

Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Renata Mikstacka

Załącznik 2

Autoreferat

Poznań 2014

1. Imię i nazwisko: Renata Mikstacka

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

Dyplom mgr chemii; Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 1974.

Dyplom dr nauk przyrodniczych; Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Poznaniu 1982 r., rozprawa doktorska pt. „Badania hydroksylazy węglowodorów aromatycznych w limfocytach ludzkich stymulowanych mitogenem *in vitro*”; promotor prof. dr hab. Andrzej Pawlak

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1974 – 1975 Instytut Przemysłu Zielarskiego - asystent

1975 – 1978 Studium Doktoranckie Akademii Medycznej w Poznaniu - doktorant

1978 – 1982 Polska Akademia Nauk, Zakład Genetyki Człowieka – asystent

1983 – 1990 Polska Akademia Nauk, Zakład Genetyki Człowieka – adiunkt

2000 – 2008 Katedra Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu – starszy specjalista naukowo-techniczny

2008 – 2013 Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu – asystent do określonych zadań

2013 – nadal Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych – starszy wykładowca

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:

Ocena wpływu naturalnych i syntetycznych pochodnych *trans*-stilbenu na aktywność enzymatyczną cytochromów P450 z rodziny 1

Podstawą ubiegania się o tytuł dr habilitowanego stanowi cykl 6 publikacji (1 poglądowa i 5 oryginalnych), w których przedstawiono wyniki badań *in vitro* dotyczących oddziaływania naturalnych i syntetycznych pochodnych *trans*-stilbenów na aktywność enzymatyczną cytochromów P450 z rodziny 1.

b) wykaz publikacji:

1. Mikstacka R., Dutkiewicz Z., Sobiak S., Baer-Dubowska W. (2012) The inhibitory effect of natural stilbenes and their analogues on catalytic activity of cytochrome P-450 family 1 in comparison with other phenols - structure and activity relationship. W: Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health (Red. Venketeshwer Rao) InTech, Rijeka, s. 519-538.

Punktacja KBN/MNiSW = 5

2. Mikstacka R., Rimando A.M., Szalaty K., Stasik K., Baer-Dubowska W. (2006) Effect of natural analogues of *trans*-resveratrol on cytochrome P450 1A2 and 2E1 catalytic activities. Xenobiotica 36, 269-285.

IF= 1,613; Punktacja KBN/MNiSW = 20

3. Mikstacka R., Przybylska D., Rimando A.M., Baer-Dubowska W. (2007) Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by *trans*-resveratrol methyl ethers. Mol. Nutr. Food Res. 51, 517-524.

IF=3.439; Punktacja KBN/MNiSW = 32

4. Mikstacka R., Wieczorek M., Sobiak S., Baer-Dubowska W. (2008) Thiomethylstilbenes as inhibitors of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 activities. Mol. Nutr. Food Res. 52, S77-S83.

5. Mikstacka R., Rimando A.M., Stefański T., Dutkiewicz Z., Sobiak S. (2012) Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. Bioorg. Med. Chem. 20, 5117-5126.

IF=2.921; Punktacja KBN/MNiSW = 30

6. Mikstacka R., Wierzchowski M., Dutkiewicz Z., Gielara-Korzańska A., Korzański A., Teubert A., Sobiak S., Baer-Dubowska W. (2014) 3,4,2'-trimethoxy-trans-stilbene – a potent CYP1B1 inhibitor. MedChemComm 5, 496-501.

IF=2.722; Punktacja KBN/MNiSW = 30

Publikacje te są zaznaczone w tekście cyframi arabskimi od 1 do 6.

Łączny Impact Factor dla tych 6 prac: 10.581

Łączna punktacja KBN/MNiSW dla tych 6 prac: 117

Liczba cytowań: 91

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstawanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 8. Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonywanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w załącznikach 4 i 8.

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

Wprowadzenie

Cytochromy P450 (CYP) stanowią nadrodzinę enzymów konstytutywnych i indukowanych odpowiedzialnych za metabolizm oksydacyjny szerokiego spektrum ksenobiotyków i biologicznie aktywnych związków endogennych. Grupę prostetyczną cytochromów P450 stanowi hem składający się z jonu żelaza (III) i protoporfiryny IX. Obecnie znanych jest 57 ludzkich genów cytochromów P450, które wykazują znaczące międzyosobnicze zróżnicowanie genetyczne (Zanger i wsp., 2014). Na podstawie homologii struktury cytochromy zostały przyporządkowane do rodzin, w skład których wchodzi enzymy wykazujące w przybliżeniu 40% homologii sekwencji aminokwasowej. W obrębie rodzin wyróżnia się podrodziny, do których należą izoformy zachowujące powyżej 55% homologii.

Cytochromy P450 rodziny 1 (CYP1) uczestniczą w metabolizmie oksydacyjnym substancji endogennych takich jak: kwasy żółciowe, hormony sterydowe, tłuszcze oraz egzogennych, w tym licznych leków oraz ksenobiotyków związanych z zanieczyszczeniem środowiska. Do związków metabolizowanych przez cytochromy P450 z rodziny 1 należą potencjalne kancerogeny: węglowodory i aminy aromatyczne, heterocykliczne aminy aromatyczne oraz nitrozoaminy. W wyniku reakcji enzymatycznych ulegają onej bioaktywacji do form genotoksycznych. Metabolizm prokancerogenów prowadzi do powstania związków mutagennych, które tworząc addukty z zasadami azotowymi kwasów nukleinowych mogą być odpowiedzialne za inicjację procesu kancerogenezy. Cytochromy P450 z rodziny 1 pełnią główną rolę wśród bioaktywatorów prokancerogenów, obok takich enzymów jak reduktazy aldozowe, N-acetylotransferazy i sulfotransferazy (Rendic i Guengerich, 2012).

Zainteresowanie cytochromami P450, w tym również izoformami z rodziny 1, wynika również z roli jaką pełnią one w metabolizmie leków. Obok interakcji farmakologicznych ważny problem dotyczy oporności na stosowane w terapii nowotworów leki, które ulegają metabolicznej inaktywacji za pośrednictwem cytochromów z rodziny 1 (Swanson i wsp., 2010). Należy dodać, że ze względu na między- i wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie ekspresji genów cytochromowych, każdy

organizm posiada swój własny unikalny profil aktywności tych enzymów rzutujący na terapeutyczne działanie metabolizowanych przez nie leków.

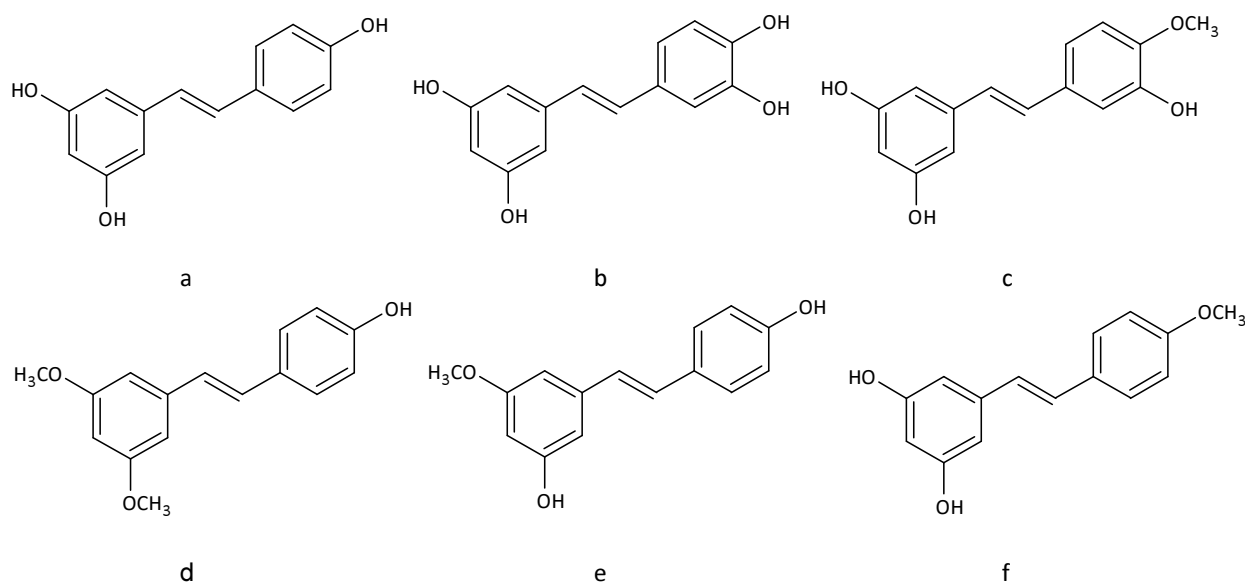
Do cytochromów z rodziny 1 należą trzy izoformy: CYP1A1 i CYP1A2, które wykazują 72% homologii struktury oraz CYP1B1 wykazujący podobieństwo strukturalne do CYP1A w 38%, a do CYP1A2 w 37%. Enzym CYP1B1 mimo niskiej homologii strukturalnej został zakwalifikowany do rodziny 1 z uwagi na podobną specyficzność substratową oraz wspólny receptor AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), za pośrednictwem którego następuje indukcja ekspresji CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 (Nebert i wsp., 2004).

