej odpowiedzi biologicznej indukowanej przez pochodne akrydyny. Część wyników tych badań, które weszły w skład osiągnięcia zgłoszonego do oceny, zostały przeze mnie szczegółowo opisane w rozdziale 4, punkt C. Natomiast w pozostałych badaniach prowadzonych w naszym zespole wykazaliśmy, że nadekspresja izoenzymu CYP3A4 w modelowym układzie komórek CHO miała istotny wpływ na rodzaj odpowiedzi komórkowej (apoptozę, nekrozę, starzenie komórkowe) indukowanej przez pochodną imidazoakrydonu C-1311 w tych komórkach mimo, iż enzym ten nie odgrywał roli w

metabolizmie badanego związku (pkt. 5.1, poz. 13). Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym laboratorium wykazały, że pochodne triazoloakrydonu C-1305 i imidazoakrydonu C-1311, nie będąc substratem cytochromu P450, ulegają metabolicznej transformacji pod wpływem monooksygenazy flawinowej, FMO głównie typu 1 i 3 [40, 48], jak również są substratem dla UDP-glukuronylotransferaz, UGT, w szczególności formy UGT1A10 [49]. W kolejnej pracy, w której jestem współautorką (pkt.5.1, poz. 8) określiliśmy rolę izoenzymu UGT1A10 w odpowiedzi biologicznej indukowanej przez C-1305 i C-1311 w komórkach nowotworowych traktowanych tymi związkami. Wykazaliśmy, że pochodne C-1305 i C-1311 w komórkach ludzkiego raka szyjki macicy KB-3 indukowały apoptozę zależną od kaspazy 3. Co jest bardzo istotne, nadekspresja UGT1A10 spowodowała znaczący wzrost cytotoksyczności pochodnej triazoloakrydonu C-1305, a nie miała wpływu na cytotoksyczność imidazoakrydonu C-1311 wobec komórek KB-3. Również nadekspresja UGT1A10 spowodowała znaczący wzrost proapoptotycznych właściwości pochodnej triazoloakrydonu C-1305 oraz ich obniżenie w przypadku imidazoakrydonu C-1311. Podsumowując te badania, izoenzym UGT1A10 odgrywa istotną rolę w cytotoksyczności i mechanizmie działania pochodnej triazoloakrydonu C-1305 w komórkach nowotworowych. Ze względu na istotną rolę jaką odgrywają systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w badaniach metabolizmu leków *in vitro,* wraz z doktorantką jestem współautorką publikacji, w której dokonałyśmy przeglądu literaturowego opracowanych dotychczas systemów ekspresyjnych z udziałem tych białek, w tym modeli bakteryjnych, drożdżowych, owadzich i ssaczych, z uwzględnieniem ich wad i zalet w zastosowaniu do badań podstawowych, jak i na skalę komercyjną (pkt.5.1, poz. 5). Prowadzone badania dotyczące wpływu ekspresji enzymów metabolizujących na odpowiedź komórkową indukowaną przez pochodne akrydyny finansowane były i są obecnie m.in. w ramach realizacji 3 grantów, w których byłam i jestem głównym wykonawcą (KBN 2004 – 2006; MNiSW 2007 – 2009; NCN OPUS5 2014 – 2017). Jestem również współautorką pracy dotyczącej metabolizmu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w mikrosomach pochodzących z wątroby szczura oraz w komórkach HepG2 (pkt. 5.1, poz. 7). Wykazaliśmy m.in., że metabolizm komórkowy C-1748 przebiega z większą intensywnością w warunkach hipoksji w porównaniu do warunków normoksji, co może mieć istotne znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej tej pochodnej w komórkach nowotworów litych. Chciałabym również nadmienić, że wyniki badań dotyczące roli nadekspresji izoenzymu CYP3A4 czy UGT1A10 w odpowiedzi komórkowej indukowanej przez pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych były przeze mnie i członków naszego zespołu prezentowane na 7 konferencjach krajowych i 2 zagranicznych.

