

Katedra Biochemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu



Violetta Krajka-Kuźniak

Załącznik 2

Autoreferat

Poznań 2013

1. Imię i nazwisko: Violetta Krajka-Kuźniak

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

Dyplom z wyróżnieniem mgr analityki medycznej; Wydział Farmaceutyczny Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej w Poznaniu, 1993 r., praca magisterska pt. „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych dla oceny wpływu przeciwutleniaczy fenolowych na profil metabolitów benzo(a)pirenu u szczurów indukowanych metylocholantrenem”; II miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich

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

Dyplom dr nauk farmaceutycznych; Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Poznaniu, 2000 r., rozprawa doktorska pt. „Wpływ roślinnych związków fenolowych - kwasu protokatechowego i taninowego na aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki w wątrobie i nerkach myszy i szczura”; promotor dr hab. Wanda Baer-Dubowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1993 - 2000	Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Zakład Biochemii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu - pracownik naukowo-dydaktyczny - asystent
1994 - 1999	Szpital kliniczny nr 2 im. H. Święcickiego w Poznaniu - asystent dyżurny
2000 – 2005	Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Zakład Biochemii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu - asystent z doktoratem
2005 – nadal	Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu - adiunkt

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:

„Badanie molekularnego mechanizmu indukcji enzymów II fazy przez roślinne związki - potencjalne czynniki chemoprewencyjne”

Podstawą ubiegania się o tytuł dr habilitowanego stanowi **cykl 10 publikacji** (1 poglądowa i 9 oryginalnych), w których przedstawiono wyniki badań dotyczących oddziaływania prostych związków fenolowych i złożonej matrycy żywieniowej w odniesieniu do indukcji enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków oraz możliwości wykorzystania ich w chemoprewencji.

b) **wykaz publikacji**

1. Krajka-Kuźniak V. (2007) Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. Post. Hig. Med. Dośw. 61, 627-638.

Punktacja KBN/MNiSW =9

2. Krajka-Kuźniak V., Kaczmarek J., Baer-Dubowska W. (2008) Effect of naturally occurring phenolic acids on the expression of glutathione S-transferase isozymes in the rat. Food Chem. Toxicol. 46, 1097-1102.

IF=2.321; Punktacja KBN/MNiSW=32

3. Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Baer-Dubowska W. (2008) Hepatic and extrahepatic expression of glutathione S-transferase isozymes in mice and its modulation by naturally occurring phenolic acids. Environ. Toxicol. Pharmacol. 25, 27-32.

IF=1.509; Punktacja KBN/MNiSW=27

4. Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Ignatowicz E., Adamska T., Oszmiański J., Baer-Dubowska W. (2009) Effect of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice on the metabolic activation and detoxication of carcinogenic N-nitrosodiethylamine in rat liver. J. Agric. Food Chem. 57, 5071-5077.

IF=2.469; Punktacja KBN/MNiSW=32

5. Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Bartoszek A., Baer-Dubowska W. (2011) Modulation of rat hepatic and kidney phase II enzymes by cabbage juices: comparison with the effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate.

Br. J. Nutr. 105, 816-826.

IF=3.013; Punktacja KBN/MNiSW=35

6. Krajka-Kuźniak V., Szafer H., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. (2012) Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. Food Chem. Toxicol. 50, 2027-2033.

IF=3.010; Punktacja KBN/MNiSW=35

7. Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Baer-Dubowska W. (2013) Xanthohumol induces phase II enzymes via Nrf2 in human hepatocytes *in vitro*. Toxicol. In Vitro, 27, 149-156.

IF=2.650; Punktacja KBN/MNiSW=30

8. Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Celewicz L., Barciszewski J., Baer-Dubowska W. (2013) Phloretamide, an apple phenolic compound, activates the Nrf2/ARE pathway in human hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 51, 202-209.

IF=3.010; Punktacja KBN/MNiSW=35

9. Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Szafer H., Baer-Dubowska W. (2013) Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. Br. J. Nutr. doi:10.1017/S00071145130001645

IF=3.302; Punktacja KBN/MNiSW=35

10. Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Oszmiański J., Baer-Dubowska W. (2013) Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) bark extract regulates antioxidant response element (ARE)-mediated enzyme expression *via* Nrf2 pathway activation in normal hepatocyte cell line. *Phytother Res.* DOI:10.1002/ptr.5035

IF= 2.068; Punktacja KBN/MNiSW=25

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

Łączny Impact Factor dla tych 10 prac wynosi: 23.352

Łączna punktacja KBN/MNiSW dla tych 10 prac wynosi 295

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

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

WPROWADZENIE

Profilaktyka chorób cywilizacyjnych takich jak nowotwory oraz schorzenia o podłożu zapalnym i degeneracyjnym, za pomocą syntetycznych środków farmakologicznych i/lub naturalnych składników diety szczególnie tzw. nieodżywczych składników żywności stanowi ważną alternatywę ciągle nieskutecznej terapii. Charakterystyczną cechą procesu nowotworzenia, a także niektórych innych schorzeń określanych jako degeneracyjne zarówno w układach eksperymentalnych i jak można przypuszczać również u człowieka, jest stosunkowo długi okres, jaki upływa od chwili inicjacji do rozwoju klinicznej postaci nowotworu, który stwarza wiele możliwości wczesnej interwencji. Tego rodzaju podejście określane jako chemoprewencja zostało zaproponowane już na początku lat 70-tych ubiegłego wieku (Wattenberg, 1966), a jego aktualna definicja zakłada stosowanie związków pochodzenia naturalnego, ich zmodyfikowanych analogów lub związków syntetycznych w celu zahamowania lub odwrócenia procesu kancerogenezy na jego

możliwie najwcześniejszych etapach. Doświadczenia ostatnich ponad 30 lat dostarczyły dowodów, że takie podejście jest możliwe i może być skuteczne. Zarówno w modelach doświadczalnych jak i u ludzi proces indukcji nowotworów wiąże się z kumulacją wielu mutacji w krytycznych genach będących wynikiem uszkodzeń DNA przez elektrofilne metabolity kancerogenów i/lub reaktywne formy tlenu (RFT). Badania ostatnich lat wykazały także, że istotną rolę w tym procesie odgrywają zjawiska epigenetyczne. Rola metabolizmu ksenobiotyków w indukcji procesu kancerogenezy została dobrze określona w ciągu ostatniego półwiecza. Jednak dopiero ostatnie lata dzięki wykorzystaniu nowych narzędzi badawczych, umożliwiających zrozumienie mechanizmu indukcji na poziomie molekularnym dostarczyły przekonujących dowodów, że selektywna indukcja enzymów II fazy jest skuteczną metodą ochrony komórki przed oddziaływaniem zarówno reaktywnych metabolitów związków kancerogennych jak i RFT. Daje to wyraźne podstawy do zastosowania jej jako strategii chemoprewencyjnej w profilaktyce nowotworów, a także ogólnej chemoprotekcji. Do najważniejszych enzymów II fazy należą S-transferazy glutationowe (GST) i reduktaza NAD(P)H:chinon 1 (NQO1). Ostatnie lata przyniosły wiele informacji na temat mechanizmu ich indukcji, roli poszczególnych izoform oraz powiązania ze ścieżkami sygnałowymi, które mogą być istotne w proliferacji i różnicowaniu komórek. Zagadnienia te omówiłam we włączonej do rozprawy habilitacyjnej pracy poglądowej (**publikacja 1**). W artykule poza charakterystyką, funkcją enzymów GST i NQO1, omówiłam czynnik transkrypcyjny Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (Nrf2) wskazując, że indukcja enzymów II fazy poprzez aktywację czynnika Nrf2 może stanowić ważną strategię zapobiegania nie tylko nowotworom, ale także takim schorzeniom jak choroby neurodegeneracyjne i układu krążenia. Przedstawiłam ponadto przykładowe induktory enzymów II fazy z grupy organicznych związków siarki i roślinnych związków fenolowych. Złożone mechanizmy indukcji enzymów II fazy oraz interakcji z komórkowymi drogami sygnałowymi mogą być celem zróżnicowanego oddziaływania tzw. nieodżywczych składników diety.