Cytochromy P450 charakteryzują się wysoką specyficznością tkankową i substratową. CYP1A1 jest formą indukowalną enzymu, występuje w płucach i tchawicy, a więc w tkankach narażonych na kontakt z zanieczyszczeniami powietrza. CYP1A2 jako forma konstytutywna występuje wyłącznie w wątrobie i uczestniczy w wątrobowym metabolizmie leków, natomiast CYP1B1 jest obecny w większości tkanek pozawątrobowych. Wysoki poziom CYP1B1 obserwuje się w tkankach estrogenozależnych, takich jak macica, gruczoł piersiowy, prostata, a także w szpiku kostnym, nerkach, śledzionie i tarczycy (Bieche i wsp., 2007). Podwyższoną ekspresję tego enzymu obserwuje się w tkankach nowotworowych (Nebert i Russel, 2002). CYP1B1 jest odpowiedzialny za hydroksylację 17 β -estradiolu. Powstałe w wyniku metabolizmu 17- β -estradiolu produkty: 4-hydroksy-17 β -estradiol, semichinony i chinony stanowią zagrożenie genotoksyczne poprzez tworzenie adduktów z kwasami nukleinowymi (Yager, 2000).

Ze względu na udział w inicjacji procesu kancerogenezy cytochromy P450 z rodziny 1 stały się celem w strategii przeciwnowotworowej (Bruno i Njar, 2007; Badal i Delgoda, 2013). Jednym z kierunków działań profilaktycznych jest chemoprewencja polegająca na zapobieganiu, inhibicji względnie odwróceniu procesu kancerogenezy za pośrednictwem związków pochodzenia naturalnego, ich zmodyfikowanych analogów lub związków syntetycznych (Sporn). Szczególnie ważnym obiektem badań jest CYP1B1, którego nadekspresja w tkankach nowotworowych może być wykorzystywana w strategiach terapeutycznych jako marker/antygen nowotworowy (Swanson i wsp.,

2010). Projektuje się także proleki, które ulegałyby przemianie do form aktywnych w nowotworowych tkankach docelowych charakteryzujących się wysoką aktywnością CYP1B1. Ważnym problemem w chemoterapii nowotworów jest oporność wielolekowa, do której prowadzi m.in. szybki metabolizm leków przeciwnowotworowych za pośrednictwem cytochromów CYP1A1 i CYP1B1. Z tego względu, aby uniemożliwić przekształcanie się leków w formy nieaktywne zaproponowano stosowanie inhibitorów CYP1B1 (Gajjar i wsp., 2012).

Główną rolę w chemoprewencji pełnią obecne w diecie człowieka bioaktywne związki należące do tzw. nie odżywczych składników pożywienia (Baer-Dubowska i Ignatowicz, 2006; Szafer i wsp., 2012). Do naturalnych związków oddziałujących na cytochromy z rodziny 1 należą polifenole, których najlepiej przebadanym przedstawicielem jest *trans*-resweratrol (3,4',5-trihydroksy-*trans*-stilben, Ryc. 1) występujący w owocach jagodowych, winogronach, orzeszkach ziemnych oraz w roślinach leczniczych (1). Na podstawie badań epidemiologicznych *trans*-resweratrol został uznany za główny składnik wina o działaniu prewencyjnym w chorobach sercowo-naczyniowych oraz nowotworowych (Renaud i wsp., 1998). Działanie chemoprewencyjne *trans*-resweratrolu wykazano na modelu doświadczalnej kancerogenezy u myszy; stilben ten hamował powstawanie indukowanych benz(a)antracenenem zmian nowotworowych (Jang i wsp., 1997). Chemoprewencyjne i chemoterapeutyczne właściwości resweratrolu zostały potwierdzone w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* (Kundu i wsp., 2008).



Ryc. 1. Chemiczne struktury naturalnych stilbenów: a- *trans*-resweratrol; b - piceatannol; c – rapontygenina; d – pterostilben; e – pinostilben; f – dezoksyrapontygenina.

Równolegle przeprowadzono badania bioaktywności naturalnych analogów resweratrolu, spośród których do najbardziej obiecujących zaliczono pterostilben (3,5-dimetoksy-4'-hydroksy-*trans*-stilben, Ryc. 1) o bioaktywności porównywalnej do związku macierzystego. Badania właściwości chemoterapeutycznych i chemoprewencyjnych pterostilbenu zapoczątkowała dr Agnes Rimando z jednostki badawczej Amerykańskiego Departamentu Rolnictwa (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service) współautorka publikacji wchodzących do cyklu habilitacyjnego, która wykazała jego działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych *in vitro* (Rimando i wsp., 2002). Dobroczynne działanie pterostilbenu zostało później szczegółowo udokumentowane kolejnymi badaniami, które wykazały jego aktywność antyoksydacyjną, przeciwcukrzycową, przeciwzapalną i proapoptotyczną (Rimando i Suh, 2008; Remsberg i wsp., 2008). Oprócz stilbenów do bioaktywnych fenolowych związków pochodzenia roślinnego zalicza się flawonoidy, kumaryny oraz kurkuminę i jej pochodne. Wpływ wymienionych związków na ekspresję genów cytochromowych oraz aktywność katalityczną enzymów był w minionym dziesięcioleciu intensywnie badany (1). Aktywność biologiczna naturalnych fenoli zainspirowała naukowców do dalszych poszukiwań związków naturalnych oraz ich

syntetycznych analogów interesujących ze względu na możliwości zastosowania w chemoterapii i chemoprewencji chorób nowotworowych. Synteza pochodnych naturalnych związków bioaktywnych umożliwiła wykonanie analizy SAR (Structure Activity Relationship) pomocnej w projektowaniu kolejnych potencjalnych modulatorów aktywności enzymatycznej cytochromów.

Cel badań

Badania wpływu naturalnych i syntetycznych analogów resweratrolu na aktywność cytochromów P450 z rodziny 1 prowadzono w celu określenia istotnych czynników strukturalnych decydujących o powinowactwie ligandu do centrum aktywnego enzymu oraz identyfikacji nowych inhibitorów o silnym i selektywnym oddziaływaniu na aktywność CYP1B1.

Wyniki i dyskusja

Naturalne pochodne *trans*-stilbenu jako inhibitory aktywności CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 *in vitro*

Trans-resweratrol, wiodący przedstawiciel pochodnych *trans*-stilbenu, cząsteczka o różnorodnych aktywnościach biologicznych mających znaczenie w chemoprewencji i chemoterapii (Juan et al., 2012), hamuje aktywność cytochromów rodziny 1 w zróżnicowany sposób. Najsilniej oddziałuje na CYP1B1 ($IC_{50} = 1.4 \mu M$) (Chang et al., 2000). Resweratrol hamuje aktywność CYP1A2 w sposób zależny od stężenia powstającego produktu reakcji (Chang et al., 2001), co pozwala przypuszczać, że powstający produkt prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji enzymu. Z badań Piver i współpracowników (Piver i wsp., 2004) wynika, że *trans*-resweratrol jest hydroksylowany w reakcji katalizowanej przez CYP1A2 do piceatannolu (3,3',4,5'-tetrahydroksy-*trans*-stilben; Ryc. 1). Ten naturalny polifenol wykazuje właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe (Piotrowska et al., 2012). Wśród naturalnych analogów resweratrolu na uwagę zasługuje również rapontygenina

(3,3',5-trihydroksy-4'-metoksy-*trans*-stilben, Ryc. 1), która selektywnie hamuje aktywność izoformy CYP1A1 (Chun i wsp., 2001a).

