

A U T O R E F E R A T

1. Imię i Nazwisko: **Agnieszka Siejka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1. Dyplom lekarza Nr Nr 14580/14493/2000, Akademia Medyczna w Łodzi

Łódź 7 września 2000 r. – dyplom z wyróżnieniem

2. Dyplom doktora nauk medycznych Nr 2495-42/05-L

Łódź, 4 października 2005 r. - dyplom z wyróżnieniem

promotor: prof. dr hab. n. med. Henryk Stępień

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Ocena wpływu somatoliberyny (GHRH) na uwalnianie angiogennych cytokin przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka w warunkach in vitro”

3. Dyplom specjalisty w dziedzinie chorób wewnętrznych Nr 0705/2007.2/244

Łódź, 14 listopada 2007 r., wynik bardzo dobry

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Klinika Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – od 2005 r.

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

ROLA SOMATOLIBERYNY (GHRH) I JEJ ANTAGONISTÓW W REGULACJI WZROSTU KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W WARUNKACH IN VITRO – ANALIZA WYBRANYCH MECHANIZMÓW DZIAŁANIA

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

1. **Siejka A**, Schally AV, Barabutis N. Activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway by growth hormone-releasing hormone. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 959-964; Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland (**IF z**

roku publikacji: 7,047; IF 2012: 6,57)

2. **Siejka A**, Schally AV, Block NL, Barabutis N. Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone Inhibit the Proliferation of Human Benign Prostatic Hyperplasia Cells. *Prostate* 2010; 70(10): 1087-1093, Wiley-Liss, Inc (**IF z roku publikacji: 3,377; IF 2012: 3,485)**)
3. **Siejka A**, Barabutis N, Schally AV. GHRH antagonist MZ-5-156 increases the expression of AMPK in A549 lung cancer cells. *Cell Cycle* 2011; 10(21): 3714-3718; Landes Bioscience (**IF z roku publikacji: 5,243; IF 2012: 5,359)**)
4. **Siejka A**, Barabutis N, Schally AV. GHRH antagonist inhibits focal adhesion kinase (FAK) and decreases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human lung cancer cells in vitro. *Peptides* 2012; 37(1): 63-68; Elsevier Inc (**IF z roku publikacji: 2,522; IF 2012: 2,434)**)
5. Barabutis N, **Siejka A**, Schally AV. Growth hormone releasing hormone induces the expression of nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* 2011; 15(5): 1148-1155; Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell Publishing Ltd (**IF z roku publikacji: 4,608; IF 2012: 4,125)**)
6. **Siejka A**, Lawnicka H, Melen-Mucha G, Motylewska E, Komorowski J, Stepień H. Antineoplastic action of growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonists. *Recent Patents in AntiCancer Drug Discovery* 2012; 7(1): 56-63; Bentham Science Publishers (**IF z roku publikacji: 2,7; IF 2012: 2,723)**)

Łączny Impact Factor prac zgłaszanych jako osiągnięcie - 25,497

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników.

Hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH, somatoliberyna)

Na istnienie czynnika uwalniającego hormon wzrostu po raz pierwszy wskazał Reichlin w 1961 roku. Autor ten wykazał, że obustronne uszkodzenie jądra brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza u szczurów powoduje zahamowanie ich wzrostu. Mimo wielu starań czynnik uwalniający hormon wzrostu został zidentyfikowany dopiero ponad 20 lat później. W 1982 pracujące niezależnie od siebie grupy naukowców, wyizolowały i scharakteryzowały dwie formy molekularne somatoliberyny (*growth hormone-releasing hormone*, GHRH): GHRH(1-40) – zbudowaną z 40 aminokwasów oraz GHRH(1-44) – zbudowaną z 44 aminokwasów. Peptydy te zostały wyizolowane po raz pierwszy nie z podwzgórza, ale z guza trzustki,

który wywołał objawy akromegalii. Hormon uwalniający hormon wzrostu został wyizolowany z podwzgórza dopiero rok później. GHRH(1-40) i GHRH(1-44) powstają w wyniku alternatywnego składowania (*splicing*) cząsteczki prekursorowej. Pełną aktywność biologiczną zachowuje N-końcowy 29-aminokwasowy fragment GHRH. GHRH wydzielany z guza trzustki i z podwzgórza stymuluje uwalnianie hormonu wzrostu (GH) z komórek somatotropowych przedniego płata przysadki ^{1, 2}.

GHRH należy do rodziny peptydów sekretyny i glukagonu (nadrodziny PACAP - *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*). Rodzina ta obejmuje dziewięć hormonów: GHRH, glukagon, peptyd glukagonopodobny typu 1 (*glucagon like peptide*, GLP-1), GLP-2, zależny od glukozy polipeptyd insulinotropowy (*glucose-dependent insulinotropic peptide*, GIP), peptyd histydyna - metionina (PHM), PACAP, sekretynę i wazoaktywny polipeptyd jelitowy (*vasoactive intestinal peptide*, VIP). Peptydy te charakteryzuje zbliżone rozmieszczenie w organizmie (zwłaszcza w obrębie mózgu i jelit), mechanizm działania (aktywują cyklazę adenylanową prowadząc do zwiększenia syntezy cyklicznego adenozynomonofosforanu - cAMP) i receptory (receptory posiadające siedem domen przezbłonowych) ^{1, 2}.

GHRH jest syntetyzowany w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), głównie w jądrach: łukowatym i brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza, a następnie uwalniany do krążenia wrotnego przysadki. Po związaniu się z receptorem w przysadce (*pituitary GHRH receptor* - pGHRHR) stymuluje syntezę i wydzielanie GH, a także wykazuje działanie mitogenne dla komórek przysadki. Niedobór sygnału GHRH (np. wskutek mutacji receptora) prowadzi do hipoplazji przysadki i niskorosłości. Wykazano, że neurony wytwarzające GHRH zlokalizowane są także w innych częściach OUN, co może sugerować neuromodulacyjne działanie GHRH, np. w procesach snu i czuwania czy też regulacji przyjmowania pokarmu.

Ekspresję GHRH wykazano także w innych tkankach organizmu, m.in. w jajniku, łożysku, jądrze, trzustce, gruczole krokowym, przewodzie pokarmowym i komórkach układu odpornościowego. Wykazanie ekspresji tego hormonu i jego receptorów poza układem przysadkowo-podwzgórzowym, w tym w komórkach nowotworowych, zapoczątkowało intensywne badania nad udziałem GHRH w onkogenezie ^{1, 2}.

GHRH w nowotworach

Istnieje wiele dowodów na udział GHRH i jego receptorów w procesie rozwoju nowotworów. Obecność mRNA dla GHRH wykazano w tkankach ludzkich

nowotworów (w tym w raku prostaty, piersi, jajnika, endometrium, kory nadnercza, trzustki). Ekspresję mRNA dla GHRH stwierdzono także w wielu liniach ludzkich komórek nowotworowych (w tym w komórkach linii: raka sutka, trzonu macicy, jajników, prostaty, trzustki, żołądka, jelita grubego, płuc (zarówno drobnokomórkowego [*small cell lung carcinoma*, SCLC] jak i niedrobnokomórkowego [*non-SCLC* - NSCLC]) oraz w guzach OUN, mięsakach, chłoniakach i raku nerki). Obecność GHRH (peptyd) wykazano najpierw w guzie neuroendokrynnym trzustki, a następnie wykryto także w innych nowotworach (w tym w: raku piersi, endometrium, jajnika, jelita grubego, trzustki, płuc (SCLC i NSCLC), chłoniakach) oraz w wielu liniach ludzkich komórek nowotworowych. Proliferacja *in vitro* komórek wielu linii nowotworowych jest stymulowana przez egzogenne GHRH, i odwrotnie, hamowana przez antagonistów GHRH lub surowice skierowane przeciwko GHRH. Obecność immunoreaktywnego i biologicznie aktywnego GHRH oraz mRNA dla GHRH w różnych nowotworach potwierdza hipotezę, że lokalnie produkowany GHRH może działać jako autokryny czynnik wzrostu tych nowotworów, a deregulacja transkrypcji genu *GHRH* może odgrywać rolę w patogenezie niektórych z nich^{1, 2}.