CEL ROZPRAWY

Celem badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy proste związki fenolowe – kwasy fenolowe wpływają na enzymy II fazy i ich izoenzymy w modelu *in vivo* w zależności od gatunku zwierząt i czasu ekspozycji;
2. Czy naturalna złożona matryca żywieniowa (sok z buraka, sok z aronii, sok z kapusty) indukuje enzymy II fazy w modelu *in vivo* oraz czy istnieje zależność między oddziaływaniem pojedynczych składników a całą naturalną matrycą żywieniową? Czy badane preparaty wpływają na metabolizm kancerogenu z grupy nitrozoamin – N-nitrozodietylaminy;
3. Czy indukcja enzymów II fazy poprzez roślinne związki jest zależna od czynnika Nrf2;
4. Czy istnieje zależność między indukcją NQO1 a poziomem białka p53;
5. Czy roślinne związki o zróżnicowanej budowie wpływają na metylację GSTP1?

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Kwasy fenolowe a indukcja enzymów II fazy w modelu *in vivo*

W pierwszym etapie celem moich badań był prosty kwas fenolowy – kwas protokatechowy oraz złożony polifenol, ester glukozy i kwasu galusowego – kwas taninowy. Obydwa związki występują powszechnie w codziennej diecie człowieka i wykazują zdolność hamowania powstawania nowotworów w różnych modelach doświadczalnych (Suzuki et al., 2003; Chung et al., 1998). Badania, które były częściowo kontynuacją pracy doktorskiej miały odpowiedzieć na pytanie czy obserwowana we wcześniejszych pracach (Krajka-Kuźniak et al., 2004 - poz. II/A/4 wg spisu publikacji) indukcja enzymów II fazy jest związana ze zmianami w poziomie izoenzymów GST (**publikacja 2**). W tym celu wykorzystano technikę Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał. Badane związki podawano szczurom rasy Wistar w dawce 50 mg/kg masy ciała, 5-krotnie przez okres 2 tygodni. Kwas protokatechowy zwiększał konstytutywny poziom GSTM, natomiast kwas taninowy obniżał poziom GSTA, GSTT w wątrobie szczura. Odmienne wpływy kwasów fenolowych na konstytutywny poziom izoenzymów GST może wynikać z różnic w ich strukturze. Zastosowanie klasycznego kancerogenu z grupy policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PWA), 3-metylocholantrenu (3-MC) miało wyjaśnić czy badane związki mogą wpływać na indukowany poziom badanych izoform.

Przeprowadzone badania wykazały, że obydwie związki nie zmieniały poziomu indukowanych izoform GST w wątrobie szczura.

W celu stwierdzenia czy istnieją różnice narządowe w oddziaływaniu tych związków na enzymy wątrobowe i pozawątrobowe wykonano analizę tych samych parametrów w nerkach (**publikacja 2**). Zarówno kwas protokatechowy jak i taninowy obniżały poziom GSTA i GSTT, podczas gdy kwas taninowy GSTP w nerkach szczura. Łączne traktowanie zwierząt 3-MC i kwasem taninowym obniżało indukowaną przez 3-MC izoformę GSTA. Kwas protokatechowy obniżał natomiast indukowaną przez 3-MC izoformę GSTP w nerkach szczura. Te obserwacje wskazywały, że zarówno kwas taninowy jak i protokatechowy zmieniają profil indukcji GST i pośrednio mogą wpływać na metabolizm 3-metylocholanu.

W celu stwierdzenia jakie znaczenie dla zaobserwowanego efektu we wcześniejszych badaniach (Krajka-Kuźniak et al., 2003; 2005 - poz. II/A/3; poz. II/A/5 wg spisu publikacji) może mieć gatunek zwierząt podawano kwas protokatechowy przez trzy kolejne dni i kwas taninowy jednorazowo myszom szczepu Swiss w dawce 80 mg/kg masy ciała (**publikacja 3**). Wcześniejsze badania wykazały, że kwas protokatechowy indukował aktywność GST w wątrobie i nerkach myszy. Kontynuując badania z wykorzystaniem metody Western blot potwierdziliśmy, że w wątrobie wiązało się to z podwyższeniem poziomu GSTM, co jest korzystne z uwagi na zaangażowanie tej izoformy w metabolizm kancerogenów obejmujących PWA. Natomiast kwas taninowy podwyższał całkowitą aktywność GST tylko w nerkach myszy, jednocześnie obniżając poziom GSTT. Z kolei ta izoforma GST jest odpowiedzialna m.in. za aktywację chlorowanych węglowodorów co wiąże się z ich neurotoksycznością (Sherratt et al., 1998). Kwas taninowy może więc obniżając poziom GSTT w nerkach chronić je przed działaniem tych związków. Dodatkowo wykazano redukcję poziomu GSTA pod wpływem badanych kwasów fenolowych w naskórku myszy.

Zestawienie wyników wcześniejszych prac i omówionych powyżej wykazało, że modulacja badanych układów enzymatycznych przez te dwa kwasy fenolowe jest zależna od gatunku zwierząt zastosowanych w badaniach, tkanki jak i czasu podawania oraz dawki.

Złożona naturalna matryca żywieniowa a indukcja enzymów II fazy w modelu *in vivo*

Idealny czynnik chemoprewencyjny powinien być łatwo dostępny i nietoksyczny. Z tego powodu wydaje się, że najlepszą strategią chemoprewencyjną jest wykorzystanie naturalnej diety człowieka. Dodatkowym argumentem jest fakt, że naturalną matrycę żywieniową tworzy wyjątkowa kombinacja wielu składników o działaniu komplementarnym (Baer-Dubowska et al., 2006).

