

AUTOREFERAT

1. **Imię i Nazwisko:** Ryszard Smolarczyk
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i rok ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

Magister biologii

Temat pracy: „Monitorowanie postępów terapii przy wykorzystaniu komórek nowotworowych znakowanych białkiem GFP”

Promotor: Prof. dr hab. S. Szala

Recenzenci: Prof. dr hab. Sylwia Łabużek

Data nadania: 9 lipiec 2003r.

Stopień nadał: Uniwersytet Śląski Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach - specjalizacja: biotechnologia roślin i mikroorganizmów.

Praca magisterska przygotowana w Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach.

doktor nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna

Temat pracy: „Przeciwnowotworowe właściwości peptydu KWKLFFKIGAVLKVL (CAMEL)”.

Promotor: Prof. dr hab. S. Szala

Recenzenci: Prof. dr hab. Janusz Siedlecki, Prof. dr hab. Maciej Ugorski

Data nadania: 1 Kwiecień 2009r.

Stopień nadała: Rada Naukowa Centrum - Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Rozprawa doktorska przygotowana w Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach.

Praca obroniona z wyróżnieniem.

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

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach (wcześniej Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach) – od 04.08.2003r.

2003-2004 w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku biochemika;

2004-2009 w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku asystenta;

2009-2010 w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku adiunkta;

od 2010r. w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów na stanowisku adiunkta;

Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu, w okresie od 2015 do 2017r.

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

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii przeciwnowotworowej

Osiągnięcia naukowo - badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpocząłem w 1999 roku. W roku tym, będąc słuchaczem drugiego roku studiów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego, zostałem wolontariuszem w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Onkologii w Gliwicach, w grupie Pana Prof. Stanisława Szali. W latach 1999-2003 pod kierunkiem prof. Stanisława Szali wykonałem pracę magisterską, której tematem było monitorowanie postępów terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem komórek nowotworach znakowanych białkiem GFP. Obrona pracy odbyła się w roku 2003 na wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego (praca uzyskała ocenę bardzo dobrą).

W trakcie trwania studiów odbyłem 5 miesięczny staż w ramach projektu Socrates-Erasmus na Uniwersytecie Aarhus w Dani w trakcie którego w Szpitalu Uniwersyteckim w Aarhus uczestniczyłem w projekcie dotyczącym zbadania poziomu zakażeń *Mycoplasma* u kobiet.

Po ukończeniu studiów zostałem zatrudniony w Instytucie Onkologii w Gliwicach w Zakładzie Biologii Molekularnej w grupie Pana profesora Stanisława Szali.

Droga mojej kariery zawodowej w Instytucie Onkologii w Gliwicach przebiegała począwszy od stanowiska biochemika (2003-2004), poprzez asystenta naukowo-badawczego (2004-2009), aż do adiunkta (od 2009). Od początku pracy w grupie Pana profesora Szali prowadziłem badania z wykorzystaniem mysich modeli onkologicznych. Początkowo pracowałem jako osoba uczestnicząca w eksperymentach na zwierzętach, a z czasem już jako samodzielnie wykonujący procedury doświadczalne. Wykonywana praca oraz zdobyte doświadczenie pozwoliły mi zostać współautorem pierwszej mojej pracy: „In vivo gene transfer using cetylated polyethylenimine” opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica* w 2004 roku.

Pierwsze moje samodzielne badania dotyczyły wykorzystania terapii genowej do zahamowania wzrostu guzów nowotworowych. W ramach prowadzonych doświadczeń wykazałem, że terapia genowa z wykorzystaniem plazmidowego DNA w kompleksach z politetylenoiminą 750 (PEI 750) stymuluje wydzielanie białek immunostymulacyjnych takich jak: IFN- γ , IL-12 i TNF- α . Zaobserwowałem, że efekt immunostymulacyjny związany był głównie z obecnością niemetylowanych sekwencji CpG pochodzących z plazmidowego DNA. Praca „Negligible induction of IFN-gamma, IL-12 and TNF-alpha by DNA-PEI 750 kDa/albumin complexes”, której byłem pierwszym autorem, została opublikowana w roku 2005 w czasopiśmie *Cytokine*. W kolejnej pracy z moim udziałem: “Plasmid DNA-induced cytokines

together with cyclophosphamide decrease size and number of melanoma lung metastases”, opublikowanej w *Anticancer Research* wykazano, że terapia genowa z wykorzystaniem plazmidowego DNA w kombinacji z cyklofosfamidem zmniejsza rozmiar i liczbę powstających przerzutów czerniaka mysiego w płucach myszy.

Za wyniki uzyskane w moich badaniach w 2004 roku otrzymałem nagrodę dyrektora Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach za odkrycie terapeutycznego efektu spowodowanego kombinacją DNA zawierającego niemetylowane sekwencje CpG i cyklofosfamidu.

Dalsze moje samodzielne badania dotyczyły stosowania terapii celowanej przeciwko naczyniom nowotworowym. W ramach tych doświadczeń wykazałem, że zastosowanie peptydu dwudomenowego z motywem swoiście rozpoznającym i niszczącym nowotworowe naczynia krwionośne skutecznie hamuje wzrost guzów mysiego czerniaka. Wyniki opublikowano w pracy: „Antitumor effect of RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)₂ peptide in mouse B16(F10) melanoma model” w 2006 roku w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica*, której byłem głównym autorem.

W okresie przed doktoratem brałem udział w realizacji pięciu projektów grantowych. Byłem głównym autorem dwu prac oryginalnych oraz współautorem kolejnych trzech. Byłem również głównym autorem jednej pracy poglądowej. Moje prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora mają łączny *Impact Factor* ok. 11,8.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna uzyskałem 1 kwietnia 2009r. Rozprawę doktorską pt.: „Przeciwnowotworowe właściwości peptydu KWKLFFKIGAVLKVL (CAMEL)”, przygotowałem pod kierunkiem Pana profesora Stanisława Szali. Praca dotyczyła zbadania właściwości przeciwnowotworowych peptydu przeciwnowotworowego - CAMEL, a także jego kombinacji z immunostymulującym białkiem IL-12. Uzyskane wyniki stały się podstawą przygotowania pracy doświadczalnej „Anticancer effects of CAMEL peptide” opublikowanej w 2009 roku w czasopiśmie *Laboratory Investigation*. Na posiedzeniu w dniu 14 kwietnia 2009r. Rada Naukowa Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie wyróżniła moją rozprawę doktorską. W tym samym roku otrzymałem nagrodę dyrektora Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach za najlepszą pracę doktorską roku.