Receptory GHRH w nowotworach

Przysadkowy receptor GHRH (pGHRHR) należy do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (*G protein-coupled receptors*) i posiada siedem domen przezłonowych. Wykazuje znaczną homologię z receptorami VIP i kalcytoniny. Po przyłączeniu się GHRH do zewnątrzkomórkowego N-końcowego fragmentu dochodzi do aktywacji w komórce cykazy adenylanowej, wzrostu stężenia cAMP, aktywacji kinazy białkowej A i napływu jonów wapnia, co w efekcie prowadzi do zwiększenia wydzielania GH. Stwierdzono, że nasilenie proliferacji komórek somatotropowych przysadki pod wpływem GHRH odbywa się poprzez stymulację szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Ekspresja pGHRHR została wykazana m.in. w komórkach chłoniaka, glejaka i SCLC.

W 2000 Rekasi i wsp. w komórkach raka nerki wykazali ekspresję receptorów, które wiążą GHRH i antagonistyczne analogi tego peptydu. Wykazano, że receptory te powstają w trakcie modyfikacji potranskrypcyjnych mRNA dla pGHRHR (*splice variants* - SVs). Przeważająca część sekwencji cDNA dla SV1 jest identyczna z odpowiednią sekwencją cDNA dla pGHRHR, a różnica dotyczy pierwszych 334 nukleotydów w przypadku SV1. Przewidywana sekwencja białka GHRHR-SV1 różni

się od pGHRHR w N-końcowej domenie zewnątrzkomórkowej, w której to 25-aminokwasowa sekwencja zastępuje pierwsze 89 aminokwasów pGHRHR. Ekspresję SVs wykazano następnie w innych nowotworach (w tym w raku prostaty, jelita grubego, żołądka, trzustki, SCLC, NSCLC, raku piersi, jajnika, trzonu macicy, glejakach, mięsakiach i chłoniakach). Chopin i Herington potwierdzili ekspresję SVs w komórkach ludzkiego raka prostaty. Schulz i wsp., przy użyciu metod immunocytochemicznych, wykazali obecność receptorów GHRH w raku piersi, jajnika i prostaty. W metodzie Western Blot stwierdzano obecność białka o masie cząsteczkowej 40 kDa, co odpowiada SV1. Freddi i wsp. wykazali ekspresję SV1, SV2 i SV4 w komórkach ludzkiego raka kory nadnercza (podsumowane w: ^{1, 2}).

Antagoniści GHRH

Antagonistyczne analogi GHRH zostały pierwotnie zsyntezowane do leczenia zaburzeń związanych z nadmierną produkcją GH lub GHRH. Robberecht i wsp. wykazali w 1985 roku, że zastąpienie alaniny (Ala) przez D-argininę (D-Arg) w pozycji 2. w cząsteczce GHRH(1-29)NH₂ prowadzi do powstania antagonistów GHRH. Pierwszy standardowy antagonist silnie hamował uwalnianie GH u badanych szczurów. Ponadto antagonist ten obniżał o 30-40% stężenie GH u chorych z akromegalią w przebiegu ektopowego wydzielania GHRH.

Cząsteczka standardowego antagonisty (Ac-[Tyr¹, D-Arg²] GHRH(1-29)NH₂) posłużyła jako wzorzec do syntezy silniejszych antagonistycznych analogów GHRH, które zostały opracowane w celu potencjalnego leczenia nowotworów. Na potrzebę syntezy antagonistów GHRH wskazali Pollak i wsp. Wykazali oni, że analogi somatostatyny niewystarczająco hamują wydzielanie GH i IGF-I u pacjentów z nowotworami potencjalnie zależnymi od insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (*insulin-like growth factor*, IGF-I), sugerując konieczność poszukiwania innych leków. Działanie antyproliferacyjne antagonistów GHRH oceniano w wielu eksperymentalnych modelach ludzkich nowotworów *in vivo* oraz *in vitro*. Struktura chemiczna najczęściej badanych antagonistów GHRH została szczegółowo opisana w innym miejscu (*Siejka i wsp., Recent Patents in Anti-Cancer Drug Discovery, 2012, 7(1): 56-63* ¹).

Mechanizm działania antagonistów GHRH

Mechanizm działania antagonistów GHRH jest złożony i obejmuje pośredni i bezpośredni wpływ na komórki nowotworowe. Pośredni mechanizm hamowania

wzrostu guza przez antagonistów GHRH obejmuje ich wpływ na oś GH - IGF-I i wydaje się mieć istotne znaczenie w przypadku nowotworów IGF-I-zależnych (np. prostaty, piersi oraz raka jelita grubego). Insulinopodobne czynniki wzrostu (zarówno IGF-I, jak i IGF-II) uczestniczą w procesie transformacji nowotworowej komórek, stymulują wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów. Antagoniści GHRH, po związaniu z receptorem w obrębie przysadki blokują wiązanie GHRH z receptorem i aktywację sygnału wewnątrzkomórkowego (cAMP). Prowadzi to do zahamowania syntezy i uwalniania hormonu wzrostu, co w efekcie obniża wytwarzanie IGF-I w wątrobie. Jednakże, IGF-I i IGF-II mogą wpływać na wzrost nowotworów także za pośrednictwem mechanizmów autokrynych i/lub parakrynych. Wiadomo dzisiaj, że niektóre nowotwory wykazują ekspresję receptorów IGF, i odpowiadają zwiększeniem proliferacji w odpowiedzi na egzogenne IGF w warunkach *in vitro*. Antagoniści GHRH hamują syntezę IGF-I i IGF-II oraz ekspresję mRNA dla IGF-II w komórkach nowotworowych, a w niektórych nowotworach wykazano, że hamują oddziaływanie autokryne lokalnie wytwarzanego GHRH. Antagoniści GHRH wpływają także hamująco na procesy neoangiogenezy w guzach nowotworowych. Po raz pierwszy hamowanie wydzielania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) zostało wykazane w naszej pracy w 2003 r. (*Siejka i wsp. Life Sciences 2003; 72(22): 2473-9*³ i potwierdzone w kolejnych^{4, 5}. Ponadto wykazano, że w modelu doświadczalnym raka jajnika antagonistą GHRH (JMR-132) znacznie zmniejszała ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Antagoniści GHRH obniżają ekspresję białek antyapoptycznych (białka Bcl-2) i zwiększają pro-apoptotycznych (Bax) (podsumowano w:¹).

Niewiele wiadomo o mechanizmie działania bezpośredniego GHRH i antagonistycznych analogów tego hormonu w komórkach nowotworowych. Wiadomo, że zwiększona proliferacja komórek nowotworowych pod wpływem GHRH może mieć związek z aktywacją szlaku MAPK oraz z wpływem na ekspresję białek regulujących proces apoptozy. Biorąc pod uwagę złożoność szlaków przekąźnikowych uczestniczących w regulacji procesów wzrostowych, zasadnym wydało mi się poszukiwanie nowych, potencjalnych białek docelowych uczestniczących w onkogenezie, których aktywność może podlegać bezpośredniemu wpływowi GHRH i jego analogów.

Cel pracy

Celem pracy była analiza wpływu somatoliberyny (syntetyczny GHRH(1-29)NH₂) oraz antagonistów tego hormonu na wybrane szlaki przekazywania sygnałów uczestniczące w regulacji wzrostu komórek nowotworowych.

Materiały i metody

Do badań wykorzystano następujące ludzkie linie komórkowe: raka płuca A549, rakowiaka oskrzela H727, raka szyjki macicy HeLa oraz linię łagodnego rozrostu prostaty (*benign prostate hyperplasia*, BPH-1) (linię tę uzyskałam od prof. Simona Haywarda z Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA). Wszystkie badania prowadzono w warunkach *in vitro*. Do oceny proliferacji komórkowej użyto gotowe zestawy oceniające aktywność metaboliczną komórek (metoda Mosmanna); ponadto oceniano całkowitą liczebność komórek oraz ekspresję markerów proliferacji PCNA i Ki67. Do analizy ekspresji wybranych białek wewnątrzkomórkowych wykorzystywano metodę Western Blot.