W drugim etapie moich badań zajęłam się oceną działania naturalnych soków z aronii, buraka i kapusty na enzymy II fazy w modelu *in vivo* z wykorzystaniem szczurów rasy Wistar. 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”. Owoce, szczególnie jagodowe obfitują w związki fenolowe o różnym charakterze. Aronia (*Aronia melanocarpa*, *Elliot*) wywodząca się z Ameryki Północnej, a aktualnie popularna w Europie jest bogatym źródłem polifenoli, szczególnie antocyjanów i polimerycznych procyanidyn, a także kwasów fenolowych. Badania, których wyniki przedstawiono w **publikacji 4** miały na celu stwierdzenie, czy sok z aronii może modulować działanie kancerogenów powstających w wyniku obróbki termicznej żywności takich jak N-nitrozodietylaminy (NDEA). Wykazano, że 28-dniowe podawanie wyłącznie soku z aronii zwiększało aktywność enzymów II fazy takich jak GST i NQO1 w wątrobie szczurów. Podwyższona aktywność GST korelowała z indukcją izoformy GSTA, co ma korzystne znaczenie w ochronie przed RFT i produktami peroksydacji lipidów takimi jak 4-hydroksynonenal (4-HNE) (Yang et al., 2003). Jednak największy wzrost pod wpływem soku z aronii zanotowano w przypadku białka NQO1 co może wskazywać na jego działanie hepatoprotective. Jednocześnie stwierdzono jednak wzrost uszkodzeń DNA, co dowodzi, że choć sam sok z aronii może działać hepatoprotective, to w połączeniu z kancerogenem, może pogłębiać jego niekorzystne działanie. Ponadto określono wpływ soku z aronii i NDEA na enzymy I fazy, które zaangażowane są w procesy aktywacji. W przypadku aktywności i poziomu CYP1A1 i 1A2 zaobserwowano obniżenie pod wpływem soku z aronii. Z kolei NDEA obniżał poziom CYP2E1, natomiast podwyższał aktywność CYP2B. W grupie zwierząt otrzymujących zarówno NDEA i sok z aronii odnotowano spadek aktywności tych izoenzymów CYP450. Analiza enzymatycznych i

biochemicznych markerów wykazała uszkodzenie wątroby pod wpływem NDEA. Natomiast spadek ich poziomu pod wpływem podawania soku z aronii potwierdza jego ochronne działanie w stosunku do wątroby. Wyniki tych badań prezentowałam ustnie na konferencji naukowej „Naturalne przeciwutleniacze – od surowca do organizmu” zorganizowaną przez Akademię Rolniczą w Poznaniu w roku 2007 (poz. B/26 wg załącznika 6). Przedstawiony komunikat został nagrodzony dyplomem za najlepszą pracę eksperymentalną.

Burak to jeden z elementów diety środkowoeuropejskiej. Zawiera szereg składników czynnych o potencjalnym działaniu chemoprewencyjnym. Są to przede wszystkim żółte i czerwone barwniki betalainowe. Wykorzystując analogiczny model badawczy jak w przypadku soku z aronii przeprowadzono ocenę wpływu długoterminowego podawania soku z buraka na enzymy I i II fazy (**publikacja 6**). Zaobserwowano, że sok z buraka zwiększał aktywność zarówno GST jak i NQO1 w wątrobie szczura. Wykazano, również korelację między podwyższoną aktywnością GST a izoformą GSTM, która może być zaangażowana w metabolizm nie tylko PWA ale także nitrozoamin i NDEA. Zwiększeniu aktywności NQO1 pod wpływem soku z buraka towarzyszył podwyższony poziom białka NQO1. Długoterminowe podawanie soku z buraka obniżało aktywność markerów cytochromu P450: CYP1A1/1A2 i CYP2E1. Podawanie NDEA także wywołało obniżenie aktywności tych enzymów natomiast zwiększenie aktywności CYP2B. Natomiast łączne traktowanie sokiem z buraka i NDEA podwyższało tylko aktywność CYP2B. Istotną informacją była redukcja uszkodzeń DNA pod wpływem soku z buraka. Podobny efekt dla soku z buraka zanotowano w przypadku biochemicznych markerów uszkodzenia funkcji wątroby. Te wyniki potwierdzają protekcyjny/ochronny wpływ soku z buraka. Ponieważ sok z buraka jest istotnym elementem naszej diety, dlatego rezultaty tych badań dostarczają istotnych argumentów do ich dalszej rekomendacji.

Kontynuując badania z wykorzystaniem matrycy żywieniowej w ramach współpracy z Politechniką Gdańską wykonałam badania, które miały wykazać prozdrowotne i przeciwnowotworowe właściwości soku z kapusty. Kapusta i jej przetwory są również popularnym elementem naszej diety. W tym celu wykorzystano szczury szczepu Wistar, którym podawano soki z kiszanej i surowej kapusty przez okres 4, 10 i 30 dni (**publikacja 5**). Uzyskane wyniki porównywano z efektami podawania potencjalnych składników czynnych kapusty takich jak: indolo-3-karbinolu

(I3C) i izotiocyjanianu fenetylu (ITCF). Wykazano, że soki a szczególnie sok z kiszzonej kapusty podobnie jak I3C i ITCF podwyższał aktywność GST indukując izoformy GSTA i GSTM w wątrobie szczura. Również aktywność i poziom białka NQO1 był podwyższony pod wpływem soków z kapusty i badanych związków w wątrobie szczura. Zwiększenie poziomu GSTA może mieć istotny wpływ w ochronie przed RFT i produktami peroksydacji lipidów (Yang et al., 2003) o czym wspomniano już przy omawianiu efektów soku z aronii. Z kolei GSTM jest zaangażowana w metabolizmie PWA podobnie jak NQO1, która katalizuje dwuelektrodową redukcję chinonów PWA (Tang et al., 2010; Keum et al., 2006). W przypadku nerek nie zaobserwowano istotnych zmian pod wpływem badanych preparatów w poziomie analizowanych izoenzymów GST z wyjątkiem GSTT, co może wynikać z odmiennego profilu narządowego tych izoenzymów. Badania ostatnich lat wykazały, że kluczową rolę w indukcji enzymów II fazy odgrywa czynnik transkrypcyjny Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2), który uznawany jest za główny cel strategii chemoprewencyjnych jak i chemioterapeutycznych. Przeprowadziłam ocenę poziomu czynnika Nrf2 wykorzystując technikę Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał w celu określenia czy indukcja GST i NQO1 pod wpływem badanych preparatów jest pod kontrolą tego czynnika. Wykazałam największe zmiany w poziomie Nrf2 we frakcji jądrowej pod wpływem indolo-3-karbinolu i izotiocyjanianu fenetylu co potwierdziło dane literaturowe (Keum et al., 2003). 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 została nagrodzona dyplomem za najlepszy poster pt. „The effect of cabbage juice and its components on the expression and activity of phase 1 and 2 enzymes in rats” (poz. B/28 wg załącznika 6).

Spostrzeżenia z **publikacji 4, 5 i 6** stanowić mogą podstawę do dalszych badań klinicznych oraz rekomendacji badanych produktów żywnościowych tj. soków z aronii, buraka i kapusty do celów profilaktycznych i prozdrowotnych.

Czynnik Nrf2 a indukcja enzymów II fazy

W omówionych do tej pory pracach stosowałam model zwierzęcy, oceniając indukcję interesujących mnie układów enzymatycznych przede wszystkim w wątrobie. Takie podejście uzasadnia fakt, że w tym narządzie procesy biotransformacji

przebiegają z najwyższą aktywnością co ma istotne znaczenie dla prawidłowej oceny toksyczności różnych ksenobiotyków oraz mechanizmu działania potencjalnych związków chemoprewencyjnych.

