

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu



Hanna Szaefer

Załącznik 2

Autoreferat

Poznań 2016

1. Imię i nazwisko: Hanna Szaefer

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej:

Dyplom mgr analityki medycznej; Wydział Farmaceutyczny Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej w Poznaniu, 1993 r., praca magisterska pt. „Wpływ roślinnych pochodnych flawonoidowych na metabolizm granulocytów”

Dyplom specjalizacji I stopnia z analityki klinicznej; 1996 r., Poznań

Dyplom z wyróżnieniem dr nauk farmaceutycznych; Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Poznaniu, 2001 r., rozprawa doktorska pt. „Roślinne związki fenolowe jako modulatory procesów związanych z indukcją kancerogenezy w naskórku myszy”, promotor prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1993 - 2001 Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Zakład Biochemii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu - pracownik naukowo-dydaktyczny - asystent

2001 – 2005 Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Zakład Biochemii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu - asystent z doktoratem

2005 – 2013 Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu – adiunkt

2013 – nadal Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu – starszy wykładowca – pracownik dydaktyczny

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:

„Cytochrom P450 - cel oddziaływania chemicznych kancerogenów i antykancerogenów oraz strategii chemoprewencyjnych”

Podstawą ubiegania się o tytuł dr habilitowanego stanowi cykl 10 publikacji (8 oryginalnych i 2 pogładowe), w których przedstawiono wyniki badań dotyczących oddziaływania kancerogenów na cytochromy P450 oraz związków roślinnych, które mogą modulować ich działanie, a tym samym być wykorzystane w chemoprewencji nowotworów.

b) wykaz publikacji:

1. **Szafer H.**, Jodynis-Liebert J., Cichocki M., Matuszewska A., Baer-Dubowska W. (2003) Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by *o*-toluidine. *Toxicology* 186, 67-77.

IF=2.061; Punktacja KBN/MNiSW=11

2. **Szafer H.**, Krajka-Kuźniak V., Baer-Dubowska W. (2008) The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols. *Toxicology* 251, 28-34.

IF=2.836; Punktacja KBN/MNiSW=32

3. **Szafer H.**, Krajka-Kuźniak V., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. (2011) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice modulates 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced hepatic but not mammary gland phase I and II enzymes in female rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 339-346.

IF=1.469; Punktacja KBN/MNiSW=20

4. **Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. (2014) Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female Sprague-Dawley rats. *Phytother. Res.* 28, 55-61.

IF=2.660; Punktacja KBN/MNiSW=25

5. **Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V., Ignatowicz I., Adamska T., Markowski J., Baer-Dubowska W. (2014) The effect of cloudy apple juice on hepatic and mammary gland phase I and II enzymes induced by DMBA in female Sprague-Dawley rats. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 472-479.

IF=1.233; Punktacja KBN/MNiSW=15

6. **Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V., Bartoszek A., Baer-Dubowska W. (2012) Modulation of carcinogen metabolizing cytochromes P450 in rat liver and kidney by cabbage and sauerkraut juices: Comparison with the effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate. *Phytother. Res.* 26, 1148-1155.

IF= 2.068; Punktacja KBN/MNiSW=25

7. **Szaefer H.**, Licznarska B., Krajka-Kuźniak V., Bartoszek A., Baer-Dubowska W. (2012) Modulation of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 expression by cabbage juices and indoles in human breast cell lines. *Nutr. Cancer* 64, 879-888.

IF= 2.695; Punktacja KBN/MNiSW=30

8. **Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V., Licznarska B., Bartoszek A., Baer-Dubowska W. (2015) Cabbage juices and indoles modulate the expression profile of AhR, ER α , and Nrf2 in human breast cell lines. *Nutr. Cancer* 67, 1342-1354.

IF=2.322; Punktacja KBN/MNiSW=25

9. Baer-Dubowska W., **Szaefer H.** (2013) Modulation of carcinogen-metabolizing cytochromes P450 by phytochemicals in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 927-941.

IF=2.934; Punktacja KBN/MNiSW=30

10. **Szaefer H.**, Cichocki M., Majchrzak-Celińska A. (2013) Nowe cytochromy P450 jako biomarkery i potencjalne cele oddziaływania w chemioprewencji i terapii nowotworów. Post. Hig. Med. Dośw. 67, 709-718.

IF=0.633; Punktacja KBN/MNiSW=15

Publikacje te są oznaczone w tekście cyframi arabskimi od 1 do 10.

Łączny Impact Factor dla tych 10 prac wynosi: 20.911

Łączna punktacja KBN/MNiSW dla tych 10 prac wynosi: 228

* Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 6. Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonywanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku 4.

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

Wprowadzenie

Cytochromy P450 (CYP) stanowią nadrodzinę monooksygenaz zawierających ugrupowanie hemowe, odpowiedzialnych przede wszystkim za I fazę metabolizmu ksenobiotyków, a także za metabolizm i biosyntezę wielu związków endogennych, w tym hormonów steroidowych, przede wszystkim estrogenów. Podstawowym celem reakcji I fazy metabolizmu ksenobiotyków z udziałem cytochromu P450 jest ich przekształcenie w postać o zwiększonej polarności, co ułatwia wydalanie. Niekiedy jednak reakcje te prowadzą do zwiększenia reaktywności lub aktywności biologicznej związku. Ta sytuacja odnosi się do wielu chemicznych kancerogenów, w tym policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PWA) i amin aromatycznych. Na podstawie homologii struktury cytochromy zostały przyporządkowane do rodzin (~40% homologii sekwencji aminokwasowej) i podrodzin (>55% homologii).

Ogółem odkryto więcej niż 12000 genów kodujących CYP, z czego w ludzkim genomie 57 (Mansuy, 2011). Większość z nich charakteryzuje się polimorfizmem. Na ich ekspresję wpływa także wiele różnych czynników środowiskowych i związanych

ze stylem życia, co skutkuje szerokimi indywidualnymi różnicami w ekspresji i aktywności CYP.

Wśród 57 ludzkich CYP około 20 wydaje się być odpowiedzialnymi za tlenowy metabolizm ksenobiotyków (Mansuy, 2011). Ostatnie dane dotyczące metabolizmu kancerogenów wykazały dominującą rolę w tym procesie trzech rodzin CYP1 (1A1, 1A2 i 1B1), CYP2 (2A6, 2E1) i CYP3 (3A4) (Rendic and Guengerich, 2012).

W moich badaniach skupiłam się głównie na rodzinie 1 i 2.

Enzymy należące do rodziny 1 są zaangażowane w aktywację policyklicznych węglowodorów aromatycznych, heterocyklicznych amin aromatycznych oraz wielu innych związków, włączając endogenne substraty takie jak estron i estradiol (Rendic, 2002). CYP1A1 jest formą indukowalną enzymu odgrywającą ważną rolę w metabolizmie kancerogenów środowiskowych i obecną w tkankach narażonych na kontakt z zanieczyszczeniami powietrza oraz składnikami dymu tytoniowego głównie w płucach. CYP1A2 jako forma konstytutywna występuje w wątrobie uczestnicząc w metabolizmie wielu leków (Bièche i wsp., 2007). Oba wymienione izoenzymy CYP są zaangażowane w metabolizm estrogenów katalizując powstawanie niekancerogennych 2-hidroksy pochodnych estradiolu. Z kolei CYP1B1 wykazuje ekspresję w pozawątrobowych tkankach steroidogennych np. jajnikach, jądrach oraz w tkankach docelowych hormonów steroidowych np. w gruczole piersiowym. Izoforma ta metabolizuje szeroki zakres ksenobiotyków oraz aktywuje wiele kancerogenów środowiskowych, żywnościowych i składników dymu tytoniowego, w tym PWA. Katalizuje również powstawanie 4-hidroksy pochodnych estradiolu o potencjalnym działaniu kancerogennym. Udowodniona w licznych badaniach obecność CYP1B1 w różnych typach komórek nowotworowych sugeruje jego udział w procesie kancerogenezy, a tym samym możliwość jego wykorzystania jako celu oddziaływania potencjalnych czynników chemoprewencyjnych (Szaefer i wsp., 2013 – poz. I/B/10 wg spisu publikacji). Przedstawiciel rodziny 2 cytochromów P450, CYP2B jest indukowany przez szeroki zakres ksenobiotyków o zróżnicowanej strukturze, w tym rozpuszczalniki organiczne, barbiturany i pestycydy (Pustylnyak i wsp., 2007).

Liczne badania wykazały, że biologicznie aktywne związki pochodzenia roślinnego, w szczególności te które stanowią składniki ludzkiej diety mogą modulować ekspresję i/ lub aktywność specyficznych cytochromów P450 zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Z tego powodu związki te są uważane nie tylko za

potencjalne czynniki chemoprewencyjne ale także użyteczne narzędzia do badania biochemicznych i molekularnych podstaw procesu kancerogenezy.

Cel badań

Celem badań przedstawionych w omawianych pracach było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy proste związki fenolowe – kwasy fenolowe i resweratrol mogą zmieniać aktywność i poziom cytochromów P450 zaangażowanych w aktywację metaboliczną kancerogenów środowiskowych w modelu *in vivo* i czy jest to uzależnione od rodzaju kancerogenu oraz gatunku i narządu zwierząt?
2. Czy naturalne złożone matryce żywieniowe (sok z aronii, buraka, jabłek) modulują wybrane izoenzymy cytochromu P450 w modelu *in vivo*? Czy badane preparaty wpływają na metabolizm klasycznego kancerogenu - DMBA w wątrobie i gruczole piersiowym?
3. Czy istnieje różnica w oddziaływaniu na poziom izoenzymów CYP z rodziny 1 i 2 soku z kapusty i dwóch potencjalnych składników czynnych kapusty: indolo-3-karbinolu i izotiocyjanianu fenetylu w modelu *in vivo*?
4. Czy istnieje zależność między indukcją cytochromów P450 zaangażowanych w metabolizm estrogenów a ekspresją czynników transkrypcyjnych *AhR*, *ERα* i *Nrf2* w modelu *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowych gruczołu piersiowego? Jak wpływają na badane parametry sok z kapusty i jego składniki czynne?

