Załącznik 3

Autoreferat

Dr Patrycja NOWAK-ŚLIWIŃSKA

Ecole Polytechnique Federal de Lausanne (EPFL)
Swiss Federal Institute of Technology
Lozanna, Szwajcaria
2014

Spis treści

1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych……..…..3
2. Posiadane stopnie naukowe……...3
3. Ogólny opis osiągnięć, stopni naukowych oraz dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych……..3
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego…….…..7
4.1. Publikacje wchodzące w skład osiągniecia naukowego……...7
4.2. Opis celów naukowych wyżej wymienionych prac oraz osiągniętych wyników…....8
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych nie zawartych w osiągnieciu naukowym...19
5.1. Publikacje naukowe znajdujące się w bazie *Journal Citation Report (JCR)* inne niż zawarte w 4.1……..19
5.2. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe…….26
5.3. Wynalazki……...26
5.4. Monografie oraz inne publikacje nie zawarte w bazie *Journal Citation Report (JCR)*……...26
5.5. Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych…….. 27
5.6. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach……..... 27
5.7. Nagrody krajowe i międzynarodowe…….28
5.8. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i narodowych konferencjach tematycznych……...29
5.8.1. Wykłady wygłoszone na zaproszenie organizatorów……....29
5.8.2. Sesyjne wykłady konferencyjne……..30
6. Piśmiennictwo……..30
7. Plany na przyszłość……...32

1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

2013 grudz.- obecnie	Kierownik projektu, Instytut Nauk Chemicznych i Inżynierii, Politechnika Federalna w Lozannie (Ecole Polytechnique Federal de Lausanne, EPFL), Lozanna, Szwajcaria (Prof. P.J. Dyson).
2011 maj-2013 list.	Kierownik projektu (responsable de recherche), Szpital Uniwersytecki w Lozannie (CHUV) Lozanna, Szwajcaria (Prof. P. Jichlinski).
2010 maj-2011 maj	Doktor (senior scientist) w Laboratorium Angiogenezy (Angiogenesis Laboratory), Katedra Onkologii Medycznej (Wydzial Onkologii Medycznej), Centrum Medyczne VU (VU Medical Center), Amsterdam, Holandia.
2007 luty-2010 maj	Doktor (post-doctoral scientist) w Grupie Fotoniki Medycznej (Medical Photonics Group, prof. dr. H. van den Bergh), Politechnika Federalna w Lozannie (Ecole Polytechnique Federal de Lausanne, EPFL), Lozanna, Szwajcaria, projekt zatytułowany: *Development of non-invasive oxygen measurements.*

2. Posiadane stopnie naukowe

2009 luty-2010czerw.	Podyplomowe studia w zarządzaniu biotechnologii, technologii medycznej oraz projektach farmaceutycznych (*Advanced Studies in Management (CAS) of Biotech, Medtech & Pharma Ventures*), Uniwersytet w Lozannie (UNIL) i Politechnika Federalna w Lozannie (Ecole Polytechnique Federal de Lausanne, EPFL), Lozanna, Szwajcaria.
2001 wrzes.-2006 list.	Studia doktoranckie oraz dyplom doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, praca zatytułowana: *Selected porphyrin and cyanine photosensitizers in PDT of melanoma malignum and novel optical sensors for tissular pO_2 measurement*. Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca została napisana w języku angielskim za względu na obecność współpromotorstwo z dr G. Wagnieres z Politechniki Federalnej w Lozannie.
1996 wrzes.-2001 czer.	Studia magisterskie oraz dyplom magistra chemii w zakresie chemii biologicznej, praca zatytułowana: *Zieleń indocyjaninowa jako obiecujący fotouczulacz w terapii fotodynamicznej czerniaka złośliwego.* Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego (Prof. dr Grażyna Stochel).

3. Ogólny opis osiągnięć, stopni naukowych oraz dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

Przed uzyskaniem tytułu doktora.

W latach 1996-2001 studiowałam Chemię Biologiczną na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Studia magisterskie zostały zakończone w czerwcu 2001 roku pracą zatytułowaną *Zieleń indocyjaninowa jako potencjalny fotouczulacz w terapii fotodynamicznej czerniaka* wykonaną pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Grażyny Stochel. Praca ta została przeprowadzona we współpracy z Zakładem Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Krystyny Urbańskiej. W ramach tego projektu pracowałam nad oceną poziomu uczulenia komórek przez zieleń indocyjaninową, znanego środka kontrastowego, klinicznie stosowanego do wizualizacji

naczyniówki w diagnostyce różnych chorób oczu. Zafascynowana tym tematem, postanowiłam kontynuować moją pracę naukową w dziedzinie terapii fotodynamicznej. W tym samym roku dołączyłam do programu studiów doktoranckich na Uniwersytecie Jagiellońskim, ponownie w zespołach Pani prof. dr hab. Grażyny Stochel i Pani prof. dr hab. Krystyny Urbańskej.

Czerniak złośliwy *(melanoma malignum)* to nowotwór rozwijający się z melanocytów, dendrytycznych komórek barwnikowych produkujących melaninę. We wczesnym stadium rozwoju czerniaka możliwa jest skuteczna interwencja chirurgiczna polegająca na wycięciu znamienia z marginesem zdrowej tkanki. Często jednak umiejscowienie znamienia nie pozwala na tak radykalne postępowanie. Dlatego tak dużą uwagę skupiono na terapii fotodynamicznej (*ang. photodynamic therapy, PDT*), której założeniem jest selektywne, nieinwazyjne niszczenie zmian nowotworowych wraz z podścieliskiem guza przy zachowaniu zdrowych tkanek, oraz bez niebezpieczeństwa rozsiewu komórek nowotworowych do krwioobiegu.

PDT polega na ogólnoustrojowym podaniu pacjentowi barwnika (fotouczulacza), który po wzbudzeniu promieniowaniem elektromagnetycznym o odpowiedniej długości fali, powoduje generowanie czynników toksycznych dla komórek nowotworowych. Istotną zaletą tej metody jest możliwość selektywnego naświetlania tkanek zmienionych nowotworowo, bez uszkodzenia tkanek zdrowych. Obecne badania mają przede wszystkim na celu poszukiwanie skutecznych fotouczulaczy dla poszczególnych nowotworów. W przypadku czerniaków są to uczulacze absorbujące światło w zakresie tzw. okna optycznego, gdzie nie absorbuje już melanina.

Działanie terapii fotodynamicznej ściśle związane jest z obecnością tlenu w tkance, dlatego też istotne jest nie tylko znalezienie nowych fotouczulaczy, ale również sensorów optycznych informujących o ciśnieniu parcjalnym tlenu w guzie nowotworowym i jego sąsiedztwie.

Równoczesne badanie tych dwóch zagadnień było tematem mojej pracy doktorskiej. Jednym z głównych celów pracy była ocena skuteczności fotodynamicznego działania dwóch uczulaczy: Merocjaniny 540 (*ang. merocyanine 540*) i wizudyny (*ang. Visudyne*) w stosunku do komórek czerniaka oraz porównanie jej ze skutecznością Fotofrinu (*ang. Photofrin II*). Wybór fotouczulaczy podyktowany został ich mechanizmem działania: typ I - Merocjanina 540, typ II - wizudyna.

Badania cytotoksyczności w ciemności oraz efektu fotodynamicznego przeprowadzono na słabo upigmentowanych komórkach mysiego czerniaka złośliwego (*ang. Cloudman melanoma, S91*). Dla każdego z testowanych związków wyznaczono stężenia subletalne, a następnie ustalono ich fotocytotoksyczność w zależności od dawki oraz gęstości mocy użytego promieniowania. Jako źródło światła zastosowano lampę halogenową emitującą promieniowanie w zakresie 500-700 nm. Każda seria badań nad efektem fotodynamicznym została poprzedzona pomiarem dozymetrycznym. Najskuteczniejszym fotouczulaczem okazała się wizudyna, która w wyniku efektu fotodynamicznego (*and. photodynamic effect, PDE*) spowodowała redukcję przeżywalności komórek czerniaka o 99,7%, podczas gdy w przypadku fotofrinu frakcja przeżywająca zmniejszyła się o 91%, a dla Merocyjaniny 540 o 16% dla takiej samej dawki światła.

W celu sprawdzenia mechanizmu PDE dla komórek czerniaka S91 wyznaczono czasy życia stanu trypletowego użytych fotosensybilizatorów oraz wydajności kwantowe tworzenia tlenu singletowego. Przy pomocy laserowej fotolizy błyskowej zarejestrowano widma przejściowe tryplet-tryplet oraz zbadano kinetykę zaniku stanu trypletowego w metanolu. Dla Merocyjaniny 540 czasy życia stanu trypletowego nie były rejestrowalne przy zastosowaniu dostępnej aparatury. Czasy życia stanu trypletowego dla wizudyny oraz fotofrinu w roztworach natlenowanych były znacząco krótsze w porównaniu do warunków beztlenowych.

Wydajności kwantowe tworzenia tlenu singletowego badano metodą bezpośrednią w deuterowanym metanolu. Dla Merocyjaniny 540 wydajność tworzenia singletowego tlenu molekularnego okazała się być zbyt niska, by możliwa była detekcja przy pomocy dostępnej aparatury. Dla wizudyny wartość ta wynosiła 0,77, a dla fotofrinu 0,35, a zatem biorąc pod uwagę wyniki testów biologicznych *in vitro*, wskazuje to na bardzo istotny udział tlenu singletowego w uszkodzeniach słabo upigmentowanych komórek czerniaka S91 (mechanizm typu II). Wysoka wartość wydajność tworzenia tlenu singletowego obserwowana dla wizudyny pozwala na zastosowanie małych dawek tego leku (2 μg/ml) w celu uzyskania zadowalającego efektu fotodynamicznego. Wyniki te zostały opublikowane kolejno w **P9** i **P10**.

Badania *in vivo* przeprowadzone dla upigmentowanego czerniaka chomiczego (*ang. Bomirski hamster melanoma, BHM Ma*) pokazały, że PDT z udziałem wizudyny (0,12 mg/kg) jako fotouczulacza oraz laserowego źródła światła (689 nm; dioda AlGaInP; 99 J/cm^2) może zwalniać tempo wzrostu tego nowotworu prawie 3-krotnie w porównaniu do guza nieleczonego, a zatem może być stosowana jako metoda uzupełniająca leczenie z wykorzystaniem radioterapii lub chemioterapii.

Podczas studiów doktoranckich urodziłam moje pierwsze dziecko i przeprowadziłam się wraz rodziną do Szwajcarii. W celu kontynuowania studiów doktoranckich, dołączyłam do grupy badawczej zainteresowanej tematem mojej pracy doktorskiej, Grupy Fotoniki Medycznej (*ang. Medical Photonics Group*) na Politechnice Federalnej w Lozannie (Ecole Polytechnique Federal de Lausanne, EPFL) kierowanej przez Prof. Huberta van den Bergha.

Przeprowadzona tam część pracy doktorskiej dotyczyła poszukiwania nowych sensorów optycznych tlenu wbudowanych w nanocząsteczki. Sensory te potencjalnie mogą być zastosowane w nieinwazyjnych badaniach wewnątrztkankowego parcjalnego ciśnienia tlenu (*ang. partial pressure of oxygen, pO_2*) poprzez pomiar wygaszania ich fosforescencji (zależność Sterna-Volmera).

Wbudowanie luminoforu do odpowiednich nanocząsteczek (o wysokiej przepuszczalności tlenu, odpowiednim rozmiarze i ładunku), może prowadzić do optymalnej biodystrybucji sensora oraz zapobiec powstaniu efektów fototoksycznych oraz efektów ubocznych związanych z niepożądanym wyciekaniem luminoforu z naczyń krwionośnych.

Pośród wielu testowanych barwników, palladowe pochodne porfiryny okazały się wygodnym narzędziem do pomiaru pO_2, z uwagi na ich wysokie współczynniki ekstynkcji w części widzialnej widma oraz relatywnie długi czas życia fosforescencji. Testowano dwie pochodne palladowe porfiryny: Oxyfor R0 [Pd-meso-tetra(4-ckarboksyfenyl)-porfiryna] oraz Oxyfor R2 [dendrymer Pd-meso-tetra(4-carboksyfenyl) porfiryny]. Właściwości spektroskopowe tych pochodnych silnie zależą od rozpuszczalnika, pH oraz obecności tlenu w otoczeniu. Wbudowanie powyższych luminoforów w nanocząsteczki spowodowało przesunięcie hipsochromowe w widmie absorpcji (w porównaniu do wolnej formy luminoforów) oraz zmianę stosunku intensywności fluorescencji do fosforescencji.

W celu znalezienia odpowiednich nanowektorów przetestowałam wiele modyfikacji nanocząsteczek (z wbudowanym luminoforem lub bez) będących pochodnymi polisacharydów, PDMS-PDMOXA-PDMS ((poly(dimethylsiloxane) - poly(2-methyloxazoline) - poly(dimethylsiloxane)) oraz nanocząsteczki silikonowe. Nanowektory te składaly się z potencjalnie biokompatybilnych składników i są obecnie testowane przez różne grupy badawcze w systemach uwalniania leków oraz w inżynierii tkankowej.

Nanocząsteczki z wbudowanymi Oxyforami zostały scharakteryzowane w warunkach laboratoryjnych pod kątem ich stabilności i fotostabilności, właściwości spektroskopowych oraz zależności czasu życia fosforescencji od stężenia tlenu (pomiary pO_2). Zmierzony czas życia fosforescencji wolnych form Oxyforów silnie zależał od stężenia tlenu. Po wbudowaniu Oxyforów do nanowektorów, we wszystkich testowanych środowiskach zawierających różną ilość tlenu (0%, 5%, 10%, 15%, 25%) zmierzono czasy życia fosforescencji, które były dłuższe

niż w przypadku wolnych Oxyforów. Zatem w wyniku wbudowania Oxyforów do nanocząsteczek ich wrażliwość na obecność tlenu zmalała 4-13 krotnie (w zależności od rodzaju nanowektora).

W badaniach *in vivo* prowadzonych w warunkach niskiego poziomu tlenu z zastosowaniem specjalnie zaprojektowanej komory, udało się uzyskać wystarczające wzmocnienie sygnału luminescencji do pomiarów z zastosowaniem rozdzielczej w czasie spektroskopii luminescencyjnej. Wynik ten potwierdza tezę, iż nanocząsteczki zawierające wrażliwe na poziom tlenu sensory fosforescencyjne mogą być podawane dożylnie i stosowane jako sensory miejscowe. Projekt ten został przeprowadzony we współpracy z Uniwersytetem w Bazylei, a uzyskane wyniki zostały opublikowane w **P13 i P14**.