W dalszych badaniach realizowanych w ramach projektu badawczego habilitacyjnego N N405 425439 wykorzystywałam linie komórkowe wyprowadzone z ludzkiej wątroby prawidłowej oraz zmienionej nowotworowo, które umożliwiają bardziej precyzyjne określanie mechanizmu działania badanych związków lub preparatów.

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że kwas protokatechowy wykazujący wielokierunkowe działanie biologiczne, może ingerować w różne mechanizmy związane z procesem nowotworzenia m.in. w procesy detoksykacji ksenobiotyków (Krajka-Kuźniak et al., 2004; 2005 - poz. II/A/4; II/A/5 wg spisu publikacji; **publikacje 2 i 3**). Ten prosty kwas fenolowy występuje w jabłkach i wielu innych owocach, a także w piwie (Baer-Dubowska et al., 2009 - poz. II/E/2 wg spisu publikacji) w skład, którego wchodzi także inny biologicznie ważny związek, ksantohumol. Na ten związek zwrócono uwagę z powodu badań przeprowadzonych w Uniwersytecie Stanu Oregon, które donosiły o „szczepionce” na raka prostaty zawierającej ksantohumol. Te informacje zainspirowały nas do przebadania ksantohumolu i jego wpływu na enzymy metabolizujące ksenobiotyki. W celu dokładnego poznania mechanizmu indukcji enzymów II fazy będących pod kontrolą czynnika Nrf2 poddano ocenie oddziaływanie ksantohumolu na poziom i ekspresję enzymów II fazy takich jak GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, NQO1 i HO-1 (**publikacja 7**). W badaniach wykorzystano nowotworowe komórki wątrobowe (HepG2) i immortalizowane/nienowotworowe hepatocyty (THLE-2). W pierwszym etapie badań wykazano, że ksantohumol zwiększał ekspresję czynnika Nrf2 w nowotworowych i prawidłowych hepatocytach. Ponieważ aktywacja Nrf2 jest związana z degradacją lub modyfikacją białka inhibitorowego Keap1 oznaczano ekspresję i poziom tego białka. Nie zaobserwowano istotnych zmian w ekspresji i poziomie białka Keap1 co może sugerować inny mechanizm aktywacji czynnika Nrf2. W kolejnym etapie badań oceniono wpływ ksantohumolu na ekspresję i poziom białka GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, NQO1 i HO-1. Do oceny mRNA zastosowano metodę RT-PCR, a Western blot do analizy poziomu białka. Wykazano, że ksantohumol indukował ekspresję i poziom GSTP, GSTT, oraz NQO1 i HO-1 w prawidłowych hepatocytach, natomiast w komórkach nowotworowych tylko ekspresję izoformy *GSTA* i *GSTP*. Następnie

poddano ocenie wiązanie czynnika Nrf2 do DNA wykorzystując technikę ELISA. Wykazano, korelację między zwiększoną ekspresją czynnika Nrf2 a wiązaniem do DNA i ekspresją genów będących pod jego kontrolą. Taki sam kierunek zmian zaobserwowano w przypadku poziomu białek kodowanych przez badane w tej pracy geny. Ponadto w ramach tej pracy wykazano, cytotoksyczność w stosunku do nowotworowych komórek wątroby HepG2 co może wskazywać na właściwości chemoterapeutyczne ksantohumolu.

Wybór kolejnego związku był związany z badaniami soku z jabłek, których rezultaty prezentowałam ustnie na konferencji PTBioch w 2006 r. (poz. A/8 wg załącznika 6) a zarazem współpracy z prof. J. Barciszewskim z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Z uwagi na korzystne właściwości soku z jabłek istotna była ocena jego aktywnych składników, do których należy kwas floretynowy, a także otrzymany niedawno na drodze syntezy chemicznej przez zespoły prof. L. Celewicza i prof. J. Barciszewskiego, amid kwasu floretynowego (floretamid). Przeprowadzono ocenę mechanizmu oddziaływania nowego syntetycznego i opatentowanego związku, floretamidu na enzymy II fazy i określono czy istnieje zależność między ich indukcją a aktywacją czynnika Nrf2 (**publikacja 8**). Badania wykazały, że floretamid zwiększał ekspresję czynnika Nrf2, wiązanie do DNA oraz ekspresję genów i poziom białka GSTA, GSTP, GSTT i NQO1 w prawidłowych ludzkich hepatocytach. Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie badanych parametrów w nowotworowych komórkach HepG2. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że floretamid wykazuje bardziej właściwości chemoprewencyjne niż chemoterapeutyczne.

Wyniki badań z wykorzystaniem całkowitej matrycy żywieniowej, zainspirowały nas do zbadania kolejnego aktywnego związku, betaniny obecnej w soku z buraka. Betanina indukowała poziom mRNA czynnika *Nrf2* w prawidłowych hepatocytach (THLE-2) (**publikacja 9**). Indukcja Nrf2 korelowała ze zwiększonym poziomem enzymów będących pod jego kontrolą takich jak GSTP, GSTM, GSTT i NQO1 w prawidłowych hepatocytach. Analiza Elisa wykazała zwiększone wiązanie Nrf2 do DNA również tylko w komórkach THLE-2. Zaobserwowano wzrost aktywności GST i NQO1 pod wpływem betaniny również tylko w prawidłowych immortalizowanych komórkach THLE-2. Ponieważ nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie białka inhibitorowego Keap1, dlatego oznaczono poziom wybranych kinaz takich jak JNK, AKT i ERK, które mogą być zaangażowane w proces fosforylacji badanego czynnika

transkrypcyjnego Nrf2. Wykazano, że betanina zwiększała poziom ufosforylowanych kinaz z zastosowaniem techniki Western blot. Modulacja poziomu tych kinaz pod wpływem betaniny wskazała, że aktywacja Nrf2 może zachodzić poprzez fosforylację AKT i MAPK kinaz. W przeciwieństwie do nowotworowych komórek HepG2 betanina nie wpływała istotnie na poziom badanych parametrów, dlatego nie może być potencjalnym chemoterapeutycznym związkiem. Rezultaty tych badań po raz pierwszy wykazały, że betanina może indukować enzymy II fazy przez aktywację Nrf2 poprzez fosforylację kinaz w nienowotworowych komórkach wątroby. Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że betanina będąca jednym z głównych składników soku z buraka może być odpowiedzialna za hepatoprotective właściwości badanego wcześniej preparatu.

Badania ostatnich lat zwracają uwagę na procyanidyny, które wykazują właściwości antymutagenne i antyoksydacyjne (Faria et al., 2006). Poprzednie badania z wykorzystaniem soku z aronii, który zawierał znaczne ilości polimerycznych procyanidyn oraz dalsza współpraca z prof. J. Oszmiańskim z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu doprowadziła do przebadania ekstraktu z kory głogu. Preparat zawierał polifenole, wśród których największą ilość stanowiły procyanidyny. Ekstrakt nie był cytotoksyczny zarówno w stosunku do prawidłowych jak i nowotworowych komórek wątroby (**publikacja 10**). Zaobserwowano wzrost mRNA i poziomu białka zależnych od Nrf2 genów takich jak *GSTA*, *GSTP*, *GSTM*, *GSTT* oraz *NQO1* i *HO-1* w nienowotworowych komórkach wątroby (THLE-2). Dodatkowo oznaczano poziom czynnika Nrf2 ufosforylowanego w pozycji Ser 40. Badania wykazały korelację między podwyższonym poziomem ufosforylowanego Nrf2 we frakcji jądrowej i jego wiązaniem do DNA oraz fosforylacją kinaz JNK i ERK. Brak wpływu ekstraktu na badane parametry w nowotworowych komórkach HepG2 może wykluczać częściowo preparat jako terapeutyczny.