Omówienie wyników

Związki fenolowe a modulacja cytochromów P450 w modelu *in vivo* w zależności od zastosowanego kancerogenu oraz gatunku i narządu zwierząt

Początkowo w moich badaniach skupiłam się na dokładniejszym poznaniu mechanizmu działania związków fenolowych będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej: kwasu protokatechowego, chlorogenowego i taninowego w modelu *in vivo*. Wymienione powyżej kwasy fenolowe są związkami o zróżnicowanej strukturze oraz o udokumentowanym działaniu chemoprewencyjnym w różnych modelach eksperymentalnych (Baer-Dubowska i wsp., 2009 – poz. II/E/1 wg spisu publikacji; Mori i wsp., 1986; Chung i wsp., 1998). Badania miały odpowiedzieć na pytanie czy

związki fenolowe w podobny sposób modulują aktywność i poziom cytochromów P450 w zależności od zastosowanego kancerogenu i modelu eksperymentalnego. Jednym z badanych kancerogenów była *o*-toluidyna, aromatyczna amina szeroko wykorzystywana w wielu gałęziach przemysłu, będąca składnikiem dymu tytoniowego (Danford, 1991). *O*-toluidyna jest metabolizowana do wielu związków głównie na drodze hydroksylacji i N-acetylacji (Soon Son i wsp., 1980) katalizowanych przez izoenzymy CYP, głównie CYP1A1. W **publikacji 1** oceniałam wpływ kwasu protokatechowego, taninowego i elagowego podanych oddzielnie oraz w połączeniu z *o*-toluidyną na aktywność izoenzymów CYP w wątrobie i nerkach szczurów. Przeprowadzone badania wykazały, że kwasy fenolowe, szczególnie elagowy mogą modulować genotoksyczne efekty *o*-toluidyny przez modyfikację dróg prowadzących do tworzenia jej reaktywnych metabolitów. Korzystniejsze działanie odnotowano dla wątroby.

W kolejnych badaniach finansowanych w ramach grantu MNiSW zastosowałam związki z grupy policyklicznych węglowodorów aromatycznych – benzo[*a*]piren (B[*a*]P) i 7,12-dimetylobenzo[*a*]antracen (DMBA). Oba związki uznawane są za skuteczne inicjatory i tzw. kompletne kancerogeny w modelu skórnej kancerogenezy u myszy. Różnią się jednak zdecydowanie aktywnością, która jest wynikiem ich odmiennego metabolizmu i tym samym profilu adduktów z DNA. W metabolicznej aktywacji B[*a*]P decydujące znaczenie odgrywa CYP1A1, natomiast w aktywację DMBA zaangażowany jest głównie CYP1B1. Wcześniejsze nasze badania (Ignatowicz i wsp., 2003 – poz. II/A/3 wg spisu publikacji; Szaefer i wsp., 2004 – poz. II/A/4 wg spisu publikacji) wykazały, że kwas protokatechowy, chlorogenowy i taninowy oraz stilben resweratrol nałożone na skórę myszy przed PWA znacząco redukowały ich wiązanie do naskórkowego DNA i poziom adduktów DMBA-DNA i B[*a*]P-DNA. Najskuteczniejszym inhibitorem tworzenia adduktów okazał się kwas taninowy. Z kolei resweratrol nie wpływał znacząco na poziom adduktów B[*a*]P-DNA, natomiast hamował aktywność hydroksylazy aryłowęglowodorowej, co mogło wiązać się z hamowaniem CYP1B1. Kontynuując powyższe badania skupiłam się na ocenie wpływu inicjujących dawek wyżej wymienionych kancerogenów na aktywność i poziom izoenzymów CYP w naskórku myszy BALB/C oraz ich możliwą modulację przez roślinne związki fenolowe (**publikacja 2**). Do oceny poziomu cytochromów P450 wykorzystałam technikę Western blot z zastosowaniem specyficznych

przeciwnie. Nałożenie inicjującej dawki B[a]P na skórę myszy znacząco podwyższyło aktywność O-deetylazy etoksyrezorufiny (EROD) - markera CYP1A1, O-demetylazy metoksyrezorufiny (MROD) – markera CYP1A2 oraz O-depentylazy pentoksyrezorufiny (PROD) – markera CYP2B. Analiza Western blot wykazała zwiększenie poziomu CYP1A1/1A2 i CYP2B u zwierząt traktowanych B[a]P. B[a]P indukował także aktywność enzymów II fazy zaangażowanych w procesy detoksykacji – S-transferazy glutationowej (GST) i reduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1). W przeciwieństwie do B[a]P nałożenie inicjującej dawki DMBA nie spowodowało zmian w aktywności i poziomie badanych izoenzymów CYP. Odnotowano natomiast wzrost aktywności GST i NQO1. Nałożenie na skórę myszy roślinnych fenoli przed nałożeniem B[a]P w większości znacząco obniżyło aktywności wszystkich O-dealkilaz alkoksyrezorufiny w porównaniu z grupą otrzymującą tylko B[a]P. Kwas taninowy obniżał poziom białka CYP1A1/1A2 i CYP1B1 zwiększony pod wpływem B[a]P. Wszystkie związki, a szczególnie resweratrol, znacząco zwiększały aktywność NQO1 w porównaniu z grupą traktowaną B[a]P. Nałożenie natomiast roślinnych fenoli przed DMBA nie spowodowało istotnych zmian zarówno w aktywności jak i poziomie badanych izoenzymów CYP. Z przeprowadzonych badań można wnioskować, że obserwowana w poprzednich pracach redukcja adduktów B[a]P-DNA pod wpływem roślinnych fenoli może wynikać z obniżonej aktywacji metabolicznej B[a]P przez te związki, co prowadzi do zmniejszenia aktywności i ekspresji specyficznych izoenzymów CYP jak i indukcji enzymów II fazy. W przypadku DMBA brak indukcji CYP pod wpływem inicjującej dawki tego kancerogenu może sugerować, że konstytutywna ekspresja CYP, zwłaszcza CYP1B1 jest wystarczająca do aktywacji DMBA i w konsekwencji do tworzenia adduktów z DNA.

Zestawienie wyników wcześniejszych prac i omówionych powyżej wykazało, że modulacja izoenzymów CYP przez roślinne związki fenolowe jest zależna od gatunku zwierząt wykorzystanych w badaniach, tkanki jak i zastosowanego kancerogenu.

Naturalne złożone matryce żywieniowe a modulacja izoenzymów CYP w modelu *in vivo*

Aktywność chemoprewencyjną w układach eksperymentalnych wykazuje wiele składników codziennej diety człowieka. Badania populacyjne, w których wzbogacano dietę w wybrane składniki fitochemiczne nie przyniosły jednoznacznych wyników.

Wydaje się, że wyizolowane składniki mogą zachowywać się inaczej w mieszaninie nie tylko z innymi związkami o podobnym działaniu, ale także z pozostałymi składnikami czynnymi występującymi w pożywieniu. Z tego powodu istotne jest badanie całej matrycy. Dotyczy to także takiej ich formy jak soki warzywne i owocowe.

Stąd w drugim etapie moich badań zajęłam się oceną wpływu naturalnych soków z aronii, buraka i jabłek na poziom izoenzymów CYP w modelu *in vivo* z wykorzystaniem samic szczurów rasy Sprague-Dawley. Badania te były finansowane z grantu zamawianego PBZ-KBN-094/P06/2003/19 „Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego”. Aronia (*Aronia melanocarpa*, Elliot) wywodząca się z Ameryki Północnej, a obecnie popularna w Europie jest bardzo bogatym źródłem polifenoli, szczególnie antocyjanów i polimerycznych procyanidyn, a także kwasów fenolowych. Związki te wykazują szereg biologicznych aktywności włączając działanie antykancerogenne. Badania, których wyniki przedstawiono w **publikacji 3** miały na celu stwierdzenie, czy sok z aronii może modulować aktywność i/lub ekspresję izoenzymów cytochromu P450 zaangażowanych w metaboliczną aktywację DMBA w wątrobie i gruczole piersiowym u samic szczurów rasy Sprague-Dawley. DMBA, należący do PWA jest szeroko stosowanym chemicznym kancerogenem w modelu kancerogenezy w gruczole piersiowym u szczurów. Chociaż wątroba nie jest docelowym narządem dla indukcji kancerogenezy przez DMBA, jest bardzo prawdopodobne, że odgrywa ważną rolę w inicjacji procesu nowotworowego. Dodatkowo większość aktywnych metabolitów DMBA, jest tworzonych w hepatocytach i dociera przez krew do gruczołu piersiowego. W metabolizm DMBA w wątrobie zaangażowany jest przede wszystkim CYP1A1, natomiast w tkankach pozawątrobowych, takich jak gruczoł piersiowy CYP1B1 (Girolami i wsp., 2008). Poza tymi dwoma izoenzymami także CYP2B1 i CYP2C6 są zaangażowane w metaboliczną aktywację tego kancerogenu (Lambard i wsp., 1991). Wykazano, że 28-dniowe podawanie soku z aronii obniżało zarówno konstytutywną jak i indukowaną przez DMBA aktywność EROD (markera CYP1A1) w wątrobie, co może chronić przed kancerogenezą inicjowaną przez ten kancerogen. Z drugiej strony odnotowano zwiększoną aktywność PROD (markera CYP2B) pod wpływem łącznego zastosowania soku z aronii i DMBA w stosunku do grupy zwierząt otrzymujących sam