W swojej dalszej pracy naukowej skupiłem się na badaniu naczyń nowotworowych w kontekście celu terapii przeciwnowotworowej. Wyniki moich badań przedstawiłem w trzech pracach. Pierwsza z nich dotyczyła niszczenia nowotworowych naczyń krwionośnych za pomocą wcześniej badanego przeze mnie peptydu CAMEL w kombinacji z liposomami zawierającymi doksorubicynę: „Experimental anticancer therapy with vascular-disruptive peptide and liposome-entrapped chemotherapeutic agent” opublikowana w *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. Kolejne dwie prace dotyczyły hamowania procesu angiogenezy w guzie za pomocą białka wazostatyny („Vasostatin increases oxygenation of B16-F10 melanoma tumors and raises therapeutic efficacy of cyclophosphamide”) oraz szczepionki DNA z endogliną („Therapeutic antitumor potential of endoglin-based DNA

vaccine combined with immunomodulatory agents”). W celu zwiększenia efektu terapeutycznego obie terapie dodatkowo skojarzyłem z czynnikami aktywującymi układ immunologiczny. W 2014 roku byłem autorem pracy, w której badano właściwości antynaczyniowe rekombinowanego białka dwudomenowego ABRaA-VEGF₁₂₁ w kombinacji z terapią genową z użyciem plazmidu zawierającego białko IL-12: „Antitumor effects of recombinant antivascular protein ABRaA-VEGF121 combined with IL-12 gene therapy”.

Z uwagi na fakt, że po zakończeniu podawania czynnika terapeutycznego indukującego nekrozę obserwowałem uwalnianie białka HMGB1 do przestrzeni pozakomórkowej i ponowny wzrost guzów, postanowiłem opracować schemat terapii kombinowanej hamującej białko HMGB1. Białko to uwalniane z jądra komórkowego podczas śmierci nekrotycznej jest odpowiedzialne za angiogenezę, zwiększenie proliferacji oraz migracji komórek nowotworowych, co w konsekwencji prowadzi do ponownego wzrostu guza. Koncepcja zapobiegania wznowie nowotworowej poprzez hamowanie białka HMGB1 wydała się na tyle nowatorska, że projekt mojego autorstwa na jej zweryfikowanie otrzymał dofinansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w formie grantu N N401 034736 pt.: „The role of HMGB1 cytokine inhibitor - glycyrrhizin in cancer therapy”. W trakcie prowadzonych badań potwierdziłem, że hamowanie białka HMGB1 za pomocą glicyryzyny zmniejsza poziom białka HMGB1 w tkance guza, zmniejsza proliferację i migrację komórek nowotworowych, a także hamuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Na mysim modelu czerniaka wykazałem, że podanie glicyryzyny razem z peptydem CAMEL indukującym nekrozę hamuje ponowny wzrost guzów nowotworowych. Wyniki opublikowano w pracy: “The role of Glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy” w czasopiśmie *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*.

Temat wykorzystania peptydów w hamowaniu nowotworów był dla mnie na tyle interesujący że w swoich dalszych pracach badawczych postanowiłem zbadać właściwości peptydu D-K₆L₉. Peptyd ten swoicie niszczy komórki nowotworowe powodując ich śmierć na drodze nekrozy oraz powoduje napływ do guza nowotworowego komórek układu immunologicznego. W doświadczeniach terapeutycznych na modelu myszy z guzami czerniaka B16-F10 wykazałem, że peptyd ten w kombinacji z IL-12 skutecznie hamuje wzrost tych guzów. Wyniki badań przedstawiłem w pracy pt.: “D-K₆L₉ peptide combination with IL-12 inhibits the recurrence of tumors in mice”, która została opublikowana w 2014 roku.

We współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Gdańskiego prowadziłem badania nad właściwościami przeciwnowotworowymi peptydów opiorfyny i sialorfyny oraz ich analogów opartych na koniugatach z peptydem cytotoksycznym klaklakklaklak. Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy: „Antitumor activity of opiorphin, sialorphin and their conjugates with a peptide klaklakklaklak” w *Journal of Peptide Science*.

Nawiązałem również współpracę z dr hab. Hubertem Wojtaskiem z Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Opolskiego, gdzie syntetyzowano nowe proleki przeciwnowotworowe. Wynikiem tych prac było wykazanie skutecznego swoistego niszczenia komórek nowotworowych *in vitro*, a także hamowania wzrostu guzów czerniaka mysiego *in vivo*. Rezultaty prac przedstawiono w pracy: „Synthesis and analysis of activity of a potential anti-melanoma prodrug with a hydrazine linker” opublikowanej w *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Moim ważnym osiągnięciem organizacyjnym było również współautorstwo projektu infrastrukturalnego pt.: „Utworzenie Centrum Badań Translacyjnych w Dziedzinie Onkologii Molekularnej” w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, priorytet 2 „Infrastruktura sfery B+R”. Celem projektu było zwiększenie jakości badań

nad molekularnymi mechanizmami procesu nowotworzenia i opracowanie nowych przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych. Projekt uzyskał dofinansowanie w wysokości 36 mln zł (niestety, Instytut zrezygnował z jego realizacji).

Poza tematami związanymi z terapią nowotworów zainteresowałem się również tematyką regeneracji uszkodzonych tkanek za pomocą terapii komórkowej. Od roku 2008 realizowałem wspólnie ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu kolejny projekt grantowy pt.: "Ocena jakościowa i ilościowa puli endogennych, sercowych komórek macierzystych i progenitorowych (Cardiac Stem/Progenitor Cells) u pacjentów z ciężkim nieodwracalnym uszkodzeniem mięśnia sercowego". W 2010 roku utworzono konsorcjum jednostek: Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu (lider projektu), Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrzu oraz Centrum Onkologii – Instytut w Gliwicach. Konsorcjum to otrzymało finansowanie projektu pt.: „Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca” (projekt był współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Działanie 1.3, Poddziałanie 1.3.1). Jako wykonawca tego projektu uczestniczyłem w analizie komórek macierzystych obecnych w ludzkim sercu, a także w badaniach nad wykorzystaniem mezenchymalnych komórek zrębu do naprawy uszkodzonej tkanki mięśniowej serca. Wynikiem tego projektu były prace: „Characteristic of c-Kit⁺ progenitor cells in explanted human hearts” opublikowana w *Clinical Research in Cardiology* oraz „Human Cardiac Mesenchymal Stromal Cells with CD105⁺CD34⁻ Phenotype Enhance the Function of Post-Infarction Heart in Mice” opublikowana w *PLoS One*. W ramach tej tematyki byłem również współwykonawcą projektu: „Mezenchymalne komórki zrębu oraz wzbogacony nimi skafold jako alternatywna forma terapii chorych z niewydolnością serca - PHOENIX” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego Programu Badań Naukowych i Prac Rozwojowych „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” – Strategmed. Projekt był realizowany w konsorcjum w składzie: Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu, Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi, Kardio-Med Silesia Sp. z o.o., Uniwersytet Jagielloński, American Heart of Poland S.A., Adamed Sp. z o.o. oraz The University of Dublin Trinity College. W ramach projektu nasza grupa opracowała skuteczną metodę hodowli mezenchymalnych komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej na dużą skalę. Wyniki tej pracy opublikowano w pracy: “The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells” w czasopiśmie *Stem Cell Research & Therapy*. Byłem również wykonawcą w projekcie pt.: „Rola cytokiny IL-6 wydzielanej przez mezenchymalne komórki zrębu (MSC) w powstawaniu naczyń krwionośnych”. Realizacja tego projektu zakończyła się opublikowaniem trzech prac doświadczalnych.