Badania inhibicji izoenzymów CYP1 zapoczątkowano w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu stosując jako źródło enzymu frakcję mikrosomalną wątroby myszy. Badaniom poddano konstytutywną formę CYP1A2, w stosunku do której silnymi inhibitorami okazały się analogi resweratrolu posiadające grupy metoksyłowe: pterostilben, pinostilben (3,4'-dihydroksy-5-metoksy-*trans*-stilben; Ryc. 1), dezoksyrapontygenina (3,5-dihydroksy-4'-metoksy-*trans*-stilben; Ryc. 1) oraz 3,4',5-trimetoksy-*trans*-stilben (2). Dla wymienionych związków wyznaczone metodą Lineweavera-Burka wartości stałej inhibicji (K_i) wynosiły odpowiednio 0,39; 1,04; 0,94 oraz 0,79 μ M. Dla porównania do badań zastosowano ludzki rekombinowany CYP1A2 produkowany przez firmę biotechnologiczną BD Gentest, (Woburn, MA, USA). Wyznaczono wartości K_i dla pinostilbenu i dezoksyrapontygeniny, które wynosiły odpowiednio 1,02 i 0,34 μ M (2).

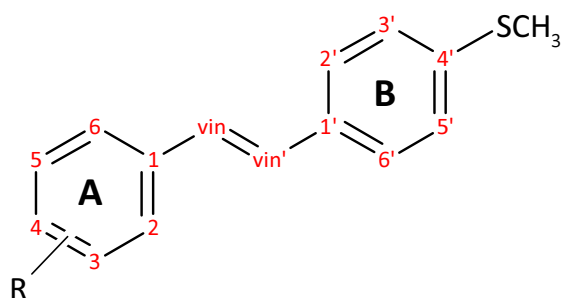
Ze względu na istotną rolę CYP1A1 i CYP1B1 w metabolizmie ksenobiotyków i związaną z tym procesem kancerogenezą oraz powstałą możliwością zastosowania do badań ludzkich rekombinowanych form wszystkich enzymów z rodziny 1 zaplanowano badania wpływu naturalnych pochodnych stilbenu na aktywność izoenzymów CYP1A1 i CYP1B1. Wyznaczone wartości K_i dla naturalnych analogów resweratrolu: pinostilbenu, dezoksyrapontygeniny i pterostilbenu w przypadku CYP1A1 wynosiły odpowiednio 0,13; 0,16; 0,57 μ M (3). Wcześniej wyznaczona przez Chuna i wsp. K_i dla resweratrolu wynosiła 9 μ M (Chun i wsp., 2001a). A zatem naturalne analogi resweratrolu, w których zastąpiono część grup hydroksylowych grupami metoksyłowymi okazały się wielokrotnie silniejszymi inhibitorami izoformy CYP1A1, podczas gdy ta różnica w strukturze nie miała znaczącego wpływu na inhibicję aktywności CYP1B1 (3).

Badanie wpływu syntetycznych metoksyłowych pochodnych *trans*-stilbenu na aktywność CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 *in vitro*

Jednym z motywów zachęcających do poszukiwań nowych analogów *trans*-resweratrolu była niska biodostępność tego związku spowodowana zbyt szybką eliminacją z organizmu w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym względnie

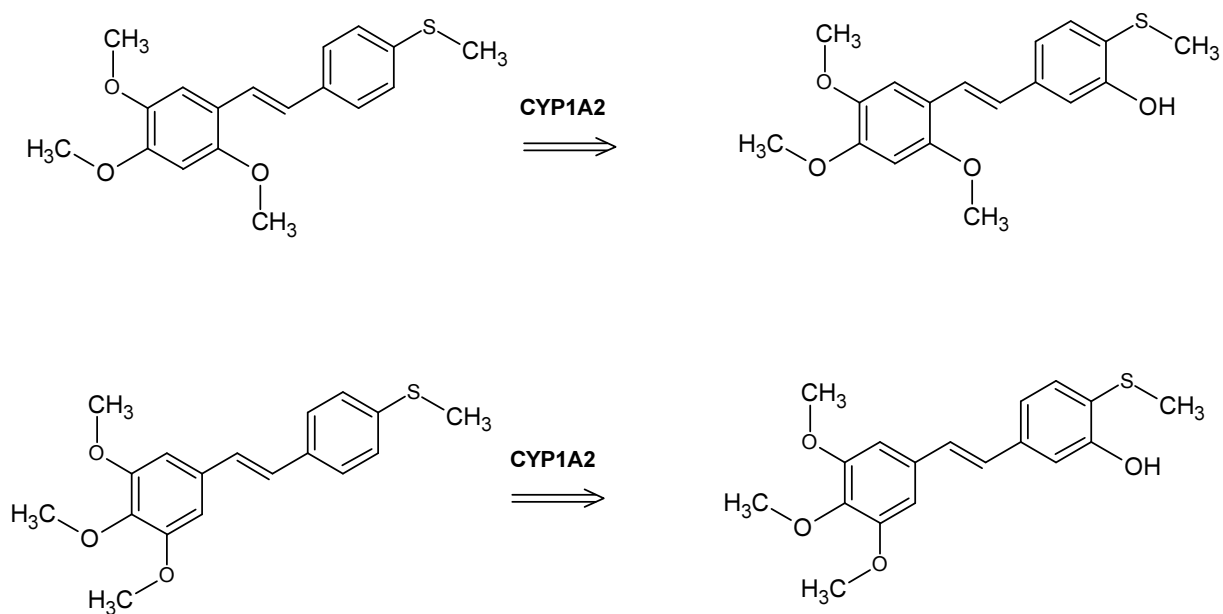
siarkowym (Walle i wsp., 2004). Wprowadzenie grup metoksyowych w miejsce hydroksyowych miało na celu zabezpieczenie związków przed glukuronidacją lub sulfatacją. W badaniach farmakokinetycznych prowadzonych na szczurach wykazano, że pterostilben - naturalny analog resweratrolu posiadający dwie grupy metoksyowe - po podaniu dożylnym ulega wolniejszej eliminacji w porównaniu z resweratrolem wykazując pięciokrotnie dłuższy klirens oraz dziesięciokrotnie dłuższy średni czas przejścia (MTT, mean transition time). Porównawcze badania dowiodły znacząco lepszej metabolicznej stabilności pterostilbenu w porównaniu z resweratrolem (Yeo i wsp., 2013).

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych rozpoczęły się intensywne poszukiwania syntetycznych pochodnych *trans*-stilbenu, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako selektywne inhibitory cytochromów P450 z rodziny 1. Wśród syntetycznych metoksyowych pochodnych *trans*-stilbenu pierwszym efektywnym inhibitorem aktywności CYP1B1 okazał się 3,5,2',4'-tetrametoksy-*trans*-stilben, którego działanie było przeszło 100-krotnie silniejsze w porównaniu do resweratrolu (Chun i wsp., 2001b). Kolejną pochodną stilbenu wykazującą silne powinowactwo do centrum aktywnego CYP1B1 był zaprojektowany i zsyntetyzowany przez Chuna i współpracowników 2,2',4,6'-tetrametoksy-*trans*-stilben (Chun i wsp., 2009). Próby syntezy pochodnych *trans*-stilbenu wykazujących selektywne działanie hamujące aktywność poszczególnych izoenzymów CYP1 podjęto także w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego. Zaprojektowano i zsyntetyzowane serię metoksyowych analogów resweratrolu posiadających w pozycji 4' grupę metylotiolową (Ryc. 2). Oceniono ich wpływ na ludzkie rekombinowane cytochromy z rodziny 1 (4).