kancerogen, co może sugerować aktywację drogi prowadzącej do utworzenia 5,6-dioli, które nie są rozważane jako bezpośrednie kancerogenne formy DMBA (Shou i wsp., 1996). Analiza Western blot z przeciwciałami przeciwko CYP1A1/1A2 oraz CYP1B1 nie wykazała konstytutywnej ekspresji wątrobowych CYP1A1/1A2 oraz CYP1B1 zarówno w grupie zwierząt kontrolnych jak i otrzymujących sok z aronii. Natomiast zwiększone poziomy tych enzymów zaobserwowano u zwierząt otrzymujących wyłącznie DMBA jak i DMBA łącznie z sokiem z aronii. Podawanie soku z aronii nie miało istotnego wpływu na konstytutywną aktywność CYP2B, natomiast podwyższony poziom tej izoformy odnotowano u zwierząt otrzymujących zarówno sam DMBA jak i DMBA łącznie z sokiem. W gruczole piersiowym ze względu na ograniczoną ilość uzyskanego materiału ograniczono się tylko do oceny poziomu wybranych izoenzymów CYP techniką Western blotu. W przeciwieństwie do wątroby sok z aronii nie wpływał na ich poziom w tym narządzie.

W badaniach tych ocenie poddano także wpływ soku z aronii na aktywność i poziom enzymów II fazy zaangażowanych w detoksykację kancerogennych metabolitów DMBA powstałych w I fazie. Zaobserwowano zwiększenie aktywności enzymów II fazy: S-transferazy glutationowej i reduktazy NAD(P)H:chinon 1 w wątrobie we wszystkich badanych grupach zwierząt. Podwyższona aktywność GST korelowała ze zwiększonym poziomem izoenzymów GST alfa i mi, zaangażowanych w detoksykację reaktywnych metabolitów PWA. Podobnie jak w przypadku cytochromów P450 sok z aronii nie wpływał na poziom enzymów II fazy w gruczole piersiowym. Nie odnotowano również zmian w uszkodzeniach DNA wywołanych podawaniem DMBA w limfocytach krwi obwodowej pod wpływem soku z aronii. Podawanie soku z aronii znacząco obniżyło natomiast poziom markerów uszkodzenia wątroby i nerek (bilirubina, kreatynina i BUN, ALT, SDH i GGT) podwyższonych przez DMBA potwierdzając ochronne działanie soku z aronii wobec tych narządów. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w postaci wystąpienia ustnego na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku w roku 2006 (poz. A/17 wg załącznika 5).

Wykorzystując analogiczny model badawczy jak w przypadku soku z aronii w kolejnej pracy oceniałam wpływ soku z buraka na aktywność i poziom enzymów związanych z metabolizmem DMBA (**publikacja 4**). Burak czerwony (*Beta vulgaris*

L.) zawiera specyficzną klasę antyoksydantów, łącznie zwanych betalainami, które wykazują potencjał antykancerogeny i przeciwzapalny.

Zaobserwowano, że sok z buraka obniżał w wątrobie aktywność CYP1A1 i CYP1A2. Z kolei aktywności markerów wszystkich badanych cytochromów P450 były zwiększone zarówno u zwierząt otrzymujących sam DMBA jak i DMBA łącznie z sokiem z buraka. W odniesieniu do poziomu CYP1A1/1A2 i CYP1B1 odnotowano analogiczne zmiany jak w badaniach dotyczących soku z aronii. W gruczole piersiowym zaobserwowano podwyższenie poziomu CYP1A1/1A2 pod wpływem samego DMBA jak i łącznego podania DMBA z sokiem z buraka.

W odniesieniu do enzymów II fazy w wątrobie wykazano istotne podwyższenie aktywności jak i poziomu NQO1. Z kolei w gruczole piersiowym najbardziej znaczące zmiany stwierdzono dla GST pi, izoenzymu zaangażowanego w detoksykację aktywnych metabolitów DMBA. Indukcja GST pi może stanowić jeden z potencjalnych mechanizmów wyjaśniających antykancerogenne działanie soku z buraka w stosunku do indukowanej przez DMBA kancerogenezy w modelach zwierzęcych. Sok z buraka nie wpływał w istotny sposób na indukowany przez DMBA poziom uszkodzeń DNA w leukocytach krwi, tym samym potwierdzono brak jego wpływu na status antyoksydacyjny krwi. Istotne znaczenie miało natomiast obniżenie pod wpływem soku z buraka poziomu i aktywności większości biochemicznych i enzymatycznych markerów uszkodzenia funkcji wątroby i nerek indukowanych przez DMBA. Najistotniejsze zmiany odnotowano dla dehydrogenazy sorbitolu, będącej kluczowym enzymem szlaku przekształcającego sorbitol do fruktozy, którego poziom jest znacząco podwyższony u cukrzyków. Redukcja aktywności dehydrogenazy sorbitolu może sugerować, że składniki soku z buraka wywierają nie tylko działanie hepatoprotektywne, ale mogą zapobiegać powikłaniom u cukrzyków.

Kolejne badania przeprowadzone na tym samym modelu badawczym dotyczyły mętnego soku z jabłek. Jabłka bogate w związki fenolowe wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznych korzystnych z punktu widzenia zdrowia, w tym działanie protekcyjne w stosunku do chorób układu krążenia, nowotworowych, cukrzycy i otyłości. W **publikacji 5** oceniałam wpływ mętnego soku z jabłek na aktywność enzymów metabolizujących DMBA w wątrobie i gruczole piersiowym samic szczurów rasy Sprague-Dawley. W wątrobie długoterminowe podawanie

mętnego soku z jabłek obniżyło aktywność CYP1A1 i CYP1A2. W przypadku łącznego podania DMBA i mętnego soku z jabłek odnotowano zwiększoną aktywność CYP2B w porównaniu z grupą otrzymującą tylko kancerogen. Podobny efekt w odniesieniu do aktywności CYP2B odnotowano w naszych badaniach po łącznym podaniu samcom szczurów Wistar mętnego soku z jabłek i *N*-nitrozodietiloaminy (NDEA) (Krajka-Kuźniak i wsp., 2015 – poz. II/A/17 wg spisu publikacji). Analogicznie jak w poprzednich badaniach dotyczących soku z aronii i buraka nie wykazano konstytutywnej ekspresji wątrobowych CYP1A1/1A2 i CYP1B1 w grupie zwierząt kontrolnych i otrzymujących mętny sok z jabłek. Podczas gdy zwiększenie poziomu tych izoenzymów odnotowano u samic szczurów otrzymujących sam DMBA jak i DMBA łącznie z mętnym sokiem z jabłek. W gruczole piersiowym podanie samego soku z jabłek obniżyło poziom CYP1A1/1A2. Natomiast podwyższony jego poziom stwierdzono pod wpływem samego DMBA jak i łącznym zastosowaniu kancerogenu i soku z jabłek.

W stosunku do enzymów II fazy najbardziej znaczące zmiany w wątrobie zaobserwowano dla GST alfa i NQO1. Z kolei w gruczole piersiowym podobnie jak w przypadku soku z buraka najwyższą indukcję odnotowano dla GST pi, co może mieć istotne znaczenie ze względu na zaangażowanie tej izoformy w detoksykację aktywnych metabolitów DMBA. Dodatkowo podanie mętnego soku z jabłek redukowało w większości poziom osoczowych biochemicznych i enzymatycznych markerów uszkodzenia funkcji wątroby i nerek indukowany przez DMBA.

Podsumowując modulacja aktywności i poziomu cytochromów P450 zaangażowanych w metaboliczną aktywację DMBA pod wpływem badanych preparatów jest tkankowo specyficzna i uzależniona od zastosowanego soku. Wykazane protekcyjne działanie stanowić może podstawę do dalszych badań klinicznych oraz rekomendacji badanych produktów żywnościowych tj. soków z aronii, buraka i jabłek do celów profilaktycznych i prozdrowotnych.