Pięć miesięcy po narodzinach drugiego dziecka, obroniłam pracę doktorską na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (listopad 2006 r.) zatytułowaną *Wybrane fotouczulacze porfirynowe i cyjaninowe w terapii fotodynamicznej czerniaka złośliwego oraz nowe sensory optyczne do pomiaru ciśnienia parcjalnego tlenu w tkance* (*Selected porphyrin and cyanine photosensitizers in PDT of melanoma malignum and novel optical sensors for tissular pO_2 measurement)*.

Po uzyskaniu stopnia doktora.

W 2007 roku rozpoczęłam pracę na Politechnice Federalnej w Lozannie, gdzie wraz z partnerem przemysłowym (Congenia Srl, Mediolan, Włochy), pracowałam nad nowymi związkami będącymi inhibitorami angiogenezy. Po dwóch latach pracy nad tym projektem, z niewielkimi możliwościami publikowania nowych wyników (**P18**) przed opublikowaniem patentu (patent **X1**, rozdział 5.2) postanowiłam podążać ścieżką naukową i skupić moje zainteresowania na terapiach skojarzonych leczenia nowotworów.

Pierwszym etapem mojej pracy było przystosowanie odpowiedniego modelu zwierzęcego do wcześniej wymienionych badań, tj. błony kosmówkowo-omoczniowej embrionu kurczaka (*ang. chorioallantoic membrane of the chicken embryo, CAM*). Model ten okazał się przydatny w wielu projektach. Odnotowałam również duże zainteresowanie tym modelem ze strony innych grup badawczych, zarówno krajowych (szwajcarskich) jak i zagranicznych, co przełożyło się na przeprowadzenie wielu wspólnych projektów.

W międzyczasie rozpoczęłam trwająca do dziś współpracę z Laboratorium Angiogenezy kierowanym przez prof. Arjana W. Griffioena (Centrum Medyczne VU, Amsterdam, Holandia). Odbyłam tam również roczny staż naukowy. Ta współpraca wprowadziła mnie do świata angiogenezy i umożliwiła powstanie wielu publikacji naukowych (np. **P19**), patentu **X2** (rozdział 5.2) oraz licznych wykładów i posterów konferencyjnych (rozdział 5.8).

Ukończyłam również podyplomowe studia: Zarządzaniu w Biotechnologii, Technologii Medycznej oraz Przedsięwzięciach Farmaceutycznych (*Advanced Studies in Management (CAS) of Biotech, Medtech & Pharma Ventures*). Studia te dały mi możliwość rozwijania moich umiejętności zarządzania zarówno projektami, jak i zasobami ludzkimi. Uzyskałam również dyplom umożliwiający wykonywanie doświadczeń na zwierzętach zgodnie z prawem szwajcarskim (2011), a następnie dyplom kierowania i zarządzania takimi projektami (2012).

Od 2011 roku współpracuję z profesorem Hubertem van den Berghiem nad rozwojem nowych terapii skojarzonych z udziałem PDT oraz selektywnych inhibitorów angiogenezy w leczeniu chorób nowotworowych oraz chorób oczu opartych na patologicznej neowaskularyzacji.

W 2011 roku dołączyłam do grupy badawczej na Wydziale Urologii Szpitala Uniwersyteckiego (CHUV) w Lozannie (prof. Patrice Jichlinski). Jako kierownik projektu (responsable de recherche) pracowałam nad optymalizacją terapii skojarzonych w leczeniu nowotworów urologicznych. Badania te były wykonywane we współpracy z kilkoma

międzynarodowymi grupami badawczymi, a ja pełniłam funkcję koordynatora (Załącznik 3, rozdział 6). Prace nad tym projektem kontynuuję do dzisiaj.

W grudniu 2013 roku, zostałam zaproszona do kontynuacji mojej pracy w zespole prof. Paula J. Dysona w Laboratorium Chemii Metaloorganicznej i Medycznej w Instytucie Nauk i Inżynierii Chemicznej, EPFL. Jako kierownik projektów (*project leader*) jestem odpowiedzialna za projektowanie i nadzorowanie badań *in vitro* oraz *in vivo* nad nowymi związkami metaloorganicznymi opartymi na bazie rutenu, o właściwościach przeciwnowotworowych lub anty-angiogennych (**P28**). W grudniu 2013 zostałam nagrodzona prestiżowym stypendium na rzecz rozwoju kariery ufundowanym przez Unię Europejską (Marie Curie Intra-European Fellowships For Career Development, FP7-PEOPLE - 2013 – IEF). Zamierzeniem tego projektu jest znalezienie nowych potencjalnych celów biologicznych w śródbłonku guzów nowotworowych.

Podsumowując, mój obecny dorobek naukowy zawiera 28 publikacji, w tym 23 artykuły oryginalne, 4 artykuły przeglądowe, 1 monografię, 2 międzynarodowe patenty, 2 rozdziały książek oraz liczne abstrakty konferencyjne (Załącznik 5).

Należy nadmienić, iż w latach 2004 i 2006 miałam dwie sześciomiesięczne przerwy w pracy naukowej związane z narodzinami dwójki moich dzieci.

Zbiorczy *impact factor* moichpublikacji naukowych zawartych **w mojej realizacji naukowej** według *Journal Citation Reports (JCR)* wynosi **45.56** (luty 2014). Całkowita ilość punktów MNiSW w osiągnieciu naukowym wynosi **320**. W następnych rozdziałach niniejszego podsumowania wymieniam publikacje, które są przedmiotem tego osiągnięcia naukowego oraz te, które nie są wliczone w realizacji naukowej, ale będące ważnym elementem mojego ogólnego rozwoju naukowego.

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego

Do opisu mojego osiągniecia naukowego wybrałam cykl sześciu prac oryginalnych oraz dwóch prac przeglądowych opublikowanych w latach 2010-2014. Prace te przedstawione są pod wspólnym tytułem:

Celowane terapie naczyniowe w schorzeniach z zaburzeniami neowaskularyzacji (Vascular targeted therapies for neovascularization-based disorders)

We wszystkich tych publikacjach jestem pierwszym lub ostatnim autorem. Mój udział eksperymentalny i intelektualny znajduje się pod opisem każdej publikacji, a oświadczenia wszystkich współautorów zamieszczone są w Załączniku 7.

4.1. Publikacje wchodzące w skład osiągniecia naukowego

Artykuły oryginalne

P1. Nowak-Sliwinska P*, Ballini JP, Wagnières G, van den Bergh H (2010), Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model, *Microvascular Research*, 79: 21-28.

MNiSW = 30

IF_{2010}: **2.39**

*autor korespondencyjny

P2. Nowak-Sliwinska P*, van Beijnum JR, van Berkel M, van den Bergh H, Griffioen AW, (2010), Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane; *Angiogenesis,* 13(4): 281-292.

MNiSW = 40

IF $_{2010}$ = **6.188**

* autor korespondencyjny

P3. Nowak-Sliwinska P*, van Beijnum JR, Casini A, Nazarov A, Wagnières G, van den Bergh H, Dyson PJ, Griffioen AW (2011), Organometallic ruthenium (II) compounds with anti-angiogenesis activity*, Journal of Medicinal Chemistry*, 54(11): 3895-3902.

MNiSW = 45

IF $_{2011}$ = **4.802**

* autor korespondencyjny

P4. Nowak-Sliwinska P*, Weiss A, van Beijnum JR, Wong T, Lovisa B, Ballini JP, van den Bergh H, Griffioen AW (2012), Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion, *Journal of Cellular and Molecular Med*icine, 16(7):1553-1562*.*

MNiSW = 35

IF $_{2012}$ = **4.125**

* autor korespondencyjny

P5. Kilarski WW, Muchowicz A, Wachowska M, Mężyk-Kopeć R, Golab J, Swartz MA, **Nowak-Sliwinska P*** (2013), Optimization and regeneration kinetics of lymphatic-specific photodynamic therapy in the mouse dermis, *Angiogenesis,* DOI:10.1007/s10456-013-9365-6.

MNiSW = 40

IF $_{2013}$ = **3.972**

* autor korespondencyjny

P6. Weiss A, van Beijnum JR, Bonvin D, Jichlinski P, Dyson PJ, Griffioen AW, **Nowak-Sliwinska P* (**2014**),** Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: lack of vascular normalization, *Journal of Cellular and Molecular Med*icine, DOI 10.1111/jcmm.12199, 18(3):480-491.

MNiSW = 35

IF $_{2013}$ = **4.753**

* autor korespondencyjny

Artykuły przeglądowe

P7. Weiss A, van den Bergh H, Griffioen AW, **Nowak-Sliwinska P*** (2012), Angiogenesis inhibition for improvement of photodynamic therapy; the revival of a promising idea, *Biophysica and Biochimica Acta; Reviews on Cancer,* 1826(1):53-70.

MNiSW = 45

IF $_{2013}$ = **9.93**

* autor korespondencyjny

P8. Nowak-Sliwinska P*, van den Bergh H, Sickenberg M, Koh AHC (2013), Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy, *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 182-199*.*

MNiSW = 50

IF $_{2013}$ = **9.44**

* autor korespondencyjny

4.2. Opis celów naukowych wyżej wymienionych prac oraz osiągniętych wyników.

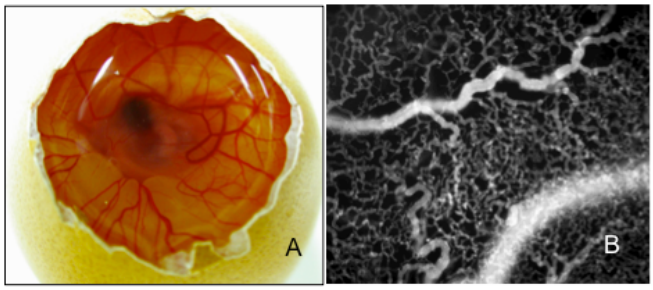
Moją samodzielną karierę naukową rozpoczęłam od opracowania modelu zwierzęcego odpowiedniego do badania reakcji naczyniowych. Model ten, błona kosmówkowo-omoczniowa zarodka kurzego (*ang. chorioallantoic membrane of a chicken embryo, CAM, rycina 1*), w formie, którą opracowałam, jest obecnie używany przez wiele grup badawczych w doświadczeniach biologii naczyniowej/angiogenezy. Wprowadzony przeze mnie nowy element w tym modelu dotyczy:

(i) metody obrazowania metodą angiografii fluorescencyjnej z udziałem czynników zwiększania kontrastu. Zwiększenie kontrastu umożliwiło opracowanie opartego na otrzymanych zdjęciach angiograficznych

(ii) zautomatyzowanego oprogramowania do kwantyfikacji unaczynienia błony. Program ten (shareware), ogólnodostępny dla społeczności naukowej, jest obecnie wykorzystywany do opisu morfologii oraz obliczeń ilości naczyń mikrokrążenia.

Szczegółowy opis tej metody obrazowania i nowego oprogramowania jest przedmiotem publikacji **P1**:

➔ **P1. Nowak-Sliwinska P***, Ballini JP, Wagnières G, van den Bergh H (2010), Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model, *Microvascular Research*, 79: 21-28.



Rycina 1. Unaczynienie błony kosmówkowo-omoczniowej zapłodnionego jaja. A) obraz całej błony. B) Angiografia fluorescencyjna wykonana przy użyciu mikroskopu epi-fluorescencyjnego w (λ> 520 nm) wyposażonego w cyfrowa kamerę CCD (naczynia wizualizowane po dożylnym podaniu FITC-dekstranu, wzbudzenie przy 470 nm oraz czynnika kontrastowego podanego do przestrzeni poza-embrionalnej (*ang. extraembryonic cavity*)).

W literaturze opisane są różne metody obliczania ilości naczyń krwionośnych oraz ich morfologii w układach modelowych oparte na ocenie wizualnej lub na parametrach matematycznych (1-3). Metody matematyczne są zwykle oparte na deskryptorach (*ang. descriptors*), takich jak gęstość naczyń (1, 4), rozgałęzienia naczyń/mm^2 (5) długość naczyń (6) lub gęstość punktów końcowych/mm^2 (7). Często metody te mogą być stosowane tylko poza organizmem (*ex vivo*) w celu uzyskania pożądanego kontrastu fotograficznego (8, 9) i nie dają możliwości opisu sieci kapilarnej (10).

Metodę analizy obrazu przeprowadzono na podstawie angiografii fluorescencyjnych, pobranych w trakcie wzrostu błony CAM w warunkach fizjologicznych (*in ovo*). Metoda, którą opisałam w **P1**, opracowana została z użyciem pakietu oprogramowania ImageJ. Ta zautomatyzowana aplikacja służy do detekcji form liniowych w trójwymiarowych obrazach medycznych i zapisuje w powtarzalny sposób sekwencję operacji prowadzących do segmentacji obrazów fluorescencyjnych oraz ekstrakcji reprezentującej szkielet sieci mikrokrążenia. Zastosowano różne filtry, takie jak korektę cieniowania "a posteriori", filtr Gaussa „*despeckle"*, filtr szybkiej transformacji Fouriera lub filtr szerokopasmowy. Analiza przeprowadzona była równolegle w dwóch fazach, których wyniki zostały następnie nałożone na siebie: identyfikacja głównych (i) naczyń krwionośnych, położonych w dolnej części błony oraz (ii) sieci kapilarnej, położonej na powierzchni błony CAM.

W wyniku tych operacji otrzymałam reprezentację wszystkich połączeń między większymi naczyniami i kapilarami, jak również między samymi kapilarami, przekształconymi w formy liniowe z użyciem binarnego algorytmu do ekstrakcji szkieletu (*ang. morphology binary connectivity*). Szkielet ten reprezentuje liczbę połączonych w szkielet (*ang. skeleton*) pikseli tworzących formy liniowe. Uzyskane formy liniowe wyraźnie pokazują ewolucję w czasie rozwoju embrionalnego zarówno większych naczyń, jak i splotu naczyń włosowatych. W ocenie uzyskanych form liniowych zostały wzięte pod uwagę bifurkacje (≥ 3 sąsiadów)

reprezentujące równoważne (kapilara-kapilara) oraz nierównoważne (naczynie krwionośne-kapilara) połączenia. W celu szczegółowego opisu splotu kapilarnego wybrane zostały deskryptory opisujące kształt i rozmiar stref awaskularnych, miedzy innymi ilość punktów rozgałęzień na powierzchni 1 mm^2. W celu potwierdzenia skuteczności nowej metody porównałam wyniki używając arbitralnej skali. Skala ta klasyfikuje morfologię naczyń w przedziale od „0" (fizjologiczna gęstość naczyń włosowatych) do poziomu „5" (masywne strefy awaskularne obecne pomiędzy dużymi naczyniami). Otrzymałam doskonała korelację pomiędzy obiema metodami.