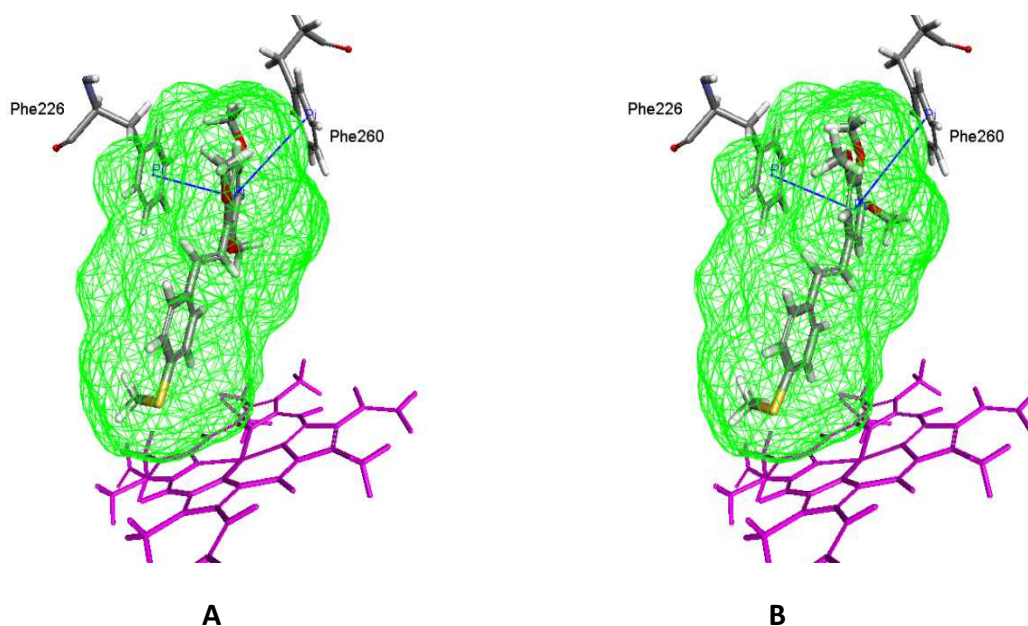
Ryc. 2. Struktura chemiczna pochodnych 4'-metyltio-*trans*-stilbenów. R – podstawnik(i) metoksyłowy(e).

Najsilniejsze działanie, selektywne w stosunku do CYP1A1 i CYP1B1 wykazywały 2-metoksy-4'-metylotio-*trans*-stilben i 3-metoksy-4'-metylotio-*trans*-stilben. Natomiast 4-metoksy-4'-metylotio-*trans*-stilben charakteryzował się słabym powinowactwem do centrum aktywnego enzymu. Na podstawie danych eksperymentalnych wykazano istotny wpływ grup metoksyłowych w pozycji 2 i 3 pierścienia fenyłowego w oddziaływaniach z resztami aminokwasowymi centrum aktywnego enzymów CYP1A1 i CYP1B1 (4). W celu wyjaśnienia wpływu struktury inhibitorów na ich aktywność, w kolejnych badaniach poszerzono serię 4'-metylotiopochodnych o nowe analogi oraz zastosowano metody obliczeniowe (5). Wyizolowano produkty metabolizmu 2,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu (2,4,5-trimetoksy-4'-MTS) i 3,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu (3,4,5-trimetoksy-4'-MTS) katalizowanego przez CYP1A2, co pozwoliło na przeprowadzenie ich identyfikacji przy użyciu metody GC-MS jako monohydroksyłowych pochodnych z grupą hydroksyłową w pozycji 3' (Ryc. 3).



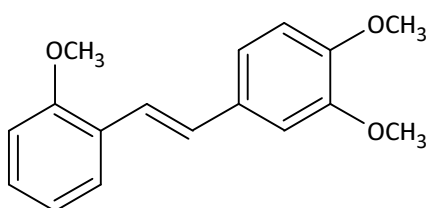
Ryc. 3. Reakcja hydroksylacji 2,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu i 3,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu katalizowana przez CYP1A2.

Enzymatyczne wprowadzenie grupy hydroksylowej w tej pozycji było możliwe przy odpowiedniej orientacji cząsteczki w miejscu aktywnym enzymu pierścieniem 4'-metylotiofenylowym w kierunku hemu. Znalazło to potwierdzenie w badaniach z użyciem modelowania molekularnego (5), a w szczególności dokowania ligandu do centrum aktywnego enzymu (Ryc. 4).



Ryc. 4. Wizualizacja centrum aktywnego CYP1A2 z zadokowanym 2,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenem (**A**) i 3,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenem (**B**). Na rycinie uwidoczniiono aminokwasy tworzące warstwowe oddziaływania π - π : Phe226 i Phe260. Hem zaznaczono kolorem różowym.

Bazując na dotychczasowych wynikach oraz danych literaturowych zaprojektowano serię metoksyowych pochodnych *trans*-stilbenu posiadających jako stały motyw 3,4-dimetoksyfenyl. Wśród 9 zsyntetyzowanych związków 2',3,4-trimetoksy-*trans*-stilben (2',3,4-triMS, Ryc. 5) hamował aktywność CYP1B1 w stężeniu nanomolarnym ($IC_{50} = 4.0 \pm 0.6$ nM) (**6**). Obecnie znane są w światowym piśmiennictwie dwa równie silne inhibitory CYP1B1: 2',3,4',5-tetrametoksy-*trans*-stilben (Chun i wsp., 2001b) i 2,2',4,6'-tetrametoksy-*trans*-stilben (Chun i wsp., 2009). 2',3,4-triMS otrzymany w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych zasługuje na dalsze badania właściwości cytotoksycznych oraz farmakokinetycznych w celu określenia przydatności w terapii nowotworów.



Ryc. 5. Struktura chemiczna 2',3,4-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

Modelowanie molekularne i dokowanie do centrum aktywnego CYP1A2 i CYP1B1

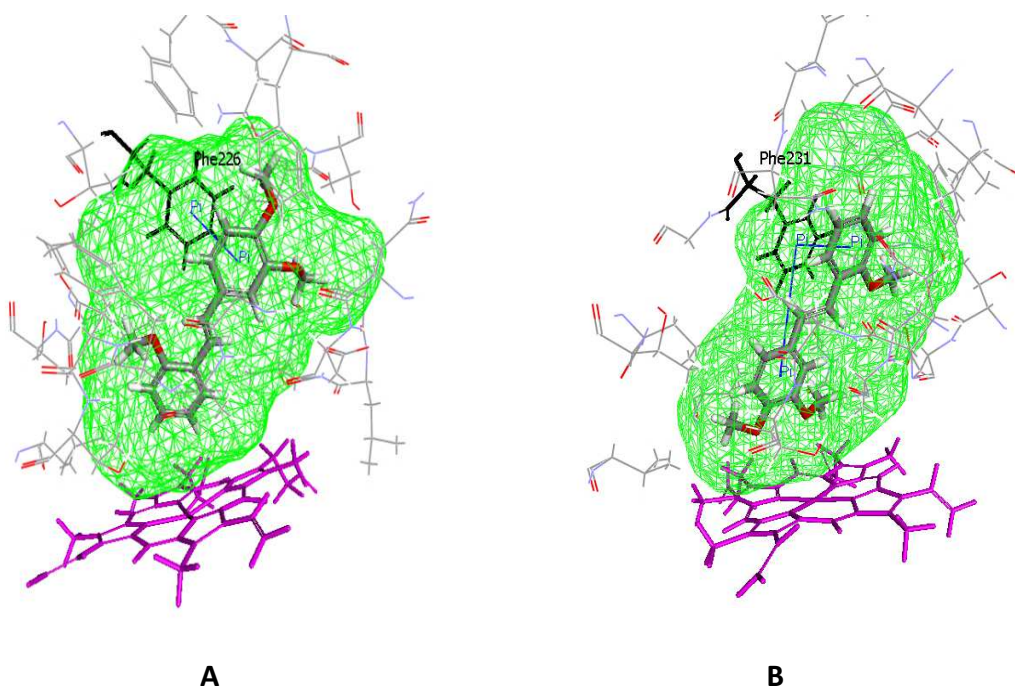
Dokowanie do centrów aktywnych struktur krystalograficznych CYP1A2 (Sansen et al., 2007) i CYP1B1 (Wang et al., 2011), dostępnych w bazie PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), pozwoliło na analizę zależności aktywności pochodnych *trans*-stilbenu od ich struktury. Zbadano orientacje cząsteczek ligandu w centrum aktywnym enzymów oraz oceniono typy oddziaływań molekularnych między cząsteczką ligandu a resztami aminokwasowymi centrum aktywnego enzymu. Zastosowana procedura LigandFit programu Accelrys Discovery Studio (Accelrys Software, 2012) umożliwiła wyznaczenie najbardziej prawdopodobnej orientacji ligandu na podstawie analizy energii oddziaływań, energii naprężeń w zadokowanej cząsteczce liganda oraz entalpii swobodnej wiązania z białkiem (ΔG). Stwierdzono, że dla badanych metyltio pochodnych stilbenu dokowanych w centrach aktywnych CYP1A2 i CYP1B1 najbardziej uprzywilejowaną energetycznie jest orientacja pierścieniem 4'-metyltiofenylowym w kierunku hemu. Dla serii 4'-metylotiostilbenów reszty aminokwasowe Phe226 i Phe260 dla CYP1A2 i Phe231 dla CYP1B1 brały udział w oddziaływaniu warstwowym (π - π stacking interaction) stabilizując ligand w centrum aktywnym. Ponadto dokowanie dla części związków wskazało na możliwość tworzenia wiązania wodorowego w centrum aktywnym CYP1B1, w którym uczestniczyła reszta aminokwasowa Gln332. Należy jednak dodać, że występowanie tego wiązania nie korelowało ze stopniem inhibicji aktywności enzymu. Szczególną rolę przypisuje się oddziaływaniom hydrofobowym, które mogą mieć wpływ na skrócenie odległości ligandu od atomu żelaza grupy prostetycznej umożliwiające zajście reakcji. Dla 3,4,5-trimetoksy-4'-MTS i 2,4,5-trimetoksy-4'-MTS odległości atomów węgla 3' i 5' były mniejsze niż 4.5 i 5.5 Å.