Uczestniczyłam również w realizacji projektu NCBR dotyczącego otrzymania nowego, oryginalnego leku przeciwnowotworowego o nowym mechanizmie działania. Jestem współautorką

zgłoszenia patentowego opartego na otrzymanych wynikach w ramach realizacji tego projektu (Załącznik nr 3, pkt. IIB).

Jednocześnie w ramach posiadanych umiejętności badawczych współpracuję z zespołami naukowymi w kraju i za granicą. Owocem tych współprac są 4 publikacje, w których jestem współautorką (pkt. 5.1, poz. 9, 10, 12 i 14). W publikacji poz. 9 wraz z naukowcami z Uniwersytetu w Wirginii w Stanach Zjednoczonych wykazaliśmy, że zahamowanie kanałów wapniowych typu T w komórkach nowotworowych centralnego układu nerwowego przez Mibefradil prowadzi do obniżenia przeżywalności tych komórek i obniżenia oporności na stosowane terapię. Z kolei z zespołem prof. Zbigniewa Stojka z Uniwersytetu Warszawskiego współpracujemy w zakresie badania właściwości biologicznych koniugatów magnetycznych nanocząstek z doksorubicyną. Mój udział w tych badaniach polegał na zbadaniu aktywności cytotoksycznej tych koniugatów wobec ludzkich komórek nowotworu pęcherza moczowego, gdzie wykazałam, iż koniugaty te odznaczały się wyższą cytotoksycznością niż wolna doksorubicyna. Ponadto wykazałam, że koniugaty nanocząstka - doksorubicyna indukowały charakterystyczne dla apoptozy zmiany w morfologii komórek nowotworu pęcherza moczowego, które obejmowały znacznie większą populację komórek w porównaniu do traktowanych tylko wolną doksorubicyną (publikacja pkt. 5.1, poz. 10). W zakresie wykonywania badań służących określeniu aktywności cytotoksycznej, współpracuję również z dr hab. inż. Anną Dołęgą z Katedry Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Owocem tej współpracy jest publikacja poz. 12 oraz 3 komunikaty na konferencjach krajowych i zagranicznych, w których jestem współautorką. W ramach tej współpracy badałam aktywność cytotoksyczną kompleksów miedzi z pochodnymi imidazoli wobec komórek nowotworowych. Z kolei w ramach współpracy z mgr inż. Grzegorzem Gorczycą z zespołu prof. Sławomira Milewskiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, badałam cytotoksyczność materiałów opatrunkowych na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny wobec komórek mysich fibroblastów NIH-3T3 (publikacja pkt. 5.1, poz. 14).

Moja działalność naukowa została nagrodzona wielokrotnie nagrodami Rektora Politechniki Gdańskiej (Załącznik nr 3, pkt. C). Jestem również zapraszana do recenzowania manuskryptów kierowanych do redakcji czasopism takich jak: *Biochemical Pharmacology, ChemMedChem, Current Pharmaceutical Analysis, Cell Biology International, Journal of Integrative Medicine* (Załącznik 3, pkt. I).

Od wielu lat jestem zaangażowana w badania prowadzone przez doktorantów w naszym zespole. Byłam nieformalnym opiekunem naukowym w przypadku 5 prac doktorskich i jestem

aktualnie promotorem pomocniczym w pracy doktorskiej pani Barbary Borowej-Mazgaj (Załącznik nr 3, pkt. G).