W tych badaniach opisałam liczbowo gęstość naczyń krwionośnych w czasie naturalnego rozwoju zarodka (*ang. embryo development day, EDD*) pomiędzy dniem 7 a 11, a także po miejscowym podaniu inhibitora angiogenezy, bewacizumabu (*ang. bevacizumab)* podanego w EDD 7 i 8. Wyniki analizowałam za pomocą wyżej wymienionej metody, na podstawie angiografii fluoresceinowych wykonanych w dużym powiększeniu.
Zaobserwowałam największy wzrost ilości punktów rozgałęzień/mm^2 pomiędzy EDD 7 i 9 fizjologicznego rozwoju błony CAM. Bewacizumab podawany w tych samych ramach czasowych rozwoju błony CAM indukował wyraźne zmiany w gęstości naczyń włosowatych, jak zmierzono za pomocą zmniejszonej liczby punktów rozgałęzień/mm^2 (1532 ± 141) w stosunku do grupy kontrolnej (0,9% NaCl) (2313 ± 129).

Podsumowując, opracowałam zautomatyzowane narzędzie kwantyfikacji form liniowych na podstawie programu ImageJ do oceny systemu naczyniowego. Program ten, udostępniony publicznie dla środowiska naukowego, jako jedyny umożliwia opis sieci drobnych naczyń krwionośnych oraz naczyń włosowatych. Wielokrotnie byłam zapraszana do przeprowadzenia warsztatów lub prezentacji (np. w Bostonie, Amsterdamie), w celu szkolenia kadry do prawidłowego posługiwania się tym narzędziem. W najbliższej przyszłości organizuję kolejne warsztaty w ramach 5-tego Międzynarodowego Zjazdu Angiogenicznego (*5th International Meeting on Angiogenesis*) w Amsterdamie, 12-14 marca 2014 (http://www.angiogenesis.nl/Amsterdam 2014/course.htm).

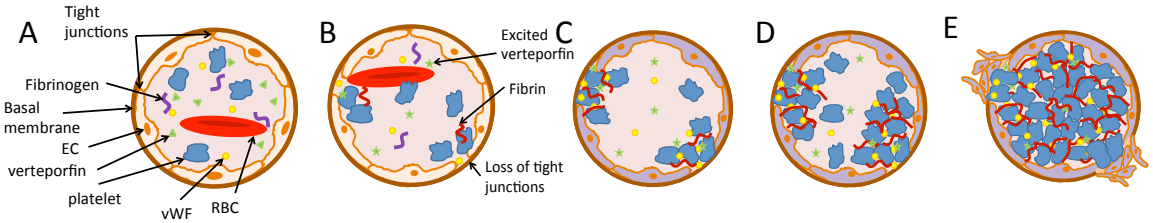
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- zaprojektowaniu koncepcji pracy
- przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedzinie
- przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych na wszystkich rycinach
- udziale w zaprojektowaniu aplikacji opartej na ImageJ, a także wyborze deskryptorów.
- interpretacji wyników badań, wykonaniu wszystkich rycin i tabel
- wykonaniu analizy statystycznej
- napisaniu wstępnej wersji całej pracy
- złożeniu manuskryptu do redakcji i korespondencji z redakcją.
Praca ta po recenzji została przyjęta do publikacji bez żadnych dodatkowych poprawek.
Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Kontynuujac moje zainteresowania terapią fotodynamiczną pracowałam nad opisem regeneracji wzrostu naczyń krwionośnych po zastosowaniu tej terapii.

➔ **P2. Nowak-Sliwinska P***, van Beijnum JR, van Berkel M, van den Bergh H, Griffioen AW, (2010), Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane, *Angiogenesis,* 13(4): 281-292.

Terapia fotodynamiczna (PDT) jest obecnie klinicznie stosowaną terapią w leczeniu chorób oczu o podłożu neowaskularnym, takich jak wysiękowe zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (*ang. age-related macular degeneration, AMD*) (11-13) lub poliploidalna waskulopatia naczyniówkowa (*ang. polypoidal choroidal vasculopathy, PCV*). W PDT

wykorzystuje się właściwości fotofizyczne cząstek pochłaniających światło, tak zwanych fotouczulaczy (*ang. photosensitizer, PS*), w celu selektywnego niszczenia tkanki. Jest niskoinwazyjną metodą leczenia, która może w sposób selektywny zniszczyć celowaną tkankę, oszczędzając przyległą tkankę zdrową. Metoda ta polega na aktywacji miejscowo podanego fotouczulacza za pomocą światła o odpowiedniej długości fali, w celu wytworzenia cytotoksycznych reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species, ROS).* Związki te miejscowo indukują uszkodzenie na poziomie komórkowym i/lub naczyniowym, jak również są źródłem odpowiedzi immunologicznej oraz wywołania reakcji angiogennej. Terapia fotodynamiczna celowana w unaczynienie krwionośne prowadzi do uszkodzenia cytoszkieletu śródbłonka i kurczenia komórek śródbłonka (*ang. endothelial cells, ECs*) powodując zwiększenie przestrzeni pomiędzy tymi komórkami. To z kolei powoduje uwrażliwienie błony naczyniowej i uwalnianie czynnika von Willebranda (*ang. von Willebrand factor, vWF*), a w konsekwencji aktywacji i agregacji płytek krwi, prowadząc w efekcie do zastoju przepływu krwi, jak schematycznie pokazano na rycinie 2 (14, 15). Z uwagi na fakt, iż terapia fotodynamiczna prowadzi do indukcji angiogenezy, logicznym krokiem w celu poprawy efektu terapeutycznego jest połączenie tej terapii z inhibitorami angiogenezy.



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie terapii fotodynamicznej prowadzącej do skurczu naczyń, zastoju przepływu krwi i powstawania zakrzepów. (A) Powiększenie normalnego naczynia krwionośnego naczyniówki. (B) Naczynia krwionośne, w których wizudyna pozostaje w postaci nieaktywnej z powodu braku oświetlenia. W normalnych warunkach komórki śródbłonka (EC) pozostają w ścisłym powiązaniu z błoną podstawną oraz są połączone ze sobą za pomocą tzw. ścisłych połączeń (*ang. tight junctions)*. (C) Ekspozycja naczyń na światło o odpowiedniej długości fali aktywuje fotouczulacz, wizudynę, inicjując naprężenia pomiędzy komórkami śródbłonka i różne odpowiedzi komórkowe, w tym oddzielenia komórek śródbłonka od błony podstawnej. Interakcja krwi z kolagenem oraz innymi czynnikami powoduje aktywację kaskady krzepnięcia, w tym aktywację płytek i uwalnianie czynnika von Willebranda (vWF). (D) Odpowiedzi komórkowe powodują zwężenie naczyń i stabilizację skrzepu krwi przez fibrynę, która jest wytwarzana z fibrynogenu jako część kaskady krzepnięcia. (E) Powstawanie skrzepów powoduje aktywację angiogenezy (*ang. angiogenic switch*) prowadzącej do aktywacji migracji i tworzenia komórek śródbłonka. Rycina zmodyfikowana na podstawie (16).

PDT z użyciem wizudyny jako fotouczulacza była pierwszą skuteczną metodą leczenia wysiękowego AMD stosowaną na szeroką skalę. Niestety metoda ta, choć hamuje rozrost niepożądanych naczyń krwionośnych naczyniówki, musi być powtarzana, z uwagi na odpowiedź angiogenną oraz odpowiedź immunologiczną.

W kolejnej pracy skupiłam się na opisaniu procesu rewaskularyzacji naczyń po zastosowaniu PDT. Opisany wcześniej model CAM jest doskonałym modelem zwierzęcym symulującym unaczynienie naczyniówki. Natychmiast po przeprowadzeniu terapii doszło do zatrzymania przepływu krwi. 24 godziny po PDT dochodzi do pobudzenia błony podstawnej, migracji i proliferacji komórek śródbłonka oraz wytworzenia rurkowatych struktur nowego naczynia, jak zaobserwowałam przy użyciu mikroskopii epi-fluorescencyjnej. Nowe naczynia powstają od krawędzi do centrum strefy PDT poprzez wykształcenie wyspecjalizowanych struktur śródbłonka (*ang. tip cell*) migrujących do środka traktowanego obszaru. 48 godzin po terapii odbudowane naczynia pokrywają równomiernie całą powierzchnię, która została

naświetlona podczas przez PDT. Naczynia te charakteryzują się funkcjonalną, ale zmienioną morfologicznie strukturą. Ponadto wykazałam, że niektóre z większych naczyń o średnicy około 100 μm, które zostały zamknięte w wyniku PDT, ulegają późniejszej reperfuzji przy użyciu istniejących kanałów (ang. *ghost vessels*). Fragmenty błony CAM traktowane przez PDT zostały poddane wybarwieniu immunohistochemicznemu z użyciem przeciwciał Ki-67 w celu oznaczenia proliferujących komórek śródbłonka w miejscu zastosowania PDT. Stwierdziłam dodatnią reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałami Ki-67 we fragmentach CAM reprezentujących poziom połączeń kapilarnych. Komórki śródbłonka wykazały wyraźną dodatnią reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałami dojrzewających naczyń krwionośnych, takich jak integryna $\alpha_V\beta_3$ (*ang. $\alpha_V\beta_3$ integrin*), wimentyny (*ang. vimentin*), galektyny-1 (*ang. galectin-1*) oraz stłumioną reakcję w przypadku cząsteczki adhezji międzykomórkowej (*ang. intercellular adhesion molecule, ICAM-1*). Ponadto, za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang. quantitative real time PCR*) potwierdziłam nadekspresję genów związanych z angiogenezą, takich jak VEGFR1, VEGFR2, neuropiliny 2 (*ang. neuropilin 2, NRP-2*), czy wimentyny.

Podsumowując, w pracy tej wykazałam, iż PDT w tym modelu indukuje angiogenezę w obecności, między innymi, czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego. We wcześniej opublikowanych pracach pokazywano reperfuzję naczyniową, a proliferacja *de novo* komórek śródbłonka była tylko hipotezą.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy
- przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny
- przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych w rycinach 1-7
- interpretacji wyników badań
- wykonaniu wszystkich rycin i tabel
- wykonaniu analizy statystycznej
- napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej
- złożeniu manuskryptu do wydawnictwa oraz korespondencji z redakcją.

Artykuł ten został wybrany do dostarczania rysunku na okładkę jednego z numerów *Angiogenesis*. Artykuł ten został wybrany do specjalnego elektronicznego wydania e-kampanii *Angiogenesis* w lipcu 2012 roku.
Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Pracowałam również nad charakterystyką innych potencjalnych inhibitorów angiogenezy. Przykładem takich związków są małocząsteczkowe związki metaloorganiczne na bazie rutenu (**P3**).

➔ **P3. Nowak-Sliwinska P***, van Beijnum JR, Casini A, Nazarov A, Wagnières G, van den Bergh H, Dyson PJ, Griffioen AW (2011), Organometallic ruthenium (II) compounds with anti-angiogenesis activity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(11): 3895-3902.

Przez wiele lat jednym z najważniejszych chemioterapeutyków była cis-platyna (17). Z uwagi na poważne skutki uboczne wywołane jej stosowaniem rozpoczęto intensywne badania nad poszukiwaniem nowych związków o lepszej selektywności działania, mniejszej ilości skutków ubocznych oraz braku oporności wobec pierwotnych i wtórnych guzów. Jednym z ciekawszych nieplatynowych połączeń są kompleksy rutenu(II/III) które oferują nowe perspektywy w leczeniu nowotworów, a szczególnie w leczeniu przerzutów (18, 19). Związki na bazie rutenu (Ru) wydają się ulegać procesowi „aktywacji przez redukcję", z Ru(III) do Ru(II), w środowisku nowotworowym z powodu obecnej tam hipoksji i niskiego pH (20).

Grupa badawcza Prof. Paul'a Dyson'a opracowała w 2004 roku serię organometalicznych połączeń rutenu(II) zawierających ligand PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan) o wzorze [Ru(areny)Cl_2PTA] (areny = bifenyl, dihydroantracen, tetrahydroantracen, p-cymen=p-metylo-izopropylobenzen), zwanych związkami RAPTA (21, 22). Przeprowadzone badania w warunkach *in vitro* wykazały, że wchodzą one w interakcję z białkami i DNA prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych, co czyni tę grupę atrakcyjną w świetle potencjalnego rozwoju jako leków przeciwnowotworowych.

Celem tego projektu było potwierdzenie hipotezy, że właściwości przeciwnowotworowe RAPTA oraz odpowiednich pochodnych DAPTA [Ru (η6 -p-cymen) Cl_2 (DAPTA)] (DAPTA = 3,7-diacetylo-1,3,7-triaza-5-fosfabicyklo[3.3.1]nonanu), przynajmniej częściowo oparte są na aktywności anty-angiogennej. **Warto zauważyć, że jest to pierwsze doniesienie anty-angiogennych właściwościach tej grupy związków.**

W moich doświadczeniach pokazałam, że kompleksy RAPTA i DAPTA mogą specyficznie hamować niektóre funkcje komórek śródbłonka, będące istotnym czynnikiem w rozwoju naczyń, tj. proliferację i migrację komórek śródbłonka czy tworzenie ścian naczyń (*ang. tube formation*) w warunkach *in vitro*. Wykazałam, że pochodna RAPTA-C ([Ru(η6-p-cymen)Cl_2(PTA)]) okazała się indukować apoptozę w komórkach śródbłonka z największa wydajnością (21%) w porównaniu do innych pochodnych RAPTA i DAPTA. Innym z testów potwierdzającym działanie anty-angiogenne testowanych kompleksów był pomiar wzrostu naczyń dojrzałej błony CAM po jej ekspozycji na terapię fotodynamiczną z użyciem wizudyny (jak opisane w **P2**) w połączeniu z późniejszym podaniem kompleksów rutenu. Wykazałam, że w tym modelu zarówno kompleks RAPTA-C jak i ich pochodna DAPTA-C były najbardziej obiecującymi związkami hamującymi angiogenezę. W oparciu o te wyniki wywnioskowałam, że związki posiadające właściwości nie tylko cytostatyczne, i jednocześnie anty-angiogenne, mogą być bardzo atrakcyjnymi kandydatami do dalszych badań w kierunku zastosowania klinicznego.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- *udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy*
- *przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny*
- *przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych w rysunkach 1-5 (hamowanie proliferacji i migracji komórek śródbłonka, hamowanie tworzenia ścian naczyń, hamowanie fizjologicznego wzrostu naczyń krwionośnych w modelu CAM, analiza obrazu oparta na angiografii fluorescencyjnej, terapia fotodynamiczna w połączeniu z testowanymi kompleksami)*
- *udziale w przeprowadzeniu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym*
- *interpretacji wyników badań*
- *wykonaniu wszystkich rycin i tabel*
- *wykonaniu analizy statystycznej*
- *napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej*
- *zaprojektowaniu graficznego abstraktu*
- *złożeniu manuskryptu do wydawnictwa oraz korespondencji z redakcją.*

Po publikacji tego artykułu otrzymałam nagrodę od American Chemical Society (ACS) za często cytowany artykuł w roku 2012. *Mój udział procentowy szacuję na 75%.*

Po wstępnym badaniu wpływu PDT na naczynia i dostarczaniu ostatecznego dowodu na to, że PDT bezpośrednio indukuje aktywację komórek śródbłonka prowadzącą do angiogenezy, postanowiłam dalej pracować nad optymalizacją skojarzonej terapii

fotodynamicznej i terapii anty-angiogennej (**P4**) w modelu zwierzęcym zwyrodnienia plamki wiązanej z wiekiem (AMD).