Natomiast w przypadku selektywnego inhibitora CYP1A1 i CYP1B1, 2,3,4-trimetoksy-4'-metyltio-*trans*-stilbenu, po zadokowaniu do centrum aktywnego CYP1A2 zaobserwowano słabe dopasowanie kształtu cząsteczki do miejsca wiążącego potwierdzone przez znaczący wzrost energii naprężenia do 103.09 kcal/mol. Dla

porównania energia naprężenia tego związku zadokowanego do CYP1B1 wynosiła jedynie 40.70 kcal/mol (5).

Struktura serii polimetoksyowych pochodnych *trans*-stilbenu posiadających stały motyw 3,4-dimetoksyfenylu wpłynęła na orientację ligandów w centrum aktywnym enzymu. W wyniku dokowania ligandy orientowały się w centrum aktywnym CYP1A2 w stronę hemu pierścieniem ze zmieniającymi się podstawnikami (orientacja A; Ryc. 6A).

Natomiast wśród orientacji 2',3,4-triMS w centrum aktywnym CYP1B1 przeważało ustawienie cząsteczki pierścieniem 3,4-dimetoksyfenylowym skierowanym w stronę hemu (orientacja B; Ryc. 6B); takie ustawienie przyjmował ligand w 17 na 20 zachowywanych podczas dokowania orientacji. Orientacja ta była również uprzywilejowana energetycznie w porównaniu do orientacji A; obliczona energia oddziaływania była wyższa o 12 kcal/mol, a energia swobodna wiązania ligandu o 40 kcal/mol.



Ryc. 6. Wizualizacja centrum aktywnego CYP1A2 (A) i CYP1B1 (B) z zadokowanym 2',3,4-trimetoksy-*trans*-stilbenem. Na rycinie zaznaczono reszty aminokwasowe otaczające centra aktywne z wyróżnioną czarnym kolorem Phe226 i Phe231. Hem zaznaczono kolorem różowym, a oddziaływanie warstwowe π - π linią niebieską.

Szczególnie silne powinowactwo 2',3,4-triMS do centrum aktywnego CYP1B1 w porównaniu do pozostałych związków badanej serii znalazło swoje odbicie w wyjątkowo wysokiej wartości entalpii swobodnej wiązania ($\Delta G = -443.1$ kcal/mol). Analiza interakcji ligandów z resztami aminokwasowymi centrum aktywnego CYP1B1 wykazała występowanie oddziaływań warstwowych typu π - π między obydwoma pierścieniami fenyłowymi 2',3,4-triMS a resztą aminokwasową Phe231. Natomiast wiązanie wodorowe występowało tylko dla mniej korzystnej energetycznie orientacji przeciwnej (A) i uczestniczyła w nim podobnie jak w serii 4'-metyltiostilbenów reszta aminokwasowa Gln332 (Ryc. 6). Zatem można sądzić, że wpływ wiązań wodorowych na powinowactwo liganda do centrum aktywnego cytochromu nie ma znaczenia nadrzędnego. Istotniejsze wydają się oddziaływania hydrofobowe między grupami metoksyłowymi i resztami aminokwasowymi centrum aktywnego determinujące powinowactwo inhibitora do cytochromu P450 (6). Z danych literaturowych zebranych dla pochodnych flawonoidów wiadomo, że zwiększenie lipofilności ligandów osiągnęte poprzez wprowadzenie grup metoksyłowych w miejsce hydroksyłowych ma wpływ na efektywne wiązanie substratu z enzymem (Takemura i wsp., 2010).

Dotychczasowe badania Chuna i współpracowników wskazywały na szczególną rolę podstawników metoksyłowych w pozycji 2 i 4, oraz 2 i 6 w hamowaniu aktywności CYP1B1 (Chun i wsp., 2001b, 2009, 2011). Zaprojektowana w naszym laboratorium cząsteczka 2',3,4-triMS okazała się porównywalnie skutecznym inhibitorem CYP1B1, wskazując na istotną rolę układu podstawników w pozycjach 2', 3 i 4. Cząsteczki posiadające dodatkowe podstawniki w jednej z pozycji: 3', 4', 5' lub 6' hamowały aktywność CYP1B1 kilkakrotnie słabiej w porównaniu z 2',3,4-triMS, a zatem te podstawniki osłabiały powinowactwo badanych stilbenów do CYP1B1.

W prowadzonych przeze mnie badaniach zestawiono wyniki oznaczeń eksperymentalnych z analizą bioinformatyczną. Dokowanie molekularne pozwoliło na wizualizację występujących oddziaływań międzycząsteczkowych oraz przestrzennego dopasowania ligandów w centrum aktywnym enzymu. Potwierdziła się hipoteza, że o silnym powinowactwie ligandu do centrum aktywnego enzymu decyduje nie

pojedynczy podstawnik, lecz układ podstawników determinujący kształt całej cząsteczki. Układ ten wpływa na ustawienie ligandu w centrum aktywnym stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe, w tym warstwowe typu π - π . Równie istotnym czynnikiem w przypadku ligandów ulegających reakcji enzymatycznej jest ich odległość od grupy prostetycznej enzymu warunkująca przebieg procesu. Wydaje się, że powiązanie badań eksperymentalnych z analizą komputerową *in silico* dla oddziaływań ligandów z centrum aktywnym enzymu na poziomie molekularnym zaowocuje w przyszłości zaprojektowaniem cząsteczek o pożądanej aktywności.