Wyniki

Wykazano, że komórki badanych ludzkich linii nowotworowych (H727, A549, BPH-1) wykazują ekspresję receptorów GHRH. W przypadku linii BPH-1 ta ekspresja została stwierdzona po raz pierwszy w literaturze (*Siejka i wsp. Prostate 2010; 70(10): 1087-1093 - IF 3,377*⁶). Pod wpływem GHRH dochodziło do zwiększenia liczebności badanych komórek, a nasilenie proliferacji potwierdzono w oparciu o ekspresję białek PCNA lub Ki67. Antagonistyczne analogi GHRH (MZ-4-71, MZ-5-156, JMR-132) hamowały proliferację komórek H727, A549 i BPH-1. Nie wykazano zmian proliferacji komórek linii ludzkiego raka szyjki macicy HeLa po podaniu GHRH. W komórkach HeLa nie wykazano ekspresji receptora GHRH i w kolejnych badaniach traktowano je jako kontrolę negatywną.

W następnym etapie wyindukowano ekspresję pGHRHR oraz wariantu tego receptora powstającego wskutek alternatywnego składowania (SV1) w komórkach HeLa poprzez wprowadzenie plazmidowego genu *pGHRHR* oraz *SV1-GHRHR*. Ponownie oceniano wpływ GHRH na proliferację komórkową i obserwowano istotne zwiększenie liczebności tych komórek pod wpływem syntetycznego GHRH (*Barabutis, Siejka & Schally. J Mol Endocrinol 2010; 44:127-134*⁷).

W dalszym etapie prac rozpoczęto analizę wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych istotnych w procesach onkogenezy i angiogenezy.

Potwierdzono, że GHRH działając poprzez pGHRHR silnie pobudza aktywację szlaku MAPK, o którym wiadomo że uczestniczy w regulacji wzrostu komórkowego. Jednocześnie po raz pierwszy wykazano, że także oddziaływanie GHRH z receptorem SV1 prowadzi do fosforylacji kinazy ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) znacznie wcześniej i silniej w porównaniu do działania zachodzącego poprzez pGHRHR, co skutkuje istotnym nasileniem proliferacji (Barabutis, Siejka, Schally. *J Mol Endocrinol* 2010; 44:127-134 ⁷).

Poprzednie badania wykazały, że antagoniści GHRH hamują proliferację komórek ludzkiego raka prostaty (LNCaP) poprzez zmniejszenie ilości reaktywnych form tlenu, które uczestniczą w procesach wzrostu nowotworów i powstawaniu przerzutów ⁸. Liczni autorzy wskazywali ponadto na istotną zależność pomiędzy rozwojem zapalenia a powstawaniem nowotworów ⁹. Wiadomo, że kinazy Janus (*Janus kinase*, JAK) należą do receptorowych kinaz tyrozynowych, które są aktywowane przez cytokiny i czynniki wzrostu ¹⁰. W efekcie ich działania dochodzi do aktywacji dalszych przekaźników, którymi są białka STAT (*signal transducer and activator of transcription*), takie jak STAT3, który jest czynnikiem transkrypcyjnym. Fosforylacja STAT3 prowadzi w efekcie do aktywacji szeregu genów biorących udział w proliferacji komórek oraz genów czynników zapalnych i proangiogennych. Biorąc pod uwagę moje wcześniejsze badania nad wzajemnym oddziaływaniem pomiędzy układami neuroendokrynnym i odpornościowym, które wykazały, że GHRH pobudza wydzielanie cytokin prozapalnych i proangiogennych ^{11, 12, 13, 14}, postanowiłam zbadać wpływ GHRH i jego analogów na aktywację tego konkretnego szlaku sygnałowego (JAK-STAT). Wykazałam po raz pierwszy w literaturze, że GHRH stymuluje aktywację kinazy JAK2 i białka STAT3 w komórkach Hela, w których wyindukowano ekspresję receptora GHRH. Wyniki te zostały przedstawione w pracy, która została natychmiast przyjęta do publikacji (*Siejka i wsp. Cell Mol Life Sci* 2010; 67:959-964 – *IF 7,047* ¹⁵). W dalszych badaniach wykazałam ponadto, że antagonistą GHRH (JMR-132) zmniejsza ekspresję aktywnych białek szlaku JAK-STAT3 w komórkach BPH-1, co przekłada się na zahamowanie proliferacji komórek. Wyniki te zostały opublikowane w 2010 r. (*Siejka i wsp. Prostate* 2010; 70(10): 1087-1093 - *IF 3,377* ⁶).

Jednocześnie wykazano także, że somatoliberyna oraz analogi tego neurohormonu zmieniają nasilenie komórkowych procesów oksydo-redukcyjnych, których znaczenie w regulacji procesów wzrostowych jest powszechnie znane. Indukowana syntaza tlenku azotu (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) jest jednym z

trzech głównych enzymów generujących syntezę tlenku azotu (NO) z L-argininy. Powstający w ten sposób NO odgrywa ważną rolę w licznych procesach fizjologicznych (np. procesie gojenia ran) i patofizjologicznych (procesy zapalne, nowotwory, cukrzyca). iNOS odgrywa istotną rolę w procesie złośliwej transformacji komórek, angiogenezie i rozwoju przerzutów ¹⁶. Po raz pierwszy wykazano, że pod wpływem GHRH dochodzi do zwiększenia ekspresji syntazy tlenku azotu (iNOS), cyklooksygenazy (COX-2) poprzez aktywację szlaku MAPK oraz czynnika NF-kappaB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NFκB) w komórkach raka płuca A549. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Barabutis, **Siejka**, Schally. *J Cell Mol Med* 2011; 15:1148-1155 – IF 4,608 ¹⁷).

Z kolei analizowano wpływ GHRH i antagonisty GHRH (MZ-5-156) na ekspresję białek szlaku kinazy białkowej serynowo-treoninowej (Akt) i kinazy mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Białko mTOR odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów wzrostowych komórek nowotworowych. Aktywacja mTOR zachodzi m.in. pod wpływem działania białka Akt ¹⁸. Wyniki ostatnich lat wskazują, że kinaza aktywowana 5'-AMP (*AMP-activated protein kinase* - AMPK) hamuje aktywację mTOR prowadząc do zahamowania proliferacji komórkowej. AMPK odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu komórkowego i homeostazy energetycznej komórki w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, i jest obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu nowotworów. Aktywacja AMPK w warunkach eksperymentalnych prowadzi do zahamowania proliferacji i indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych ¹⁹. To hamujące działanie związane jest ze zmniejszeniem aktywności mTOR. Wiadomo, że białko p53 (tzw. „strażnik genomu”) ma wpływ na aktywność AMPK i szlaku Akt/mTOR. W pracy w *J Cell Mol Med* opublikowanej w 2011 r. ((Barabutis, **Siejka**, Schally. *J Cell Mol Med* 2011; 15:1148-1155 – IF 4,608 ¹⁷) wykazano, że w komórkach A549 antagonistą GHRH (MZ-5-156) zwiększa ekspresję p53. Zatem antagoniści GHRH mogą aktywować AMPK także pośrednio, przez komórkową akumulację p53. AMPK wpływa hamująco na procesy glukoneogenezy, syntezy glikogenu, lipidów i białek. Ze względu na swą centralną rolę w regulacji metabolizmu lipidów i glukozy, AMPK jest uważana także za kluczowy cel terapeutyczny w leczeniu otyłości, cukrzycy typu 2, i nowotworów. W komórkach raka płuca linii A549 wykazano po raz pierwszy, że pod wpływem antagonisty GHRH dochodzi do fosforylacji kinazy AMPK, do zmniejszenia ekspresji aktywnej formy białka mTOR oraz Akt, co przekłada się na zahamowanie proliferacji tych komórek i

redukcję ekspresji markera proliferacji Ki67. GHRH wykazywał działanie przeciwstawne. Nie obserwowano zmian ekspresji badanych białek w komórkach HeLa po zastosowaniu GHRH (*Siejka i wsp. Cell Cycle 2011; 10:3714-3718 – IF 5,243*²⁰).