➔ **P4. Nowak-Sliwinska P***, Weiss A, van Beijnum JR, Wong T, Lovisa B, Ballini JP, van den Bergh H, Griffioen AW (2012), Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion, *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 16(7): 1553-1562.

Zwyrodnienie plamki wiązane z wiekiem (*ang. age-related macular degeneration, AMD*) jest chorobą centralnej części siatkówki, prowadzącą w stadiach zaawansowanych do upośledzenia widzenia. Pomimo intensywnych badań w wielu ośrodkach naukowych patogeneza tej choroby nadal pozostaje nieznana. Najnowsze metody leczenia, przede wszystkim terapia doszklistkowa anty-VEGF, pod warunkiem stałego kontunuowania i monitorowania leczenia, pozwalaja na spowolnienie lub zatrzymanie choroby, a u niektórych chorych na poprawę jakości widzenia. To ten czynnik został uznany za podstawowy w patologicznej angiogenezie w okolicy plamki i leżący u podłoża zmian i nowotwórstwa podplamkowego oraz tworzących się w wyniku dalszych zmian błon podsiatkówkowych (*ang. choroidal neovascularization, CNV*). Ciągle jednak nie nastąpił przełom w sposobie leczenia, który skutecznie zahamowałby rozprzestrzenianie się tego schorzenia. Jak wspomniałam w **P2**, PDT z użyciem wizudyny (*ang. Visudyne*®) jako fotouczulacza była pierwszą skuteczną metodą leczenia wysiękowej postaci AMD stosowaną na szeroką skalę. Niestety metoda ta, choć hamuje rozrost niepożądanych naczyń krwionośnych naczyniówki, często obarczona jest późniejszymi wznowami tworzenia patologicznych naczyń. Stosowane obecnie klinicznie połączenie PDT z lekami anty-VEGF daje lepsze efekty terapeutyczne niż każda z tych terapii stosowana odrębnie, nie prowadząc jednak do całkowitego wyleczenia. **Co więcej, długo terminowe i powtarzalne stosowanie** doszklistkowego anty-VEGF (bewacizumabu lub ranibizumabu) prowadzi o reakcji immunologicznych oraz uodpornienia.

Moja kolejna praca miała na celu polepszenie wydajności terapii fotodynamicznej przez jej skojarzenie z inhibitorami kinazy tyrozynowej (*ang. tyrosine kinase inhibitors, TKIs*), Zablokowanie aktywności zewnętrznych receptorów VEGF lub innych czynników wzrostu, jak EGFR, przez małocząsteczkowe TKIs, które mogłyby być aplikowane w formie kropli, powinno skutkować ograniczeniem lub zablokowaniem patologicznej angiogenezy oraz mniejszych skutków ubocznych niż przy częstym stosowaniu doszklistkowego anty-VEGF.

Wyniki działania tych leków, tj. sunitynibu/Sutentu®, erlotynibu/Tarcevy® i sorafenibu/Nexavaru® stosowanych indywidualnie lub w połączeniu z terapią fotodynamiczną na wzrost i morfologię naczyń waskularnych porównałam z wynikami terapii fotodynamicznej oraz z kombinacją terapii fotodynamicznej z bewacizumabem. W badaniach tych wykorzystałam opisany wcześniej model CAM. PDT z zastosowaniem wizudyny jako fotouczulacza, powodowała natychmiastowe zamknięcie naczyń krwionośnych w leczonym obszarze. Podobnie jak wykazałam w **P2**, 24 godziny po zastosowaniu terapii obserwowałam wzrost nowego unaczynienia pojawiającego się od obrzeża okluzji w kierunku centralnej części leczonego obszaru. Badane związki podawałam bezpośrednio po terapii fotodynamicznej, a także 24 godziny później. Do analizy wyników wykorzystano **zmodyfikowana formę metody analizy obrazu przedstawionej w P1**, która umożliwia ilościową ocenę morfologii naczyń dokładnie w miejscu aplikacji terapii fotodynamicznej. Wszystkie badane związki poprawiły wydajność działania terapii fotodynamicznej, tj. przedłużyły czas okluzji naczyń krwionośnych. Najlepszy wynik osiągnęłam stosując terapię fotodynamiczną w połączeniu z sorafenibem. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, iż sorafenib jest inhibitorem licznych kinaz i jako jedyny z nowych leków będących inhibitorami kinaz białkowych hamuje jednocześnie szlaki kinaz Raf, Mek i Erk. Inną ciekawą obserwacją był fakt, ze skuteczna dawka inhibitorów kinaz w hamowania angiogenezy występującej w skutek zastosowania PDT była około 10-cio krotnie niższa niż ta potrzebna do zahamowania fizjologicznej angiogenezy.

Może to oznaczać to, że proces angiogenezy rozwojowej jest procesem silniejszym, bardziej misternie regulowanym i lepiej zbalansowanym niż proces zachodzący po zastosowaniu PDT.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy
- przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny
- przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych w rycinach 1-3,5
*- zmodyfikowaniu opisanej w **P1** metody analizy obrazu do użytku w obszarze działania PDT*
- udziale w przeprowadzeniu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (rycina 4)
- interpretacji wyników badań
- wykonaniu wszystkich rycin i tabel
- wykonaniu analizy statystycznej
- napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej
- złożeniu manuskryptu do wydawnictwa oraz korespondencji z redakcją.
Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Charakterystyczną cechą modelu CAM jest fakt, że wszystkie pomiary przeprowadzane są podczas fizjologicznego (embrionalnego) rozwoju naczyń. W związku z tym, że w modelu tym układ immunologiczny nie jest w pełni rozwinięty, możliwe jest hodowanie przeszczepialnych guzów innych gatunków, w tym ludzkich. Model ten zastosowałam w badaniu optymalizacji skojarzonej terapii fotodynamicznej oraz anty-angiogennej w leczeniu różnych typów nowotworów (**P5**).

➔ **P5.** Weiss A, van Beijnum JR, Bonvin D, Jichlinski P, Dyson PJ, Griffioen AW, **Nowak-Sliwinska P* (**2014**),** Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: lack of vascular normalization, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, DOI 10.1111/jcmm.12199, 18(3):480-491.

PDT jest zatwierdzoną i powszechnie stosowaną metodą leczenia niektórych nowotworów skóry, takich jak nowotwór podstawnokomórkowy (*ang. basal cel carcinoma, BCC*), jak również zmiany przedrakowe, takie jak zrogowacenie słoneczne (*ang. actinic keratinosis*), oraz w mniejszym stopniu guzy głowy i szyi oraz wczesne stadia (*in situ*) nowotworów oskrzeli i przełyku (23-27). Istnieje jednak cały szereg ograniczeń wykorzystania PDT w leczeniu innych, a zwłaszcza bardziej zaawansowanych nowotworów, głównie związane z niską penetrację światła w tkance, indukowanej odpowiedzi immunologicznej oraz powstawaniu reakcji angiogennych. Jedną z cech odróżniających komórki nowotworowe od prawidłowych jest "nadczynność" kinaz, głównie kinaz tyrozynowych fosforylujących białka regulujące przebieg cyklu komórkowego. Odkrycie tej właściwości komórek doprowadziło do opracowania grupy leków przeciwnowotworowych hamujących przekazywanie sygnałów odpowiedzialnych za proliferację i różnicowanie komórek, zapobiegając tym samym wzrostowi tkanki nowotworowej.

W tym projekcie testowałam skuteczność klinicznie stosowanych inhibitorów kinazy tyrozynowej tj. sunitynibu, sorafenibu, oraz aksitinibu (*ang. axitinib*), które skojarzyłam z PDT w dwóch modelach ludzkich guzów nowotworowych. i następnie porównałam uzyskane wyniki z efektem działania bewacizumabu w połączeniu z PDT. Głównym celem badań było znalezienie takich (niskich) dawek obu typów terapii oraz odpowiedniej sekwencji ich stosowania, które w połączeniu dałyby synergistyczny efekt hamujący wzrost naczyń krwionośnych, jednoczenie prowadząc do zahamowania wzrostu nowotworu. Dodatkowym celem było udowodnienie roli inhibitorów kinazy tyrozynowej w możliwej indukcji normalizacji naczyń nowotworowych.

Normalizacja naczyń (*ang. normalization*) prowadzi od okresowego zmniejszenia przepuszczalności naczyń w wyniku leczenia anty-angiogennego. We wcześniej opublikowanych badaniach łączących PDT ze związkami anty-angiogennymi, związki te były podane równocześnie z PDT lub po jej wykonaniu. Jak zasugerował Rakesh K. Jain (28, 29) hamowanie angiogenezy może prowadzić do czasowej „normalizacji" naczyń krwionośnych, poprawić przepływ krwi, zmniejszyć przepuszczalność ścian naczyń, co może prowadzić do zwiększonego natlenienia w guzie i poprawienia wydajności skojarzonego leczenia.

Doświadczenia przeprowadziłam na dwóch modelach guzów ludzkich: nowotworu złośliwego jajnika (*ang. human ovarian carcinoma, A2780*) oraz nowotwór złośliwy jelita grubego (*ang. human colorectal carcinoma, HCT-116*). Najskuteczniejsze hamowanie wzrostu nowotworów uzyskałam przez połączenie PDT z aksitinibem, podanym dożylnie w suboptymalnych (powodujących tylko niewielki efekt) dawkach po PDT. Przypuszczalnym wytłumaczeniem takiego efektu jest znaczne powinowactwo (*ang. affinity*) aksitinibu do receptora VEGF (VEGFR2) w porównaniu z innymi testowanymi lekami. Wykonując pomiary utlenowania guzów nowotworowych 24 godziny po PDT, czyli w momencie podania inhibitorów angiogenezy wykazałam, że w tym przedziale czasowym nie dochodzi do normalizacji naczyń. Najważniejszą obserwacją był fakt, że wynik terapii był spowodowany hamowaniem angiogenezy, a nie indukcją normalizacji naczyń.

Ilość naczyń krwionośnych w grupie leczonej PDT skojarzonej z aksitinibem była znacznie niższa niż w przypadku stosowania tych terapii indywidualnie, jak i w porównaniu z PDT skojarzoną z innymi testowanymi lekami. W przedstawionych w tej pracy warunkach doświadczalnych nie zaobserwowałam normalizacji naczyń w guzach po podaniu testowanych związków w suboptymalnych dawkach, tj. aksitinib (13μg/kg), sorafenib (85 μg/kg) lub bewacizumab (497 μg/kg), jak zmierzono 24 godziny po ich podaniu. Zatem wynik terapii był spowodowany hamowaniem angiogenezy, a nie indukcją normalizacji naczyń.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- *udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy*
- *przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny*
- *szkoleniu studentów w przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych w rycinach 1-3*
- *udziale w przeprowadzeniu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (rycina 5)*
- *interpretacji wyników barwień histochemicznych*
- *analizie wszystkich danych*
- *udziale w wykonaniu wszystkich rycin i tabel*
- *udziale w wykonaniu analizy statystycznej*
- *udziale w napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej*
- *udziale w złożeniu manuskryptu do wydawnictwa oraz korespondencji z redakcją.*

Mój udział procentowy szacuję na 65%.

Chociaż wpływ PDT na naczynia krwionośne był badany w ciągu ostatnich lat, stosowanie PDT do ablacji naczyń limfatycznych (*ang. lymphatics vessels*) jest dopiero ostatnio eksploatowane. Naczynia limfatyczne umożliwiają transport płynu tkankowego, antygenów oraz limfocytów i komórek dendrytycznych z tkanek do okolicznych węzłów limfatycznych. Strategia ta może mieć znaczenie w zamykaniu okołoguzowych naczyń limfatycznych, w celu zapobiegania tworzenia i rozprzestrzeniania się przerzutów znajdujących się w naczyniach (30, 31). Szczegółowe badania na ten temat przedstawione są w **P6**.

➔ **P6.** Kilarski WW, Muchowicz A, Wachowska M, Mężyk-Kopeć R, Golab J, Swartz MA, **Nowak-Sliwinska P*** (2013), Optimization and regeneration kinetics of lymphatic-specific photodynamic therapy in the mouse dermis, *Angiogenesis,* DOI:10.1007/s10456-013-9365-6.

Celem tej pracy było ustalenie warunków, w jakich naczynia limfatyczne w skórze mogą być selektywnie uszkadzane/zamykane przy użyciu terapii fotodynamicznej bez jednoczesnego uszkodzenia sąsiadujących naczyń krwionośnych oraz innych zdrowych tkanek. Konkretniej, skupiliśmy się na (i) zbadaniu mechanizmu PDT prowadzącego do selektywnego zamknięcia układu limfatycznego stosując optymalne dawki fotouczulacza oraz światła, jak również (ii) określeniu kinetyki regeneracji systemu limfatycznego po zastosowanej terapii.

W toku badań dowiedliśmy, iż specyficzna ablacja skóry naczyń limfatycznych w skórze myszy, może być osiągnięta przy zastosowaniu niskich dawek podawanego lokalnie (podskórnie) fotouczulacza (wizudyny), a dawka światła może być dostosowana do pożądanego czasu odbudowania drożności naczyń. Użycie tak niskiej dawki światła jak 3,5 J/cm^2 powodowało blokadę drenażu limfatycznego na około 1 tydzień, podczas gdy 25 J/cm^2, mógł hamować drenaż limfatyczny za około 3 tygodnie. Zastosowanie większej dawki fotouczulacza prowadziło do zamknięcia zarówno naczynia krwionośnych jak i limfatycznych, co może być korzystne w sytuacji, gdy równoczesne zniszczenie zarówno systemów limfatycznych jak i krwionośnych i jest celem leczenia, np. przed keratoplastyką rogówki. Niższa dawka wizudyny (25 ng) powodowała selektywne zamknięcie limfatycznych naczyń kolektorowych, co powoduje zablokowanie odpływu limfy z całego układu limfatycznego. Okazało się, że regeneracja naczyń limfatycznych w wyniku okluzji z zastosowaniem terapii fotodynamicznej nie występuje *de novo* za pomocą limfangiogenezy, lecz za sprawą rzadkiego w ssaków mechanizmu prawdziwej regeneracji epimorficznej, w którym niedrożne i niefunkcjonalne naczynia zostają ponownie wypełnione nabłonkiem (*ang. epithelium*) i oraz zostają pokryte komórkami mięśni gładkich (*ang. smooth muscle cells, SMC*). Pełna regeneracja struktury i funkcji jest bardzo rzadko spotykana u wyższych kręgowców. Obecność miofibroblastów pod koniec etapu regeneracji może być spowodowana przewlekłym stanem zapalnym lub innymi czynnikami uwalnianymi przez komórki śródbłonka podczas regeneracji limfatycznych, jak i przez perycyty. Co ciekawe, tylko zregenerowane naczynia limfatyczne, pokryte warstwą perycytów, odzyskały swoją funkcję, a ich pokrycie SMC było wyraźnie gęstsze niż w przypadku fizjologicznych naczyń limfatycznych. Niedrożne i niezregenerowane naczynia limfatyczne nie miały w ogóle SMCs, co oznacza, że rekrutacja SMC jest koniecznym krokiem w funkcjonalnej regeneracji układu limfatycznego.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy
- udziale w przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń prezentowanych w rysunkach 1-7
- udziale w interpretacji wyników badań
- udziale w wykonaniu wszystkich rysunków
- udziale napisaniu wstępnej wersji całej pracy
- udziale w korespondencji z redakcją.