Z drugiej strony wyniki tych badań sugerują, że aktywacja ścieżki Nrf2/ARE może odgrywać istotną rolę w regulacji enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych pod wpływem procyanidyn, a także może tłumaczyć hepatoprotekcyjne i chemoprewencyjne ich właściwości.

Indukcja NQO1 a poziom p53

Jednym z badanych przeze mnie enzymów II fazy była reduktaza NAD(P)H:chinon 1 (NQO1), która katalizuje dwuelektronową redukcję chinonów do hydrochinonów chroniąc komórki przed toksycznym wpływem RFT. Szereg badań pochodzących z ostatnich lat wskazuje na udział NQO1 w stabilizacji poziomu genu supresorowego *p53*, jednak mechanizm nie jest do końca poznany (Gong et al., 2007). Z uwagi na zaobserwowaną w **publikacjach 7, 8, 9 i 10** indukcję zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka NQO1 przeprowadzono analizę poziomu *p53* pod wpływem ksantohumolu, floretamidu, betaniny oraz ekstraktu z kory głogu. Wszystkie badane związki zwiększały poziom *p53* w prawidłowych hepatocytach co potwierdza hipotezę o stabilizacji poziomu *p53* poprzez NQO1 i jednoczesnej ochronie przed degradacją w proteosomie. Te obserwacje zawarte są w **publikacjach 7, 8, 9 i 10**.

Metylacja GSTP1 w nowotworowych komórkach HepG2

Ostatnia dekada przyniosła przełom w wyjaśnieniu epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów wskazując na ścisłe współdziałanie metylacji DNA, kowalencyjnych modyfikacji histonów i przebudowy chromatyny. Od kilku lat uwaga wielu naukowców skupia się wokół poznania specyficznego profilu metylacji charakteryzującego każdy typ nowotworu u ludzi. Istnieje wiele genów, dla których opisano hipermetylację w nowotworach wątroby m.in. *p16*, *GSTP1*, *RASSF1A*. Genem wyciszonym przez nadmierną metylację jest również gen *GSTP1*. W ramach projektu habilitacyjnego N N405 425439 przeprowadzono analizę metylacji *GSTP1* w komórkach nowotworowych HepG2 poddanych działaniu floretamidu, betaniny i ekstraktu z kory głogu zawierającego procyanidyny. Technika MSP nie wykazała jednak zmian w metylacji *GSTP1* pod wpływem badanych związków. W przyszłości chciałabym kontynuować analizę metylacji innych genów ponieważ badania te mogłyby dostarczyć nowych markerów diagnostycznych nowotworów wątroby. Wyniki dotychczasowych badań z tego zakresu opublikowano w **publikacjach 8, 9 i 10**.

PODSUMOWANIE

W przedstawionych pracach:

- Wykazano, że kwasy protokatechowy i taninowy, znane wcześniej jako inhibitory procesu kancerogenezy, oraz złożona matryca żywieniowa mogą stymulować aktywność enzymów II fazy takich jak GST i NQO1.
- Wykorzystując technikę Western blot wykazano ponadto, że zmiany w poziomie izoform GST wywołane przez kwasy fenolowe są skorelowane ze zdolnością tych związków do oddziaływania na metabolizm kancerogenów z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Za szczególnie ważną należy uznać indukcję izoformy GSTM pod wpływem kwasu protokatechowego oraz soku z buraka, ponieważ ta forma może odpowiadać za deaktywację kancerogenów z grupy PWA i nitrozoamin. Indukcja izoformy GSTA pod wpływem soku z aronii chroni przed reaktywnymi formami tlenu i produktami peroksydacji lipidów, które mogą być produktami metabolizmu NDEA z grupy nitrozoamin.
- Wykazano zdolność syntetycznego związku amidu kwasu floretynowego obecnego w jabłkach do modulacji enzymów II fazy będących pod kontrolą czynnika Nrf2. Ponadto udowodniono, że związek ten jest induktorem izoenzymów GST i NQO1 w prawidłowych komórkach wątrobowych co sugeruje możliwość zastosowania go w celach chemoprewencyjnych.
- Potwierdzono wcześniejszą obserwację innych autorów wskazującą, że ksantohumol jest silnie cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych wątroby HepG2. Nowością naszych badań było wykorzystanie immortalizowanych komórek wątroby wobec których, ksantohumol nie wykazywał tak silnego toksycznego działania. To wskazuje na możliwość wykorzystania ksantohumolu w celach terapeutycznych i chemoprewencyjnych.
- Porównanie oddziaływania pojedynczych związków i matrycy żywieniowej *in vitro* i *in vivo* wskazuje, że zarówno proste związki jak i złożona matryca żywieniowa mogą indukować enzymy II fazy zwiększając tym samym procesy detoksykacji kancerogenów takich jak N-nitrozodietyloamina czy 3-metylocholanren. Wykazałam ponadto, że stopień indukcji jest zróżnicowany w zależności od modelu badawczego, budowy związków, długości ekspozycji i gatunku zwierząt.

- Ocena ekspresji i fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w powiązaniu z białkiem inhibitorowym Keap1 i poziomem kinaz MAPK i AKT oraz ich fosforylacji dostarczyła informacji na temat mechanizmu aktywacji czynnika Nrf2 pod wpływem badanych związków.
- Wykazano również, że NQO1 jest zaangażowany w stabilizację białka supresorowego p53 pod wpływem ksantohumolu, floretamidu, betaniny i ekstraktu z kory głogu zawierającego procyanidyny.
- Nie stwierdzono demetylacji genu *GSTP1* pod wpływem betaniny, floretamidu i procyanidyn z kory głogu co wskazuje, że w badanym układzie związki te nie są zdolne do reaktywacji tego wyciszonego w wyniku metylacji genu.

Przeprowadzone badania dostarczyły więc nowych informacji na temat działania prostych i złożonych związków fenolowych na poziomie subkomórkowym i molekularnym. Porównanie działania prostych związków i złożonej matrycy żywieniowej dostarczyło ponadto informacji, które z badanych preparatów są najbardziej korzystne z punktu widzenia chemoprewencji i/lub wspomaganej chemioterapii. Potwierdzenie zaangażowania czynnika Nrf2 w mechanizm indukcji enzymów omawianych w ramach rozprawy habilitacyjnej dostarcza dodatkowych argumentów za jego wykorzystaniem jako nowego i atrakcyjnego celu oddziaływania zarówno czynników chemoprewencyjnych jak i chemioterapeutycznych. Ponadto uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań klinicznych oraz rekomendacji określonych produktów żywnościowych do celów profilaktycznych, prozdrowotnych („health claims”).