Następnie oceniano zmiany ekspresji kinazy ogniskowo-adhezyjnej (*focal adhesion kinase* - FAK) pod wpływem antagonisty GHRH (MZ-5-156) w komórkach raka płuca (A549) oraz rakowiaka oskrzela (H727). FAK jest cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową o masie cząsteczkowej 125 kDa. Występuje ona w komórkach wytwarzających połączenia z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) lub z innymi komórkami. Nadrzędną funkcją FAK jest przekazywanie sygnału pochodzącego z receptorów integrynowych, biorących udział w adhezji, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek. Kinaza FAK odgrywa istotną rolę w wielu procesach zachodzących w komórkach. Białko to nasila proliferację komórkową, proces angiogenezy oraz inwazyjność komórek nowotworowych, m.in. poprzez stymulację metaloproteinaz²¹. Po raz pierwszy w piśmiennictwie wykazano, że pod wpływem antagonisty GHRH (MZ-5-156) dochodzi do zmniejszenia ekspresji aktywnej postaci kinazy FAK w badanych komórkach co wiązało się ze zmniejszeniem ekspresji metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9). Ponadto, potwierdzono hamujący wpływ antagonisty GHRH (MZ-5-156) na wydzielanie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) przez komórki raka płuca (A549) oraz rakowiaka oskrzela (H727). Z kolei GHRH pobudzał wydzielanie VEGF przez te komórki (*Siejka i wsp. Peptides 2012; 37:63-68 – IF 2,522*²²).

W oparciu o uzyskane wyniki sformułowano następujące wnioski:

1. Somatoliberyna pobudza wzrost badanych komórek *in vitro* oraz zwiększa ekspresję czynników uczestniczących w procesie angiogenezy i migracji komórkowej.
2. Antagonistyczne analogi GHRH wykazują działanie przeciwnowotworowe i antyangiogenne.
3. GHRH oraz antagonistyczne analogi tego hormonu zmieniają aktywność wybranych wewnątrzkomórkowych białek przekaźnictwa komórkowego o istotnej roli w regulacji wzrostu komórek nowotworowych i w procesie angiogenezy.
4. Antagonistyczne analogi GHRH mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii wybranych nowotworów.

Komentarz:

Przedstawione prace stanowią kontynuację dotychczasowych badań prowadzonych głównie przez grupę profesora Schally'ego, laureata Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 1977 r.

Nowatorstwo mojej pracy polega na:

1. wykazaniu, że GHRH poprzez oddziaływanie ze stwoistymi receptorami (pGHRHR) prowadzi do aktywacji szlaku JAK2-STAT3 przez co pobudza proliferację komórkową,
2. stwierdzeniu, że pod wpływem GHRH dochodzi do aktywacji kinazy FAK, co może odgrywać istotną rolę w migracji oraz adhezji komórkowej,
3. udowodnieniu, że w komórkach ludzkiego raka płuca A549 wykazujących ekspresję receptorów GHRH, peptyd ten (GHRH) zmniejsza aktywność kinazy AMP (AMPK) oraz pobudza mTOR,
4. wykazaniu ekspresji receptorów GHRH (GHRHR) w linii BPH-1 (ludzkiej linii łagodnego rozrostu prostaty)
5. stwierdzeniu zmian proliferacji komórek BPH-1 pod wpływem GHRH i antagonistów GHRH.

Wyniki przedstawionych prac zostały potwierdzone przez innych autorów i są obecnie coraz szerzej cytowane. Doniesienia na temat udziału GHRH i analogów tego peptydu nie ograniczają się aktualnie do badań w onkogenezie, ale dotyczą także innych procesów patofizjologicznych. Pierwsze doniesienia na temat korzystnego wpływu podawania GHRH na parametry układu sercowo-naczyniowego ukazały się w 2009 roku. Wykazano wtedy, że kardioprotekcyjne działanie GHRH *in vitro* było zależne od aktywacji białek ERK1/2 i PI3K/Akt²³. GHRH zmniejszał dysfunkcję lewej komory oraz obszar zawału u zwierząt doświadczalnych^{23, 24, 25}. W 2013 r. wskazano na istotną rolę jaką odgrywa aktywacja białek Jak/STAT3, AMPK oraz eNOS w kardioprotekcyjnym działaniu GHRH²⁶. Coraz szerzej wskazuje się na udział szlaku GHRH/GH/IGFs w regulacji wzrostu komórek gruczołu krokowego, szczególnie w odniesieniu do łagodnego rozrostu prostaty²⁷. Wykazano, że zastosowanie antagonisty GHRH (oddzielnie lub łącznie z analogiem GnRH) prowadziło do zmniejszenia objętości prostaty u zwierząt doświadczalnych^{28, 29}. Potwierdzono także hamujący wpływ antagonisty GHRH i GnRH na proliferację komórek BPH (ale także raka prostaty) w warunkach *in vitro*^{28, 29, 30, 31, 32}. Uważam, że w najbliższych latach

należy oczekiwać kolejnych doniesień wskazujących na istotne znaczenie GHRH i jego analogów także w innych zaburzeniach (ukazały się już pierwsze doniesienia wskazujące chociażby na udział tego peptydu i jego analogów w procesie neuroprotekcji i starzenia się^{33, 34, 35, 36, 37}).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Dane bibliometryczne (stan na dzień 10 września 2013 r.):

Jestem współautorem **28 oryginalnych publikacji**, w tym 19. w czasopismach z listy filadelfijskiej. Pięć z prac oryginalnych wchodzi w skład rozprawy habilitacyjnej (sumaryczny impact factor prac oryginalnych włączonych do pracy habilitacyjnej wynosi: 22,797). Jestem ponadto współautorem 5 prac poglądowych, 2 doniesień kazuistycznych, 1 doniesienia zjazdowego opublikowanego następnie w postaci pracy oryginalnej (Medimond, International Proceedings) oraz autorem lub współautorem 19 doniesień zjazdowych międzynarodowych i 18 doniesień zjazdowych krajowych.

Sumaryczny impact factor według roku publikacji wynosi **61,422** (w tym **35,978** przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne).

Suma punktów MNiSW za publikacje naukowe w czasopismach (bez suplementów) wynosi **529 punkty**, w tym **265** punktów przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne i kazuistyczne.

Cytowania: **109** według bazy ISI Web of Science, **148** według bazy Scopus). Indeks Hirscha wynosi **7**.

Tematyka pozostałych prac badawczych:

1. Rola angiotensyn w procesach wzrostowych kory nadnercza

W czasie Indywidualnego Toku Studiów odbywanego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Gabrieli Meleń-Muchy w latach 1998-2000, moje prace koncentrowały się nad badaniem wpływu angiotensyn (angiotensyny II, IV oraz antagonistów receptora angiotensyny typu 1) na procesy wzrostowe w nadnerczach. Badania te, prowadzone na modelu zwierzęcym (szczury Wistar), dotyczyły oceny zmian zachodzących pod wpływem tych substancji w komórkach kory nadnerczy u zwierząt poddanych zabiegowi gonadektomii. Wyniki tych badań, prezentowane były na Konferencjach Studenckich Kół Naukowych oraz zostały opublikowane w 2006 r. w *Journal of Physiology and Pharmacology*. Wykazano, że pod wpływem owariektomii dochodzi

do zmiany rozmieszczenia komórek BrDU-dodatnich (oceniano indeks wbudowywania BrDU – LI (*labeling index*) w porównaniu do zwierząt nie poddawanych gonadektomii. Zaobserwowano bowiem, że najwyższy wskaźnik LI był obecny w warstwie siateczkowej, a najniższy w warstwie kłębuszkowej kory nadnerczy. Angiotensyna IV istotnie zmniejszyła LI we wszystkich ocenianych warstwach kory nadnerczy, najsilniej jednak w warstwie siateczkowej i kłębuszkowej. Losartan (antagonista receptora angiotensyny typu 1, AT1R) częściowo odwracał działanie angiotensyny IV w warstwie siateczkowej. Co istotne, losartan niemal całkowicie odwrócił obserwowane zmiany w rozkładzie LI, które zostały wywołane poprzez owariektomię. Niespodziewanie, angiotensyna II nie zmieniała istotnie LI komórek kory nadnerczy u owariektomizowanych zwierząt, jednakże dodanie losartanu spowodowało istotne zmniejszenie LI w całej korze nadnerczy, przede wszystkim jednak w warstwie siateczkowej i kłębuszkowej, w porównaniu do zwierząt poddanych gonadektomii oraz tych, które otrzymywały angiotensynę II³⁸.