Kolejny obszar moich zainteresowań naukowych, czyli nośniki polimerowe mogące mieć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej, realizuję we współpracy Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu (współpraca nawiązana w roku 2018). Konsorcjum naukowe utworzone przez obie instytucje właśnie uzyskało finansowanie projektu: „Polimerosomy specyficznie uwalniające cGAMP i doksorubicynę w nowotworowych obszarach hipoksji jako nowe przeciwnowotworowe rozwiązanie terapeutyczne” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (proj. nr 2020/39/B/NZ5/00745), którego jestem kierownikiem. Jestem również głównym wykonawcą reprezentującym Instytut Onkologii w konsorcyjnym projekcie kierowanym przez dr Katarzynę Jelonek z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN pt. „Biodegradowalne micle polimerowe o podwójnej modyfikacji powierzchniowej do dostarczania leków

przeciwnowotworowych” (proj. nr 2019/34/E/NZ7/00010). Wynikiem dotychczasowej współpracy z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych są prace „Bioresorbable filomicelles for targeted delivery of betulin derivative - In vitro study” - *International Journal of Pharmaceutics*, 2019 oraz „Electrospun paclitaxel delivery system based on PGCL/PLGA in local therapy combined with brachytherapy” - *International Journal of Pharmaceutics*, 2021.

Od 2019 roku współpracuję również ze Szpitalem Uniwersyteckim w Ostrawie w Czechach. W ramach projektu nr Cz.02.1.01/0.0/0.0/17 049/0008440 pt.: „Cell CoLab Ostrava”, Research and Development Center for Cell Therapy in Hematology and Oncology, Ostrava, prowadzę wspólne badania dotyczące terapii szpiczaka ludzkiego. Prowadzone badania dotyczą terapii szpiczaka ludzkiego z wykorzystaniem izolowanych od pacjentów komórek NK. W ramach tych badań ukazała się wspólna praca: „Selection, Expansion, and Unique Pretreatment of Allogeneic Human Natural Killer Cells with Anti-CD38 Monoclonal Antibody for Efficient Multiple Myeloma Treatment” opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie *Cells*, a kolejne dwie są w przygotowaniu.

Jednak głównym obszarem zainteresowań badawczych stały się zagadnienia dotyczące mikrośrodowiska nowotworowego oraz jego modyfikacji w celach terapeutycznych. Wynikiem tych badań są między innymi prace, w których jako współautor przedstawiam znaczenie polaryzacji (przekształcenia) mikrośrodowiska nowotworowego z proangiogenne i immunosupresyjnego w kierunku mikrośrodowiska antyangiogenne i immunostymulującego. W jednej z nich: „M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma” prezentowane jest znaczenie przekształcenia makrofagów do fenotypu M1 w normalizacji nowotworowych naczyń krwionośnych, która powoduje, że suboptymalne dawki doksorubicyny skutecznie hamują wzrost guzów u myszy. W kolejnej: „Brachytherapy in a Single Dose of 10Gy as an "in situ" Vaccination” przedstawiono, że jedynie odpowiednio dobrana dawka promieniowania hamuje wzrost guzów nowotworowych przez aktywację limfocytów cytotoksycznych oraz makrofagów. Wykazano, że taka dawka promieniowania jest w stanie przekształcić mikrośrodowisko guza w szczepionkę „in situ” i doprowadzić do znacznego zahamowania wzrostu guza. Innymi interesującymi mnie aspektami funkcji mikrośrodowiska nowotworowego są nowotworowe naczynia krwionośne oraz aktywacja układu odpornościowego w terapii nowotworów. Tematyka ta stanowi przedmiot wskazanego we wniosku osiągnięcia naukowego.

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem lub biorę udział w realizacji 18 projektów grantowych. W trzech z nich byłem lub jestem kierownikiem. Jestem współautorem lub autorem 36 prac naukowych. Jestem również współautorem i autorem 93 doniesień zjazdowych (wystąpienia ustne i plakatowe). Moje prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora mają łączny *Impact Factor* ok. 124,4.

Osiągnięcie naukowe będące przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

Niniejsza rozprawa habilitacyjna została przygotowana na podstawie cyklu pięciu prac oryginalnych oraz dwóch prac przeglądowych opublikowanych w okresie 2012-2021 (w czasopismach o łącznym *Impact Factor* = 25,567). Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie wskazanych publikacji naukowych znajdują się w załączeniu.

Prace tworzące cykl habilitacyjny:

1. Kułach N, Pilny E, Cichoń T, Czapla J, Jarosz-Biej M, Rusin M, Drzyzga A, Matuszczak S, Szala S†, **Smolarczyk R**[#]. Mesenchymal stromal cells as carriers of IL-12 reduce primary and metastatic tumors of murine melanoma. *Scientific Reports*. 2021; 11: 18335. doi: 10.1038/s41598-021-97435-9.
2. Drzyzga A, Cichoń T, Czapla J, Jarosz-Biej M, Pilny E, Matuszczak S, Wojcieszek P, Urbaś Z, **Smolarczyk R**[#]. The Proper Administration Sequence of Radiotherapy and Anti-Vascular Agent—DMXAA Is Essential to Inhibit the Growth of Melanoma Tumors. *Cancers*. 2021; 13: 3924. doi: 10.3390/cancers13163924.
3. **Smolarczyk R**, Czapla J, Jarosz-Biej M, Czerwinski K, Cichoń T. Vascular disrupting agents in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 891: 173692. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173692.
4. **Smolarczyk R**, Cichoń T, Pilny E, Jarosz-Biej M, Poczkaj A, Kułach N, Szala S. Combination of anti-vascular agent - DMXAA and HIF-1 α inhibitor - digoxin inhibits the growth of melanoma tumors. *Scientific Reports*. 2018; 8: 7355. doi: 10.1038/s41598-018-25688-y.
5. Cichoń T, **Smolarczyk R**, Matuszczak S, Barczyk M, Jarosz M, Szala S. D-K₆L₉ peptide combination with IL-12 inhibits the recurrence of tumors in mice. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2014; 62: 341-351. doi: 10.1007/s00005-014-0268-z.
6. **Smolarczyk R**, Cichoń T, Matuszczak S, Mitrus I, Lesiak M, Kobusińska M, Kamysz W, Jarosz M, Sieroń A, Szala S. The role of Glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2012; 60: 391-399. doi: 10.1007/s00005-012-0183-0.
7. **Smolarczyk R**, Cichoń T, Jarosz M, Szala S. HMGB1--its role in tumor progression and anticancer therapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2012; 66: 913-920. doi: 10.5604/17322693.1021108.