Podsumowanie

Prowadzone przeze mnie badania dostarczyły informacji o oddziaływaniu naturalnych, występujących w diecie człowieka pochodnych *trans*-stilbenu oraz ich syntetycznych pochodnych na aktywność enzymów biorących udział w metabolizmie licznych związków endo i egzogennych, w tym leków i prokancerogenów. Wyniki badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- Naturalne analogi *trans*-resweratrolu: pinostilben, dezoksyrapontygenina i pterostilben, które w miejscu grup hydroksylowych posiadają grupy metoksyłowe, silniej hamują aktywność CYP1A1 i CYP1A2 w porównaniu z *trans*-resweratrolem.
- Syntetyczna pochodna stilbenu, 2',3,4-trimetoksy-*trans*-stilben, jest jednym z najsilniejszych znanych inhibitorów CYP1B1, izoenzymu będącego potencjalnym celem chemoprewencji i chemoterapii nowotworów. Związek ten charakteryzuje się wysoką selektywnością działając 90 razy silniej na CYP1B1 w porównaniu do CYP1A1 oraz 830 razy silniej w porównaniu do CYP1A2 i zasługuje na dalsze badania potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych.
- Brak wpływu 2,3,4-trimetoksy-4'-metyltio-*trans*-stilbenu na aktywność CYP1A2 został wyjaśniony niedopasowaniem kształtu cząsteczki do centrum aktywnego

CYP1A2, co znalazło potwierdzenie w wysokiej energii naprężenia zadokowanej cząsteczki obliczonej z wykorzystaniem oprogramowania Accelrys Discovery Studio.

- Przeprowadzone badania z zastosowaniem dokowania molekularnego serii pochodnych stilbenu do centrum aktywnego CYP1A2 potwierdziły umiejscowienie pierścienia 4'-metylotiofenylowego dla 2,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu i 3,4,5-trimetoksy-4'-metylotio-*trans*-stilbenu w bezpośrednim sąsiedztwie hemu umożliwiające przebieg reakcji hydroksylacji w pozycji 3'. Decydujący wpływ na oddziaływanie pochodnych *trans*-stilbenu na aktywność cytochromów z rodziny 1 wywiera wzajemny układ podstawników połączonych z rdzeniem *trans*-stilbenu. Pozycja wybranych podstawników wpływa na ustawienie ligandu i interakcje z resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym, a tym samym na jego odległość od hemu, co warunkuje przebieg reakcji katalitycznej.

Badania z zastosowaniem metod komputerowych pozwoliły wyjaśnić naturę interakcji między cząsteczką liganda a centrum aktywnym enzymu. Analiza przeprowadzona dla dwóch serii związków: 4'-metylotio-*trans*-stilbenów i polimetoksy-*trans*-stilbenów wskazuje na rolę przestrzennego dopasowania cząsteczki do centrum aktywnego, które umożliwia powstanie korzystnych energetycznie oddziaływań pomiędzy ligandem a resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym enzymu. Analiza tych oddziaływań pozwoliła na zidentyfikowanie reszt aminokwasowych centrum aktywnego enzymów uczestniczących w oddziaływaniach z ligandem. Stwierdzono, że dla CYP1A2 aminokwasem biorącym udział w oddziaływaniu typu π - π z jednym z pierścieni stilbenów jest reszta aminokwasowa Phe226. Natomiast w centrum aktywnym CYP1B1 oddziaływanie typu π - π występuje pomiędzy resztą aminokwasową Phe231 a dwoma pierścieniami stilbenów. Warto zauważyć, że w centrum aktywnym CYP1B1 jedynym aminokwasem tworzącym wiązanie wodorowe z pochodnymi zarówno 4'-metylotio-*trans*-stilbenu jak i 3,4-dimetoksy-*trans*-stilbenu jest Gln332.

Pochodne *trans*-stilbenu należą do związków o bioaktywności mającej znaczenie w chemoprewencji i chemoterapii nowotworów. Poszerzenie wiedzy o mechanizmie ich oddziaływania na cytochromy z rodziny 1 – enzymy uczestniczące w metabolizmie prokancerogenów, a także leków przeciwnowotworowych umożliwi dalsze badania mające na celu zaprojektowanie efektywnych chemoterapeutyków o pożądanych właściwościach.

Piśmiennictwo

Accelrys Software Inc., Discovery studio Modeling environment, Release 3.5, San Diego, 2012.

Badal S., Delgoda R. (2014) Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. J. Appl. Toxicol. 34, 743-753.

Baer-Dubowska W., Ignatowicz E. Chemoprevention of cancer: basic mechanisms and molecular targets, Carcinogenic and anticarcinogenic food components (Red. Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Giganti D.), CRC Press Taylor&Francis Group Boca Raton FL, USA, London UK, 2006, 177-198.

Bièche I., Narjoz C., Asselah T., Vacher S., Marcellin P., Lidereau R., Beaune P., de Waziers I. (2007) Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. Pharmacogenet. Genomics 17, 731-742.

Bruno R.D., Njar V.C.O. (2007) Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. Bioorg. Med. Chem. 15, 5047-5060.

Chang T.K.H., Lee W.B., Ko H.H. (2000) Trans-resveratrol modulates the catalytic activity and m-rNA expression of the procarcinogens-activating human cytochrome P450 1B1. Can. J. Physiol. Pharmacol. 78, 874-881.

Chang T.K.H., Chen J., Lee W.B.K. (2001) Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by trans-resveratrol: evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2. J. Pharmacol. Exp. Ther. 299, 874-882.

- Chun Y.-J., Ryu S.Y., Jeong T.C., Kim M.Y. (2001a) Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A1 by rhapontigenin. *Drug Metab. Dispos.* 29, 389-393.
- Chun Y.-J., Kim S., Kim D., Lee S.K., Guengerich F.P. (2001b) A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis. *Cancer Res.* 61, 81-64-8170.
- Chun Y.-J., Oh Y.-K., Kim B.J., Kim D., Kim S.S., Choi H.-K., Kim M.-Y. (2009) Potent inhibition of human cytochrome P450 1B1 by tetramethoxystilbene. *Toxicol. Lett.* 189, 84-89.
- Chun Y.J., Lim c., Ohk S.O., Lee J.M., Lee J.H., Choi s., Kim S. (2011) trans-Stilbenoids: potent and selective inhibitors for human cytochrome P450 1B1. *MedChemComm.* 2, 402-405.
- Gajjar K., Martin-Hirsch P.L., Martin F.L. (2012) CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer Lett.* 324, 13-30.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn D.A., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Science* 275, 218-220.
- Juan M.E., Alfaro I., Planas J.M. (2012) Colorectal cancer chemoprevention by *trans*-resveratrol. *Pharmacol. Res.* 65, 584-591.
- Kundu J.K., Surh Y.-J. (2008) Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Lett.* 269, 243-261.
- Nebert D.W., Russell D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155-1162.
- Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847-23850.
- Piotrowska H., Kucińska M., Murias M. (2012) Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res.* 750, 60-82.

- Piver B., Fer M., Vitrac X., Merillon J.-M., Dreano Y., Berthou F., Lucas D. (2004) Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 773-783.
- Protein Data Base, PDB Current Holdings Breakdown,
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> [dostęp 2014-10-28]
- Remsberg C.M., Yáñez J.A., Ohgami Y., Vega-Villa K.R., Rimando A.M., Davies N.M. (2008) Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother. Res.* 22, 169–179.
- Renaud S.C., Guenguen R., Schenker J., d'Houtaud A. (1998) Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 9, 184-188.
- Rendic S., Guengerich F.P. (2012) Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1316-1383.
- Rimando A.M., Cuendet M, Desmarchelier C., Mehta R.G., Pezzuto J.M., Duke O.D. (2002) Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3453-3457.
- Rimando A.M., Suh N. (2008) Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. *Planta Med.* 74, 1635-1643.
- Sansen S., Yano J.K., Reynald R.L., Schoch G.A., Griffin K.J., Stout C.D., Johnson E.F. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 14348.
- Swanson H.I., Njar V.C.O., Yu Z., Castro D.J., Gonzalez F.J., Williams D.E., Huang Y., Kong A.-N. T., Doloff J.C., Ma J., Waxman D.J., Scott E.E. (2010) Targeting Drug-metabolizing enzymes for effective chemoprevention and chemotherapy. *Drug Metab. Dispos.* 38, 539-544.
- 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.

Takemura H., Itoh T., Yamamoto K., Sakakibara H., Shimoi K. (2010) Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 6310-6315.

Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E.Jr., Walle U.K. (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1377-1382.

Wang A., Savas U., Stout C.D., Johnson E.F. (2011) Structural characterization of the complex between α -naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1. *J. Biol. Chem.* 286, 5736

Wattenberg L.W. (1966) Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review. *Cancer Res.* 26, 1520-1526.