Z kolei oceniano wpływ testosteronu podawanego osobno lub łącznie z kaptoprylem na proliferację komórek kory nadnerczy u szczurów, samców szczepu Wistar, po orchidektomii. Zaobserwowano, że orchidektomia nie zmieniła znamienne proliferacji komórek kory nadnerczy, jednak nieznamiennie zwiększyła ją w całym przekroju i w warstwie siateczkowej. Testosteron obniżył proliferację komórek w całym przekroju kory nadnerczy u kastrowanych szczurów działając głównie na warstwę kłębuszkową. Łączne podanie testosteronu z kaptoprylem nie zmieniło znamienne wpływu samego testosteronu na proliferację komórek kory nadnerczy, jednak zaobserwowano, że dodanie kaptoprylu nieznamiennie podwyższyło proliferację w całym przekroju i w warstwie siateczkowej. Uzyskane wyniki wskazują na udział hormonów płciowych w regulacji wzrostu komórek kory nadnerczy. Nie można wykluczyć udziału układu renina-angiotensyna we wpływie tych hormonów na procesy wzrostowe nadnerczy³⁹.

2. Wzajemne oddziaływania pomiędzy układami neuroendokrynnym i immunologicznym

Podczas studiów doktoranckich pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Henryka Stępnia, badałam wzajemne oddziaływania zachodzące pomiędzy układem neuroendokrynnym i immunologicznym. Oceniałam wpływ GHRH i antagonistów tego neuropeptydu (MZ-4-71 i JV-1-36) na wydzielanie wybranych cytokin przez

ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) *in vitro*. W tym czasie została nawiązana współpraca z ośrodkiem profesora Andrew V. Schally'ego z Tulane University w Nowym Orleanie, Luizjana, USA. Wynikiem tej współpracy była praca wykazująca po raz pierwszy w literaturze hamujący wpływ antagonisty GHRH na wydzielanie VEGF przez komórki mysiego śródbłonna (HECa10). Została ona opublikowana w 2003 roku w *Life Sciences* ³. W 2008 r. w badaniu opublikowanym w *Cancer Letters* potwierdziliśmy, że antagonistą GHRH (JV-1-36) hamuje wzrost ludzkich komórek rakowiaka oskrzela (H727) i wydzielanie VEGF ⁴. Ponadto wykazano, że GHRH nasila proliferację komórek H727 oraz wydzielanie VEGF i chromograniny A z tych komórek ⁵.

Ponadto wykazano, że GHRH(1-44)NH₂ znacznie zwiększa wydzielanie IFN- γ z ludzkich PBMC, w porównaniu z grupą kontrolną. MZ-4-71 (antagonista GHRH) hamował wydzielanie tej cytokiny z PBMC w sposób zależny od dawki, ale statystycznie istotne różnice obserwowano jedynie dla najwyższych stężeń (najwyższe stężenie badane to 10⁻⁶M). GHRH był w stanie częściowo odwrócić działanie hamujące odpowiednich stężeń MZ-4-71 na wydzielanie IFN- γ . Wyniki te zostały przedstawione na konferencjach międzynarodowych, zostały nagrodzone prezentacją ustną na Kongresie Europejskiego Towarzystwa Endokrynologicznego w Lyonie w 2003 r. i opublikowane w *Neuropeptides* w 2004 roku ¹¹. GHRH(1-44)NH₂ nie zmieniał wydzielania interleukiny 6 (IL-6) i IL-8 z niepobudzanych lipopolisacharydem PBMC, jednak nieznacznie hamował wydzielanie IL-6 przez stymulowane PBMC (praca opublikowana w *Endocrine Regulations* w 2005 r. ¹³). GHRH(1-44)NH₂ również pobudzał wydzielanie IL-2 i rozpuszczalnego receptora IL-2 z PBMC stymulowanych fitohemaglutyniną (PHA) (opublikowane w *Endokrynologii Polskiej* w 2005 r. ¹²). GHRH i jego analogi zmieniały także wydzielanie TNF- α i IL-18 z PBMC (opublikowane *Reviews & Research in Biosciences* w 2007 r. ⁴⁰). Ponadto, GHRH zwiększał stężenie IL-17 w mediach pochodzących ze stymulowanych przez PHA hodowli komórek PBMC. Antagonista GHRH (JV-1-36) nie zmieniał wydzielania IL-17 w monoterapii, ale hamował wydzielanie IL-17 pobudzane podawaniem GHRH (praca opublikowana w *Neuroendocrinology Letters* w 2010 r. ¹⁴).

3. Regulacja procesów angiogenezy przez talidomid

We współpracy z Zakładami Nefropatologii oraz Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, oceniano wpływ talidomidu na procesy angiogenezy w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Badania te zostały opublikowane

w *Life Sciences* – dwukrotnie w 2006 r. W modelu *in vitro* komórek śródbłonka EA.hy 926 oceniano wpływ talidomidu na migrację, tworzenie naczyń włosowatych i adhezję komórek oraz wydzielanie VEGF. Podawanie talidomidu zmniejszyło wydzielanie VEGF z 72-godzinnej hodowli komórkowej. W "wound healing assay" talidomid w stężeniu 0,01 μM nasilał a w stężeniu 10 μM hamował migrację komórek w stosunku do kontroli (24-godzinne hodowle komórkowe). Podanie talidomidu w stężeniach 0,01 μM i 10 μM nasiliło adhezję komórek do kolagenu w 24-godzinnych hodowlach komórkowych w porównaniu z kontrolą, ale nie miało żadnego wpływu na adhezję do fibronektyny. Ponadto podawanie talidomidu hamowało tworzenie kapilar ⁴¹.

Zbadano także wpływ talidomidu na wydzielanie prolaktyny (PRL) i VEGF, proliferację, apoptozę i angiogenezę w przednim płacie przysadki w modelu guzów prolaktynowych indukowanych długotrwałym podawaniem dietylstilbestrolu (DES) osobnikom płci żeńskiej szczurów szczepu Fisher (F344). Stwierdzono, że DES istotnie zwiększał stężenia PRL i VEGF. Podawanie zwierzętom F344 talidomidu przez ostatnie 15 dni hamowało pobudzający wpływ DES-u na wydzielanie PRL i VEGF. Ponadto obserwowano zmniejszenie liczby PCNA-dodatnich komórek i wzrost apoptozy ocenianej metodą TUNEL. Gęstość naczyń włosowatych w obrębie przysadki oceniano immunohistochemicznie poprzez obecność CD-31-pozytywnych naczyń krwionośnych – obserwowano zahamowanie tworzenia naczyń po podaniu talidomidu. Ponadto, talidomid hamował proliferację komórek, wydzielanie prolaktyny i VEGF przez komórki *prolactinoma* w hodowli *in vitro* ⁴².