[#] - autor korespondencyjny

Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Podstawy teoretyczne

Mikrośrodowisko guza to nie tylko same komórki nowotworowe, ale także towarzyszące im komórki prawidłowe. Komórki te obejmują między innymi makrofagi związane z nowotworem (TAM), fibroblasty związane z nowotworem (CAF), limfocyty T regulatorowe (Treg), neutrofile związane z nowotworem (TAN), komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (MDSC) oraz komórki śródbłonkowe tworzące nowotworowe naczynia krwionośne [Wang i wsp., 2017]. Wzrost guza pierwotnego powyżej 1–2 mm³ wymaga dobrze rozwiniętej sieci naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe

w tlen i substancje odżywcze [Folkman, 1971]. Naczynia krwionośne guza różnią się w budowie i funkcjach od normalnego układu naczyniowego. Ich układ jest chaotyczny i mocno poskręcany. Jest to konsekwencją ich nieskoordynowanego wzrostu i rozwoju. Chaotyczna struktura naczyń, nieprawidłowe połączenia między komórkami, ślepe gałęzie naczyń i znaczne siły fizyczne działające na naczynia powodują, że przepływ krwi w guzach jest niejednorodny. W obrębie układu naczyniowego guza często występuje spowolnienie przepływu krwi, zastój, a nawet regresja przepływu krwi [Brurberg i wsp., 2008]. Skutkiem dysfunkcji naczyń są obszary niedotlenienia, które pojawiają się w mikrośrodku guza [Dewhirst i wsp., 2008; Kumari i wsp., 2019]. Nieprawidłowa struktura naczyń krwionośnych implikuje w mikrośrodku guza zmiany m. in. w macierzy zewnątrzkomórkowej co powoduje supresję cytotoksycznych limfocytów T, makrofagów przeciwnowotworowych M1, komórek dendrytycznych lub aktywację komórek T_{reg}, MDSC czy makrofagów M2 [Jiang i wsp., 2017; Kuczek i wsp., 2019].

W terapii przeciwnowotworowej można zastosować dwa główne podejścia terapeutyczne. Pierwsze z nich polega na mniej lub bardziej swoistym niszczeniu komórek nowotworowych. Drugie natomiast, opiera się na celowaniu w komórki mikrośrodku nowotworowego, w tym nowotworowe naczynia krwionośne. Leki bezpośrednio niszczące komórki nowotworowe posiadają dużą skuteczność, jednak często wykazują wysoką toksyczność ogólną dla organizmu oraz niską efektywność docierania do komórek docelowych. Z kolei związki działające na nowotworowe naczynia krwionośne, hamujące ich rozwój (leki antyangiogenne) lub bezpośrednio je niszczące, pośrednio niszczą komórki nowotworowe wykazując przy tym nieznaczną toksyczność ogólną. Zaletą terapii skierowanej przeciwko naczyniom krwionośnym jest duża skuteczności niszczenia komórek nowotworowych, ponieważ zniszczenie jednej komórki śródbłonkowej pociąga za sobą śmierć wielu komórek nowotworowych [Smolarczyk i wsp., 2021]. Drugą zaletą tej strategii jest mniejsza oporność na stosowane związki terapeutyczne. Komórki nowotworowe wykształcają więcej mechanizmów oporności na stosowane leki niż komórki mikrośrodku nowotworowego, co wynika z ich heterogenności i częstości pojawiających się zmian genetycznych.

Celowanie w komórki mikrośrodku nowotworowego ma również swoje ograniczenia. Stosowanie leków przeciwnaczyniowych skutecznie hamuje wzrost guza, jednak po zakończeniu terapii, w krótkim czasie obserwuje się ponowny jego wzrost. Jest on związany z powstałą wewnątrz guza hipoksją oraz z pozostającymi na krawędzi guza żywymi komórkami nowotworowymi. Konieczne zatem, wydaje się skojarzenie terapii przeciwnaczyniowej z innymi strategiami przeciwnowotworowymi takimi jak chemioterapia, radioterapia czy immunoterapia. Takie połączenie dwóch strategii terapeutycznych działających na różne komórki obecne w mikrośrodku nowotworowym powinno skutecznie zahamować ponowny wzrost guza.

Omówienie wyników badań stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej.

Zaprezentowany cykl prac doświadczalnych stanowi podsumowanie wyników badań prowadzonych w ramach czterech projektów badawczych, których celem było zbadanie znaczenia mikrośrodku nowotworowego w terapii nowotworów. Prace włączone do cyklu

wykazują również, że terapia ukierunkowana na nowotworowe naczynia krwionośne skojarzona z immunostymulacją jest skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym w terapii przeciwnowotworowej.

Tematyką mikrośrodowiska nowotworowego zainteresowałem się już po obronie pracy doktorskiej. W ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „The role of HMGB1 cytokine inhibitor - glycyrrhizin in cancer therapy”, którego byłem kierownikiem, badałem wpływ glicyryzyny, naturalnego inhibitora białka HMGB1, na zmiany zachodzące w mikrośrodowisku nowotworowym. Zauważyłem, że zastosowanie leków indukujących nekrozę komórek nowotworowych, w moim przypadku, badanego wcześniej, peptydu CAMEL, indukuje uwalnianie białka HMGB1 do przestrzeni międzykomórkowej mikrośrodowiska nowotworowego. Funkcje białka HMGB1 zależą w dużym stopniu od biologicznych warunków w jakich to białko się znajduje. Informacje na temat białka HMGB1 umieściłem w pracy przeglądowej: „HMGB1 – rola w progresji i terapii przeciwnowotworowej”, której byłem głównym autorem. W jądrze komórkowym białko HMGB1 tworzy kompleksy z wieloma białkami jądrowymi, m.in. z p53, p73, białkami aktywującymi rekombinację, jądrowymi receptorami hormonów steroidowych [Gauley i Pisetsky, 2009; Smolarczyk i wsp. 2021]. Białko HMGB1 stabilizuje także strukturę nukleosomów oraz bierze udział w transkrypcji różnych genów. Białko to w procesie nekrozy jest uwalniane z jądra komórkowego do przestrzeni międzykomórkowej. Po uwolnieniu białko to staje się cytokiną prozapalną i jest odpowiedzialne za proliferację komórek nowotworowych, silny wzrost nowotworowych naczyń krwionośnych, zwiększoną migrację komórek czy aktywację stanu zapalnego. Wszystkie te procesy prowadzą do ponownego wzrostu guza. Aby temu zapobiec zaproponowałem zastosowanie inhibitora białka HMGB1 - glicyryzyny w terapii guzów czerniaka mysiego. Zastosowanie peptydu CAMEL indukowało nekrozę w guzach oraz uwalnianie białka HMGB1 z komórek do przestrzeni międzykomórkowej, a w konsekwencji napływ komórek układu odpornościowego, zwłaszcza makrofagów. Zauważyłem, że zastosowanie glicyryzyny skutecznie hamuje aktywność białka HMGB1 *in vitro* zarówno w proliferacji komórek nowotworowych, migracji, jak i zdolności do aktywacji procesu angiogenezy. Zastosowanie tego inhibitora u myszy hamuje ponowny wzrost guzów czerniaka B16-F10, a nawet prowadzi do całkowitego ich wyleczenia. Wyniki zostały opublikowane w pracy: „The role of Glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy” autorów Smolarczyk R, Cichoń T, Matuszczak S, Mitrus I, Lesiak M, Kobusińska M, Kamysz W, Jarosz M, Sieroń A, Szala S.