Yager J.D. (2000) Endogenous estrogens are carcinogens through metabolic activation. *J. Natl. Cancer Inst, Monogr.*, 27, 67-73.

Yeo S.C.M., Ho P.C., Lin H.S. (2013) Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: The impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation and dosing route on bioavailability. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1015-1025.

Zanger U.M., Klein K., Thomas M., Rieger J.K., Tremmel R., Kandel B.A., Klein M., Magdy T. (2014) Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 258-261.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk przyrodniczych

Po ukończeniu studiów chemicznych w roku 1974 na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza i odbyciu rocznego stażu w Instytucie Przemysłu Zielarskiego w Poznaniu podjęłam studia doktoranckie przy Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pracę doktorską wykonywałam w Zakładzie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu kierowanym przez prof. dr hab. Antoniego Horsta. W roku 1978 zostałam zatrudniona na etacie naukowo-technicznym, po obronie pracy doktorskiej na etacie adiunkta. W PAN pracowałam do roku 1990. Badania naukowe wykonywałam w Zespole Patologii Molekularnej kierowanym przez prof. dr hab. Andrzeja Pawlaka. Dotyczyły one zróżnicowania międzysobniczego aktywności hydroksylazy węglowodorów aromatycznych (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase; AHH), enzymu zależnego od cytochromu P450 w limfocytach ludzkich.

W roku 1982 obroniłam pracę doktorską pt. „Badania hydroksylazy węglowodorów aromatycznych w limfocytach ludzkich stymulowanych mitogenem *in vitro*”. Na ówczesnym poziomie wiedzy izoenzymy cytochromu P450 były różnicowane przy pomocy specyficznych substratów oraz inhibitorów. W pracy przedstawiłam badania inhibicji enzymu AHH indukowanego metylocholanem przez α -naftoflawon, β -naftoflawon i metyrapon (II A/1, II A/2).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk przyrodniczych

Po obronie doktoratu zajmowałam się badaniem aktywacji i inaktywacji benzo(a)pirenu [B(a)P] w fibroblastach ludzkich oraz w komórkach GMK (Green Monkey Kidney) podejmując badania produktów metabolizmu B(a)P metodą HPLC (II A/3; IIA/6). Następnie we współpracy z dr hab. Damianem Brauze badałam wpływ przeciwciał monoklonalnych oraz specyficznego inhibitora – α -naftoflawonu, na metabolizm B(a)P w mikrosomach wątroby myszy (II A/4; II A/5; II A/7). Zaobserwowaliśmy silne hamowanie metabolizmu benzo(a)pirenu przez α -naftoflawon oraz zmianę ilościową proporcji poszczególnych metabolitów; stosunek ilości

powstałych fenoli do chinonów i dwuhydroksypochodnych był dwukrotnie wyższy. W 1987 roku przebywałam na stażu naukowym w Uniwersytecie w Oulu w Finlandii w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii kierowanym przez profesora Olafa Pelkonena, gdzie prowadziłam badania w zakresie metabolizmu B(a)P oraz powstawania adduktów metabolitów B(a)P z DNA w procesie kancerogenezy. W Zakładzie Genetyki Człowieka stosowałam nową metodę synchronicznej fluorescencji (Synchronous Fluorescence spectrophotometry; SFS) do oceny adduktów B(a)P z DNA w płucach, wątrobie, nerkach, śledzionie i jelicie cienkim myszy szczepów różniących się odpowiedzią na podanie B(a)P. Wykazaliśmy, że u myszy charakteryzujących się słabą odpowiedzią na indukcję AHH, poziom adduktów w badanych tkankach (z wyjątkiem jelita cienkiego) był wyższy w porównaniu z myszami o wysokiej indukowalności AHH. Wysoki poziom adduktów w jelicie cienkim myszy „indukowalnych” tłumaczy się dożołądkową drogą podania B(a)P. Myszy te charakteryzowały się szybkim procesem eliminacji adduktów wskazującym na szczególną rolę komórek jelita cienkiego w procesie detoksykacji (II A/8). Ten etap pracy zaowocował siedmioma publikacjami w czasopismach polskich i jedną w czasopiśmie zagranicznym o wysokim wskaźniku IF (Carcinogenesis, 12, 1607-1611, 1991).

W latach 1990-1999 pracowałam w Liceum Ogólnokształcącym św. Marii Magdaleny w Poznaniu. W roku 1998 uzyskałam uprawnienia egzaminatora maturalnego. W 2000 roku powróciłam do pracy naukowo-badawczej w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Podjęłam badania pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Baer-Dubowskiej w tematyce związanej z funkcją cytochromów P450 i ich znaczeniem w profilaktyce i terapii nowotworów.

Badania obejmujące wpływ naturalnych substancji będących składnikami diety człowieka na aktywność cytochromów uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków: CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 oraz wątrobowego cytochromu CYP2E1 w początkowym okresie prowadziłam na materiale zwierzęcym: izolowanej frakcji mikrosomalnej wątroby myszy, a potem z wykorzystaniem ludzkich rekombinowanych cytochromów. Spośród licznych związków naturalnych o aktywności biologicznej, obiektem mojego zainteresowania stały się *trans*-stilbeny, do których należy *trans*-resweratrol, naturalny polifenol występujący w jagodach, winogronach, orzeszkach

ziemnych oraz w czerwonym winie, stanowiący składnik diety o udokumentowanych właściwościach chemoprewencyjnych. Jego naturalne analogi silnie hamowały aktywność cytochromów P450 z rodziny 1 (punkt 4 autoreferatu). Równolegle prowadzono badania wpływu związków naturalnych: kwasu protokatechowego, kwasu taninowego oraz *trans* resweratrolu na aktywność CYP2E1, cytochromu silnie indukowanego w wątrobie przez rozpuszczalniki organiczne, nitrozaminy i środki anestetyczne. Wyznaczono K_i dla hamowania aktywności CYP2E1 przez *trans*-resweratrol (2.1 μ M) oraz określono mechanizm inhibicji jako kompetycyjny (II A/9). Zaobserwowano znaczącą różnicę w powinowactwie do centrum aktywnego ludzkiego rekombinowanego CYP2E1 dwóch analogów resweratrolu: pinostilbenu i dezoksyrapontygeniny, różniących się położeniem grupy metoksylowej (2). Wyniki tych badań zostały opublikowane (II A/9, 2) oraz przedstawione w formie komunikatów ustnych i posterowych na konferencjach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (2001, 2003), European Environmental Mutagen Society (2002) oraz na kongresie organizowanym przez Federation of European Biochemical Societies (2004).

W 2004 roku nawiązałam współpracę z dr Agnes Rimando z Amerykańskiego Departamentu Rolnictwa (United States Department of Agriculture) w Stanach Zjednoczonych, której prace poświęcone są biologicznej aktywności metoksyloвого analogu *trans*-resweratrolu – pterostilbenu będącego składnikiem naturalnych preparatów stosowanych w tradycyjnej medycynie wschodniej. W Katedrze Biochemii Farmaceutycznej wykonałam ocenę inhibicji cytochromów P450 z rodziny 1 przez serię naturalnych analogów resweratrolu, w tym pterostilbenu syntetyzowanego w pracowni dr Rimando. Owocem tej współpracy są wspólne publikacje w międzynarodowych czasopismach (2, 3, 5, II A/10) oraz uczestnictwo w kongresie American Chemical Society w Chicago (2007). Tematyce chemoprewencyjnego i terapeutycznego działania naturalnych analogów resweratrolu została poświęcona praca przeglądowa, która ukazała się w czasopiśmie polskojęzycznym (II D/2). Tematem prowadzonych równolegle badań we współpracy z dr Ewą Ignatowicz z Katedry Biochemii Farmaceutycznej był synergizm antyoksydacyjnego działania naturalnych polifenoli, kwercetyny, resweratrolu i pterostilbenu, oceniany w ludzkich erytrocytach w warunkach *in vitro* (II A/10, Plant Foods Hum. Nutr. 65, 57-63, 2010). Praca ta cieszy się dużym zainteresowaniem i była do 28.10.2014 roku cytowana 41

razy (Web of Science). Opisano w niej hamowanie peroksydacji lipidów w erytrocytach ludzkich pod wpływem kwercetyny i pterostilbenu, a tym samym ochronne działanie tych związków na błony erytrocytarne. Kwercetyna, pterostilben oraz *trans*-resweratrol zapobiegały hemolizie erytrocytów i spadkowi poziomu zredukowanego glutationu w komórkach. Wykazano synergiczny efekt ochronny niskich stężeń resweratrolu z kwercetyną i resweratrolu z pterostilbenem na peroksydację lipidów będącą wykładnikiem uszkodzenia oksydacyjnego błon komórkowych. Badania dotyczące właściwości antyoksydacyjnych naturalnych polifenoli zostały opublikowane (II A/10) oraz przedstawione na dwóch konferencjach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (2007, 2008). Ogółem w tym okresie mojej pracy badawczej zostały opublikowane 3 prace oryginalne w czasopismach zagranicznych, których wyniki przedstawiono na 3 zjazdach krajowych oraz międzynarodowej konferencji Resveratrol 2010, 1st International Conference of Resveratrol and Health, Elsinore, Denmark (2010).