Od 1999 roku prowadzę regularną działalność dydaktyczną, kiedy to zostałam zatrudniona najpierw na etacie asystenta, potem adiunkta naukowo-dydaktycznego, a obecnie starszego wykładowcy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. W ramach tej działalności prowadzę wykłady, seminaria, ćwiczenia oraz laboratoria, jak również opiekuję się dyplomantami. W 2002 roku opracowałam i prowadzę wykłady i laboratoria z nowego dla kierunku Biotechnologia, studia I stopnia, przedmiotu: "Kultury tkankowe". Opracowałam 15 godzin wykładów i 13 ćwiczeń laboratoryjnych, które zostały opisane w skrypcie, praca zbiorowa pod moją redakcją pt. "Wybrane aspekty hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych". Na potrzeby tego laboratorium zorganizowałam na naszym Wydziale pomieszczenie do prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* (fitotron) z kontrolowanymi warunkami wzrostu roślin (temperatura, oświetlenie i wilgotność). Prowadzę również wykład obieralny dla studentów Biotechnologii, studia II stopnia z Biologii komórki nowotworowej. Wykład (30 godzin w semestrze), który wprowadziłam w 2002 roku cieszy się dużym zainteresowaniem wśród studentów i corocznie jest przez nich wybierany. Od 3 lat wykład ten oraz ćwiczenia prowadzę również dla studentów międzywydziałowego kierunku Inżynieria biomedyczna, strumień chemia w medycynie, studia II stopnia. Kolejnym przedmiotem jest biochemia dla kierunku Biotechnologia, studia I stopnia, w ramach którego prowadzę laboratoria oraz seminaria. Chciałabym również dodać, że w Katedrze Technologii Leków i Biochemii jestem osobą kierującą organizacją laboratoriów prowadzonych na kierunku Biotechnologia.

Od 2000 roku 51 dyplomantów wykonało pod moją opieką pracę dyplomową, w tym 32 studentów magisterską i 19 inżynierską na kierunku Biotechnologia. Byłam również recenzentem 87 prac dyplomowych, w tym 66 magisterskich i 21 inżynierskich również na kierunku Biotechnologia. W latach 1999 - 2004 byłam Opiekunem Roku kierunku Biotechnologia na naszym Wydziale, za co na wniosek studentów otrzymałam w roku akademickim 1999/2000 nagrodę Rektora Politechniki Gdańskiej dla: "Najlepszego Opiekuna Roku". Od kilku lat współpracuję również z Kołem Studentów Biotechnologii w zakresie hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych *in vitro.* W 2011 otrzymałam za całokształt działalności dydaktycznej Medal Komisji Edukacji Narodowej. Moja działalność dydaktyczna oraz organizacyjna została szczegółowo opisana w Załączniku nr 3.

Reasumując, na cały mój dorobek naukowy składają się:

publikacje - 21 (**w tym wydzielone jako osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny - 7**)
doniesienia konferencyjne - **73**
zgłoszenie patentowe - **1**
Łączna wartość wskaźnika IF - **58,945** (**w tym dla prac wydzielonych jako osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny IF - 16,746**)
Łączna wartość punktacji MNiSW - **605** (**w tym na prace wydzielone jako osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny - 185**)
Suma cytowań na podstawie Web of Science - **168**

Ogólna liczba cytowań z uwzględnieniem cytowań dla publikacji z bazy Scopus: **186**

h-index (Index Hirsch'a): **7** (na podstawie bazy Web of Science)

5.1. Wykaz pozostałych publikacji naukowych nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

1. **E. Augustin**, D.N. Wheatley, J. Lamb, J. Konopa. Imidazoacridinones arrest cell cycle progression in the G2 phase of L1210 cells. 1996. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology,*38, 39-44. IF 1,261; 5-letni IF 2,79; MNiSW 25; liczba cytowań 28

2. Z. Mazerska, **E. Augustin**, J. Dzięgielewski, M.W. Chołody, J. Konopa. 1996. QSAR of acridines, III. Structure-activity relationship for antitumor imidazoacridinones and intercorrelations between in vivo and in vitro tests. *Anti-Cancer Drug Design*, 11, 73-88. IF 1,69; IF aktualny - 2,38; MNiSW 20; liczba cytowań 30

3. A. Skwarska, **E. Augustin**, J. Konopa. 2007. Sequential induction of mitotic catastrophe followed by apoptosis in human leukemia MOLT4 cells by imidazoacridinone C-1311. *Apoptosis*, 12 (12), 2245-2257. IF 3,043; 5-letni IF 4,16; MNiSW 30; liczba cytowań 23