Porównanie oddziaływania soku z kapusty i potencjalnych składników czynnych kapusty indolo-3-karbinolu i izotiocyjanianu fenetylu na poziom izoenzymów CYP w modelu *in vivo*

Kontynuując badania z wykorzystaniem naturalnych złożonych preparatów w ramach współpracy z Politechniką Gdańską podjęłam się oceny

przeciwnowotworowych właściwości soków z kapusty. Kapusta biała jak i produkt jej fermentacji – kapusta kiszona stanowi istotny element diety w krajach wschodniej i centralnej Europy. W przeciwieństwie do innych przedstawicieli warzyw krzyżowych antykancerogenna aktywność białej i kiszonej kapusty była mniej badana, chociaż epidemiologiczne dane potwierdziły, że konsumpcja tych produktów żywnościowych jest związana z obniżeniem ryzyka nowotworów piersi, prostaty i trzustki (Kristal i Lampe, 2002; Larsson i wsp., 2006). Ze względu na charakter substancji czynnych zawartych w kapuście działanie takie może być związane z modyfikacją enzymów biorących udział w aktywacji (cytochromy P450) i detoksykacji (enzymy II fazy) związków kancerogennych. Jako model badawczy wykorzystano szczury szczepu Wistar, którym podawano soki z kiszonej i surowej kapusty przez okres 4, 10 i 30 dni (**publikacja 6**). Uzyskane wyniki porównywano z efektami podawania potencjalnych składników czynnych kapusty takich jak: indolo-3-karbinol (I3C) i izotiocyjanian fenetylu (ITCF). Oceniając wpływ wyżej wymienionych preparatów na aktywność i poziom cytochromów P450 odgrywających dominującą rolę w bioaktywacji większości środowiskowych chemicznych kancerogenów (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 i CYP2B) w wątrobie i nerkach wykazano znaczące różnice między tymi narządami. W wątrobie oba badane soki obniżały aktywność enzymatycznych markerów CYP1A1 i CYP1A2 po 10 dniach ekspozycji, podczas gdy w nerkach zaobserwowano zwiększenie aktywności tych enzymów po 4 i 10 dniach. 30-dniowe podawanie soku z kiszonej kapusty podwyższało aktywność markerów CYP1A1 i CYP1A2 w wątrobie, co korelowało ze zwiększonym poziomem białka CYP1A1/1A2. Indolo-3-karbinol zwiększał zarówno aktywność jak i poziom wątrobowych izoenzymów CYP we wszystkich badanych punktach czasowych. W przypadku nerek analogiczne zmiany odnotowano jedynie dla EROD. Warto zauważyć, że zarówno w wątrobie jak i nerkach najwyższą aktywność EROD zaobserwowano po 4 dniach podawania I3C i następnie stopniowo się zmniejszała wskazując, że indukcja CYP1A1 występuje w ograniczonym czasie. Mimo wielu przeprowadzonych badań dotyczących I3C (Fuentes i wsp., 2015) przedstawione w **publikacji 6** dane są pierwszym doniesieniem dotyczącym długo-terminowego podawania i tkankowo-specyficznego efektu I3C. Drugi z badanych składników czynnych kapusty – izotiocyjanian fenetylu podwyższał aktywność wszystkich markerów cytochromu P450 w wątrobie we wszystkich punktach czasowych. Jednakże najwyższy wzrost podobnie jak dla soku z

kiszzonej kapusty odnotowano po 30-dniowym podawaniu. Badania Konsue i Ioannidesa (2008, 2010) wykazały, że ITCF w zależności od dawki i tkanki może hamować (w niższych dawkach) bądź indukować (w wyższych dawkach) aktywność poszczególnych CYP w różnych tkankach. Stąd można przypuszczać, że związek ten może być odpowiedzialny za początkową inhibicję aktywności CYP1A1 i CYP1A2 w wątrobie szczurów otrzymujących soki z kapusty i ich wzrost po dłuższej ekspozycji. Jednakże w przeciwieństwie do ITCF podanie soków z kapusty nie zmieniało zarówno aktywności jak i poziomu białka CYP2B. Może to wynikać z faktu, że być może soki z kapusty aktywują receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), kontrolujący geny *CYP1A1* i *CYP1A2* a indukcja CYP2B jest związana z aktywacją konstytutywnego receptora androstanu (CAR). W **publikacji 6** ocenie poddano także wpływ soków z kapusty i ich związków czynnych na poziom CYP1B1 mierzony techniką Western blotu. Jednakże nie odnotowano istotnych zmian w poziomie tego białka pod wpływem żadnego z badanych preparatów.

Podsumowując, uzyskane dane wykazały, że soki z kiszzonej i surowej kapusty mogą modulować aktywność i poziom izoenzymów CYP zaangażowanych w aktywację kancerogenów/ksenobiotyków i w ten sposób wywierać swoją aktywność antykancerogenną/chemoprewencyjną. Ostateczny efekt uzależniony jest jednak od czasu ekspozycji i jest tkankowo specyficzny. Wyniki tych badań były prezentowane na 5th International Conference Cancer Prevention w 2008 r. "Advances in Molecular and Clinical Aspects of Cancer Prevention" w St. Gallen, w Szwajcarii a przedstawiona praca „The effect of cabbage juice and its components on the expression and activity of phase 1 and 2 enzymes in rats” została nagrodzona dyplomem za najlepszy poster (poz. A/25 wg załącznika 5).

Modulacja indukcji cytochromów P450 zaangażowanych w metabolizm estrogenów oraz ekspresji czynników transkrypcyjnych *AhR*, *ERα* i *Nrf2* przez soki z kapusty i ich składniki czynne w komórkach nabłonka gruczołu piersiowego *in vitro*

W omówionych do tej pory pracach w celu oceny modulacji poziomu cytochromów P450 przez naturalne składniki diety wykorzystywałam model *in vivo*. Badania przeprowadzone u różnych gatunków zwierząt pozwoliły na określenie specyfiki narządowej oddziaływania badanych związków bądź preparatów. W celu

dokładniejszego poznania mechanizmu ich działania w kolejnym etapie przeprowadzono badania *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórkowych.

W badaniach finansowanych w ramach projektu MNiSW wykorzystywałam linie komórkowe wyprowadzone z gruczołu piersiowego: nowotworowe różniące się statusem receptora estrogenowego: estrogeno-zależne (MCF7) i estrogeno-niezależne (MDA-MB-231) oraz nienowotworowe, immortalizowane (MCF10A), co miało umożliwić bardziej precyzyjne określenie mechanizmu działania soku z kapusty i jego składników czynnych.

Istnieje wiele dowodów wskazujących, że estrogeny są głównym czynnikiem ryzyka nowotworu piersi. Długotrwała ekspozycja na estrogeny może nie tylko promować rozwój nowotworu, ale także inicjować kancerogenezę przez reakcję ich aktywnych metabolitów z DNA. Jeden z możliwych mechanizmów uszkodzenia DNA powodowanego przez estrogeny może być wyjaśniony unikalną chemiczną strukturą estrogenów. W przeciwieństwie do wszystkich innych hormonów steroidowych, estrogeny takie jak 17- β -estradiol posiadają aromatyczny pierścień A. W wyniku utlenienia powstają katechole, które mogą być dalej utlenione do wysoce reaktywnych semichinonów i chinonów (Belous i wsp., 2007). Oksydacyjny metabolizm estrogenów jest głównie katalizowany przez izoenzymy cytochromu P450: CYP1A1, CYP1A2 oraz CYP1B1 i prowadzi do powstania metabolitów o różnej kancerogenności. CYP1B1 ulega wysokiej ekspresji w tkankach estrogeno-zależnych, w tym w gruczole piersiowym i swoiście katalizuje 4-hydroksylację estradiolu. 4-hydroksyestradiol może być dalej przekształcany albo do 4-metoksyestradiolu bądź w wyniku cyklu redox tworzyć wspomniane powyżej chinony i semichinony, tym samym wykazując aktywność kancerogenną. W przeciwieństwie do 4-hydroksyestradiolu, 2-hydroksyestradiol, tworzony w reakcji katalizowanej przez CYP1A2 w wątrobie i CYP1A1 w tkankach pozawątrobowych nie jest uważany jako kancerogeny (Tsuchiya i wsp., 2005).

Biorąc pod uwagę powyższe informacje w **publikacji 7** ocenie poddano oddziaływanie soków z kapusty na poziom i ekspresję kluczowych izoenzymów CYP uczestniczących w metabolizmie estrogenów w trzech liniach komórkowych wyprowadzonych z gruczołu piersiowego MCF7, MDA-MB-231 oraz MCF10A. Otrzymane wyniki porównano z efektami uzyskanymi dla potencjalnych składników czynnych kapusty indolo-3-karbinolu oraz produktu jego kondensacji 3,3'-

diindolilometanu (DIM). Przeprowadzone badania wykazały, że soki z kapusty i indole oddziaływały na ekspresję genów z rodziny *CYP1* w zróżnicowany sposób w zależności od linii komórkowej. Chociaż stwierdzono w większości indukcję ekspresji wszystkich badanych izoform *CYP* we wszystkich liniach komórkowych, stosunek *CYP1A1/CYP1B1* był 1.2-10.6-krotnie wyższy w linii MCF7 i MCF10A. Zwiększoną ekspresję *CYP1A2* w porównaniu z *CYP1B1* odnotowano także w linii MCF7. W przeciwieństwie do tych nieinwazyjnych komórek, w linii MDA-MB-231 *CYP1B1* był preferencyjnie indukowany. Stąd można przypuszczać, że w nienowotworowych komórkach MCF10A i nieinwazyjnych komórkach MCF7 soki z kapusty mogą przesunąć metabolizm estrogenów w kierunku powstawania 2-hydroksyestradiolu i zmniejszania poziomów 4-hydroksyestradiolu, redukując w ten sposób możliwość genotoksycznego działania tego wysoce reaktywnego metabolitu estrogeny. Przeciwnie, w bardziej agresywnych/ inwazyjnych estrogeno-niezależnych komórkach MDA-MB-231 soki z kapusty mogą zwiększać powstawanie metabolitów estrogenów uszkadzających DNA. Jednakże istotne zmiany w poziomie mRNA izoenzymów *CYP* pod wpływem badanych preparatów nie korelowały w większości z poziomem białka. Spośród badanych soków z kapusty najbardziej efektywnym modulatorem ekspresji izoenzymów *CYP* okazał się sok z kiszzonej kapusty. Kiszona kapusta jest produktem fermentacji mlekowej rozdrobnionej i osolonej białej kapusty. Podczas rozdrabniania glukobrasycyna, najczęściej badany glukozynolan, jest przekształcana do indolo-3-karbinolu pod wpływem działania myrozynazy. Podczas fermentacji przy obniżonym pH, indole reagują nieenzymatycznie z kwasem L-askorbinowym dając askorbigen, który jest dominującym końcowym produktem w kiszzonej kapuście (Ciska i Pathak, 2004; Wagner i Rimbach, 2009). Istnieją doniesienia (Stephensen i wsp., 1999; Kravchenko i wsp., 2001) wskazujące, że askorbigen sam lub w kombinacji z innymi indolami (I3C lub sulforafanem) moduluje enzymy zaangażowane w metabolizm ksenobiotyków indukując *CYP1A1*. Stąd obserwowana w omawianej publikacji indukcja ekspresji *CYP1* przez sok z kiszzonej kapusty wydaje się potwierdzać możliwą rolę askorbigeny w tym procesie. Zgodnie z oczekiwaniami zarówno I3C jak i DIM w większym stopniu indukowały ekspresję *CYP1A1* i *CYP1B1*, natomiast w mniejszym stopniu *CYP1A2* we wszystkich badanych liniach komórkowych. Jednakże podobnie jak dla soków z kapusty stosunek ekspresji *CYP1A1/CYP1B1* był wyższy w komórkach linii MCF7 i MCF10A niż w komórkach linii MDA-MB-231.