Poszerzając moje zainteresowanie oddziaływaniami naturalnych stilbenów z enzymatycznymi systemami detoksykacyjnymi w kontekście zależności pomiędzy strukturą a funkcją związków chemicznych nawiązałam współpracę prof. dr hab. Stanisławem Sobiakiem, kierownikiem z Katedry Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, w której od 2008 roku jestem zatrudniona na etacie asystenta, a od 2013 roku na etacie starszego wykładowcy. W swoich badaniach skupiłam się na wpływie syntetycznych metoksylowych i metylotio pochodnych stilbenu na aktywność trzech izoenzymów cytochromu P450: CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1, odpowiedzialnych za aktywację prokancerogenów, (4, 5, 6). Wyniki badań prowadzonych w tym okresie zostały opisane w dwóch artykułach opublikowanych w czasopismach zagranicznych. Ponadto wyniki prezentowano na konferencjach krajowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (2008, 2012) oraz Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej (2008, 2012, 2013). Badania te są kontynuowane.

W ramach grantu MNiSW/NCN (Projekt nr 2011/03/B/NZ7/00509) uczestniczę w badaniach aktywności antytubulinowej pochodnych *cis*-stilbenu stanowiących analogi kombretastatyny A-4 – naturalnego stilbenu wykazującego silne antymitotyczne działanie o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów. Badane związki różnią

się układem podstawników metoksyowych i metyltiolowych w obrębie układu *cis*-stilbenowego oraz sposobem jego zabezpieczenia przed izomeryzacją z formy *cis* do *trans*. Zahamowanie zachodzenia spontanicznej izomeryzacji jest możliwe dzięki wbudowanym do ich struktury pierścieniom imidazolowym i oksazolowym. W badaniach zidentyfikowano kilka oksazolowych pochodnych *cis*-stilbenu o działaniu antymitotycznym porównywalnym z kombretastatyną A-4. Zagadnieniu wpływu struktury stilbenów na ich aktywność antytubulinową została poświęcona praca przeglądowa pt. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents (II D/3, Cell. Mol. Biol. Lett. 18, 368-397, 2013).

Jestem autorem 16 oryginalnych prac doświadczalnych oraz 4 prac poglądowych (załącznik 4). Większość tych prac ukazała się w czasopismach znajdujących się na liście Thomson Reuters (sumaryczny IF = 18,246). Na mój dorobek naukowy składają się ponadto 24 streszczenia prac prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych, z których 10 było publikowanych w wydawnictwach ciągłych (załącznik 4).

5.2. Dorobek dydaktyczny

W ramach mojej działalności dydaktycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego prowadziłam zajęcia laboratoryjne i seminaryjne dla studentów farmacji z biochemii, biologii molekularnej oraz technologii chemicznej środków leczniczych.

Jestem autorem dwóch rozdziałów w skrypcie „Ćwiczenia z biochemii” dla studentów farmacji oraz materiałów do ćwiczeń przeznaczonych dla studentów anglojęzycznych (Study Guide for English Speaking Pharmacy Students) wydanych przez Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (II E/3; II E/4; II E/5).

Byłam kierownikiem względnie opiekunem 10 prac magisterskich wykonanych w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej oraz 4 prac magisterskich wykonanych w Katedrze Technologii Środków Leczniczych.

5.3. Udział w projektach badawczych

Brałam udział w realizacji trzech projektów badawczych finansowanych w ramach badań własnych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego oraz aktualnie biorę udział jako wykonawca w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

1. Wpływ analogów resweratrolu – potencjalnego czynnika chemoprewencyjnego, na aktywność katalityczną CYP2E1. Projekt Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, Nr 501-3-02-05, realizowany w latach 1999-2002 - wykonawca
2. Wpływ analogów resweratrolu – potencjalnego czynnika chemoprewencyjnego na aktywność katalityczną cytochromów P450. Projekt Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego, Nr 501-01-03302404-02524, realizowany w latach 2002-2006 - wykonawca
3. Badanie aktywności biologicznej naturalnych i syntetycznych pochodnych *trans*-stilbenu. Projekt Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego, Nr 501-01-03313427-08032 – realizowany w latach 2009-2010 - kierownik
4. Projektowanie, synteza i ocena aktywności biologicznej metylotio-pochodnych kombrestastatyny A-4 – potencjalnych czynników antymitotycznych Projekt MNiSW/NCN OPUS nr 2011/03/B/NZ7/00509 - realizowany - wykonawca
5. Badanie modulacji syntezy i metabolizmu estrogenów – czynników ryzyka nowotworu piersi przez nowe syntetyczne pochodne resweratrolu. Projekt MNiSW/NCN OPUS Nr 2012/05/B/NZ7/03048 – realizowany – wykonawca

5.4. Nagrody i wyróżnienia

Nagroda Zespołowa Dydaktyczna Uniwersytetu Medycznego im K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2007/2008

5.5. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Brałam udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Jestem współautorem 50 komunikatów prezentowanych w formie ustnej lub posterowej (wykaz streszczeń – załącznik 6).

5.6. Staże naukowe

1987 – University of Oulu, Department of Pharmacology and Toxicology, Finlandia

5.7. Współpraca międzynarodowa

2004 – nadal: dr Agnes Rimando, Agricultural Research Service, United States

Department of Agriculture, University, MS, USA

5.8. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych

Jestem członkiem następujących towarzystw naukowych:

- Polskie Towarzystwo Biochemiczne
- Polskie Towarzystwo Chemii Medycznej

5.9. Recenzje

W okresie ostatnich 4 lat byłam recenzentem 9 prac w następujących czasopismach naukowych: *Planta Medica* (dwukrotnie); *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; *Journal of Natural Products*; *Plant Foods for Human Nutrition*; *Molecular Nutrition and Food Research*; *Molecules*; *Current Cancer Drug Targets*; *Drug Design, Development and Therapy*.

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

W skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi: prace oryginalne, 4 prace poglądowe dotyczące tematyki związanej z chemoprewencją i chemoterapią nowotworów, oraz 2 rozdziały w podręczniku biochemii dla studentów farmacji, a także materiały do ćwiczeń z biochemii dla studentów anglojęzycznych z wydane w postaci płyty CD. Wynikająca z bibliometrii łączna punktacja mojego dorobku naukowego wynosi:

KBN/MNiSW = 224

IF = 18,246

Prace były cytowane w 193 artykułach innych autorów wg bazy Web of Sciences/Thomson Reuters, a mój Indeks Hirscha wynosi 7 (Web of Science/Thomson Reuters).

Jestem autorem i współautorem 24 doniesień zjazdowych: w tym 8 posterów prezentowałam na konferencjach zagranicznych i 11 na krajowych zjazdach. Pięć doniesień było prezentowanych w formie komunikatów ustnych, z tego dwa zostały w analizie bibliometrycznej zakwalifikowane jako referaty. Brałam udział w realizacji trzech projektów badawczych finansowanych w ramach badań własnych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego oraz aktualnie biorę udział jako wykonawca w realizacji dwóch projektów OPUS finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Denise Jilka