Artykuł ten został wybrany do dostarczania rysunku na okładkę jednego ze specjalnych wydań *Angiogenesis w 2014 roku.* *Mój udział procentowy szacuję na 45%.*

➔ **P7.** Weiss A, van den Bergh H, Griffioen AW, **Nowak-Sliwinska P*** (2012), Angiogenesis inhibition for improvement of photodynamic therapy; the revival of a promising idea, *Biophysica and Biochimica Acta; Reviews on Cancer,* 1826(1):53-70.

W tej pracy przeglądowej opisałam obecny stan wiedzy dotyczący zastosowania terapii fotodynamicznej skojarzonej z terapią anty-angiogenną w leczeniu zmian nowotworowych. Zebrane tu badania dotyczą wyników uzyskanych w modelach przedklinicznych, gdzie PDT skojarzona była z rożnymi typami inhibitorów angiogenezy, takimi jak inhibitory czynników wzrostu (np. anty-VEGF, anty-EGF (*ang. epidermal growth factor, EGF*), czy inhibitorami kinaz), ale również innymi czynnikami, jak metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. matrix metalloproteinases, MMPs*) czy cyclooxygenazy (*ang. cyclooxygenases, COXs*). Angiogeneza nowotworowa nie tylko dostarcza nowe cele dla skojarzonych terapii, lecz również stanowi źródło komórek śródbłonka, które zaadoptowały się do zwiększonych wymagań metabolicznych sąsiadujących komórek nowotworowych. Takie aktywowane komórki śródbłonka są źródłem celów do selektywnego dostarczania leków, również fotouczulaczy. Selektywne dostarczanie fotouczulacza do tkanki nowotworowej jest możliwe dzięki ukierunkowaniu fotouczulacza poprzez tworzenie koniugatów z udziałem cząstek nakierowanych na receptor docelowy (fotouczulacz-przeciwciało). Do głównych zalet tej strategii należą: wysokie powinowactwo wiążącej cząstki do receptora lub antygenu docelowej powierzchni komórki; bezpośrednia lub bardziej specyficzna lokalizacja dzięki czemu można zwiększyć wydajność i selektywność PDT stosując niższe stężenia fotouczulacza. Wzrost efektu PDT i zmniejszenie stężenia fotouczulacza można osiągnąć używając specyficznych cząsteczek „wyszukujących" komórki nowotworowe jak specyficzne białko transferyna (*fibronectin extra domain B, EDB*), czy integryna $\alpha_v\beta_3$. Ostatni rozdział tej pracy stanowi rozważania na temat możliwych ścieżek rozwoju skojarzonej terapii fotodynamicznej. Moim zdaniem rozwój ten powinien koncentrować się nie tylko na poszukiwaniu nowych skuteczniejszych fotouczulaczy, czy źródeł światła, lecz także na poszukiwaniu nowych celów w śródbłonku nowotworowym, co stanowi przedmiot pracy **P19** (rozdział 5.1).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy
- przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny
- udziale w wykonaniu wszystkich rysunków
- udziale napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej
- udziale w korespondencji z redakcją.
Mój udział procentowy szacuję na 65%.

Terapia fotodynamiczna była pierwszą skuteczną i szeroko stosowaną metodą leczenia wysiękowego zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). Znacznie lepsze wyniki leczenia tą metodą u pacjentów rasy innej niż biała doprowadziły do wniosku, że pacjenci o pochodzeniu azjatyckim lub afroamerykańskim mogą mieć zwiększone ryzyko rozwoju poliploidalnej formy waskulopatii naczyniówkowej (*ang. polypoidal choroidal vasculopathy, PCV*).

➔ **P8. Nowak-Sliwinska P***, van den Bergh H, Sickenberg M, Koh AHC (2013), Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy, *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 182-199.

Wynikało to z faktu, że kryteria włączenia do badania były w dużej mierze oparte na angiografii fluoresceinowej, na podstawie której trudno odróżnić wysiękową formę AMD od PCV. Ustalono, że w przypadku pacjentów o pochodzeniu azjatyckim lub afroamerykańskim (i) wyniki PDT w leczeniu PCV były znacznie lepsze niż wyniki w leczeniu wysiękowej formy AMD, oraz (ii) populacja o pochodzeniu azjatyckim lub afroamerykańskim zawiera znacznie wyższy odsetek pacjentów z PCV w porównaniu z rasą białą. Od roku 2006 terapia

fotodynamiczna, która przez wiele lat była główną metodą leczenia wysiękowego AMD, coraz częściej zastępowana jest przez związki anty-angiogenne. Niestety, w przypadku PCV, strategia anty-angiogenna nie jest tak skuteczna jak w przypadku wysiękowej AMD.

W tym przeglądowym artykule omówiłam rolę terapii fotodynamicznej, w leczeniu PCV, oraz możliwości łączenia PDT ze związkami anty-angiogennymi oraz/lub przeciwzapalnymi. Starałam się również zgromadzić dostępne w literaturze różnice pomiędzy wysiękową AMD a PCV, oraz ich wspólne cechy, zarówno na poziomie molekularnym, jaki i morfologicznym. Jak wykazały długoterminowe badania kliniczne najlepsze efekty uzyskuje się w leczeniu PCV stosując połączenie PDT z inhibitorami czynnika wzrostu (anty-VEGF), co prowadzi do zamknięcia naczyń w naczyniówce na okres około 2 lat. Zatem podobnie jak w przypadku AMD leczenie polipoidalnej waskulopatii naczyniówkowej nie zostało do tej pory w pełni ustalone i opracowane.

Artykuł ten powstał na zaproszenie edytora *Progress in Retinal and Eye Research*, będącego najwyżej punktowanym czasopismem okulistycznym.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w zaprojektowaniu koncepcji pracy
- przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny
- udziale w wykonaniu wszystkich rysunków
- udziale w napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej
- korespondencji z redakcją.
Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Podsumowując, głównymi osiągnięciami przedstawionymi w powyższych pracach było:
(i) stworzenie nowego narzędzia do analizy obrazu ułatwiającego kwantyfikację procesu (anty)-angiogenezy na poziomie kapilarnym (**P1** oraz **P4**), (ii) wykazanie właściwości anty-angiogennych arenowych pochodnych rutenu (II), otwierające nowe możliwości zastosowania tych związków w terapii przeciwnowotworowej (**P3**), (iii) opisanie kinetyki angiogenezy po terapii fotodynamicznej (**P2**) oraz opisu jej hamowania w modelu AMD (**P4**), (iv) skuteczne skojarzenie PDT z inhibitorami kinaz prowadzące do zahamowania wzrostu guzów nowotworowych (**P5**), (v) ustalenie warunków selektywnego zamykania naczyń limfatycznych przez PDT oraz opisanie kinetyki ich regeneracji (**P6**).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych nie zawartych w osiągnieciu naukowym

5.1. Publikacje naukowe zawarte w bazie Journal Citation Report (JCR) inne niż przedstawione w 4.1.

Publikacje prezentowane są w blokach tematycznych: (i) poszukiwanie nowych fotouczulaczy, (ii) niskoinwazyjne pomiary parcjalnego ciśnienia tlenu, (iii) nowe inhibitory angiogenezy w modelu AMD, (iv) terapie skojarzone w leczeniu AMD. Cytowane poniżej referencje są tylko wybranymi dla potrzeb tego referatu. Pełna lista cytowań znajduje się w każdej z poniżej opisanych publikacji. Mój udział procentowy znajduje się w załączniku 4 i 4A.

Przed otrzymaniem tytułu doktora:

Podczas studiów doktoranckich w Polsce pracowałam nad skutecznością fotouczulaczy w leczeniu komórek upigmentowanego czerniaka złośliwego. Chociaż czerniak jest ogólnie

uważany za odporny na działanie PDT, otrzymałam obiecujące wyniki, stosując wysoce aktywny fotouczulacz, zieleń indocyjaninową.

➔ **P9.** Urbańska K, Romanowska-Dixon B, Matuszak Z, Oszajca J, **Nowak-Sliwinska P**, Stochel G, Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas, *Acta Biochim Pol,* 49(2): 387-91, 2002. **(IF_{2002} 0.600)**

Zieleń indocyjaninowa (*ang. indocyanine green, ICG*), jest powszechnie stosowanym środkiem angiograficznym i charakteryzuje się bardzo ciekawymi właściwościami fotochemicznymi, z widmem absorpcji pomiędzy 700-800 nm. Ponieważ melanina nie absorbuje w tym rejonie widma, celem tych badań była ocena wpływu efektu fotodynamicznego z użyciem ICG jako fotouczulacza na ludzkie lub mysie komórki czerniaka. Fotouczulająca wydajność ICG była bardzo wysoka powodując ponad 10-krotną redukcję ilości komórek traktowanych przez PDT w stosunku do komórek nienaświetlonych (opis tych badań znajduje się również w rozdziale 3).

➔ **P10. Nowak-Sliwinska P**, Karocki A, Elas M, Pawlak A, Stochel G, Urbańska K, Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 349:549-55, 2006. **(IF_{2006} 2.855)**

W tej pracy testowałam trzy fotouczulacze: fotofrin (*ang. Photofrin II*), wspomnianą wcześniej wizudynę oraz merocyjaninę 540 (*ang. merocyanine, MC540*) wobec komórek czerniaka złośliwego. Połowiczny czas życia stanu trypletowego oraz wydajności kwantowe tworzenia tlenu singlowego przez te związki zostały skorelowane z efektami biologicznymi. Wizudyna okazała się najbardziej skutecznym czynnikiem uczulającym względem komórek czerniaka (opis tych badań znajduje się również w rozdziale 3).

Po otrzymaniu tytułu doktora:

Doświadczenia opisane w **P11** i **P12** prowadzone były we współpracy z naukowcami z fundacji CARIF z Malezji (*ang. Cancer Research Initiatives Foundation, CARIF*).

➔ **P11.** Lim S, Thivierge C, **Nowak-Sliwinska P**, Han J, van den Bergh H, Wagnières G, Burgess K, Lee H, In vitro and in vivo photo-cytotoxicity of BODIPY derivatives for photodynamic therapy; *J Med Chem*, 53(7): 2865-74*,* 2010. **(IF_{2012} 4.802)**

Alternatywną grupą fotouczulaczy mającą inną strukturę niż porfirynową są związki boronu (*ang. boron dipyrromethene, BODYPY*). Związki te posiadają szereg cech charakterystycznych dla „idealnego" fotouczulacza, takie jak wysoki współczynnik wzbudzenia (*ang. extinction coefficient*), wysoką wydajność tworzenia tlenu singletowego czy oporność na fotowybielanie (*ang. photobleaching*). W tych badaniach testowałam jodynowe pochodne BODYPY w celu porównania efektu fotodynamicznego z efektem otrzymanym z udziałem wizudyny. Pochodne takie charakteryzują się pasmem bardziej długofalowym (*ang. red-shifted*) absorbcji, co z kolei umożliwia wzbudzenie światłem o długości fali, która głębiej penetruje tkankę.

Pochodne BODYPY okazały się skutecznymi fotouczulaczami, a ich wydajność zależała od rodzaju modyfikacji pochodnej i była skorelowana z wydajnościami tworzenia tlenu singletowego każdej z tych cząsteczek. W dalszych badaniach wykazaliśmy, że pochodna BODYPY prezentująca najbardziej obiecujące wyniki fotouczulające w efekcie fotodynamicznym w komórkach HSC-2, zlokalizowana jest prawie wyłącznie w mitochondriach, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M i prowadzi do

apoptozy. W doświadczeniach na modelu CAM wydajność zamykania naczyń w terapii fotodynamicznej z udziałem tej pochodnej była skuteczna, podobna do PDT z udziałem wizudyny i zależna od jego dawki.

➔ **P.12.** Lim S, **Nowak-Sliwinska P**, Kamarulzaman FA, van den Bergh H, Wagnières G, Lee H, The neovessel occlusion efficacy of 15^1-hydroxypurpurin-7-lactone dimethyl ester induced with photodynamic therapy; *Photochem Photobiol* 86(2): 397-402, 2010. **(IF_{2010} 2.387)**

Równolegle z badaniem pochodnych boronu, pracowałam nad skutecznością terapii fotodynamicznej z udziałem związku G2 (*ang. 151-hydroxypurpurin-7-lactone dimethyl ester, G2*) jako fotouczulacza w modelu CAM. Związek ten jest naturalnym produktem wyizolowanym w Malezji z grupy roślin obrazkowatych (*Aracea*). Badania rozpoczęłam od potwierdzenia biokompatybilności tego związku w modelu CAM oraz optymalnego czasu akumulacji G2 w naczyniach. W terapii fotodynamicznej z użyciem tego związku zaobserwowałam, że wydajność G2 zamykania kapilar i małych naczyń jest porównywalna z tą, otrzymaną w wyniku stosowania wizudyny, stosując te same parametry światła (dawkę, czas naświetlania oraz czas pomiędzy podaniem fotouczulacza i naświetleniem). Zatem związek ten wydał się więc obiecującym kandydatem do dalszych badan przedklinicznych w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanej z wiekiem.