4. **E. Augustin*,** A. Moś-Rompa, D. Nowak-Ziatyk, J. Konopa. 2010. Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and HT29 cells. *Biochemical Pharmacology,* 79, 1231-1241. IF 4,889; 5-letni IF 4,772; MNiSW 40; liczba cytowań 11

5. M. Pawłowska, **E. Augustin***. Systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w badaniach metabolizmu leków. 2011. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej,* 65, 367 –376. IF 0,654; 5-letni IF 0,761; MNiSW 15; liczba cytowań 5

6. **E. Augustin.** 2011. Indukcja apoptozy w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 przez acyloksytriazoloakrydony – nową grupę związków o właściwościach przeciwnowotworowych. *Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji,* 1 (1), 31 – 38.

7. A. Wiśniewska, M. Niemira, K. Jagiełło, A. Potęga, M. Świst, C. Henderson, A. Skwarska, **E. Augustin**, J. Konopa, Z. Mazerska. 2012. Diminished toxicity of C-1748, 4-methyl-9-hydroxyethylamino-1-nitroacridine, compared with demethyl analog, C-857, corresponds to its resistance to metabolism in HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology,* 84, 30-42. IF 4,576; 5-letni IF 4,772; MNiSW 40; liczba cytowań 2

8. M. Pawłowska, R. Chu, B. Fedejko, **E Augustin**, Z. Mazerska, A. Radomińska-Pandya, T. Chambers. 2013. Metabolic transformation of antitumor acridinone C-1305 but not C-1311 via selective cellular expression of UGT1A10 increases cytotoxic response: implication for clinical use. *Drug Metabolism and Disposition,* 41: 414-421. IF 3,334; 5-letni IF 3,827; MNiSW 35; liczba cytowań 3

9. N.C.K. Valerie, B. Dziegielewska, A.S. Hosing, **E. Augustin**, L.S. Gray, D. Brautigan, J.M. Larener, J. Dziegielewski. 2013. Targeting of T-type calcium channels inhibits the Akt pro-survival pathway and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochemical Pharmacology,* 85:888-897. IF 4,65; 5-letni IF 4,772; MNiSW 40; liczba cytowań 7

10. A.M. Nowicka, A. Kowalczyk, A. Jerzebinska, M. Donten, P. Krysinski, Z. Stojek, **E. Augustin**, Z. Mazerska. 2013. Progress in targeting tumor cells by using drug-magnetic nanoparticles conjugate. *Biomacromolecules,* 14:828-833. IF 5,788; 5-letni IF 5,75; MNiSW 40; liczba cytowań 11

11. J. Polewska, A. Skwarska, **E. Augustin,** J. Konopa. 2013. DNA-damaging imidazoacridinone C-1311 induces autophagy followed by irreversible growth arrest and senescence in human lung cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 346:393-405. IF 3,855; 5-letni IF 3,959; MNiSW 35; liczba cytowań 4

12. S. Godlewska, J. Jezierska, K. Baranowska, **E. Augustin**, A. Dołega. 2013. Copper(II) complexes with substituted imidazole and chlorido ligands: X-ray, UV-Vis, magnetic and EPR studies and chemotherapeutic potential. *Polyhedron,* 65:288-297. IF 2,047; 5-letni IF 2,068; MNiSW 30; liczba cytowań 2

13. M. Pawłowska, **E. Augustin**[*] and Z. Mazerska. 2014. CYP3A4 is not involved in C-1311 metabolism, but affects the cellular response induced by this drug in CHO cells overexpressing CYP3A4 isoenzyme and P450 reductase. *Acta Pharmacologica Sinica,* 35(1):98-112. IF 2,496; 5-letni IF 2,673; MNiSW 30; liczba cytowań 0

14. G. Gorczyca, R. Tylingo, P. Szweda, **E. Augustin,** M. Sadowska, S. Milewski. 2014. Fabrication and characterization of a porous chitosan – protein scaffold for biomedical application. *Carbohydrate Polymers,* 102:901-911. IF 3,916; 5-letni IF 3,94; MNiSW 40; liczba cytowań 3

[*]Autor korespondencyjny.