Piśmiennictwo

- Baer-Dubowska W., Ignatowicz Ewa, Chemoprevention of cancer: basic mechanisms and molecular targets, Carcinogenic and anticarcinogenic food components (Eds Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Giganti D.), CRC Press Taylor&Francis Group Boca Raton FL, USA, London UK, 2006, 177-198.
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y. (1998) Tannins and human health: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38, 421-464.
- Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. (2006) Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. J. Agric. Food Chem. 54, 2392–2397.

- Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswal AK. (2007) NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res* 67, 5380-5388.
- Keum Y.S., Han Y.H. Liew C. (2006) Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. *Pharm Res.* 23, 2586-2594.
- Keum Y.S., Owuor E.D., Kim B.R., Hu R., Kong A.N. (2003) Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharm Res.* 20, 1351-1356.
- Sherratt P.J., Manson M.M., Thomson A.M., Hissink E.A.M., Neal G.E. van Bladeren P.J., Green T., Hayes J.D. (1998) Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J.* 335, 619-630.
- Suzuki R., Kohno H., Sugie S., Tanaka T. (2003). Dietary protocatechuic acid during the progression phase exert chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 4, 319-326.
- Tang S.C., Sheu G.T., Wong R.H. (2010) Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicol. Lett.* 192, 316-323.
- Wattenberg L.W. (1966) Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review. *Cancer Res.* 26, 1520-1526.
- Yang Y., Sharma R., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C. (2003) Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim. Pol.* 50, 319-333.

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 z wyróżnieniem 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. Wykonywana przeze mnie praca magisterska pt. „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych dla oceny wpływu przeciwutleniaczy fenolowych na profil metabolitów benzo(a)pirenu u szczurów indukowanych metylocholantrenem” została nagrodzona na Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich (II miejsce). Zarówno praca magisterska jak i pierwsze zadania jakie mi powierzono dotyczyły oddziaływania przeciwutleniaczy na metabolizm benzo(a)pirenu u szczurów indukowanych 3-metylocholantrenem. Wyniki tych badań, po uzupełnieniu danych stały się przedmiotem publikacji w *Nutrition and Cancer* (poz. II/A/2 wg spisu publikacji).

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

Moje zainteresowania koncentrowały się na badaniach mechanizmu kancerogenezy w modelu *in vitro* i *in vivo* oraz możliwościach jej modulacji. Badania *in vitro* dotyczyły oceny wpływu naturalnych związków fenolowych na aktywność markerów izoform cytochromu P450 1A1, 1A2, 2B. Wyniki tych badań opublikowano w *Xenobiotica* (poz. II/A/1 wg spisu publikacji). W pracy, która jest najczęściej cytowaną w mojej bibliografii wykazano m.in., że kwas taninowy, składnik wielu owoców jagodowych, jest silnym niekompetycyjnym inhibitorem CYP1A1 o K_i porównywalnym z β -naftoflawonem uznanym inhibitorem tej formy cytochromu P450.

Badania *in vivo* miały na celu ocenę wpływu kwasu protokatechowego i taninowego na aktywność cytochromów P450 i enzymów II fazy w wątrobie i nerkach myszy. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na konferencji EACR w Sztokholmie w 1998 r. (poz. A/1 wg załącznika 6), a mój czynny udział został sfinansowany przez Towarzystwo Naukowe Warszawskie i Fundację im. Stefana Batorego.

W kolejnych badaniach oceniano wpływ kwasów fenolowych na poziom izoenzymów S-transferazy glutationowej (GST) w wątrobie myszy i szczura z zastosowaniem chromatografii powinowactwa i techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Technika ta umożliwiła rozdzielenie głównych klas GST i bezpośredni pomiar ich w materiale biologicznym. Jej wdrożenie wymagało ustalenia optymalnych warunków postępowania w celu zapewnienia powtarzalności i dokładności uzyskiwanych wyników. Dokonano standaryzacji warunków analizy pod względem doboru odpowiednich parametrów: kolumny chromatograficznej, gradientu stężeń, czasu prowadzenia rozdziału i retencji wzorców. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na 3rd Conference on Food and Cancer Prevention Norwich (UK) we wrześniu 1999 r. (poz. B/10 wg załącznika 6) i stały się przedmiotem publikacji w *Dietary Anticarcinogens and Antimutagens: Chemical and Biological Aspects* (Eds I.T. Johnson & G.R. Fenwick) Royal Society of Chemistry 2000 (poz. II/E/1 wg spisu publikacji). Udział w tej konferencji był możliwy dzięki uzyskaniu grantu promotorskiego KBN.

Problematyka chemicznej kancerogenezy i modulacji tego procesu przez związki o charakterze antykancerogenów była również przedmiotem mojej pracy doktorskiej pt. „Wpływ roślinnych związków fenolowych - kwasu protokatechowego i taninowego na aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki w wątrobie i nerkach myszy i szczura”, której promotorem była prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska. Przeprowadzone badania wykazały, że roślinne związki fenolowe modulują aktywność enzymów uczestniczących w aktywacji i detoksykacji chemicznych kancerogenów. Zaobserwowany ogólny profil indukcji i /lub aktywacji badanych enzymów kwalifikuje kwas protokatechowy i taninowy raczej do induktorów monofunkcjonalnych enzymów II fazy niż oddziałujących za pośrednictwem receptora Ah. Na podstawie danych uzyskanych *in vivo* i *in vitro* należy uznać kwas taninowy o strukturze polifenolu jako silniejszy induktor lub inhibitor niż kwas protokatechowy o strukturze prostego kwasu fenolowego. Praca doktorska była częściowo finansowana ze środków KBN w ramach grantu promotorskiego.

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

Po uzyskaniu stopnia doktora równolegle do badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej, oceniałam aktywność enzymów II fazy w skórze myszy indukowanej benzo(a)pirenem - B(a)P i 7,12-dimetylobenzo(a)antracenenem - DMBA. Jednocześnie przy zastosowaniu techniki Western blot oceniałam poziomy poszczególnych izoform badanych enzymów. Przy użyciu tej metody wykazano indukcję izoformy GSTM pod wpływem B(a)P oraz wzrost poziomu GSTA po nałożeniu na skórę myszy DMBA. Obydwa izoenzymy są zaangażowane w metabolizm badanych kancerogenów. Kwas taninowy obniżał indukowany przez B(a)P i DMBA poziom GSTA co potwierdziło wyniki badań z wykorzystaniem innych modeli doświadczalnych. Ponadto zaobserwowano wzrost aktywności NQO1 pod wpływem zastosowanych kancerogenów. Spośród wszystkich badanych związków tylko resweratrol zwiększał indukowany poziom NQO1 co może mieć wpływ na ochronę przed kancerogennym działaniem B(a)P. Ta pochodna stilbenu zmniejszała natomiast poziom tego enzymu indukowanego przez DMBA. Badania były finansowane w ramach grantu MNiSW a ich wyniki zostały opublikowane w *Toxicology* (poz. II/A/6 wg spisu publikacji).