W ramach kontynuacji prac związanych z wykorzystaniem peptydów w terapii nowotworów zbadałem właściwości innego peptydu indukującego nekrozę - D-K₆L₉. Peptyd ten według pracy Papo i wsp. [Papo i wsp. 2006] indukuje swoiście nekrozę komórek nowotworowych. Wykazano, że podobnie jak w przypadku peptydu CAMEL z komórek nowotworowych uwalniane jest białko HMGB1. W pracy tej postanowiono skojarzyć działanie peptydu swoiście niszczącego komórki nowotworowe D-K₆L₉ z glicyryzyną lub peptydem wykazującym właściwości antyangiogenne BP1 lub immunostymulującym i antyangiogennym białkiem interleukiny 12 (IL-12). Zastosowanie glicyryzyny lub peptydu antyangiogennego BP1 hamowało wzrost guzów w terapii skojarzonej. Jednak zahamowanie wzrostu guza obserwowano jedynie w trakcie trwania terapii. Po zakończeniu podawania związków

następował ponowny wzrost guzów czerniaka mysiego. Takie rozwiązanie terapeutyczne nie spełniało pokładanych oczekiwań. Dlatego postanowiłem skojarzyć działanie peptydu D-K₆L₉ z podawaniem IL-12 w postaci plazmidowego DNA. Taka kombinacja skutecznie hamowała wzrost guzów zarówno czerniaka mysiego B16-F10 jak i mysiego raka jelita grubego C26. Po dwu miesiącach od przeprowadzonej terapii 60% myszy z guzami mysiego czerniaka nadal pozostawało przy życiu, a w przypadku raka jelita grubego po trzech miesiącach od przeprowadzonej terapii 50% myszy grupy leczonej. Wykazano również, że efekt terapeutyczny związany był ze stymulacją komórek układu odpornościowego, głównie komórek NK oraz limfocytów cytotoksycznych CD8⁺. Rezultaty tych badań opublikowano w pracy: „*D-K6L9 peptide combination with IL-12 inhibits the recurrence of tumors in mice*” autorów Cichoń T, Smolarczyk R, Matuszczak S, Barczyk M, Jarosz M, Szala S.

Rezultaty terapii z użyciem IL-12 były na tyle obiecujące, że skłoniły mnie do kontynuacji badań nad tą cytokiną. Interleukina ta posiada duży potencjał przeciwnowotworowy, niestety, przy jednoczesnej wysokiej ogólnoustrojowej toksyczności. Uzasadnione wydało się zatem opracowanie takiego mechanizmu dystrybucji, który pozwalałby na bezpieczne i bezpośrednie dostarczenie IL-12 do guza nowotworowego. Do tego celu wykorzystano mezenchymalne komórki zrębu. Komórki te posiadają cechy nośnika idealnego. Są to łatwo dostępne komórki wykazujące silny tropizm do tkanek objętych stanem zapalnym w tym guzów. Uprzywilejowane immunologicznie – nie wywołują odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie, działają immunomodulująco w środowisku zapalnym i nie powodują nacieku komórek układu odpornościowego [Guadix i wsp. 2017]. Wykazano, że komórki mezenchymalne mają silny tropizm do komórek nowotworowych zarówno czerniaka jak i glejaka mysiego. Komórki mezenchymalne transdukowano genem IL-12 za pomocą wektorów adenowirusowych, a następnie traktowano nimi myszy z pierwotnymi guzami czerniaka. Po przeprowadzonej terapii zaobserwowano znamienne zahamowanie wzrostu guzów czerniaka mysiego. Dodatkowo u myszy z doświadczalnymi przerzutami czerniaka do płuc, którym podano modyfikowane komórki mezenchymalne, zaobserwowano znamienne statystycznie zmniejszenie ich liczby. Analizy przeprowadzone po terapii wykazały, że liczba naczyń krwionośnych w guzie u myszy, którym podawano modyfikowane IL-12 komórki mezenchymalne, jest niższa. Poza tym, udowodniono, że podanie genu IL-12 polaryzuje makrofagi z pronowotworowego fenotypu M2 do przeciwnowotworowego M1 oraz zwiększa liczbę limfocytów cytotoksycznych w guzie. Wyniki opublikowano w pracy: „*Mesenchymal stromal cells as carriers of IL-12 reduce primary and metastatic tumors of murine melanoma*” autorów Kułach N, Pilny E, Cichoń T, Czapla J, Jarosz-Biej M, Rusin M, Drzyzga A, Matuszczak S, Szala S[†], Smolarczyk R. W pracy wykazano, że pleiotropowe (antyangiogenne i immunostymulujące) działanie cytokiny IL-12, swoiście dostarczonej za pomocą mezenchymalnych komórek zrębu, może przyczynić się do zmiany charakteru mikrośrodowiska nowotworu (polaryzacji) z proangiogennego i immunosupresyjnego na antyangiogenne i immunostymulujące.

W dalszych badaniach skupiłem się na swoistym niszczeniu już istniejących nowotworowych naczyń krwionośnych. Do tego celu używałem znanego związku antynaczyniowego DMXAA. DMXAA jest syntetycznym związkiem, który niszczy nowotworowe naczynia krwionośne poprzez indukcję apoptozy komórek śródbłonkowych

w guzie. Na początku badań nad tym związkiem wykazano, że apoptoza komórek nowotworowych związana jest z uwalnianiem cytokiny prozapalnej - czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) [Hantel i wsp., 2016]. TNF- α zmienia organizację cytoszkieletu komórek śródbłonkowych, zmieniając w ten sposób kształt tych komórek i stymuluje ich apoptozę. Zaobserwowano, że u myszy pozbawionych genu TNF- α lub receptora TNF- α nie obserwuje się cytotoksycznego wpływu DMXAA na komórki śródbłonkowe. [Ching i wsp., 1999; Zhao i wsp., 2002]. Efektu tego nie obserwuje się w normalnej tkance, ponieważ komórki śródbłonka guza są bardziej wrażliwe na DMXAA niż komórki śródbłonka obecne w normalnych tkankach. [Ching i wsp., 2004]. W swoich badaniach zaobserwowałem, że podanie DMXAA indukuje rozległą nekrozę w centralnej części guza, natomiast na obrzeżach guza pozostawała warstwa żywych komórek nowotworowych. Zniszczenie nowotworowych naczyń krwionośnych wiąże się z pojawieniem się hipoksji i aktywacją białka HIF-1 α w nowotworach, co z kolei prowadzi do m.in. powstania nowych naczyń krwionośnych i wzrostu poziomu cytokin proangiogennych, takich jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i czynnik pochodzenia zrębowego 1 (SDF-1 α), wzrostu inwazyjności, proliferacji komórek nowotworowych i immunosupresji [Schito i Semenza, 2016; Wigerup i wsp., 2016]. Wszystkie te procesy prowadzą w konsekwencji do ponownego wzrostu guza. Postanowiłem zatem skojarzyć działanie związku przeciwnaczyniowego DMXAA z inhibitorem białka HIF-1 α - digoksyną. Digoksyna jest znanym lekiem stosowanym w chorobach układu krwionośnego. Wykazano, że digoksyna jest inhibitorem translacji białka HIF-1 α i ekspresji HIF-2 α [Masoud, G. N. i Li, W., 2015; Zhang, H. i wsp., 2008]. W mojej pracy wykazałem, że kombinacja DMXAA z digoksyną hamuje wzrost guzów nowotworowych mysiego czerniaka skuteczniej niż każdy z czynników z osobna. W guzach myszy traktowanych digoksyną poziom białka HIF-1 α był niższy. Zaobserwowano, że stosując taką kombinację leków liczba naczyń krwionośnych w guzie jest niższa. Dodatkowo wykazano, że wzrasta infiltracja guzów makrofagami cytotoksycznymi M1. Udowodniono również, że efekt terapeutyczny związany jest ze wzrostem liczby limfocytów cytotoksycznych CD8⁺, a także komórek NK. Uzyskane wyniki opublikowano w pracy: „*Combination of anti-vascular agent - DMXAA and HIF-1 α inhibitor - digoxin inhibits the growth of melanoma tumors*” autorów Smolarczyk R, Cichoń T, Pilny E, Jarosz-Biej M, Poczka A, Kułach N, Szala S. W pracy wykazano, że stosując kombinację obu związków terapeutycznych można kontrolować wzrost guzów oraz, że stosowanie leków przeciwnaczyniowych jak DMXAA w połączeniu z inhibitorami czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α może hamować ponowny wzrost guzów.