Równocześnie wróciłam do pracy nad tematyką niskoinwazyjnego pomiaru parcjalnego ciśnienia tlenu, rozpoczętej w czasie trwania moich studiów doktoranckich. Badania te rozwinęły się w ramach grantu (SNSF 205320-130518), którego koordynatorem był dr Georges Wagnieres. Byłam głównym wykonawca tego grantu, a wyniki moich prac zostały opublikowane w dwóch artykułach **P13** i **P14**:

➔ **P13. Nowak-Sliwinska P***, Forte E, Ballini JP, van den Bergh H, Wagnières G, *In vitro* and *in vivo* studies of new photoluminescent oxygen sensors for non-invasive intravascular pO_2 measurements; *Proc. SPIE*, 7380:57-61, 2009. **(IF_{2009} 0.770)**

➔ **P14. Nowak-Sliwinska P***, Käuper P, van den Bergh H, Wagnières G, Study of the pO_2-sensitivity of the dendrimeric and free forms of Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin, incorporated or not in chitosan-based nanoparticles; Chimia (Aarau), 65(9): 691-695, 2011. **(IF_{2011} 1.212)**

Badania opisane w **P13** i **P14** miały na celu opracowanie nowych biokompatybilnych sensorów tlenu wykorzystywanych do badania ciśnienia parcjalnego tlenu (*ang. partial pressure of oxygen, pO_2*) w tkance. Pomiar ciśnienia tlenu w tkance może być wykonany z wykorzystaniem zależnego od stężenia tlenu czasu życia fosforescencji niektórych metalopochodnych porfiryn. Odpowiednimi kandydatami do roli takich sond są kompleksy palladu (*ang. Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin*) lub jego pochodna dendrymeryczna charakteryzującą się wysoką wrażliwością na tlen. Wraz z moimi współpracownikami wysunęłam hipotezę, że produkowany podczas pomiaru pO_2 tlen singletowy będzie reagował wewnątrz nanocząsteczki, zatem jego cytotoksyczność w otaczającej tkance będzie zmniejszona. Wbudowanie luminoforu do odpowiednich nanocząsteczek (o wysokiej przepuszczalności tlenu, odpowiednim rozmiarze i ładunku), może prowadzić do optymalnej biodystrybucji sensora oraz zapobiegać powstaniu efektów fototoksycznych oraz efektów ubocznych związanych z niepożądanym wyciekiem sondy z naczyń krwionośnych.

W badaniach *in vitro*, prowadzonych z użyciem czasowo-rozdzielczej spektrofotometrii w różnych stężeniach tlenu wykazano, że wprowadzenie do takich sond kompleksu palladu w

nanocząsteczki zbudowane na bazie kitosanu (*ang. chitosan*) zmniejsza ich wrażliwość na tlen.

Kontynuacją tych badań było zmodyfikowanie wyżej opisanej techniki czasowo-rozdzielczej spektrofotometrii do badania czasów życia opóźnionej fluorescencji (*ang. delayed fluorescence*), co jest przedmiotem kolejnej publikacji (**P15**).

➔ **P15.** Piffaretti F, Novello AM, Kumar RS, Forte EN, Paulou C, van den Bergh H, **Nowak-Sliwinska P,** Wagnières G, Real-time, *in vivo* measurement of tissular pO_2 through the delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX during photodynamic therapy, *J Biom Optics*, 17(11): 1150071-9, 2012. **(IF_{2012} 3.48)**

To pierwsze opublikowane pomiary wykorzystujące metodę pomiarów czasów życia opóźnionej fluorescencji przeprowadzone w warunkach *in vivo* do oceny tkankowego pO_2. Do tego celu wykorzystywaliśmy aktywowaną światłem pochodną porfiryny (*ang. photoactivable porphyrin*), protoporfirynę IX (*ang. protoporphyrin IX*). Do oceny morfologicznych zmian w unaczynieniu podczas prowadzonej PDT wykorzystaliśmy indeks zmian unaczynienia ocenianego na podstawie makroskopowych zdjęć angiograficznych. W toku naszych doświadczeń uzyskaliśmy doskonałą korelację otrzymanego naczyniowego efektu fotodynamicznego oraz zachodzącej podczas tej terapii redukcji tkankowego pO_2.

Swoistym podsumowaniem moich badań w temacie wykorzystanie terapii fotodynamicznej w AMD był artykuł przeglądowy opisujący rolę PDT w klinicznym zastosowaniu terapii fotodynamicznej w leczeniu chorób oka, **P16**.

➔ **P16. Nowak-Sliwinska P*,** Weiss A, Sickenberg M, Griffioen AW, van den Bergh H, The role of photodynamic therapy in malignant and non-malignant eye disorders, *J Anal Bioanal Tech S1*: 007, 2013. **(IF_{2013} 3.480)**

Praca ta podsumowuje obecny stan wiedzy w zakresie PDT w okulistyce, ze szczególnym omówieniem jego wykorzystania w ocznych zmianach nowotworowych. Skupiłam się również na przedstawieniu obiecujących nowych metod leczenia, które są obecnie na różnych etapach rozwoju.

Istotne miejsce w moim dorobku naukowym zajmują badania dotyczące prac nad nowymi inhibitorami angiogenezy (**P17-P22**), które mogłyby być stosowane w połączeniu z terapią fotodynamiczną w leczeniu AMD. W monograficznej pracy przeglądowej (**B1**, rozdział 5.4) napisanej na zaproszenie *Current Angiogenesis*, dokonałam przeglądu literaturowego o obecnym zastosowaniu inhibitorów angiogenezy w leczeniu AMD.

Dimetylosulfotlenek (*ang. sulfoxid dimetyl, DMSO*) jest często stosowanym rozpuszczalnikiem wielu lipofilowych leków, w tym silnych środków anty-angiogennych. Głównym celem **P17**:

➔ **P17. Nowak-Sliwinska P***, Ballini JP, van den Bergh H, Wagnières G, Vascular effects induced by anti-VEGF agents in the CAM model: effect of the DMSO; *Proc. SPIE*, 7380:15-18, 2009. **(IF_{2009} 0.770)**

było określenie wpływu DMSO na rozwój sieci kapilarnej CAM. Uzyskane wyniki wskazują, że podawanie miejscowe wodnego roztworu DMSO w stężeniu równym lub większym niż 0,1%, powoduje modyfikację morfologii sieci kapilarnej w sposób zależny od dawki DMSO w porównaniu z kontrolą.

Badałam również właściwości anty-angiogenne małocząsteczkowej pochodnej maleimidu, GNX-686. Projekt ten został wykonany we współpracy z partnerem komercyjnym, a wyniki są przedmiotem patentu międzynarodowego (**X1**, rozdział 5.2) oraz publikacji **P18**.

➔ **P18. Nowak-Sliwinska P***, Storto M, Cataudella T, Ballini JP, Gatz R, Giorgio M, van den Bergh H, Plyte S, Wagnières G, Study of the anti-angiogenic effects induced by the small molecule GNX-686, *Microvasc Res,* 83: 105-110, 2012. **(IF_{2012} 2.929)**

Znaczące działanie anty-angiogenne związku GNX-686 zaobserwowałam zarówno w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, a wyniki porównałam z działaniem bewacizumabu, stosowanego klinicznie inhibitora VEGF. GNX-686 się równie skuteczny, jak bewacizumab. Zmieniał morfologię sieci naczyń zarówno w modelu CAM, jak i w modelu retinopatii wcześniaków (*ang. retinopathy of prematurity, ROP*). Wyniki te wskazują, że GNX-686 jest obiecującym związkiem anty-angiogennym, który może być stosowany w leczeniu chorób charakteryzujących się nieprawidłową angiogenezą, takich jak patologie dna oka czy zmiany nowotworowe.

Podczas stażu podoktorskiego w laboratorium prof. A.W. Griffioena (Centrum Medyczne VU, Amsterdam), brałam udział w badaniach nad nowymi markerami śródbłonka nowotworowego.

➔ **P19.** van Beijnum JR, **Nowak-Sliwinska, P**, Van den Boezem E, Hautvast P, Buurman WA, Griffioen AW, Tumor angiogenesis is enforced by autocrine regulation of high-mobility group box 1, *Oncogene,* 17; 32(3): 363-374. 2013. **(IF_{2013} 7.357)**

Jednym z markerów śródbłonka nowotworowego jest białko nazwane HMGB1 (*ang. high mobility group box 1*). Białko to jest plejotropową cząsteczką, z funkcjami regulującymi transkrypcję, stymulującymi stany zapalne oraz regulującymi angiogenezę. W pracy tej wykazano, że HMGB1 stymuluje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego oraz płytkopochodnego czynnika wzrostu (*ang. platelet-derived growth factor, PDGF*), zarówno w doświadczeniach prowadzonych na komórkach śródbłonka, jaki i w modelach zwierzęcych. Wykazano, ze stosując wykluczenie (*ang. knockdown*) genu HMGB1 prowadzi do zakłócenia w ekspresji genu HMGB1 i/lub jego funkcji,, a stosowanie specyficznego przeciwciała prowadzi do zahamowania angiogenezy poprzez hamowanie migracji i proliferacji komórek śródbłonka. Stosując odpowiednie monoklonalne przeciwciała anty-HMGB1 zaobserwowano zahamowanie wzrostu gęstości naczyń w modelu CAM, któremu towarzyszyło zmniejszenie ekspresji receptorów VEGF. Podsumowując, dane te posłużyły do identyfikacji HMGB1 jako ważnego modulatora angiogenezy i sugerują możliwości stosowania HMGB1 w leczeniu nowotworów.

➔ **P20.** Nazarov A, Baquié M, **Nowak-Sliwinska P***, Zava O, van Beijnum JR, Groessl M, Chisholm DM, Ahmadi Z, McIndoe SJ, Griffioen AW, van den Bergh H, Dyson PJ, Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agent based on ruthenium clusters, *Sci Rep,* 3; 1485, 2013. (**IF_{2013} 2.93**)

W tym projekcie używałam nowosyntetyzowanei pochodnymi klastrów tri-rutheno-karbonylowych (*ang. triruthenium-carbonyl*). Związki te zostały zmodyfikowane poprzez przyłączenie do nich ligandów dwucyklo-fosforanu glukozy (*ang. glucose-modified bicyclophosphite ligands*). Związki te w zależności od ilości ligandów dwucyklo-fosforanu miały specyficzny charakter przeciwnowotworowy lub anty-antyangiogenny. Chociaż niektóre pochodne charakteryzowały się toksycznością w wielu typach komórek nowotworowych, inne

wykazały specyficzną i zależną od dawki skuteczność, hamującą zarówno proliferację, jak i migrację komórek śródbłonka oraz zahamowanie angiogenezy w modelu CAM.

➔ **P21.** van Wijk XM, Thijssen VL, Lawrence R, van den Broek SA, Dona M, Naidu N, Oosterhof A, de Westerlo EM, Kusters LJ, Khaled Y, Jokela TA, **Nowak-Sliwinska P**, Kremer H, Stringer SE, Griffioen AW, van Wijk E, van Delft FL, van Kuppevelt TH, A pleiotropically acting GlcNAc analog interferes with UDP-GlcNAc metabolism, heparan sulfate expression, and angiogenesis *in vivo*, *ACS Chemical Biology* 18;8(10): 2331-8, 2013. **(IF_{2013} 5.689)**

Siarczan heparanu (*ang. heparan sulfate, HS*), polisacharyd o strukturze liniowej, odgrywa rolę w różnych etapach onkogenezy, w tym angiogenezy. W tym projekcie pracowałam z analogiem 4-deoksy-HS wewnątrzkomórkowo zaktywowanym do formy UDP-4-dezoksy-GlcNAc. Analiza ekspresji genów wykazała zmniejszenie ekspresji genów regulowanych przez HS wiążących czynniki wzrostu, takie jak FGF-2 i VEGF. Co więcej, sygnalizacja tych czynników angiogennych została zahamowana. Podanie tych związków zarodkom dania pręgowanego (*ang. zebrafish*), jednego z flagowych modeli angiogenezy, silnie zredukowało biosyntezę HS oraz wpłynęło na zahamowanie angiogenezy. Wyniki te zostały potwierdzone również w modelu CAM. Zebrane tu wyniki wskazują, że 4-deoksy-GlcNAc jest silnym inhibitorem syntezy HS, która prowadzi do hamowania sygnalizacji pro-angiogennej.

Innym projektem, nad którym pracowałam w czasie mojego stażu w Centrum Medycznym VU w Amsterdamie było określenie roli prolaktyny w chorobach o podłożu naczyniowym.

➔ **P22.** Reuwer AQ, **Nowak-Sliwinska P**, Mans L, van der Loos CM, von der Thüsen JH, Twickler TB, Spek AC, Goffin V, Griffioen AW, Borensztajn KS, Prolactin induces angiogenesis through stimulation of endothelial cell migration, *J Cell Mol Med*, 16(9): 2035-2048, 2012. **(IF_{2012} 4.125)**

Prolaktyna jest znanym hormonem polipeptydowym, który reguluje rozwój gruczołu sutkowego przez angiogenezę. Uzyskane w tej pracy wyniki sugerują, że prolaktyna może bezpośrednio stymulować angiogenezę, co z kolei może być jednym z mechanizmów, przez który prolaktyna pośredniczy w progresji raka sutka, stanowiąc jednoczenie potencjalne narzędzie do walki z guzami nowotworowymi.

➔ **P23.** Griffioen AW, Mans L, de Graaf AM, **Nowak-Sliwinska P**, Bosch S, de Hoog C, Dellemijn T, Vyth-Dreese F, Jonasch E, Bex A, Preoperative sunitinib treatment of RCC patients inhibits angiogenesis in the primary tumor; rapid angiogenesis onset after discontinuation of treatment, *Clin Cancer Res,* 18(14):1-11, 2012**. (IF_{2012} 7.837)**

Nowotwór nerki (*ang. renal cell carcinoma*) jest jednym z typów nowotworów, które skutecznie leczone są obecnie terapiami anty-angiogennymi. Jednym z flagowych przykładów takiego leku angiogennego jest sunitynib, który jest inhibitorem kinazy tyrozynowej ukierunkowanym głównie na receptory VEGF czy PDGF.

W tej pracy opisano zmiany w unaczynieniu w nowotworach nerki u pacjentów, którym przed operacyjnym usunięciem guzów podawano sunitinib. Jest to pierwszy opis odpowiedzi angiostatycznej w ludzkich pierwotnych nowotworach nerki, na poziomie tkankowym po traktowaniu celowaną terapią anty-angiogenną. Ważnym spostrzeżeniem był fakt, że przerwanie leczenia sunitynibem prowadziło do przyspieszonej proliferacji komórek śródbłonka i w efekcie do szybszego wzrostu nowotworu. Wyniki opisane w tym artykule stanowią ważną

podstawę do toczącej się dyskusji na temat przerywania leczenia nowotworów inhibitorami kinazy.

Nieprawidłowo zbudowane i źle działające naczynia krwionośne są typową cechą guzów litych, bezpośrednio związaną z ich złośliwością, a także z upośledzonym dostarczeniem leków do komórek nowotworowych. Uporządkowanie naczyniowego chaosu tzw. normalizacja (*ang. vessel normalization*) wewnątrz guzów nowotworowych daje nowe możliwości ich zwalczania.