W ramach kolejnego projektu, którego kierownikiem był prof. dr hab. Włodzimierz Grajek z Akademii Rolniczej w Poznaniu brałam udział w badaniach mających na celu ocenę modulacji enzymów II fazy u szczurów Sprague-Dawley poddanych działaniu DMBA i soku z aronii. Dwudziestoośmiodniowe podawanie soku z aronii zwiększało aktywność NQO1, GST i poziom izoformy GSTA w wątrobie samic szczurów. Natomiast zastosowany kancerogen - DMBA indukował izoformy GSTM w wątrobie i gruczole piersiowym, zaś GSTA również w wątrobie samic. Modulacja izoenzymów GST pod wpływem badanych preparatów potwierdza ich zaangażowanie w metabolizm DMBA. Wyniki tych badań były prezentowane na konferencji naukowej „Naturalne przeciwutleniacze – od surowca do organizmu” i zostały opublikowane w *Environmental Toxicology and Pharmacology* (poz. II/A/9 wg spisu publikacji).

Kolejną matrycą żywieniową, którą badałam w ramach współpracy z Politechniką Gdańską (dr hab. A. Bartoszek) był sok z kapusty. Oceniałam aktywność i poziom izoenzymów CYP450 w wątrobie i nerkach szczura. Wykazano, że sok z kapusty

podobnie jak izotiocyjanian fenetylu i indolo-3-karbinol zwiększa aktywność i ekspresję CYP1A1/1A2, ale punkty czasowe ich maksymalnej indukcji różnią się zasadniczo w obydwu tkankach. Wyniki tych badań opublikowano w *Phytotherapy Research* (poz. II/A/11 wg spisu publikacji).

W modelu *in vitro* oceniałam także wpływ soku z kapusty w porównaniu z indolo-3-karbinolem, 3,3'-diindolilometanem i sulforafanem na ekspresję Nrf2 w dwóch liniach nowotworowych piersi (MCF-7 i MDA-MB-231) oraz immortalizowanej linii MCF-10A. Pod wpływem wszystkich badanych związków zanotowano translokację czynnika Nrf2, przy czym w największym stopniu wpływał sulforafan. Wyniki tych badań były prezentowane na konferencjach naukowych: PTBioch w 2009 r. (poz. A/20 wg załącznika 6) i w San Francisco na konferencji American Chemical Society National w 2010 r. (poz. A/23 wg załącznika 6). W badaniach tych oceniano także poziom białka CYP1A1, 1A2 i 1B1. Pod wpływem soku z kapusty i produktów degradacji glukozynolanów: sulforafanu i 3,3'-diindolilometanu zanotowano indukcję badanych izoform cytochromu tylko na poziomie mRNA, co może częściowo wyjaśniać chemoprewencyjne właściwości badanych preparatów. Wyniki tych badań opublikowano w *Nutrition and Cancer* (poz. II/A/12 wg spisu publikacji).

Resweratrol (*trans* 3,4',5-trihydroksystilben) jest uważany za niezwykle obiecujący czynnik chemoprewencyjny i/lub terapeutyczny. Jednak z uwagi na jego niską biodostępność i rozpuszczalność w wodzie poszukuje się analogów tego związku charakteryzujących się nie tylko większą biodostępnością, ale także selektywnością wobec określonych biomarkerów poszczególnych etapów kancerogenezy. Najczęściej są to pochodne metoksyłowe. Badania m.in. naszego zespołu wykazały, że zastąpienie tlenu atomem siarki w tym ugrupowaniu może znacznie zwiększyć aktywność stilbenów. We współpracy z własnym zespołem, a także Katedry Toksykologii UMP (dr hab. M. Murias) analizowałam działanie obydwu typów analogów w odniesieniu nie tylko do cytochromów P450 i enzymów II fazy, ale także białka p53. Szczególnie interesującym wynikiem tych badań było stwierdzenie zwiększonej ekspresji genu kodującego to białko w komórkach raka piersi pod wpływem 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksystilbenu. Wiązało się to z obniżeniem poziomu mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej przy równoczesnej aktywacji kaspazy 9 i 3. Efektu takiego nie wywoływał związek macierzysty, wskazując na korzystny efekt wprowadzenia

dodatkowych grup hydroksylowych co opublikowano w *Toxicology in Vitro* (poz. II/A/7 wg spisu publikacji).

Wyniki pozostałych badań dotyczących oddziaływania analogów resweratrolu były prezentowane na wielu międzynarodowych konferencjach naukowych: 6th Swiss Apoptosis w Bernie w Szwajcarii 2010 r. (poz. B/29 wg załącznika 6); PTBioch w Wiśle w 2010 r. (poz. A/28 wg załącznika 6); EACR w Turcji w 2011 r. (poz. B/32 wg załącznika 6); 6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences w Düsseldorf w 2011 r. (poz. B/30 wg załącznika 6); Cell Death in Cancer w Amsterdamie w 2012 r (poz. B/33 wg załącznika 6) i są aktualnie przedmiotem publikacji przygotowywanych do druku.

Ostatnie lata badań dostarczyły dowodów, że obok zmian genetycznych w patogenezie nowotworów istotną rolę odgrywają także mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów. Badania z tego zakresu prowadziłam w ramach projektu finansowanego przez MNiSW (kierownik V. Krajka-Kuźniak). Celem projektu była ocena możliwości reaktywacji wyciszonych w wyniku metylacji genów supresorowych w liniach komórkowych raka piersi (MCF-7) oraz raka krtani (UT-SCC 42B). Badania te wykazały, że choć roślinne związki fenolowe hamowały aktywność metylotransferaz DNA (DNMT) w układzie bezkomórkowym, nie miały wpływu w przeciwnieństwie do stosowanych już w leczeniu nukleozydowych inhibitorów tego enzymu, na metylację badanych genów w hodowanych komórkach. Może to wskazywać, że roślinne związki fenolowe nie wydają się być skutecznymi modulatorami epigenetycznymi przynajmniej w badanym układzie doświadczalnym. Nie można jednak wykluczyć takiego działania w wyniku długotrwałej ekspozycji, która jest związana z dietą. Wiązać się to może z faktem, że stany zapalne mogą indukować metylację DNA, a przynajmniej część badanych związków wykazuje działanie przeciwzapalne. Możliwe jest więc ich pośrednie oddziaływanie na epigenom. Rezultaty tych badań prezentowano na konferencjach: PTBioch w 2007 r. (poz. A/12 wg załącznika 6), EACR w Lyon w 2008 r. (poz. A/14 wg załącznika 6), PTBioch w 2009 r. (poz. A/21 wg załącznika 6) i zostały opublikowane w *Toxicology Letters* i *Toxicology In Vitro* (poz. II/A/8 i II/A/10 wg spisu publikacji).

Badania z tego zakresu są kontynuowane, a ocenie poddany jest wpływ kwasów fenolowych, elagowego i rozmarynowego oraz mirecytyny na funkcję sirtuiny 1 w powiązaniu z inhibicją glikohydrolazy poli ADP-rybozy (PARG). Metylacja DNA i

acetylacja histonów są ze sobą integralnie powiązane tworząc specyficzny kod epigenetyczny. Szczególną grupę deacetylaz zależnych od NAD⁺ tworzą sirtuiny. Zahamowanie ekspresji PARG może mieć wpływ na mechanizmy związane z epigenetycznym wyciszaniem genów supresorowych w komórkach nowotworowych. Uzyskane do tej pory wyniki wskazują, że kwas elagowy zwiększa poziom izoform PARG.