4. Rola GnRH i antagonisty GnRH (Cetrorelix) w regulacji wzrostu komórek prostaty (BPH) – analiza wybranych mechanizmów działania

Podczas pobytu w Miller School of Medicine, University of Miami oraz Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute, Veterans Affairs Medical Center w Miami oceniałam wpływ antagonisty gonadoliberyny (GnRH) na wzrost komórek łagodnego rozrostu prostaty (BPH). Dzięki uprzejmości dr Simona Hayward'a z Vanderbilt University w Tennessee w USA uzyskałam linię komórek BPH-1. Komórki te wszczepione podskórnym myszom bezgrasiczym nie tworzą guzów, zatem badania zostały ograniczone do badań w warunkach *in vitro*. Po raz pierwszy wykazano, że komórki BPH-1 wykazują ekspresję receptorów GnRH. Cetrorelix (antagonista GnRH) hamował proliferację komórek BPH-1, zmniejszał ekspresję białka PCNA. Cetrorelix znamienne odwracał także pobudzający wpływ czynników wzrostu (FGF-2, IGF-I, IGF-II). Cetrorelix zmniejszał również ekspresję receptorów GnRH i EGF, jak i

receptorów $\alpha 1_A$ -adrenergicznych, oraz hamował aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT3. Wyniki te zostały opublikowane w *BJU International* w 2010 roku ⁴³.

Wiadomo, że komórki podścieliska (*stromal cells*) ściśle kontrolują różnicowanie prawidłowych komórek nabłonkowych gruczołu krokowego i że w BPH dochodzi do istotnego zwiększenia odsetka komórek podścieliska w porównaniu do komórek nabłonka prostaty. W kolejnej pracy (opublikowanej w *Hormone and Metabolic Research* w 2013 r. ⁴⁴) dokonano oceny wzajemnego wpływu medium hodowlanego (*conditioned medium* - CM) pochodzącego z hodowli komórek linii WPMY-1 (myofibroblast prostate cell line) oraz z hodowli komórek BPH-1 na proliferację drugiej linii (odpowiednio). Ponadto zbadano wpływ podawania antagonisty GnRH (Cetrorelix). Oceniano ekspresję PCNA i p53 w tych komórkach pod wpływem antagonisty GnRH (Cetrorelix) oraz wzajemne oddziaływanie CM i wybrane mechanizmy działania. CM z hodowli komórek WPMY-1 silnie pobudzał proliferację komórek BPH-1 w sposób zależny od dawki, a CM z komórek BPH-1 zwiększał tylko nieznacznie proliferację komórek WPMY-1. Cetrorelix hamował proliferację obu linii komórkowych oraz zmniejszał ekspresję PCNA, podczas gdy ekspresja p53 była wyższa. Cetrorelix hamował także proliferację komórek BPH-1 poddanych działaniu CM pochodzącego z hodowli komórek WPMY-1. CM pochodzące z hodowli komórek obu linii zwiększały ekspresję aktywnych (fosforylowanych) białek ERK 1/2 i STAT3.

5. Rola greliny w regulacji procesów wzrostowych

W 2005 roku opublikowałam dwie prace pogładowe dotyczące wpływu greliny na czynność układu sercowo-naczyniowego oraz regulacji metabolizmu glukozy ^{45, 46}. Kilka lat później, we współpracy z dr n. med. Joanną Połowinczak-Przybyłek i prof. dr hab. n. med. Gabrielą Meleń-Muchą oceniano wpływ dwóch form greliny: acylowanej (*acylated ghrelin*, AG) i nieacylowanej (*unacylated ghrelin*, hUAG), oraz antagonisty receptora ghreliny typu 1 (*growth hormone secretagogues receptor*, GHS-R1a) na proliferację komórek mysiego śródbłonna (HECa10). Grelinę zastosowano oddzielnie lub razem z D-Lys3-GHRP-6, który jest powszechnie stosowany jako antagonist GHS-R1a. Proliferację HECa10 oceniano metodą Mosmanna oraz w wybranych warunkach także metodą BrdU i TUNEL. Zarówno hAG i hUAG hamowały wzrost komórek HECa10. Podobnie, szczurza AG zmniejszała proliferację komórek. Nieoczekiwanie, D-Lys3-GHRP-6 sam również hamował proliferację tych komórek. D-Lys3-GHRP-6 nie zmienił hamującego działania rAG. Jednakże, D-Lys3-GHRP-6

zmniejszał, znosił lub wręcz odwracał hamujące działanie hUAG w hodowli 72-godzinnej. Wyniki zostały opublikowane w *Peptides* w 2012 r.⁴⁷

6. Prace kliniczne

A. Przeprowadzone w Klinice Endokrynologii

- i. Długoterminowy wpływ pionowej plastyki żołądka (*vertical banded gastroplasty*, VBG) na stężenie leptyny, rozpuszczalnego receptora leptyny, greliny, omentyny-1, obestatyny i białka wiążącego retinol 4 (*retinol binding protein*, RBP4) u pacjentów z otyłością patologiczną⁴⁸
 - a) Po zabiegu obserwowano istotne zmniejszenie masy ciała, BMI i obwodu talii. Średnia redukcja masy ciała osiągnęła 42,4 kg po 12 miesiącach. Obserwowano zmniejszenie nasilenia zmian metabolicznych. Istotnie obniżyło się stężenie glukozy na czczo, insuliny i triglicerydów, a także wskaźnika insulinooporności HOMA. Stężenie cholesterolu HDL istotnie wzrosło po VBG. Ponadto, stwierdzono obniżone stężenie leptyny, oraz zwiększone stężenie greliny i rozpuszczalnego receptora leptyny.
- ii. Infliksymab w leczeniu orbitopatii tarczycowej⁴⁹
 - a) Po raz pierwszy w Polsce zastosowano monoklonalne przeciwciało anti-TNF- α (infliksymab) u pacjentki z orbitopatią Gravesa i Basedowa. Pojedyncza dawka leku spowodowała znaczne zmniejszenie nasilenia stanu zapalnego i poprawę ostrości widzenia.
- iii. Zmiany osoczowych stężeń niektórych białek pochodnych tkanki tłuszczowej oraz kostnej u pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu (*growth hormone deficiency*, GHD) o różnej etiologii^{50, 51}
 - a) Badaniem objęto 44 pacjentów z GHD o początku w wieku dojrzałym (*adult onset*, AO-GHD), 12 pacjentów o początku w dzieciństwie (*childhood onset*, CO-GHD) i 11 pacjentów bez GHD stanowiących grupę kontrolną. W grupie CO-GHD obserwowano zgodnie z oczekiwaniami najniższe stężenia IGF-1. BMI był istotnie wyższy w grupach z GHD w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie leptyny było istotnie wyższe w grupie mężczyzn z AO-GHD w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast stężenie osteoprotegeryny istotnie wyższe w grupie AO-GHD niż w CO-GHD.

- iv. II/III faza badań klinicznych poświęconych efektom niektórych nowych preparatów hormonu wzrostu podawanych raz w tygodniu (ARX201601, LB03002) dorosłym pacjentom z GHD.

B. Przeprowadzone w trakcie odbywania specjalizacji w Klinice Diabetologii i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

- i. Ocena skuteczności fosfomycyny i nitrofurantoiny w leczeniu zakażeń dróg moczowych (*urinary tract infections*, UTI) u pacjentów z cukrzycą, w tym ocena skuteczności tych leków w zapobieganiu nawrotom UTI^{52, 53}.

- a) Do pierwszego z badań zakwalifikowano kobiety w wieku 50-70 lat, u których stwierdzono w posiewie moczu bakterie wrażliwe na nitrofurantoinę i kotrimoksazol. Porównano skuteczność obu leków nie stwierdzając istotnych różnic (9 miesięcy leczenia i 3 miesiące dalszej obserwacji).

- b) Drugie badanie miało na celu porównanie skuteczności fosfomycyny i nitrofurantoiny w leczeniu i zapobieganiu nawrotom UTI. Fosfomycyna okazała się równie skuteczna jak nitrofurantoina w leczeniu infekcji dróg moczowych u chorych na cukrzycę. Obserwowano także podobny odsetek nawrotów w badanych grupach.

- ii. Odtworzenie pierwszej fazy wydzielania insuliny i przełamywanie wtórnej nieskuteczności glimepirydu poprzez doposiłkowe wstrzyknięcia insuliny^{54, 55}.