Podsumowując tę część badań wykazano, że modulacja ekspresji genów rodziny *CYP1* przez soki z kapusty może częściowo wyjaśniać chemoprewencyjną aktywność preparatów kapusty obserwowaną w badaniach epidemiologicznych dotyczących nowotworu piersi. Zaobserwowany profil ekspresji *CYP1* wskazuje, że przez działanie na układ hormonalny, kapusta może zapobiegać rozwojowi nowotworu piersi.

Powyższe obserwacje skłoniły nas do podjęcia dalszych badań mających na celu dokładniejsze wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania preparatów z kapusty na metabolizm estrogenów oraz ich wpływu na receptor węglowodorów aromatycznych kontrolujący ekspresję genów z rodziny *CYP*. Oprócz omówionej powyżej możliwości zwiększania przez estrogeny ryzyka nowotworu piersi poprzez tworzenie reaktywnych metabolitów o działaniu kancerogennym i uszkadzających DNA, istnieje druga odrębna droga ich działania. Estrogeny aktywują bowiem receptor estrogenowy (ER), który stymuluje rozrost komórek nowotworowych. Krytyczne etapy w obu tych przypadkach kontroluje receptor węglowodorów aromatycznych (AhR). AhR, zwany także receptorem dioksynowym, jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym ligandem należącym do białek typu helisa-pętla-helisa, który aktywuje ekspresję genów metabolizujących estrogeny jak i inicjuje degradację ER (Okino i wsp., 2009). W formie nieaktywnej AhR jest zlokalizowany w cytoplazmie w kompleksie z dwoma białkami szoku termicznego (Hsp90) i chaperonami. Po związaniu liganda receptor ten przemieszcza się do jądra komórkowego, heterodimeryzuje z jądrowym translokatorem AhR i wiąże się z elementami odpowiedzi na ksenobiotyki w regulatorowym regionie wielu genów, indukując enzymy I i II fazy metabolizujące ksenobiotyki (Singhal i wsp., 2008). Ostatnie badania wykazały, że AhR i ER α wzajemnie oddziałują ze sobą i modulują aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (Nrf2). Nrf2 odgrywa istotną rolę w indukcji ekspresji detoksykacyjnych enzymów, w tym S-transferaz glutationowych i reduktazy NAD(P)H:chinon, które chronią przed elektrofilowymi metabolitami stresu oksydacyjnego (Lo and Matthews, 2013). Nrf2 wiąże się do elementu odpowiedzi na antyoksydanty (ARE) w promotorach genów kodujących te detoksykacyjne enzymy zwiększając ich transkrypcję. Stąd badania przeprowadzone w ramach **publikacji 8** miały odpowiedzieć na pytanie czy istnieje zależność między obserwowaną w przez nas (**publikacja 7**) indukcją cytochromów P450 zaangażowanych w metabolizm estrogenów pod wpływem soków z kapusty i ich związków czynnych a ekspresją

czynników transkrypcyjnych *AhR*, *ERα* i *Nrf2*. Do tego celu wykorzystano analogiczny jak w poprzednich badaniach schemat podawania soków z kapusty i ich związków czynnych w liniach komórkowych gruczołu piersiowego. Wykazano, że ekspresja *AhR* i *ERα* ulegała zmianie w zależności od linii komórkowej i w większości korelowała z obserwowaną w poprzedniej pracy modulacją ekspresji izoenzymów *CYP*. Odnotowano znaczące różnice w oddziaływaniu soków z kapusty i indoli. W linii MCF7 i MDA-MB-231 soki z kapusty, szczególnie z kiszzonej, podobnie jak indole zwiększały ekspresję *AhR*, podczas gdy w nienowotworowej linii MCF10A, w przeciwieństwie do I3C i DIM obniżały ją. Ogólnie w komórkach MCF7 kierunek zmian odzwierciedlał indukcję *CYP1A1* obserwowaną w poprzednich badaniach, podczas gdy w komórkach MDA-MB-231 był powiązany z indukcją *CYP1B1*. Wpływ soków z kiszzonej i surowej kapusty na ekspresję *ERα* w linii MCF7 był zróżnicowany, natomiast oba indole ją obniżały. Z kolei w linii MCF10A soki z surowej kapusty znacząco obniżały nie tylko ekspresję *AhR*, ale i *ERα*, podczas gdy I3C wykazywał tendencję do zwiększania ekspresji obu receptorów. O ile chemoprewencyjne działanie indoli, a zwłaszcza I3C, w odniesieniu do nowotworu piersi zostało dobrze udokumentowane, istnieje mało doniesień na ten temat dla soków z kapusty. I3C i DIM oprócz indukcji enzymów uczestniczących w metabolizmie estrogenów także wiążą się do *AhR* i aktywują go (Jellinck i wsp., 1993; Denison i Nagy, 2003). Związki te są także zdolne do wiązania się do receptora estrogenowego (Liu i wsp., 1994).

Zarówno indole jak i soki z kapusty zwiększały ponadto w większości poziom transkryptów *NQO1* we wszystkich badanych liniach komórkowych. Indukcja tego enzymu jest rozważana jako ważny mechanizm ochrony przed toksycznym i kancerogennym działaniem metabolitów estrogenów (Montano i wsp., 2007). Dodatkowo sugeruje się, że niedobór *NQO1* jest związany z progresją nowotworu i opornością na chemioterapię. Z tego powodu poziom *NQO1* może być prognostycznym i predykcyjnym markerem nowotworu piersi (Fagerholm i wsp., 2008). Badane indole zwiększały także w linii MCF7 i MDA-MB-231 transkrypcję *GST pi*, enzymu katalizującego sprzęganie chinonów estrogenów z glutationem. Ponieważ indukcja obu enzymów jest rozważana jako ważny mechanizm chroniący przed toksycznością i kancerogennością metabolitów estrogenów te obserwacje mogą częściowo wyjaśnić chemoprewencyjną aktywność preparatów kapusty. Dodatkowo

uzyskane wyniki wskazują, że modulacja ekspresji specyficznych czynników transkrypcyjnych odgrywa ważną rolę w tym procesie.

Uzupełnieniem zestawu prac oryginalnych, które przedstawiłam jako osiągnięcie mające być podstawą do nadania stopnia dr hab. są dwa artykuły pogładowe. W pierwszym z nich (**publikacja 9**), napisanym na zaproszenie redakcji *Expert Opinion in Drug Metabolism and Toxicology* przedstawiono aktualną wiedzę i jej krytyczną ocenę na temat możliwości wykorzystania cytochromów P450 jako punktów uchwytu dla roślinnych związków chemoprewencyjnych.

W artykule poza krótką charakterystyką cytochromów P450 opisałam modulatory ludzkich CYP m.in. w modelu zwierzęcym, w ludzkich liniach komórkowych wywodzących się z wątroby, jelita grubego i gruczołu piersiowego oraz u zdrowych wolontariuszy. Efekty działania modulatorów CYP u ludzi są jednak kompleksowe i trudne do przewidzenia, szczególnie w przypadku izoenzymów CYP metabolizujących kancerogeny. Stąd należy ostrożnie podchodzić do oceny ich aktywności. Wiele informacji na ten temat otrzymano przy wykorzystaniu modeli *in vitro*. Nie odzwierciedlają one jednak kompleksowych komórkowych interakcji, które występują *in vivo*. Skuteczność modulacji cytochromów P450 jako strategia chemoprewencyjna powinna być potwierdzona przez kliniczne badania obejmujące populację eksponowaną na specyficzne kancerogeny, co jednak jest dość trudne do przeprowadzenia. Oprócz tego typu podejścia wysoce pożądane są modele humanizowane.

W drugim artykule pogładowym (**publikacja 10**) podsumowano aktualny stan wiedzy na temat wybranych izoform cytochromu P450, które mogą być wykorzystane jako biomarkery chorób nowotworowych oraz punkty uchwytu strategii chemoprewencyjnych i terapeutycznych. Opisano izoformę CYP1B1 oraz zaliczane do izoform „sierocych” CYP2W1, CYP2S1, CYP2R1, CYP2U1 z uwagi na fakt, że poziom ich ekspresji w tkankach nowotworowych zdecydowanie przewyższa obserwowany w tkankach prawidłowych. Izoformy te mogą być wykorzystane nie tylko jako biomarkery procesu nowotworzenia, ale jako aktywatory proleków w tkankach nowotworowych. Stwarza to możliwość opracowania nowych terapii nowotworów.