Podsumowanie

Wszystkie przedstawione wyżej kierunki badań nawiązują do głównego nurtu moich zainteresowań, które szczegółowo przedstawiłam w rozprawie habilitacyjnej. Realizując je z różnymi zespołami starałam się poszerzyć ich zakres o nowe potencjalne czynniki chemoprewencyjne i techniki badawcze umożliwiające poznanie mechanizmów ich działania i ostatecznie zaproponowanie nowych strategii chemoprewencyjnych.

5.3. Udział w projektach badawczych

5.3.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

1. Zadanie badawcze: Wpływ roślinnych związków fenolowych – kwasu taninowego i protokatechowego na aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki *in vivo*.

Projekt KBN 4 P04F 007 16 (grant promotorski) – zakończony- wykonawca

5.3.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

2. Zadanie badawcze: Badanie wpływu roślinnych związków fenolowych oraz inhibitorów glikohydrolazy poli(ADP-rybozy) na aktywność metylotransferaz DNA i metylację DNA. Projekt MNiSW N N405 04831/3338 – zakończony – kierownik projektu

3. Zadanie badawcze: Badanie molekularnego mechanizmu indukcji enzymów II fazy przez roślinne związki fenolowe - potencjalne czynniki chemoprewencyjne. Projekt MNiSW/NCN N N405 4254 39 (projekt habilitacyjny) – zakończony – kierownik projektu

4. Zadanie badawcze : Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego. Projekt PZB/KBN 094/P06/2003/19 – zakończony – wykonawca

5. Zadanie badawcze: Poszukiwanie molekularnych celów oddziaływania roślinnych fenoli – potencjalnych czynników chemoprewencyjnych. Projekt KBN 2 P05F 049 26 – zakończony – wykonawca
6. Zadanie badawcze: Wpływ aktywnych składników soku z kapusty na proliferację, apoptozę i ekspresję wybranych genów komórek raka piersi. Projekt MNiSW N N405 3390 33 – zakończony – wykonawca
7. Zadanie badawcze: Ocena chemoprewencyjnego i przeciwnowotworowego działania wybranych pochodnych resweratrolu. Projekt MNiSW N N405 180135- zakończony – wykonawca
8. Zadanie badawcze: Badanie modulacji dróg przekazywania sygnałowego przez naturalne i syntetyczne stilbeny - potencjalne czynniki chemoprewencyjne i chemioterapeutyczne. Projekt MNiSW N N405 209737 – realizowany - wykonawca

Projekty własne AM i UM w Poznaniu

1. Zadanie badawcze: Ocena wpływu roślinnych związków fenolowych na poziom izoenzymów S-transferazy glutationowej u szczurów. 501-3-02-05 - zakończony - kierownik projektu
2. Zadanie badawcze: Badanie wpływu roślinnych związków fenolowych na enzymy metabolizujące ksenobiotyki u myszy i szczura. 501-3-02-05 - zakończony - kierownik projektu
3. Zadanie badawcze: Badanie wpływu indolo-3-karbinolu i izotiocyjanianu fenetylu na aktywność GST oraz poziom jej izoenzymów u szczura. 501-01-3302404-07048 - zakończony - kierownik projektu

5.4. Nagrody i wyróżnienia

1. Nagroda Indywidualna Naukowa Rektora Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2003
2. Nagroda Naukowa Zespołowa Ministra Zdrowia, Warszawa, 2006
3. Nagroda Zespołowa Dydaktyczna Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2007/2008
4. Nagroda Zespołowa Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2009/2010

5. Nagroda Zespołowa Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2011/2012

6. Amicus Studentium, Poznań 2012

5.5. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:

Brałam udział w międzynarodowych i w krajowych konferencjach naukowych. Jestem autorem i współautorem 64 streszczeń (wykaz streszczeń - załącznik 6).

Wyniki badań prezentowałam w formie 5 wystąpień ustnych:

1. **Krajka-Kuźniak V.**, Gnojkowski J., Baer-Dubowska W. (1998) Wpływ kwasu taninowego na aktywność enzymów katalizujących reakcje biotransformacji w wątrobie i nerkach szczurów. Streszczenia XXXIV Zjazdu PTBioch., Białystok, 15-18.09.1998, 202.

2. Szaefer H., **Krajka-Kuźniak V.**, Baer-Dubowska W. (2005) Modulation of cytochrome P450 isoforms by indole-3-carbinol in rat liver and kidney. Acta Bioch. Pol. 52 suppl. 1, 151. 40th Meeting of the Polish Biochemical Society, Lublin, 19-23 September, 2001.

3. **Krajka-Kuźniak V.**, Szaefer H., Mikołajczyk K., Baer-Dubowska W. (2007) Wpływ soku z buraka na aktywność i ekspresję enzymów metabolizujących ksenobiotyki u szczura. Streszczenia Konferencji naukowej „Naturalne przeciwutleniacze – od surowca do organizmu”, Poznań, 29-30.01.2007, 135.

4. **Krajka-Kuźniak V.**, Szaefer H., Markowski J., Baer-Dubowska W. (2006) The effect of cloudy apple juice on the activity and expression cytochrome P450 and phase II enzymes in N-nitrosodiethylamine-induced rat liver. Acta Bioch. Pol. 53 suppl. 1, 42. Abstracts of the 41th Meeting of the Polish Biochemical Society, Białystok, 12-15 September 2006.

5. **Krajka-Kuźniak V.**, Paluszczak J., Szaefer H., Baer-Dubowska W. (2012) Betanin induces Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. Acta Bioch. Pol. 59 suppl. 3, s. 194. Abstracts of the 47th Congress of the Polish Biochemical Society and Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting. Poznań Poland, September 11th -14th, 2012

5.6. Szkolenia i kursy naukowe

W celu kontynuacji kształcenia i podniesienia kwalifikacji brałam udział w wielu kursach i konferencjach naukowo-szkoleniowych (załącznik 6):

- 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)
- Kurs „Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA” (3-5.12.2007; Łódź Uniwersytet Medyczny w Łodzi)
- 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

5.8. Recenzje

Byłam recenzentem 6 prac w następujących czasopismach: *Food and Chemical Toxicology*, *Drug Chemical Toxicology*, *BBA-Molecular Cell Research*, *British Journal of Nutrition*, *Inflammation*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

W skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi 23 prace oryginalne, 1 praca pogładowa oraz 2 rozdziały w książkach. Jestem także autorem 2 rozdziałów w skrypcie oraz 2 rozdziałów w podręczniku dla studentów z łączną punktacją KBN/MNiSW = 591 oraz IF = 52.135.

Prace były cytowane w 235 publikacjach wg bazy Web of Knowledge; w 222 publikacjach wg bazy Web of Sciences, a mój Indeks Hirscha wynosi 8 (Web of Knowledge); 7 (Web of Sciences).

Brałam udział w realizacji 8 projektów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN (w dwóch jako kierownik projektu), oraz w 3 finansowanych w ramach badań własnych UMP jako kierownik.

Jestem autorem i współautorem 64 doniesień zjazdowych: 28 prezentowanych na konferencjach zagranicznych i 36 na krajowych zjazdach, w tym 5 prezentowałam jako wystąpienia ustne.

O. Kućka - Kuswaś