W kolejnych badaniach próbowałem ocenić skuteczność terapeutyczną związku DMXAA w kombinacji z radioterapią, a konkretnie radioterapią kontaktową (brachyterapią). Taka kombinacja powinna niszczyć naczynia krwionośne obecne w guzie oraz dodatkowo stymulować układ odpornościowy do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych. Radioterapia niszczy komórki nowotworowe, ale także wpływa na mikrośrodowisko guza, głównie poprzez stymulację komórek odpornościowych [Jarosz-Biej i wsp. 2019; Hanna i wsp. 2015]. Skumulowane dawki powyżej 5 Gy zmniejszają również gęstość naczyń krwionośnych w guzie. Fuks i wsp. wykazali, że pojedyncza dawka powyżej 8–10 Gy i frakcjonowane promieniowanie 1,8–3 Gy na frakcję ma silne działanie przeciwnaczyniowe [Fuks i wsp., 2005]. Uzyskane wyniki były dla mnie zaskoczeniem, ponieważ, jedynie kombinacja, w której

najpierw stosowano brachyterapię, a następnie podawano związek niszczący naczynia krwionośne wykazywała synergizm działania. Dodatkowo zauważyłem, że odwrotna kombinacja nie dawała spodziewanego efektu terapeutycznego, a wręcz znosiła efekt działania DMXAA. Po raz pierwszy przedstawiono znaczenie komórek układu odpornościowego aktywowanych w odpowiednim czasie w kombinacji takich czynników terapeutycznych. Wykazano również, że zahamowanie wzrostu guza wiąże się z redukcją naczyń krwionośnych, zwiększoną infiltracją limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ i komórek NK oraz polaryzacją makrofagów do cytotoksycznego fenotypu M1. Uzyskane wyniki opublikowano w pracy: *„The Proper Administration Sequence of Radiotherapy and Anti-Vascular Agent—DMXAA Is Essential to Inhibit the Growth of Melanoma Tumors”* autorów Drzyzga A, Cichoń T, Czapla J, Jarosz-Biej M, Pilny E, Matuszczak S, Wojcieszek P, Urbaś Z, Smolarczyk R. Praca ta po raz pierwszy zwróciła uwagę na fakt że, kombinacja brachyterapii z czynnikiem niszczącym nowotworowe naczynia krwionośne skutecznie hamuje wzrost guzów czerniaka, ale efekt ten obserwowany jest jedynie przy zastosowaniu określonej sekwencji podań obu czynników terapeutycznych.

W pracy przeglądowej pt: *„Vascular disrupting agents in cancer therapy”* autorów Smolarczyk R, Czapla J, Jarosz-Biej M, Czerwinski K, Cichoń T podsumowałem wyniki moich badań dotyczących terapii z wykorzystaniem czynników niszczących nowotworowe naczynia krwionośne. Związki niszczące naczynia krwionośne pomimo niewątpliwych zalet posiadają również pewne ograniczenia. Mogą mieć przejściowe działanie kardiotoksyczne, a ich stosowanie może pozostawiać żywe komórki na brzegu guza. Dodatkowo, pojawianie się rozległej hipoksji w guzie aktywuje szereg procesów naprawczych aktywowanych głównie przez białko HIF-1 α , co prowadzi do ponownego wzrostu guzów. W podsumowaniu, wskazuję na konieczność odpowiedniej kombinacji związków przeciwnaczyniowych z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Taka kombinacja terapii powinna przynieść efekt terapeutyczny w postaci kontrolowania wzrostu guza oraz zahamowania ponownego jego wzrostu.

Wnioski płynące z moich prac.

1. Mikrośrodowisko nowotworowe wydaje się być dobrym celem w terapii przeciwnowotworowej. Jednym z potencjalnych, skutecznych celów takiej terapii są nowotworowe naczynia krwionośne.
2. Kombinacja związków niszczących komórki nowotworowe z czynnikami modulującymi mikrośrodowisko nowotworowe skutecznie hamuje wzrost guzów nowotworowych.
3. Aktywacja układu odpornościowego, jest kluczowym elementem terapii skojarzonej, odpowiedzialnym za zahamowanie wzrostu guza.
4. Jedynie odpowiednio zaplanowany schemat terapii tzn. odpowiednia kolejność stosowanych czynników terapeutycznych gwarantuje sukces terapeutyczny.

Podsumowanie

Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii przeciwnowotworowej to nowatorskie i skuteczne podejście w terapii nowotworów. Rozwiązania terapeutyczne oparte

na modulowaniu mikrośrodowiska nowotworowego to odpowiedź na ciągłą potrzebę poszukiwania nowych, bardziej skutecznych rozwiązań terapeutycznych, pozwalających na kontrolę wzrostu guzów nowotworowych.

W przyszłości planuję dalsze badanie nad kombinacją leków niszczących swoiście naczynia krwionośne z immunostymulacją. Obiektem mojego zainteresowania jest nowa ścieżka aktywacji układu odpornościowego w nowotworach poprzez białko STING. Białko to jest jednym z elementów wrodzonej odpowiedzi na pojawiający się, w cytoplazmie komórek eukariotycznych, dwuniciowy DNA pochodzący z bakterii, wirusów lub uszkodzonych komórek nowotworowych. Badania te otrzymały wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Nauki w ramach dwu konkursów OPUS. W ramach tych projektów prowadzone będą również badania nad swoistym dostarczaniem agonisty białka STING oraz chemioterapeutyku za pomocą zaprojektowanych nanonośników polimerowych. W swoich badaniach zamierzam również kontynuować tematykę związaną z polaryzacją mikrośrodowiska nowotworowego z proangiogenego i immunosupresyjnego w kierunku antyangiogenego i immunostymulującego. Planuję również opracować, a następnie zbadać terapię przeciwnowotworową opartą o autologiczne komórki NK.