Podsumowanie

W przedstawionych pracach:

- Wykazano modulację izoenzymów CYP zaangażowanych w metabolizm kancerogenów z grupy amin aromatycznych (*o*-toluidyna) i policyklicznych węglowodorów aromatycznych (B[a]P i DMBA) pod wpływem prostych roślinnych związków fenolowych: kwasu protokatechowego, chlorogenowego, taninowego, elagowego oraz resweratrolu w modelu *in vivo*. Efekt działania uzależniony był od gatunku zwierząt wykorzystanych w badaniach, tkanki jak i zastosowanego kancerogenu.
- Naturalna złożona matryca żywieniowa modyfikowała aktywność i poziom izoenzymów CYP zaangażowanych w metaboliczną aktywację DMBA w wątrobie i gruczole piersiowym samic szczurów. Działanie soków z aronii, buraka i jabłek było tkankowo specyficzne i uzależnione od zastosowanego preparatu. Wykazane protekcyjne działanie stanowić może podstawę do dalszych badań klinicznych oraz rekomendacji badanych produktów żywnościowych do celów profilaktycznych i prozdrowotnych.
- Wykazano tkankowo-specyficzną modulację izoenzymów CYP pod wpływem soków z kapusty i potencjalnych składników czynnych kapusty: indolo-3-karbinolu i izotiocyjanianu fenetylu w wątrobie i nerkach szczurów.
- Badania przeprowadzone w modelu *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych wyprowadzonych z gruczołu piersiowego wykazały zróżnicowane, choć w większości indukcyjne oddziaływanie soków z kapusty i indoli na poziom i ekspresję kluczowych izoenzymów CYP zaangażowanych w metabolizm estrogenów. Spośród badanych soków najbardziej skutecznym induktorem cytochromów P450 okazał się sok z kiszanej kapusty, co może częściowo wyjaśniać chemoprewencyjną aktywność kapusty obserwowaną w badaniach epidemiologicznych nowotworu piersi.
- Odnotowano zależność między indukcją cytochromów P450 zaangażowanych w metabolizm estrogenów a ekspresją czynników transkrypcyjnych *AhR*, *ERα* i *Nrf2*. Szczególnie istotne wydaje się zwiększenie transkryptów *NQO1*, enzymu będącego pod kontrolą *AhR* i *Nrf2*, pod wpływem soków z kapusty jak i indoli, co stanowi ważny mechanizm obrony przed toksycznym i kancerogennym działaniem metabolitów estrogenów.

Przeprowadzone badania potwierdziły zaangażowanie różnych izoform cytochromu P450 z rodziny 1 i 2 w metabolizm specyficznych tkankowo kancerogenów. Wykazano, że związki z grupy roślinnych polifenoli oraz niektóre elementy diety mogą znacząco zmieniać poziom i ekspresję tych układów enzymatycznych. Dane te stanowią mogą podstawę ich rekomendacji do zaleceń dietetycznych, a także do dalszych badań mających na celu opracowanie nowych czynników chemoprewencyjnych i/lub chemioterapeutyków.

Piśmiennictwo

- Belous A.R.**, Hachey D.L., Dawling S., Roodi N., and Parl F.F. Cytochrome P450 1B1 – mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res*, 2007, 67, 812-817.
- Bièche I.**, Narjoz C., Asselah T., Vacher S., Marcellin P., Lidereau R., Beaune P., de Waziers I. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome CYP1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17, 731-742.
- Chung K.T.**, Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y. Tannins and human health: review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1998, 38, 421-464.
- Ciska E. and Pathak D.R.** Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *J Agric Food Chem*, 2004, 52, 7938-7943.
- Danford N.** The genetic toxicology of *ortho*-toluidine. *Mutat Res*, 1991, 258, 207-236.
- Denison M.S., Nagy S.R.** Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43, 309-334.
- Fagerholm R.**, Hofstetter B., Tammiska J., Aaltonen K., Vrtel R., Syrjäkoski K., Kallioniemi A., Kilpivaara O., Mannermaa A., Kosma V.M., Uusitupa M., Eskelinen M., Kataja V., Aittomäki K., von Smitten K., Heikkilä P., Lukas J., Holli K., Bartkova J., Blomqvist C., Bartek J., Nevanlinna H. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet*, 2008, 40, 844-853.

Fuentes F., Paredes-Gonzalez X., Kong A.T. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: anti-oxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and in vivo cancer chemopreventive efficacy. *Curr Pharmacol Rep*, 2015, 1, 179-196.

Girolami F., Abbadessa G., Racca S., Spaccamiglio A., Piccione F., Dacasto M., Carletti M., Gardini G., Di Carlo F., Nebbia C. Time-dependent acetylsalicylic acid effects on liver CYP1 and antioxidant enzymes in rat model of 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis. *Toxicol Lett*, 2008, 181, 87-92.

Jellinck P.H., Forkert P.G., Riddick D.S., Okey A.B., Michnovicz J.J., Bradlow H.L. Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45, 1129-1136.

Konsue N., Ioannides C. Modulation of carcinogen-metabolising cytochromes P450 in human liver by the chemopreventive phytochemical phenethyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables. *Toxicology*, 2010, 268, 184-190.

Konsue N., Ioannides C. Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 3677-3683.

Kravchenko L.V., Avren'eva L.I., Guseva G.V., Posdnyakov A.L., Tutel'yan V.A. Effect of nutritional indoles on activity of xenobiotic metabolism enzymes and T-2 toxicity in rats. *Bull Exp Biol Med*, 2001, 131, 544-547.

Kristal A.R., Lampe J.W. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, 2002, 42, 1-9.

Lambard S.E., Burnett A.K., Wolf C.R., Craft J.A. The role of specific cytochromes P450 in the formation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-protein adducts in rat liver microsomes in vitro. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42, 1529-1535.

Larsson S.C., Håkansson N., Näslund I., Bergkvist L., Wolk, A. Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15, 301-305.

Liu H., Wormke M., Safe S.H., Bjeldanes L.F. Indolo[3,2-b]carbazole: a dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86, 1758-1765.

Lo R., Matthews J. The aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha differentially modulate nuclear factor erythroid-2-related factor 2 transactivation in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 270, 139-148.

Mansuy D. Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: Adaptation of aerobic organisms to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. *An Pharm Fr*, 2011, 69, 62-69.

Montano M.M., Chaplin L.J., Deng H., Mesia-Vela S., Gaikwad N., Zahid M., Rogan E. Protective roles of quinone reductase and tamoxifen against estrogen-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene*, 2007, 26, 3587-3590.

Mori H., Tanaka T., Shima H., Kuniyasu T., Takahashi M. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer Lett*, 1986, 30, 49-54.

Okino S.T., Pookot D., Basak S., Dahiya R. Toxic and chemopreventive ligands preferentially activate distinct aryl hydrocarbon receptor pathways: implications for cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2, 251-256.

Pustyl'nyak V.O., Gulyaeva L.F., Lyakhovich V.V. Induction of cytochrome P4502B: role of regulatory elements and nuclear receptors. *Biochemistry (Mosc)*, 2007, 72, 608-617.

Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*, 2002, 34, 83-448.

Rendic S., Guengerich FP. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25, 1316-1383.

Shou M., Korzekwa K.R., Krausz K.W., Buters J.T., Grogan J., Goldfarb I., Hardwick J.P., Gonzalez F.J., Gelboin H.V. Specificity of cDNA-expressed human and rodent cytochrome P450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog*, 1996, 17, 241-249.

Singhal R., Shankar K., Badger T.M., Ronis M.J. Estrogenic status modulates aryl hydrocarbon receptor-mediated hepatic gene expression and carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 2008, 29, 227-236.

Soon Son O.C.K., Everett D.W., Fiala E.S. Metabolism of o-[methyl-14C]toluidine in the F344 rat. *Xenobiotica*, 1980, 10, 457-468.

Stephensen P.U., Bonnesen C., Bjeldanes L.F., Vang O. Modulation of cytochrome P4501A1 activity by ascorbigen in murine hepatoma cells. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58, 1145-1153.

Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, 2005, 227, 115-124.

Wagner A.E. and Rimbach G. Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clin Dermatol*, 2009, 27, 217-224.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Jestem absolwentką Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Studia ukończyłam w roku 1993 i bezpośrednio po ich ukończeniu zostałam zatrudniona w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej, kierowanej przez prof. dr hab. Władysława Fenrycha, na etacie naukowo-dydaktycznym. Pod kierunkiem profesora wykonałam pracę magisterską pt. „Wpływ roślinnych pochodnych flawonoidowych na metabolizm granulocytów”. Praca magisterska jak i pierwsze zadania jakie mi powierzono dotyczyły oddziaływania różnych flawonoidów m.in. orientyny, sylibiny oraz sylidianiny na produkcję reaktywnych form tlenu przez stymulowane zymosanem granulocyty obojętnochłonne. Wyniki tych badań zostały zamieszczone w publikacji w *Acta Biochimica Polonica* (poz. II/A/1 wg spisu publikacji).

Od 1996 r. wchodzę w skład zespołu badawczego prowadzonego przez prof. dr hab. Wandę Baer-Dubowską w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

W moich badaniach koncentrowałam się na poznaniu mechanizmu chemoprewencyjnego oddziaływania naturalnych jak i syntetycznych związków fenolowych w różnych modelach badawczych. Wyniki badań *in vitro*, które opublikowano w *Xenobiotica* (poz. II/A/2 wg spisu publikacji) wykazały, że związki fenolowe: kwas protokatechowy, chlorogenowy i taninowy, galusan propylu i dodecylu oraz sylibina mogą w zróżnicowany sposób hamować aktywność markerów CYP1A1,

CYP1A2 oraz CYP2B w mikrosomach wątroby myszy. Najsilniejszym inhibitorem CYP1A1 oraz CYP2B okazał się kwas taninowy. Jak wykazały dalsze nasze badania związek ten także całkowicie hamował tworzenie adduktów DMBA z deoksyadenozyną oraz obniżał stymulowany 13-octanem 12-O-tetradekanoiloforbolu (TPA) wybuch tlenowy w ludzkich granulocytach obojętnochłonnych (poz. II/A/3 wg spisu publikacji).