Doposiłkowe podskórne podawanie niewielkich dawek insuliny lispro przez pięć dni spowodowało poprawę wrażliwości na insulinę i prowadziło do zwiększenia wydzielania proinsuliny, insuliny i peptydu C (ocenianych w trakcie dożylnego testu tolerancji glukozy (*intravenous insulin tolerance test*, IVGTT). Wszyscy pacjenci poddani temu leczeniu od szóstego dnia powracali do leczenia glimepirydem. Po trzech miesiącach ponownie przeprowadzano IVGTT i u większości (59,1 %) nie stwierdzano nawrotu oporności na glimepiryd.

- iii. Bezpieczeństwo różnych metod intensywnej insulinoterapii stosowanych w warunkach szpitalnych z oceną częstości i długości hipoglikemii przy pomocy systemu ciągłego monitorowania poziomu glukozy (*continuous*

glucose monitoring system, CGMS)⁵⁶.

Pacjenci, którzy dotychczas byli leczeni metodą konwencjonalnych wstrzyknięć (insulina dwa razy dziennie), zostali przydzieleni do trzech grup: MDI (wielokrotnych wstrzyknięć insuliny), CSII (ciągłego podskórnego wlewu insuliny) i IVII (ciągłego dożylnego wlewu insuliny). Średnia częstość objawowych hipoglikemii wykrytych z CGMS była dwa razy wyższa dla MDI niż dla IVII i CSII. Liczba bezobjawowych hipoglikemii wykrytych w CGMS była wyższa w grupie MDI w porównaniu do IVII i CSII, ale różnice te nie były istotne statystycznie. Średni czas trwania jednego bezobjawowego przypadku hipoglikemii wykrytego w CGMS był dłuższy w grupie MDI niż CSII.

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

Piśmiennictwo

¹ Siejka A, Lawnicka H, Melen-Mucha G, Motylewska E, Komorowski J, Stepień H. Antineoplastic action of growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonists. *Recent Patents in AntiCancer Drug Discovery* 2012; 7(1): 56-63

² Schally AV, Varga JL, Engel JB. Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Jan;4(1):33-43.

³ Siejka A, Lawnicka H, Komorowski J, Schally AV, Stepień T, Krupinski R, Stepień H. GH-RH antagonist (MZ-4-71) inhibits VEGF secretion and proliferation of murine endothelial cells. *Life Sciences* 2003; 72(22): 2473-9

⁴ Sacewicz M, Lawnicka H, Siejka A, Stepień T, Krupinski R, Komorowski J, Stepień H. Inhibition of proliferation, VEGF secretion of human neuroendocrine tumor cell line NCI-H727 by an antagonist of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) in vitro. *Cancer Letters.* 2008; 268(1): 120-128.

⁵ Stepień T, Sacewicz M, Lawnicka H, Krupinski R, Komorowski J, Siejka A, Stepień H. Stimulatory effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH(1-29)NH₂) on the proliferation, VEGF and chromogranin A secretion by human neuroendocrine tumor cell line NCI-H727 in vitro. *Neuropeptides.* 2009; 43(5): 397-400.

⁶ Siejka A, Schally AV, Block NL, Barabutis N. Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone Inhibit the Proliferation of Human Benign Prostatic Hyperplasia Cells. *Prostate* 2010; 70(10): 1087-1093

⁷ Barabutis N, Siejka A, Schally AV, Block NL, Cai R, Varga JL. Activation of mitogen-activated protein kinases by a splice variant of GHRH receptor. *J Mol Endocrinol* 2010; 44(2): 127-134

⁸ Barabutis N, Schally AV. Antioxidant activity of growth hormone-releasing hormone antagonists in LNCaP human prostate cancer line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 23;105(51):20470-5

⁹ Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):715-23.

¹⁰ Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2008 Mar;33(3):122-31.

¹¹ Siejka A, Lawnicka H, Komorowski J, Stepień T, Krupinski R, Stepień H. Effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and GHRH antagonist (MZ-4-71) on interferon-gamma secretion from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Neuropeptides.* 2004; 38(1): 35-9

-
- ¹² Siejka A, Stepień T, Lawnicka H, Krupinski R, Komorowski J, Stepień H. Evaluation of the effect of GHRH(1-44)NH₂ on the secretion of interleukin-2 (IL-2) and soluble IL-2 receptor alpha (sIL-2Ralpha) from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Endokrynologia Polska (Polish Journal of Endocrinology)*. 2005; 56(5): 773-8
- ¹³ Siejka A, Stepień T, Lawnicka H, Krupinski R, Komorowski J, Stepień H. Effect of the growth hormone-releasing hormone [GHRH(1-44)NH₂] on IL-6 and IL-8 secretion from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Endocrine Regulations* 2005; 39(1): 7-11
- ¹⁴ Stepień T, Lawnicka H, Komorowski J, Stepień H, Siejka A. Growth Hormone-Releasing Hormone stimulates the secretion of interleukin 17 from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Neuroendocrinology Letters* 2010; 31(6): 852-856
- ¹⁵ Siejka A, Schally AV, Barabutis N. Activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway by growth hormone-releasing hormone. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 959-964
- ¹⁶ Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2003 Apr 15;34(8):955-68.
- ¹⁷ Barabutis N, Siejka A, Schally AV. Growth hormone releasing hormone induces the expression of nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* 2011; 15(5): 1148-1155
- ¹⁸ Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal*. 2009 May;21(5):656-64.
- ¹⁹ Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochem Soc Trans*. 2011 Jan;39(1):1-13.
- ²⁰ Siejka A, Barabutis N, Schally AV. GHRH antagonist MZ-5-156 increases the expression of AMPK in A549 lung cancer cells. *Cell Cycle* 2011; 10(21): 3714-3718
- ²¹ Totoń E, Rybczyńska M. The characteristics of focal adhesion kinase (FAK) and its role in carcinogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007 May 16;61:303-9.
- ²² Siejka A, Barabutis N, Schally AV. GHRH antagonist inhibits focal adhesion kinase (FAK) and decreases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human lung cancer cells in vitro. *Peptides* 2012; 37(1): 63-68
- ²³ Granata R, Trovato L, Gallo MP, Destefanis S, Settanni F, Scarlatti F, Brero A, Ramella R, Volante M, Isgaard J, Levi R, Papotti M, Alloatti G, Ghigo E. Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovascular Research* (2009) 83, 303–312
- ²⁴ Kanashiro-Takeuchi RM, Tziomalos K, Takeuchi LM, Treuer AV, Lamirault G, Dulce R, Hurtado M, Song Y, Block NL, Rick F, Klukovits A, Hu Q, Varga JL, Schally AV, Hare JM. Cardioprotective effects of growth hormone-releasing hormone agonist after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 2604–2609
- ²⁵ Kanashiro-Takeuchi RM, Takeuchi LM, Rick FG, Dulce R, Treuer AV, Florea V, Rodrigues CO, Paulino EC, Hatzistergos KE, Selem SM, Gonzalez DR, Block NL, Schally AV, Hare JM. Activation of growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor stimulates cardiac reverse remodeling after myocardial infarction (MI). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(2):559-63.
- ²⁶ Penna C, Settanni F, Tullio F, Trovato L, Pagliaro P, Alloatti G, Ghigo E, Granata R. GH-releasing hormone induces cardioprotection in isolated male rat heart via activation of RISK and SAFE pathways. *Endocrinology*. 2013 Apr;154(4):1624-35.
- ²⁷ Rick FG, Saadat SH, Szalontay L, Block NL, Kazzazi A, Djavan B, Schally AV. Hormonal manipulation of benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol*. 2013 Jan;23(1):17-24
- ²⁸ Rick FG, Szalontay L, Schally AV, Block NL, Nadji M, Szepeshazi K, Vidaurre I, Zarandi M, Kovacs M, Rekasi Z. Combining growth hormone-releasing hormone antagonist with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist greatly augments benign prostatic hyperplasia shrinkage. *J Urol*. 2012 Apr;187(4):1498-504. doi: 10.1016/j.juro.2011.11.081
- ²⁹ Rick FG, Schally AV, Block NL, Nadji M, Szepeshazi K, Zarandi M, Vidaurre I, Perez R, Halmos G, Szalontay L. Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) reduce prostate size in experimental benign prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1;108(9):3755-60
- ³⁰ Rick FG, Schally AV, Block NL, Halmos G, Perez R, Fernandez JB, Vidaurre I, Szalontay L. LHRH antagonist Cetrorelix reduces prostate size and gene expression of proinflammatory cytokines and growth factors in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2011 May 15;71(7):736-47
- ³¹ Rick FG, Schally AV, Szalontay L, Block NL, Szepeshazi K, Nadji M, Zarandi M, Hohla F, Buchholz S, Seitz S. Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit growth of androgen-independent prostate cancer through inactivation of ERK and Akt kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):1655-60.
- ³² Rick FG, Schally AV, Block NL, Abi-Chaker A, Krishan A, Szalontay L. Mechanisms of synergism between antagonists of growth hormone-releasing hormone and antagonists of luteinizing