Literatura

1. Brurberg KG, Gaustad JV, Mollatt CS, Rofstad EK. Temporal heterogeneity in blood supply in human tumor xenografts. *Neoplasia*. 2008; 10(7): 727-35.
2. Ching, L.M., Goldsmith, D., Joseph, W.R., Korner, H., Sedgwick, J.D., Baguley, B.C. Induction of intratumoral tumor necrosis factor (TNF) synthesis and hemorrhagic necrosis by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF knockout mice. *Cancer research* 1999; 59: 3304-3307.
3. Ching, L.M., Zwain, S., Baguley, B.C. Relationship between tumour endothelial cell apoptosis and tumour blood flow shutdown following treatment with the antivascular agent DMXAA in mice. *British journal of cancer*. 2004; 90: 906-910.
4. Dewhirst, M. W.; Cao, Y.; Moeller, B., Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews Cancer*; 2008; 8(6): 425-37.
5. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971; 285: 1182-1186.
6. Fuks, Z.; Kolesnick, R. Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell*; 2005, 8: 89–91.
7. Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity*. 2009; 42:299–301.
8. Guadix, J. A., Zugaza, J. L. & Galvez-Martin, P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Medicina clinica*. 2017; 148: 408-414.
9. Hanna, G.G.; Coyle, V.M.; Prise, K. Immune modulation in advanced radiotherapies: Targeting out-of-field effects. *Cancer Lett.*; 2015, 368: 246–251.
10. Hantel, C., Ozimek, A., Lira, R., Ragazzon, B., Jackel, C., Frantsev, R., Reincke, M., Bertherat, J., Mussack, T., Beuschlein, F. TNF alpha signaling is associated with

therapeutic responsiveness to vascular disrupting agents in endocrine tumors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016; 423: 87-95.

11. Jarosz-Biej, M.; Smolarczyk, R.; Cichon, T.; Kułach, N. Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(13): 3212.
12. Jiang, H., Hegde, S., DeNardo, D.G. Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2017; 66: 1037-1048.
13. Kuczek, D.E., Larsen, A.M.H., Thorseth, M.L., Carretta, M., Kalvisa, A., Siersbaek, M.S., Simoes, A.M.C., Roslind, A., Engelholm, L.H., Noessner, E., Donia, M., Svane, I.M., Straten, P.T., Grontved, L., Madsen, D.H. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *J Immunother Cancer*. 2019; 7(1) :68.
14. Kumari, R., D. Sunil, R. S. Ningthoujam and N. A. Kumar. "Azodyes as markers for tumor hypoxia imaging and therapy: An up-to-date review." *Chem Biol Interact*. 2019; 307: 91-104.
15. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B*. 2015; 5: 378–389.
16. Papo N, Seger D, Makovitzki A, et al. Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide. *Cancer Res*. 2006; 66: 5371–5378.
17. Schito, L., Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in cancer*. 2016; 2: 758-770.
18. Smolarczyk R, Czapla J, Jarosz-Biej M, Czerwinski K, Cichoń T. Vascular disrupting agents in cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2021; 891:173692.
19. Wang, M., J. Zhao, L. Zhang, F. Wei, Y. Lian, Y. Wu, Z. Gong, S. Zhang, J. Zhou, K. Cao, X. Li, W. Xiong, G. Li, Z. Zeng and C. Guo. "Role of tumor microenvironment in tumorigenesis." *J Cancer*. 2017; 8(5): 761-773.
20. Wigerup, C., Pahlman, S., Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2016; 164, 152-169
21. Zhang, H. et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 19579–19586.
22. Zhao, L., Ching, L.M., Kestell, P., Baguley, B.C. The antitumour activity of 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF receptor-1 knockout mice. *British journal of cancer*. 2002; 87: 465-470.

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

Większą część mojej aktywności naukowej realizowałem w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach (wcześniej Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie). Część aktywności naukowej realizowałem również w Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu.

Ponadto, prowadziłem prace badawcze realizowane we współpracy różnymi jednostkami naukowymi.

- W ramach projektu Socrates-Erasmus, w terminie od 1 wrzesień 2001 do 31 styczeń 2002 odbyłem staż zagraniczny na Uniwersytecie Aarhus w Dani. Ponadto, w ramach wyjazdu w Szpitalu Uniwersyteckim w Aarhus dodatkowo uczestniczyłem w projekcie dotyczącym zbadania poziomu zakażeń *Mycoplasma* u kobiet.
- We współpracy z prof. dr hab. Wojciechem Kamyszem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadziłem badania związane z przeciwnowotworowymi właściwościami peptydów.
- We współpracy z prof. dr hab. Hubertem Wojtąskim z Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Opolskiego badałem właściwości przeciwnowotworowe nowo syntetyzowanych proleków.
- We współpracy z dr Haliną Waś z Uniwersytetu Jagiellońskiego zajmowałem się wpływem oksygenazy hemowej na wzrost guzów czerniaka mysiego oraz udziałem komórek układu odpornościowego w tym procesie.
- Od 2018 roku współpracuję ze Szpitalem Uniwersyteckim w Ostrawie w Czechach, gdzie w ramach projektu nr Cz.02.1.01/0.0/0.0/17 049/0008440 pt.: „Cell CooLab Ostrava”, Research and Development Center for Cell Therapy in Hematology and Oncology, Ostrava, prowadzę wspólne badania dotyczące terapii szpiczaka ludzkiego z wykorzystaniem komórek NK oraz komórek macierzystych.
- Obecnie, w ramach konsorcjum naukowego realizującego granty Narodowego Centrum Nauki, prowadzę również współpracę z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze. W ramach wspólnych projektów badamy możliwość stosowania nanonośników polimerowych w swoistym dostarczaniu leków przeciwnowotworowych w rejon guza oraz możliwości stosowania materiałów polimerowych jako nośnika z zaplanowanym i regulowanym uwalnianiem chemioterapeutyków.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne.

W trakcie studiów na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego zaliczyłem kurs pedagogiczny dający kwalifikacje do nauczania biologii. W trakcie pracy w Instytucie Onkologii w Gliwicach opiekowałem się studentami w ramach wolontariatów, praktyk i staży studenckich. Byłem opiekunem 12 prac magisterskich. Byłem również opiekunem doktoratu mgr Natalii Kułach, „Mezenchymalne komórki zrębu (MSC) jako nośniki genu IL-12 w terapii myszy z czerniakiem B16-F10 i przerzutami” obronionym na Uniwersytecie Śląskim w 2018 roku, a także promotorem pracy inżynierskiej Pani Kingi Tupty realizowanej na Politechnice Krakowskiej. Jestem opiekunem naukowym projektu PRELUDIUM Pani mgr Aliny Drzyzgi pt.: „Wpływ aktywacji białka STING na polaryzację neutrofili w mikrośrodku nowotworowym” finansowanego przez NCN (2019/35/N/NZ5/02506). Jestem również promotorem pomocniczym doktoratu Pani Joanny

Ciepłej w projekcie OPUS pt.: „Polimerosomy specyficznie uwalniające cGAMP i doksorubicynę w nowotworowych obszarach hipoksji jako nowe przeciwnowotworowe rozwiązanie terapeutyczne” finansowanego przez grant NCN (2020/39/B/NZ5/00745), którego jestem kierownikiem. Prowadziłem wykłady w ramach kursu hodowli komórkowej dla studentów Politechniki Śląskiej na wydziale Biotechnologii.