Poznanie mechanizmu działania kwasu protokatechowego, chlorogenowego i taninowego w kontekście modulacji procesu kancerogenezy było również przedmiotem mojej pracy doktorskiej pt. „Roślinne związki fenolowe jako modulatory procesów związanych z indukcją kancerogenezy w naskórku myszy”, której promotorem była prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska. Przeprowadzone badania wykazały, że roślinne związki fenolowe wpływają na etap inicjacji kancerogenezy w naskórku myszy na drodze obniżania wiązania PWA - B[a]P i DMBA do DNA naskórka myszy. Najsukuteczniejszym inhibitorem tworzenia adduktów PWA okazał się kwas taninowy. Poza zdolnością wychwytywania reaktywnych metabolitów związków kancerogennych, kwas protokatechowy i chlorogenowy wpływały na układy enzymatyczne metabolizujące ksenobiotyki. Badane kwasy fenolowe oddziaływały także na procesy związane z etapem promocji kancerogenezy w naskórku myszy, o czym świadczyło zahamowanie wywołanej nałożeniem TPA translokacji izoenzymów kinazy białkowej C (PKC) z cytosolu do błon w tej tkance. Badane związki hamowały również peroksydację lipidów *in vitro* w mikrosomach wątroby szczura i preparatach naskórka myszy oraz indukowały cytoplazmatyczną peroksydazę glutationową *in vivo* w wątrobie i nerkach szczura oraz w naskórku myszy. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej stały się przedmiotem publikacji w *Nutrition and Cancer* (poz. II/A/4 wg spisu publikacji).

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora uzupełniając dane uzyskane w ramach pracy doktorskiej dotyczące wpływu roślinnych fenoli na etap promocji kancerogenezy w naskórku myszy wykonałam badania związane z oceną aktywności PKC. Wykazały one, że najsilniejszym inhibitorem stymulowanej TPA zarówno translokacji jak i aktywności

PKC okazał się kwas taninowy, co częściowo wyjaśnia anty-promocyjne działanie tego związku. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Toxicology* (poz. II/A/7 wg spisu publikacji).

W ramach projektu, którego kierownikiem był prof. dr hab. Włodzimierz Grajek z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu uczestniczyłam w badaniach mających na celu ocenę modulacji cytochromów P450 u szczurów Wistar poddanych działaniu *N*-nitrozodietiloaminy i trzech soków: z aronii, buraka i jabłek.

Zastosowany klasyczny kancerogen dla wątroby - NDEA zmniejszał aktywność enzymatycznych markerów CYP1A1, CYP1A2 i CYP2E1, natomiast podwyższał aktywność CYP2B w wątrobie samców szczurów. Dwudziestośmiodniowe podawanie soku z aronii obniżyło aktywność enzymatycznych markerów CYP1A1 i CYP1A2. W przypadku soku z buraka i mętnego soku z jabłek identyczny efekt odnotowano dodatkowo dla CYP2E1. Natomiast łączne podanie NDEA i soku z aronii, NDEA i soku z buraka oraz NDEA i soku z jabłek spowodowało w większości dalsze obniżenie aktywności wymienionych enzymów. W przypadku aktywności PROD (markera CYP2B) odnotowano jej wzrost po podaniu samego soku z jabłek, łącznej ekspozycji na NDEA i sok z jabłek oraz NDEA i sok z buraka. Modulacji aktywności wymienionych izoenzymów CYP towarzyszyły analogiczne zmiany w poziomie białka, co potwierdza zaangażowanie badanych przeze mnie izoform CYP w metabolizm NDEA. Wyniki tych badań były prezentowane na konferencji naukowej „Naturalne przeciwutleniacze – od surowca do organizmu” i zostały opublikowane w *Journal of Agricultural and Food Biochemistry* (poz. II/A/9 wg spisu publikacji), *Food and Chemical Toxicology* (poz. II/A/11 wg spisu publikacji) oraz *Acta Poloniae Pharmaceutica* (poz. II/A/17 wg spisu publikacji).

Kolejne badania realizowane w ramach projektu MNiSW, w których uczestniczyłam dotyczyły wpływu aktywnych składników soku z kapusty na proliferację, apoptozę i ekspresję wybranych genów komórek raka piersi. Oceniałam wpływ soku z kapusty w porównaniu z indolo-3-karbinolem i 3,3'-diindolilometanem na poziom CYP19, kluczowego izoenzymu CYP uczestniczącego w syntezie estrogenów w dwóch liniach nowotworowych piersi (MCF7 i MDA-MB-231) oraz immortalizowanej, nienowotworowej linii MCF10A. Podczas gdy soki z kapusty w niższych dawkach obniżały ekspresję CYP19 w nienowotworowej/immortalizowanej linii MCF10A, indolo-3-karbinol i 3,3'-diindolilometan były bardziej skuteczne w zmniejszaniu

ekspresji *CYP19* w estrogeno-zależnej linii nowotworu piersi MCF7. Z kolei w estrogeno-niezależnej linii nowotworu piersi MDA-MB-231 zaobserwowano podwyższoną ekspresję *CYP19* pod wpływem I3C i DIM. Uzyskane wyniki, które zostały opublikowane w *European Journal of Nutrition* (poz. II/A/13 wg spisu publikacji) zwłaszcza otrzymane dla nienowotworowej/immortalizowanej linii MCF10A sugerują, że obserwowana w badaniach epidemiologicznych chemoprewencyjna aktywność kapusty w stosunku do nowotworu piersi może być częściowo wyjaśniona inhibicją ekspresji aromatazy. W tym samym modelu badawczym oceniałam wpływ sulforafanu (naturalnie występującego *L*-izomeru), składnika warzyw z rodziny krzyżowych na poziom izoenzymów CYP zaangażowanych w syntezę i metabolizm estrogenów. Najbardziej znaczące zmiany odnotowano dla izoenzymu CYP19, co potwierdza że antykancerogenna aktywność sulforafanu w tkance gruczołu piersiowego może być związana z modulacją aromatazy przez ten związek. Wyniki tych badań opublikowano w *Phytotherapy Research* (poz. II/A/18 wg spisu publikacji) oraz zaprezentowano na wielu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych: Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi w 2009 r. (poz. A/26, A/27, A/28 wg załącznika 5), 239th American Chemical Society National Meeting w San Francisco w 2010 r. (poz. A/29 wg załącznika 5), 21st Meeting of the European Association for Cancer Research w Oslo w 2010 r. (poz. A/30 wg załącznika 5), 6th International Conference on Clinical Cancer Prevention w St. Gallen w 2010 r. (poz. A/33 wg załącznika 5) oraz 4th Annual World Cancer Congress “Collaborative Actions against Cancer” w Dalian w 2011 r. (poz. B/26 wg załącznika 5).

Resweratrol, a także niektóre jego naturalne analogi, wzbudziły zainteresowanie wielu naukowców z powodu wielokierunkowego oddziaływania na wszystkie etapy procesu kancerogenezy. Działanie antykancerogenne resweratrolu wiąże się z ingerencją w wiele zjawisk prowadzących do indukcji nowotworu, w tym ekspresji genów, których produkty kontrolują procesy zapalne oraz proliferację i różnicowanie komórek. Znacznym ograniczeniem jest jednak niska biodostępność tego polifenolu, wynikająca z intensywnego metabolizmu, któremu podlega on w ustroju. W związku z tym poszukuje się pochodnych, które miałyby lepszy profil farmakokinetyczny, a tym samym wykazywały większą aktywność biologiczną w odniesieniu do specyficznych kaskad sygnałowych. Najczęściej są to pochodne metoksyłowe. Badania z tego

zakresu prowadziłam w ramach projektu finansowanego przez MNiSW/NCN (kierownik H. Szaefer), którego celem była synteza metylotiopochodnych resweratrolu i zbadanie potencjalnego mechanizmu oddziaływania wyselekcjonowanych związków, poprzez ocenę ich działania cytotoksycznego wobec linii komórek nowotworowych i prawidłowych oraz oddziaływania na ścieżki sygnałowe związane z procesami kancerogenezy w modelu *in vitro* i *in vivo*. Związki o najniższej cytotoksyczności, przeznaczone do badania ich wpływu na drogi sygnałowe związane z indukcją nowotworzenia. Analizowałam ich oddziaływanie na poziom receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), czynników transkrypcyjnych AP-1, NF-κB, Stat3 i Nrf2 oraz powiązanych z nimi enzymów w komórkach linii HaCaT. W celu weryfikacji obserwacji *in vitro* przeprowadzono dalsze badania w naskórku myszy CD-1 (ICR) wykorzystując jako aktywator dróg sygnałowych promotor kancerogenezy, 13-octan 12-O-tetradekanoiloforbolu (TPA). Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność metylotiopochodnych resweratrolu zależy w dużym stopniu od liczby podstawników metoksyłowych. Wszystkie badane związki mają zdolność modulacji dróg sygnałowych, związanych z etapem promocji kancerogenezy, jednak ich aktywność nie jest wyższa, niż związku macierzystego, czyli resweratrolu. Wyniki wyżej wymienionych badań opublikowano w *Pharmacological Reports* (poz. II/A/14 wg spisu publikacji), *Molecular and Cellular Biochemistry* (poz. II/A/16 wg spisu publikacji), *Cellular and Molecular Biology Letters* (poz. II/A/15 wg spisu publikacji) oraz zaprezentowano na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych: 1st International Conference of Resveratrol and Health w Elsinore w 2010 r. (poz. B/25 wg załącznika 5), 47th Congress of the Polish Biochemical Society and Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting w Poznaniu w 2012 r. (poz. A/35 i A/36 wg załącznika 5), 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research w Barcelonie w 2012 r. (poz. A/37 wg załącznika 5), XVIIth Gliwice Scientific Meetings 2013, w Gliwicach w 2013 r. (poz. B/27 i B/28 wg załącznika 5). Wyłonienie nowych syntetycznych pochodnych resweratrolu w kontekście ich ingerencji w metabolizm estrogenów jest celem kolejnego aktualnie realizowanego projektu NCN, którego jestem wykonawcą. W badaniach są wykorzystywane dwie linie nowotworowe gruczołu piersiowego o różnym statusie receptora estrogenowego (estrogeno-zależna linia MCF7 oraz estrogeno-niezależna linia MDA-MB-231) oraz immortalizowane, nienowotworowe komórki nabłonka gruczołu piersiowego

MCF10A. Oceniam techniką Western blot poziom białek odpowiedzialnych za lokalną syntezę estrogenów (CYP19, sulfatazy i sulfotransferazy steroidowej, dehydrogenaz 17-beta hydroksysteroidowej 1 i 2) oraz metabolizm estrogenów (CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1). Badania obejmują także oznaczenie poziomu receptorów AhR, ER α oraz HER2/neu.