➔ **P24. Nowak-Sliwinska P***, Wagnières G, van den Bergh H, Griffioen AW, Angiostasis induced vascular normalization can improve photodynamic therapy; *Cell Mol Life Sci,* 67(9): 1559-60, 2010. **(IF_{2010} 6.57)**

W tym artykule komentującym prace przeglądową autorstwa Bhuvaneswari i wpół. (32) odniosłam się do potencjalnej roli normalizacji naczyń w zwiększeniu skuteczności naczyniowej terapii fotodynamicznej. Normalizacja naczyń krwionośnych w guzie ułatwia jego penetrację przez chemioterapeutyki i zwiększa ich skuteczność. Podobnie, lepszy przepływ krwi w znormalizowanych naczyniach, prowadzi do wydajniejszego dostarczania tlenu oraz potencjalnie większej wydajności terapii fotodynamicznej.

W ostatnich latach biorę również udział w projektach mających na celu wykorzystanie światła lub efektów termicznych w zwiększeniu wydajności leków przeciwnowotworowych.

➔ **P25.** Adar Y, Stark M, Bram EE, **Nowak-Sliwinska P**, van den Bergh H, Szewczyk G, Sarna T, Skladanowski A, Griffioen AW, Assaraf YG, Imidazoacridinone-dependent lysosomal photodestruction: a pharmacological Trojan horse approach to eradicate multidrug resistant cancers, *Cell Death Dis*, doi:10.1038, 2012. **(IF_{2012} 5.53)**

Jednym z mechanizmów lekooporności jest sekwestracja chemioterapeutyków w różnych organellach (33). W tej pracy wykazano, że komórki podlegające wielolekowej oporności charakteryzują się znacznie większą liczbą lizosomów niż komórki nieleczone. Ponadto wykazano, że takie chemioterapeutyki jak pochodne imidazoakrydynonów (*ang. imidazoacridinones, IAs*), które są cytotoksycznymi fluorochromami, lokalizują się bardzo szybko w lizosomach z powodu ich hydrofobowego charakteru (słabej zasady).

W tych badaniach wraz ze współpracownikami opracowałam zatem nowy, oparty na fotoaktywacji farmakologicznej sposób eliminowania lekoopornych komórek nowotworowych za pomocą ich naświetlania. Naświetlanie takich komórek, prowadzi do pęknięcia lizosomów obciążonych IAs, wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz lizy komórek nowotworowych. Ta ważna obserwacja może znacząco poprawić wydajność leczenia chemioterapeutykami o specyficznych właściwościach fizyko-chemicznych.

➔ **P26.** Clavel CM, Păunescu E, **Nowak-Sliwinska P**, Dyson PJ, Thermoresponsive Organometallic Arene Ruthenium Complexes for Tumour Targeting, *Chem Sci,* 5, 1097-1101, 2014. **(IF_{2014} 8.310)**

Hipertermia (*ang. hyperthermia, HT*), czyli przegrzanie guza nowotworowego, staje się jedną z cenionych metod walki z rakiem. Jest to niejonizujący (*ang. non-ionizing*) rodzaj radioterapii, który może istotnie zwiększyć skuteczność leczenia nowotworów (34). Jej zastosowanie wiąże się z wykorzystaniem większej wrażliwości komórek nowotworowych niż komórek zdrowych na wyższe temperatury. W trakcie łagodnej hypertermii tkanki są poddawane temperaturze od 40 do 42 stopni Celsjusza.

W tym projekcie wykazałam wraz we współpracownikami, że wysoka temperatura może uszkodzić i zabić komórki nowotworowe, zwykle z towarzyszącym niewielkim ryzykiem uszkodzenia tkanek zdrowych. Mechanizm niszczenia komórek obejmuje zjawiska związane z bezpośrednim efektem cytotoksycznym wysokich temperatur, z tzw. efektem komórkowym powodowanym przez ekspresję białek szoku cieplnego, indukcję i regulację apoptozy, wpływ na przesyłanie sygnału wewnątrzkomórkowego oraz modulację odporności na leki.

W tym projekcie wykorzystaliśmy nowe metaloorganiczne kompleksy rutenu (*ang. ruthenium(II)–arene complexes*) z długim fluorowym ligandem i testowaliśmy ich cytotoksyczność w licznych liniach ludzkich komórek nowotworowych oraz zdrowych. Wykazaliśmy, ze przedstawiciele tej klasy związków wykazały znaczną chemotermiczną selektywność wobec komórek nowotworowych.

5.2. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe

X1. WO 2013/014629 A1. Pharmaceutical compositions comprising pyrrole diones and their use to inhibit angiogenesis. Wynalazcy: Plyte S, Fancelli D, Verasi M, Storto M, Nowak-Sliwinska P, złożony 25 lipca 2011, opublikowany w 2013. Congenia Srl., Mediolan, Włochy.

Patent ten dotyczy nowego leku o właściwościach anty-angiogennnych opisanego w publikacji **P17**. *Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

X2. US20120283620 A1, United States Patent, Treatment of disease utilizing chromophoric hydrophobic weak base drugs and phototherapy. Wynalazcy: Assaraf Y, Turgeman YA, Skladanowski AM, Griffioen AW, Verheul H, Gotink K, van en Bergh H, Nowak-Sliwinska P., złożony 8 marca 2012, opublikowany w 2014. Technion Research and Development Foundation Limited, Heifa, Izrael.

Patent ten pochodzi z badań przeprowadzonych we współpracy z grupami badawczymi w Amsterdamie, Holandia (prof. A.W. Griffioen) i Hajfie, w Izraelu (prof. Y. Assaraf). Mój wkład intelektualny patentu polegał na wykazaniu właściwości fotochemicznych sunitynibu, który można stosować jako „fotouczulacz". Badania na ten temat zostały opublikowane (**P20**), a kolejne doniesienie zostało niedawno złożone do publikacji (Nowak-Śliwińska P i współ. *Photoactivation of cellular sunitinib causes vascular damage and tumor growth inhibition*, 2014, patrz rozdział 6). *Mój udział procentowy szacuję na 20%.*

5.3. Wynalazki

Moje wynalazki zostały opatentowane i są opisane w rozdziale 5.2.

5.4. Monografie oraz inne publikacje nie zawarte w bazie Journal Citation Report (JCR)

B1. Nowak-Sliwinska P*, Anti-angiogenic treatment for exudative age-related macular degeneration: new strategies are underway, *Current Angiogenesis* 1(4): 318-334, 2012.
Current Angiogenesis otrzyma *impact factor* w 2014 roku.

W tym, **pisanym za zaproszenie edytora**, artykule przeglądowym opisałam obecnie stosowane strategie leczenia wysiękowego zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD). Szybko rozwijający się rynek nowych środków anty-angiogennych pozwoli na stosowanie lepszych metod leczenia wysiękowego AMD w najbliższej przyszłości.

Jestem jedynym autorem tej pracy i oceniam mój wkład procentowy na 100%.

B2. Gay S, Martoccia C, Barge J, **Nowak-Sliwinska P**, Wagnières G, Etude préclinique des effets vasculaires induits par la thérapie photodynamique de nouveaux dérivés d'acide 5-aminolevulnique, in Proc. Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine, OPTIAG, Paris, France, 2012.

W tym projekcie badaliśmy rolę nowych pochodnych kwasu 5-aminolewulinowego (*ang. aminolevulinic acid, ALA*). ALA jest jednym z obecnie jednym ze stosowanych klinicznie fotouczulaczy. Synteza nowych pochodnych ALA miała na celu polepszenie ich specyficzności względem naczyń krwionośnych. Po badaniu stabilności w roztworach oceniona została ich skuteczność fotouczulająca w modelu CAM.

Mój udział w tej publikacji polegał na udziale w zaprojektowaniu badań, nauczeniu pracownika operowania wszystkimi potrzebnymi technikami, pomocy w przeprowadzeniu doświadczeń przedstawionych w rycinach 2, 4 i 5, interpretacji danych, udziale w napisaniu manuskryptu, udziale w przygotowaniu rycin. Mój wkład procentowy oceniam na 25%.

5.5. Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych

Jestem autorką dwóch rozdziałów w książkach:

B3. Nowak-Sliwinska P*, Weiss A, Sickenberg M, van den Bergh H, Photodynamic Therapy in Ophthalmology, a chapter in *The Handbook of Photomedicine,* M. Hamblin and Y.Y Huang (edytorzy), wydawca: CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 9781439884690, 451-465, 2013.

*Mój wkład w powstanie tego, **pisanego na zaproszenie,** rozdziału polegał na zaprojektowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny, udziale w wykonaniu wszystkich rycin, udziale napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej, korespondencji z redakcją.*

B4. Nowak-Sliwinska P*, Sickenberg M, van den Bergh H, Photodynamic therapy in Polyploidal Choroidal Vasculopathy, a chapter in *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*, Abdel-Kader, Mahmoud H. (edytor), wydawca: Springer, ISBN 978-3-642-39628-1, 2013.

*Mój wkład w powstanie tego, **pisanego na zaproszenie,** rozdziału polegał na zaprojektowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu przeglądu literatury z tej dziedziny, udziale w wykonaniu wszystkich rycin, udziale w napisaniu wstępnej wersji całej pracy i przygotowaniu wersji finalnej, korespondencji z redakcją.*

5.6. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.

1. *Platforma przesiewowa do badania optymalnych połączeń leków.* Jest to największy projekt międzynarodowy, którym obecnie kieruję. Projekt finansowany jest przez:

EPFL (pozycji doktoranta, za zakup platformy do przesiewowego badania kombinacji leków (*ang. screening platform workstation*)

VU Centrum Medyczne (pozycja technika).

Projekt wykonywany jest w ścisłej współpracy z Centrum Medycznym VU (Amsterdam, Holandia, prof. A.W. Griffioena), Uniwersytetem Kalifornijskim w Los Angeles (Los Angeles, USA, prof. C.M. Ho) oraz Uniwersytetem Shanghai Jiao Tung (Shanghai, Chiny, Prof. D. Xianting). Projekt ten ma na celu znalezienie optymalnie działającej kombinacji leków anty-angiogennych zaprojektowanych przy użyciu algorytmu matematycznego. Lata: 2012-2015.

2. *Badania przesiewowe nowych celów biologicznych w naczyniach guzów nowotworowych.* Ufundowany przez Komisję Europejską, program Marie Curie, 7PR, UE-PEOPLE-2013-IEF. Lata: 2014-2016.

3. *Rozwój nowych terapii opartych na wykorzystaniu prekursorów protoporfiryny IX.* Ufundowana przez: Swiss National Science Fundation (SNSF, 205320_130518) Szwajcaria. W tym projekcie jestem współwnioskodawcą wraz z dr G. Wagnièresem. Dlatego głównym celem projektu było określenie optymalnych kandydatów spośród pochodnych ALA w leczeniu chorób, które są związane z (mikro) zaburzeniami naczyniowymi. Lata: 2010-2013.

4. *Izolacja komórek śródbłonka z guzów nowotworowych oraz badanie ich reakcji na optymalną kombinację leków.* Rok: 2013. Ufundowana przez Międzynarodową Unię Kontroli Walki z Rakiem (UICC), Genewa, Szwajcaria.

5.7. Nagrody narodowe i międzynarodowe

1. Stypendium podczas *11-tego Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (European Society of Photobiology)*, Aix-Les-Bains, Francja, wrzesień 2005. Podczas tego kongresu wygłaszałam wykład oraz prezentowałam poster.
2. Stypendium podczas *13-tego Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (European Society of Photobiology)*, Wrocław, Polska, wrzesień 2009. Podczas tego kongresu wygłaszałam wykład oraz prezentowałam poster.
3. Stypendium podczas Międzynarodowego Stowarzyszenia Fotodynamicznego (*International Photodynamic Association)*, Seattle, USA, czerwiec 2009. Podczas tego kongresu wygłaszałam wykład oraz prezentowałam poster.
4. Nagroda specjalna rektora EPFL za osiągnięcia naukowe i zaangażowanie w pracę, Lozanna, Szwajcaria, październik 2010.
5. Stypendium podczas *35-tego Zjazdu Amerykańskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (American Society of Photobiology)*, Providence, USA, czerwiec 2010. Podczas tego kongresu wygłaszałam wykład oraz prezentowałam poster.
6. Zostałam wybrana do wywiadu przeprowadzonego przez czasopismo wydawane przez Centrum Medyczne VU (*Leve het leven*), Amsterdam. Holandia, styczeń 2011.
7. Nagroda za najlepszy poster podczas Zjazdu Szwajcarskiego Towarzystwa Chemicznego (*Swiss Chemical Society Fall Meeting),* Lozanna, Szwajcaria, wrzesień 2011.
8. Nagroda za najlepszy poster podczas *36-tego Zjazdu Amerykańskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (American Society of Photobiology)*, Montreal, Kanada, czerwiec 2012. Podczas tego kongresu wygłaszałam wykład na zaproszenie, wykład sesyjny oraz prezentowałam postery.
9. Najlepsze zdjęcie biologiczne wybrane przez *Amerykańskie Towarzystwo Fotobiologiczne do publikacji na stronie internatowej. Zdjęcie pochodzi z publikacji* ***P6*** *(*Kilarski WW, Muchowicz A, Wachowska M, Mężyk-Kopeć R, Golab J, Swartz MA, **Nowak-Sliwinska P*** (2013), Optimization and regeneration kinetics of lymphatic-specific photodynamic therapy in the mouse dermis, *Angiogenesis,* DOI:10.1007/s10456-013-9365-6), wrzesień 2012).

10. Nagroda amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego *American Chemical Society (ACS)* za często cytowany artykuł (**P3**).

5.8. Wygłaszanie referatów na międzynarodowych i narodowych konferencjach tematycznych.

Lista moich abstraktów konferencyjnych dotyczących posterów znajduje się w załączniku 5.

5.8.1. Wykłady wygłoszone na zaproszenie organizatorów.

O1. Nowak-Sliwinska P, On the role of the vascularization in cancer detection and photodynamic therapy *Angiogenesis Seminar Series,* Centrum Medyczne VU, Amsterdam, Holandia, maj 2009.

O2. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, van den Bergh H, Wagnières G, Quantification of capillary growth, and its inhibition by an anti-VEGF agent in the chick's chorioallantoic membrane model, *Angiogenesis: Present and Future*, Timisoara, Rumunia, marzec 2009.

O3. Nowak-Sliwinska P, Synergies between photodynamic vascular damage and anti-angiogenesis approach, *Wellman Center Lecture Series*, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA, luty 2011.

O4. Nowak-Sliwinska P, *Synergy between anti-angiogenesis and photodynamic therapy,* Immunotherapy of uro-genital cancers *seminar series,* Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lozanna, Szwajcaria, kwiecień 2011.