Osiągnięcia organizacyjne.

W ramach projektu Śląska BIOFARMA, realizowanego w ramach działania 2.1 Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka „Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Regionalnego, przygotowałem Pracownię badań mikroskopowych w Instytucie Onkologii w Gliwicach. Pracownia ta została wyposażona w dwa mikroskopy badawcze: wysokorozdzielczy mikroskop konfokalny oraz mikroskop semi-konfokalny z komorą do hodowli tkankowych, który umożliwia przyżyciowe obserwacje komórek. Dodatkowo utworzono w pełni wyposażoną pracownię hodowli tkankowych. W roku 2015 zorganizowałem razem z firmą Zeiss IX Ogólnopolskie Spotkanie Użytkowników Mikroskopów Konfokalnych oraz uczestniczyłem w XIII warsztatach dla użytkowników mikroskopów konfokalnych w 2019 roku. W 2019 roku odbyłem dwa szkolenia z mikroskopii wysokiej rozdzielczości w firmie Zeiss (Lattice SIM) i firmie Abberior (STED Microscopy) w Oberkochen i Getyndze w Niemczech.

Od roku 2015 do roku 2017 brałem udział w organizacji Banku Tkanek i Komórek w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej i Izolowanych Tkanek i Narządów Śląskiego Parku Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia w Zabrze. Pozwoliło mi to na zdobycie doświadczenia do pracy w laboratorium typu „Clean room”.

Inne osiągnięcia dotyczące aktywności naukowej.

W 2015 roku odbyłem szkolenie w ramach Narodowego Programu Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej w zakresie: „Kwalifikacja dawców i pobieranie tkanek – od dawców zmarłych”. Rok później szkolenie: „Wymagania higieniczne i normy pracy w pomieszczeniu czystym wg PN-EN ISO14644 i GMP”. Posiadam niezbędne uprawnienia do pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi po uzyskaniu certyfikatu dla osób planujących oraz wykonujących eksperymenty na zwierzętach laboratoryjnych wydane przez Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PolLASA. Brałem udział w szkoleniu z monitorowania żywotności tkanek, automatycznego liczenia kolonii oraz pracy w warunkach hipoksji. W 2017 roku przeszedłem również 3-dniowe szkolenie w zakresie obsługi cytometru przepływowego.

W ramach popularyzacji nauki regularnie organizuję spotkania dla młodzieży licealnej z Gliwic, Bytomia i Chorzowa, podczas których zapoznają uczniów z pracą naukowca.

Byłem recenzentem 7 prac w czasopismach takich jak: *Cancers, Pathobiology, Pharmaceuticals, Cells Tissues Organs, OncoTargets and Therapy, Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Od 2021 roku jestem członkiem rady redakcyjnej w czasopiśmie *Biomedicines*, które ma IF 6,081. W 2020 roku zostałem zaproszony przez Narodowe Centrum Nauki do

grona ekspertów oceniających projekty naukowe w 37 edycji konkursu PRELUDIUM w panelu NZ5.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Wyróżnienia i nagrody

2009 - III miejsce za najlepszą prezentację plakatową: "A combination of endoglin-based DNA vaccine and interleukin-12 gene enhances antiangiogenic and antitumor effects". Gliwice Scientific Meetings, 20-21 November.2009, Gliwice.

2009 - 7th Cardiac Scientific Session. ESCVS Young Cardiac Surgeon Prize. Zembala M., Wilczek P., Cichoń T., Smolarczyk R., Śliwka J., Sokal A., Szala S., Zembala M.: Human Cardiac Stem Cells are Present in Severely Damaged, Ischemic Myocardium. Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery. Suppl.1 Vol 8, 2009.

2010 – Nagroda Dyrektora Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie za najlepszy doktorat obroniony w 2009 roku.

2017 – I miejsce za najlepszą prezentację plakatową: "Combination of antivascular agent - DMXAA and inhibitor of HIF-1alpha - digoxin inhibited melanoma tumor growth" podczas XXI Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.

2018 – Pierwsza nagroda za najlepszą prezentację plakatową jako współautor pracy: "The elevated level of HSF1 directs human mammary epithelial cells towards mesenchymal phenotype" podczas XXII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.

2018 – III miejsce za najlepszą prezentację plakatową: "IL-12 secreted by modified MSC significantly reduces the volume of primary tumors and the number of lung metastases of murine melanoma" podczas XXII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.

Plany na przyszłość

W ramach kolejnych projektów badawczych finansowanych przez NCN planuję kontynuować badania związane z modulacją mikrośrodowiska nowotworowego w terapii nowotworów. Zamierzam prowadzić badania z użyciem nowego stymulatora układu odpornościowego związanego z aktywacją ścieżki białka STING. Aktywacja tego białka silnie stymuluje układ odpornościowy do niszczenia komórek nowotworowych poprzez aktywację limfocytów cytotoksycznych, komórek NK, neutrofili oraz polaryzację makrofagów ze wspierającego wzrost nowotworów fenotypu M2 do przeciwnowotworowego M1. Agonista tego białka, oligonukleotyd cGAMP lub brachyterapia, będzie kojarzony z lekami przeciwnaczyniowymi: kombretastatyną lub wcześniej przeze mnie badanym peptydem RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)₂. W ramach uzyskanego finansowania projektu NCN zbadana zostanie skuteczność terapeutyczna oraz udział komórek układu odpornościowego zaproponowanego leczenia. W ramach innego projektu we współpracy z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze planuję zaprojektować oraz uzyskać polimerosomy (nanonośniki polimerowe) swoiście dostarczające cGAMP w kombinacji z doksorubicyną do guza

nowotworowego. Ich swoistość będzie polegała na rozpadzie skonstruowanych polimerosomów w miejscach hipoksji w guzie. W przyszłości chciałbym również kontynuować prace związane z terapią komórkową z wykorzystaniem komórek NK w terapii nowotworów. Przedstawione przeze mnie wyniki wskazują, że ta populacja komórek bierze znaczący udział w uzyskiwanym efekcie niszczenia guzów przy zastosowaniu terapii kombinowanej.

Dorobek naukowy wg. danych bibliometrycznych.

Jestem autorem lub współautorem **42 publikacji** oraz **106 doniesień zjazdowych** (doniesienia ustne i plakatowe). **Sumaryczny Impact Factor** moich prac wynosi **136,182**. **Liczba cytowań bez autocytowań** według bazy Web of Science (WoS) z dnia 29.09.2021 wynosi **513** przy **całkowitej liczbie cytowań** wynoszącej **612**, a według bazy Scopus: **634** (bez autocytowań **530**). **Liczba punktów MNiSW** moich prac wynosi **1997**. **Indeks Hirscha** według bazy Web of Science (WoS) z dnia 29.09.2021 wynosi **14** (**14** wg. bazy Scopus).

Susłowicz