W ramach projektu współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego uczestniczyłam w badaniach genotoksyczności żywności funkcjonalnej. Dzięki wdrożeniu założeń teoretycznych, dotyczących żywności funkcjonalnej i jej znaczenia w zapewnieniu zdrowia, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu realizował badania skuteczności żywności funkcjonalnej we wspomaganiu leczenia pacjentów cierpiących, m. in. na cukrzycę typu II, nadciśnienie i otyłość. Eksperyment, w którym uczestniczyłam został poprzedzony badaniami toksyczności wybranych produktów spożywczych (ekstrakt z liści żółtej herbaty; ekstrakt z liści morwy białej; liofilizowany sok z aronii; suszony sok z ziemniaka; łuska gryki; liofilizowane liście jarmużu; ekstrakt ziela karczocha; łuska czerwonej fasoli; kielki soi) przeprowadzonymi na szczurach rasy Wistar, samcach i samicach, w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Materiał pochodzący od tych zwierząt posłużył do badania genotoksyczności wyżej wymienionych preparatów na podstawie analizy uszkodzenia DNA metodą elektroforezy komatkowej. Wyniki badań pozwalają wnioskować, że oceniane surowce nie powodują uszkodzeń oksydacyjnych kwasów nukleinowych. Wyniki z przeprowadzonych badań zostały opublikowane w *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* (poz. II/D/3 wg spisu publikacji), *Plant Foods for Human Nutrition* (poz. II/A/21 wg spisu publikacji) oraz *Journal of Medicinal Food* (poz. II/A/20 wg spisu publikacji).

Podsumowanie

Wszystkie realizowane przeze mnie zadania badawcze dotyczyły możliwości wykorzystania związków pochodzenia naturalnego, zarówno o prostej budowie jak i złożonych preparatów oraz syntetycznych pochodnych w chemoprewencji nowotworów w różnych modelach badawczych. Uzyskane wyniki wskazały na mechanizmy, które mogą decydować o ich działaniu antykancerogennym. W większości przypadków było to działanie pleiotropowe.

5.3. Udział w projektach badawczych

1. Projekt MNiSW/NCN N N405 209737 Badanie modulacji dróg przekazywania sygnałowego przez naturalne i syntetyczne stilbeny - potencjalne czynniki chemoprewencyjne i chemioterapeutyczne – zakończony – kierownik
2. Projekt KBN 4 P05F 003 19 Ocena oddziaływania roślinnych fenoli i resweratrolu na procesy związane z indukcją nowotworów – zakończony – wykonawca
3. Projekt PZB/KBN 094/P06/2003/19 Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego – zakończony – wykonawca
4. Projekt KBN 2 P05F 049 26 Poszukiwanie molekularnych celów oddziaływania roślinnych fenoli – potencjalnych czynników chemoprewencyjnych – zakończony – wykonawca
5. Projekt KBN 2 PO6T 085 26 Badania nad właściwościami przeciwdziałającymi rozwojowi nowotworów wykazywanymi przez wybrane składniki żywności będące tradycyjnym elementem polskiej diety - zakończony - wykonawca
6. Projekt MNiSW N N405 3390 33 Wpływ aktywnych składników soku z kapusty na proliferację, apoptozę i ekspresję wybranych genów komórek raka piersi - zakończony - wykonawca
7. Projekt POIG 01.01.02-00-061/09 Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka Działanie 1.1.2). Zadanie 4.3.: Ocena bezpieczeństwa wyizolowanych frakcji - zakończony - wykonawca
8. Projekt NCN 2012/05/B/NZ7/03048 Badanie modulacji syntezy i metabolizmu estrogenów – czynników ryzyka nowotworu piersi przez nowe syntetyczne pochodne resweratrolu - realizowany - wykonawca

Projekty własne AM i UM w Poznaniu

1. 501-3-02-02 Badanie wpływu wybranych składników diety na aktywność S-transferazy glutationowej u szczurów - zakończony - kierownik projektu
2. 501-3-0007079 Badanie wpływu wybranych składników diety na aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki w wątrobie i nerkach szczurów - zakończony - kierownik projektu

3. 501-01-3302404-07079 Badanie wpływu wybranych składników diety na aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki w wątrobie i nerkach szczurów - zakończony - kierownik projektu

5.4. Nagrody i wyróżnienia

1. Doktorat z wyróżnieniem, Poznań 2001
2. Nagroda Indywidualna Naukowa Rektora Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2000/2001
3. Nagroda Indywidualna Naukowa Rektora Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2002/2003
4. Nagroda Naukowa Zespołowa Ministra Zdrowia, Warszawa, 2006
5. Nagroda Zespołowa Dydaktyczna Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2007/2008
6. Nagroda Zespołowa Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2009/2010
7. Nagroda przyznawana przez studentów: Amicus Studentium, Poznań, 2011
8. Nagroda Zespołowa Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2011/2012
9. Nagroda Indywidualna Dydaktyczna Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2012/2013
10. Nagroda Zespołowa Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2013/2014

5.5. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Uczestniczyłam w międzynarodowych i w krajowych konferencjach naukowych. Jestem autorem i współautorem 70 streszczeń (wykaz streszczeń – załącznik 5).

Wyniki badań prezentowałam w formie 2 wystąpień ustnych:

1. **Szaefer H.**, Baer-Dubowska W. (1998) Wpływ kwasu protokatechowego i chlorogenowego na wiązanie benzo(a)pirenu do DNA naskórka myszy. Streszczenia XXXIV Zjazdu PTBioch., Białystok, 15-18.09.1998, 202.
2. **Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V., Baer-Dubowska W. (2006) Modulation of the activity and expression of enzymes metabolizing xenobiotics by orally administered aronia juice in rat liver and mammary gland. Acta Bioch. Pol. 53 suppl. 1, 42.

Abstracts of the 41th Meeting of the Polish Biochemical Society, Białystok, 12-15.09.2006.

5.6. Szkolenia i kursy naukowe

W celu kontynuacji kształcenia i podniesienia kwalifikacji brałam udział w wielu kursach i konferencjach naukowo-szkoleniowych (załącznik 5):

- Kurs pedagogiczny (1996/1997 Zakład Pedagogiki Medycznej AM, Poznań)
- Kurs przygotowawczy na II stopień specjalizacji z zakresu analityki klinicznej/diagnostyki laboratoryjnej (1998-2000 Katedra Onkologii Zakład Analityki Medycznej AM, Poznań)
- Kurs praktyczny „Techniki filtracyjne i elektroforetyczne w badaniach kwasów nukleinowych i białek” (6-8.06.2001; Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, Poznań)
- Letni kurs hodowli komórek zwierzęcych (9-12.06.2008; Zakład Cytologii na Wydziale Biologii, Uniwersytet Medyczny w Warszawie)
- XX Szkoła Letnia „Postępy biologii molekularnej” (23-27.06.2008; Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań)

5.7. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

Jestem członkiem następujących towarzystw naukowych:

- European Environmental Mutagen Society, 2002
- European Association for Cancer Research, 2004
- Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, 1993
- Polskie Towarzystwo Biochemiczne, 2006
- Poznańskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, – od 2008 roku sekretarz Komisji Chemii Klinicznej.

5.8. Recenzje

Byłam recenzentem 5 prac w następujących czasopismach: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *Enviromental Health Perspectives*, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *Biofactors*, *BioMed Research International*.

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

W skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi 29 prac oryginalnych i 2 prace poglądowe z łączną punktacją KBN/MNiSW=699 oraz IF=67.255. Jestem także autorem 1 rozdziału w podręczniku międzynarodowym oraz 3 rozdziałów w podręczniku krajowym oraz 2 rozdziałów w skrypcie. Prace cytowano w 370 publikacjach wg bazy Web of Sciences. Mój Indeks Hirscha wynosi 11 (Web of Sciences).

Uczestniczyłam w realizacji 7 projektów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN (w jednym jako kierownik projektu) i 1 projekcie POIG oraz w 3 finansowanych w ramach badań własnych AM/UMP jako kierownik.

Jestem autorem i współautorem 70 doniesień zjazdowych: 38 prezentowanych na konferencjach zagranicznych i 32 na krajowych konferencjach, w tym 2 prezentowałam jako wystąpienie ustne.

Kamila Szarek