O5. Nowak-Sliwinska P, Griffioen AW, van en Bergh H, Efficacy assessment of photodynamic vascular damage in combination with anti-angiogenic kinase inhibitors, *13th International Photodynamic Association World Congress*, Innsbruck, Austria, maj 2011.

O6. Nowak-Sliwinska P, Efficacy assessment of photodynamic vascular damage in combination with anti-angiogenic kinase inhibitors *14th Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (European Society for Photobiology)*, Genewa, Szwajcaria, wrzesień 2011.

O7. Nowak-Sliwinska P, Selective photodynamic occlusion of lymphatic vessels, *36th Zjazdu Amerykanskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (American Society for Photobiology)*, Montreal, Kanada, czerwiec 2012.

O8. Nowak-Sliwinska P, Angiogenesis and vaso-occlusive photodynamic treatment, *Wellman Center Lecture Series, Harvard School of Engineering and Applied Sciences,* Boston, USA, czerwiec 2012.

O9. Nowak-Sliwinska P, Angiogenesis followed by vaso-occlusive photodynamic treatment, *Special Seminar, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School*, USA, czerwiec 2012.

O10. Kilarski WW, Swartz MA, **Nowak-Sliwinska P**, Specific ablation of the lymph vasculature by photodynamic therapy, *Angiogenesis, Present and Future*, Timisoara, Rumunia, marzec 2012.

O11. Nowak-Sliwinska P, Combination therapies for targeting tumor vasculature, *Angiogenesis Seminar Series, VU University Medical Center, Amsterdam, Holandia*, grudzień 2013.

O12. Nowak-Sliwinska P, New strategies of targeting tumor vasculature, *CardioVascular Seminar Series*, *University of Geneva*, Genewa, Szwajcaria, styczeń 2014.

5.8.2. Sesyjne wykłady konferencyjne

O13. Nowak-Sliwinska P, G. Stochel and K. Urbanska, *Light dose dependence of Visudyne, Photofrin or Merocyanine 540 mediated photodynamic effect (PDE) on Cloudman melanoma cells*, *11-tego Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (European Society of Photobiology)*, Aix-Les-Bains, Francja, wrzesień 2005.

O14. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, van den Bergh H, Wagnières G, *Quantitation of Angiogenesis Inhibition in the Chick's Chorioallantoic Membrane Model Using an Image Processing Method,* Biomedical Photonics Network, Lozanna, Szwajcaria, listopad 2008.

O15. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, van den Bergh H, Quantification of the vascular effects induced by PDT and anti-VEGF in the chicken's chorioallantoic membrane model, International Photodynamic Association World Congress, Seattle, USA, czerwiec 2009.

O16. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, van den Bergh H, Development and validation of an image-processing method to quantify the vascular effects in the CAM model, 13th *Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (European Society for Photobiology),* Wroclaw, Polska, wrzesień 2009.

O17. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, van den Bergh H, Photodynamic therapy-induced vascular regrowth in the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM), 35th *Zjazd Amerykanskiego Towarzystwa Fotobiologicznego* (American Society for Photobiology), Providence, USA, czerwiec 2010.

O18. Nowak-Sliwinska P, van den Bergh H, Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion*, International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics*, Wiedeń, Austria, grudzień 2011.

O19. Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Griffioen AW, van en Bergh H, Targeted therapy to improve photodynamic vascular damage; *International Society of Cellular Oncology, ISCO,* Palma de Mallorca, Hiszpania, marzec 2012.

O20. Nowak-Sliwinska P, Verteporfin-PDT in combination with kinase inhibitors on human ovarian carcinoma model, *36th Zjazd Amerykańskiego Towarzystwa Fotobiologicznego* (American Society for Photobiology), Montreal, Kanada, czerwiec 2012.

O21. Piffaretti F, Novello A, Senthil Kumar R, Forte E, Paulou C, **Nowak-Sliwinska P**, van den Bergh H, Wagnières G, In vivo measurement of PpIX delayed fluorescence lifetime to monitor the tissue oxygen depletion during PDT, *36th Zjazd Amerykanskiego Towarzystwa Fotobiologicznego* (American Society for Photobiology), Montreal, Kanada, czerwiec 2012.

O22. Weiss, A, van Beijnum JR, Bonvin D, van den Bergh H, Groffioen AW, **Nowak-Sliwinska P**, Improvement of photodynamic therapy for cancer with tyrosine kinase inhibitors. Implications for scheduling of anti-angiogenic drugs, *15th Congress of European Society of Photobiology, Liege,* Belgia, wrzesień *2013.*

O23. Nowak-Sliwinska P, Weiss, A, van Beijnum JR, Szewczyk G, Sarna T, van en Bergh H, Groffioen AW, Photoactivated sunitinib causes endothelial and vascular damage, *15th Congress of European Society of Photobiology,* Liege, Belgia, wrzesień 2013.

6. Piśmiennictwo

1. Blacher S, Davy L, Hlushchuk R, Larger E, Lamande N, Burri P, et al. Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). Image Anal Stereol . 2005;24:169-80.

2. Wei HJ, Xing D, Lu JJ, Gu HM, Wu GY, Jin Y. Determination of optical properties of normal and adenomatous human colon tissues in vitro using integrating sphere techniques. World J Gastroenterol. 2005 Apr 28;11(16):2413-9. PubMed PMID: 15832410. Epub 2005/04/16. eng.

3. Larger E, Marre M, Corvol P, Gasc JM. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. Diabetes. 2004;53(3):752-61.
4. Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, et al. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. Microvascular Research. 1998;55(3):201-14.
5. Doukas CN, Maglogiannis I, Chatziioannou A, Papapetropoulos A. Automated angiogenesis quantification through advanced image processing techniques. Conference Proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society. 2006;1:2345-8.
6. Pyriochou A, Tsigkos S, Vassilakopoulos T, Cottin T, Zhou Z, Gourzoulidou E, et al. Anti-angiogenic properties of a sulindac analogue. British journal of pharmacology. 2007;152(8):1207-14.
7. Strick DM, Waycaster RL, Montani JP, Gay WJ, Adair TH. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia. American Journal of Physiology. 1991;260(4 Pt 2):H1385-9.
8. Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, et al. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. Microvasc Res. 1998 May;55(3):201-14. PubMed PMID: 9657920.
9. Doukas J, Mahesh S, Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Yokoi K, et al. Topical administration of a multi-targeted kinase inhibitor suppresses choroidal neovascularization and retinal edema. J Cell Physiol. 2008 Jul;216(1):29-37. PubMed PMID: 18330892. eng.
10. Vickerman MB, Keith PA, McKay TL, Gedeon DJ, Watanabe M, Montano M, et al. VESGEN 2D: automated, user-interactive software for quantification and mapping of angiogenic and lymphangiogenic trees and networks. Anatomical Record (Hoboken, NJ: 2007). 2009;292(3):320-32.
11. Bressler NM, Arnold J, Benchaboune M, Blumenkranz MS, Fish GE, Gragoudas ES, et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration: additional information regarding baseline lesion composition's impact on vision outcomes-TAP report No. 3. Archives of ophthalmology. 2002 Nov;120(11):1443-54. PubMed PMID: 12427056.
12. Blumenkranz MS, Bressler NM, Bressler SB, Donati G, Fish GE, Haynes LA, et al. Verteporfin therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: three-year results of an open-label extension of 2 randomized clinical trials--TAP Report no. 5. Archives of ophthalmology. 2002 Oct;120(10):1307-14. PubMed PMID: 12365909.
13. Bressler NM, Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study G. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. Archives of ophthalmology. 2001 Feb;119(2):198-207. PubMed PMID: 11176980.
14. Van den Bergh HB, J.-P. Photodynamic therapy: basic principles and mechanisms. Lasers in Opthalmology. 2003:183-95.
15. Weiss A, van den Bergh H, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. BBA Reviews on Cancer. 2012;1826(1):53-70.
16. Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Sickenberg M, Griffioen AW, van den Bergh H. The Role of Photodynamic Therapy in Non-malignant and Malignant Eye Disorders. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques. 2013;S1:1-25.
17. Muggia F. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. Gynecologic oncology. 2009 Jan;112(1):275-81. PubMed PMID: 18977023. Epub 2008/11/04. eng.
18. Sava G, Gagliardi R, Bergamo A, Alessio E, Mestroni G. Treatment of metastases of solid mouse tumours by NAMI-A: comparison with cisplatin, cyclophosphamide and dacarbazine. Anticancer research. 1999 Mar-Apr;19(2A):969-72. PubMed PMID: 10368640. Epub 1999/06/16. eng.
19. Hartinger CG, Dyson PJ. Bioorganometallic chemistry--from teaching paradigms to medicinal applications. Chem Soc Rev. 2009 Feb;38(2):391-401. PubMed PMID: 19169456. Epub 2009/01/27. eng.

20. Schluga P, Hartinger CG, Egger A, Reisner E, Galanski M, Jakupec MA, et al. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. Dalton Trans. 2006 Apr 14(14):1796-802. PubMed PMID: 16568190. Epub 2006/03/29. eng.
21. Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurenczy G, et al. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. J Med Chem. 2005 Jun 16;48(12):4161-71. PubMed PMID: 15943488. Epub 2005/06/10. eng.
22. Scolaro C, Chaplin AB, Hartinger CG, Bergamo A, Cocchietto M, Keppler BK, et al. Tuning the hydrophobicity of ruthenium(II)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. Dalton Trans. 2007 Nov 21(43):5065-72. PubMed PMID: 17992291. Epub 2007/11/10. eng.
23. Grosjean P, Savary JF, Mizeret J, Wagnieres G, Woodtli A, Theumann JF, et al. Photodynamic therapy for cancer of the upper aerodigestive tract using tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. J Clin Laser Med Surg. 1996 Oct;14(5):281-7. PubMed PMID: 9612194. Epub 1996/10/01. eng.
24. Grosjean P, Wagnieres G, Fontolliet C, van den Bergh H, Monnier P. Clinical photodynamic therapy for superficial cancer in the oesophagus and the bronchi: 514 nm compared with 630 nm light irradiation after sensitization with Photofrin II. Br J Cancer. 1998 Jun;77(11):1989-95. PubMed PMID: 9667680. Pubmed Central PMCID: 2150371. Epub 1998/07/17. eng.
25. Fayter D, Corbett M, Heirs M, Fox D, Eastwood A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. Health Technol Assess. 2010 Jul;14(37):1-288. PubMed PMID: 20663420. Epub 2010/07/29. eng.
26. Sanchez A, Reza M, Blasco JA, Callejo D. Effectiveness, safety, and cost-effectiveness of photodynamic therapy in Barrett's esophagus: a systematic review. Dis Esophagus. 2010 Nov;23(8):633-40. PubMed PMID: 20545970. Epub 2010/06/16. eng.
27. Issa MC, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. An Bras Dermatol. 2010 Aug;85(4):501-11. PubMed PMID: 20944910. Epub 2010/10/15. eng
por.
28. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. Nature medicine. 2001 Sep;7(9):987-9. PubMed PMID: 11533692. Epub 2001/09/05. eng.
29. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005 Jan 7;307(5706):58-62. PubMed PMID: 15637262. Epub 2005/01/08. eng.
30. Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. Nat Immunol. 2008;9(9):960-9.
31. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. Nat Rev Immunol. 2005;5(8):617-28.
32. Bhuvaneswari R, Gan YY, Soo KC, Olivo M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. Cell Mol Life Sci. 2009 Jul;66(14):2275-83. PubMed PMID: 19333552. eng.
33. Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, et al. Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. Clin Cancer Res. 2011 Dec 1;17(23):7337-46. PubMed PMID: 21980135.
34. Wendtner CM, Abdel-Rahman S, Krych M, Baumert J, Lindner LH, Baur A, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high-risk soft tissue sarcomas. J Clin Oncol. 2002 Jul 15;20(14):3156-64. PubMed PMID: 12118030.

7. Plany na przyszłość

W najbliższej przyszłości planuję kontynuować moja karierę naukową, której celem jest zdefiniowanie nowych możliwości leczenia nowotworów. Ponieważ angiogeneza jest obecna w wielu procesach życiowych, przyszłe terapie oparte na hamowaniu patologicznej

angiogenezy mogą być stosowane również w przypadku chorób sercowo-naczyniowych, miażdżycy, reumatoidalnego zapalenia stawów, a także zwyrodnienia plamki związanej z wiekiem, retinopatii cukrzycowej, łuszczycy czy endometriozy.

Moje badania skupiam na następujących głównych kierunkach: (i) optymalizacji terapii wielolekowej w leczeniu nowotworów złośliwych, (ii) poszukiwaniu nowych celów biologicznych dla terapii celowanych w śródbłonek nowotworów, oraz (iii) wykorzystanie światła w pokonaniu oporności lekowej.

(i) Celem tego projektu jest znalezienie najbardziej optymalnej kombinacji leków anty-nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem długoterminowej skuteczności leczenia oraz niskiego poziomu działań ubocznych. Systematyczne poszukiwanie kombinacji wielolekowej o działaniu anty-angiogennym nie było dotychczas przeprowadzone. Co więcej, projekt ten będzie źródłem nowej wiedzy dotyczącej mechanizmów angiogenezy oraz skojarzonych terapii związanych za zahamowaniem wzrostu nowych naczyń krwionośnych.

(ii) Do tej pory, tylko bardzo ograniczona liczba badań dotyczyła profilu ekspresji ludzkich genów śródbłonka nowotworowego. Wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji, możliwe będzie wytypowanie bardziej szczegółowych i bardziej selektywnych markerów nowotworowych (komórek śródbłonka i samych komórek nowotworowych).

(iii) Niedawno wykazałam, że inhibitor kinazy tyrozynowej, sunitynib, który lokalizuje się w lizosomach komórki i po ich ekspozycji na działanie światła, powoduje natychmiastowe niszczenie lizosomów, uwalnianie sunitynibu do cytoplazmy i śmierć komórek. Wraz ze współpracownikami wysnułam hipotezę, że takie właściwości sunitynibu mogą być stosowane do zamykania naczyń krwionośnych. (Nowak-Śliwińska P i współ., *Photoactivation of cellular sunitinib causes vascular damage and tumor growth inhibition*, 2014, w przygotowaniu).

Podsumowując, całkowity *impact factor* **wszystkich moich publikacji naukowych** według *Journal Citation Reports* (JCR) wynosi **132,711** (luty 2014 r.),
liczba cytowań *Web of Science* (WoS) wynosi **269** (luty 2014 r.).
Mój Hirsch Index według *Web of Science* (WoS) wynosi **8** (luty 2014 r.).
Liczba publikacji przed otrzymaniem tytułu doktora wynosi **2**,
Liczba publikacji po otrzymaniu tytułu doktora wynosi **26**.
Liczba referatów to **23,** w tym **12** referatów wygłoszonych na zaproszenie.

Lozanna, 25 luty 2014

Dr Patrycja NOWAK-ŚLIWIŃSKA