hormone-releasing hormone in shrinking experimental benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2013 Jun;73(8):873-83.

³³ Friedman SD, Baker LD, Borson S, Jensen JE, Barsness SM, Craft S, Merriam GR, Otto RK, Novotny EJ, Vitiello MV. Growth hormone-releasing hormone effects on brain γ -aminobutyric acid levels in mild cognitive impairment and healthy aging. *JAMA Neurol*. 2013 Jul;70(7):883-90.

³⁴ Jaszberenyi M, Rick FG, Szalontay L, Block NL, Zarandi M, Cai RZ, Schally AV. Beneficial effects of novel antagonists of GHRH in different models of Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*. 2012 Nov;4(11):755-67.

³⁵ Baker LD, Barsness SM, Borson S, Merriam GR, Friedman SD, Craft S, Vitiello MV. Effects of growth hormone-releasing hormone on cognitive function in adults with mild cognitive impairment and healthy older adults: results of a controlled trial. *Arch Neurol*. 2012 Nov;69(11):1420-9.

³⁶ Banks WA, Morley JE, Farr SA, Price TO, Ercal N, Vidaurre I, Schally AV. Effects of a growth hormone-releasing hormone antagonist on telomerase activity, oxidative stress, longevity, and aging in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(51): 22272-7

³⁷ Nair D, Ramesh V, Li RC, Schally AV, Gozal D. Growth hormone releasing hormone (GHRH) signaling modulates intermittent hypoxia-induced oxidative stress and cognitive deficits in mouse. *J Neurochem*. 2013 Jul 2. doi: 10.1111/jnc.12360. [Epub ahead of print]

³⁸ Siejka A, Melen-Mucha G, Mucha SA, Pawlikowski M. Angiotensins II and IV modulate adrenocortical cell proliferation in ovariectomized rats. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57(3): 451-61

³⁹ Siejka A, Meleń-Mucha G. Wpływ testosteronu podawanego osobno lub łącznie z kaptoprylem na proliferację komórek kory nadnerczy u szczurów po orchidektomii. *Streszczenia XVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, Warszawa 2002*

⁴⁰ Siejka A, Komorowski J, Lawnicka H, Stepień T, Krupinski R, Stepień H. Effect of GHRH and its analogs on the secretion of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Res Rev Biosci* 2007; 1 (1): 1-7

⁴¹ Komorowski J, Jerczynska H, Siejka A, Baranska P, Lawnicka H, Pawlowska Z, Stepień H.. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. *Life Sciences* 2006; 78(22): 2558-63.

⁴² Stepień H, Lawnicka H, Mucha S, Wagrowska-Danilewicz M, Stepień B, Siejka A, Komorowski J. Inhibitory effect of thalidomide on the growth, secretory function and angiogenesis of estrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats. *Life Sciences*. 2006; 79(18): 1741-8.

⁴³ Siejka A, Schally AV, Block NL, Barabutis N. Mechanisms of inhibition of human benign prostatic hyperplasia in vitro by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetorelix. *BJU Int* 2010; 106(9): 1382-88

⁴⁴ Siejka A, Schally AV, Barabutis N. The effect of LHRH antagonist Cetorelix in crossover conditioned media from epithelial (BPH-1) and stromal (WPMY-1) prostate cells. *Horm Metab Res* 2013, Jul 9, doi: 10.1055/s-0033-1349127 (IF 2012: 2,145)

⁴⁵ Siejka A, Ruxer J, Loba J. Ghrelin - role in energy homeostasis and glucose metabolism. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw*. 2005 Mar; 11(3): 181-5.

⁴⁶ Ruxer J, Siejka A, Loba J. Ghrelin: a new perspective in cardiology? *Folia Cardiologica* 2005; 12: 531-537

⁴⁷ Polowinczak-Przybyłek J, Siejka A, Melen-Mucha G. D-Lys3-GHRP-6 antagonizes the effect of unacylated but not of acylated ghrelin on the growth of HECa10 murine endothelial cells. *Peptides* 2012;38: 248-254

⁴⁸ Siejka A, Jankiewicz-Wika J, Kolomecki K, Cywinski J, Piestrzeniewicz K, Swietoslowski J, Stepień H, Komorowski J. Long-term impact of vertical banded gastroplasty (VBG) on plasma concentration of leptin, soluble leptin receptor, ghrelin, omentin-1, obestatin, and retinol binding protein 4 (RBP4) in patients with severe obesity. *Cytokine* 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.07.026>

⁴⁹ Komorowski J, Jankiewicz-Wika J, Siejka A, Lawnicka H, Klysik A, Gos R, Majos A, Stefanczyk L, Stepień H. Monoclonal anti-TNF α antibody (infliximab) in the treatment of patient with thyroid associated ophthalmopathy. *Klin Oczna*. 2007 Oct; 109(10-12): 457-460

⁵⁰ Mucha SA, Siejka A, Komorowski J. Analiza stężeń hormonów tkanki tłuszczowej i białek pochodzenia kostnego u chorych z niedoborem hormonu wzrostu. *XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, Poznań 27-29 września 2012 r – Endokrynologia Polska 2012; 63, Supl A*

⁵¹ Mucha SA, Siejka A, Komorowski J. Changes in blood levels of some adipose- and bone-related proteins in patients with Growth Hormone Deficiency of different origins. *15th Congress of the European Neuroendocrine Association, ENEA 2012, September 12-15, 2012, Vienna, Austria*

⁵² Ruxer J, Mozdzan M, Siejka A, Loba J, Markuszewski L. (2006, June 1). Fosfomicyn and nitrofurantoin in the treatment of recurrent urinary tract infections in type 2 diabetic women: a preliminary report. *Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna* 2006; 6: 277-282

⁵³ Mozdzan M, Ruxer J, Siejka A, Loba J, Markuszewski L. Efficacy of nitrofurantoin in the treatment of chronic urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pol Merkur Lekarski*. 2006; 21(125): 434-438

⁵⁴ Ruxer J, Mozdzan M, Siejka A, Pińkowski D, Sosnowska-Woźniak U, Markuszewski L, Loba J. Effects of breaking the secondary failure of glimepiride with insulin prandial boluses - preliminary report. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2006; 6: 29-34

⁵⁵ Ruxer J, Mozdzan M, Siejka A, Pińkowski D, Wozniak-Sosnowska U, Markuszewski L, Loba J. (2006, June 1). The restitution of the first phase of insulin secretion in patients with poorly-controlled type 2 diabetes treated with high doses of glimepiride. *Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna* 2006; 6: 206-212

⁵⁶ Mozdzan M, Ruxer J, Loba J, Siejka A, Markuszewski L. Safety of various methods of intensive insulin therapy in hospital condition assessed by hypoglycaemic episodes detected with the use of continuous glucose monitoring system. *Adv Med Sci*. 2006; 51(1): 133-136

Agnieszka Siejka