



Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Monika Papież

AUTOREFERAT

Zakład Cytobiologii
Katedra Farmakobiologii
Wydział Farmaceutyczny UJ CM
Kraków 2016

SPIS TREŚCI

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	3
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
3. 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.).....	4
3.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji.....	4
3.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
3.2.1. Wprowadzenie.....	5
3.2.1.1. Polifenole jako związki modulujące działanie cytostatyków w komórkach białaczkowych	6
3.2.1.2. Cytogenotoksyczne działanie etopozydu na komórki białaczkowe i prawidłowe komórki mieloidalne.....	7
3.2.1.3 Kurkumina i (–)-epikatechina jako potencjalne związki modyfikujące cytogenotoksyczne działanie etopozydu.....	9
3.2.2. Cel badań stanowiących podstawę habilitacji.....	10
3.2.3. Omówienie wyników badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej.....	11
3.2.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej oraz ich ewentualne wykorzystanie.....	26
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	28
4.1. Badania przed doktoratem.....	28
4.2. Badania po doktoracie.....	30
5. Plany dotyczące badań.....	34
6. Piśmiennictwo.....	34
7. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego.....	40
8. Kierowanie i udział w projektach badawczych.....	41
9. Udział w konferencjach.....	42
10. Nagrody, wyróżnienia.....	42
11. Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	42
12. Członkostwo w radach redakcyjnych czasopism naukowych.....	42
13. Recenzje prac.....	42

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

1992: magister biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

2002: doktor nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UJ, Kraków, tytuł pracy: Wpływ składników wyciągu z kwiatów malwy czarnej (*Flos Malvae Arboreae*) na obraz histoenzymatyczny i morfologiczny tarczycy i gonady męskiej szczura.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1993 – pracownik inżynierijno-techniczny, Zakład Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków, Instytut Farmakologii, PAN, Kraków

1993 – 1995: asystent, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Collegium Medicum, UJ, Kraków

1995 – 2009: pracownik naukowo-techniczny, asystent, adiunkt, Zakład Cytobiologii i Histochemii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UJ, Kraków

2010 – obecnie: adiunkt, starszy wykładowca; Zakład Cytobiologii (pierwotna nazwa Zakład Cytobiologii i Histochemii), Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UJ, Kraków

3. 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.):

Podstawą pracy habilitacyjnej zatytułowanej „**Modulujący wpływ wybranych polifenoli na przeciwbiałaczkowe działanie etopozydu i na jego cytogenotoksyczną aktywność w komórkach prawidłowych**” jest monotematyczny cykl 6 publikacji o łącznym IF wynoszącym 12.5 (141 pkt. MNiSW). We wszystkich publikacjach stanowiących podstawę habilitacji jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

3.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

- P1.** Papież MA, Dybała M, Sowa-Kućma M, Krzyściak W, Taha H, Józkowicz A, Nowak G. (2009) Evaluation of oxidative status and depression-like responses in Brown Norway rats with acute myeloid leukemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33 (4): 596–604. IF = 2.823, 24 pkt.
- P2.** Papież MA, Baran J, Bukowska-Straková K, Wiczkowski W. (2010) Antileukemic action of (–)-epicatechin in the spleen of rats with acute myeloid leukemia. *Food and Chemical Toxicology* 48 (12): 3391-3397. IF = 2.602, 32 pkt.
- P3.** Papież MA, Baran J, Bukowska-Straková K, Krośniak M. (2011) Epicatechin administration leads to necrotic cell death of rat leukemia promyelocytes *in vivo*. *In Vivo* 25 (1): 29-34. IF = 1.264, 20 pkt.
- P4.** Papież MA, Bukowska-Straková K, Krzyściak W, Baran J. (2012) (–)-Epicatechin enhances the etoposide-induced antileukaemic effect in rats with acute myeloid leukaemia. *Anticancer Research* 32 (7): 2905-2914. IF = 1.713, 20 pkt.
- P5.** Papież MA. (2013) The influence of curcumin and (–)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. *Drug and Chemical Toxicology* 36 (1): 93-101. IF = 1.098, 15 pkt.

P6. Papież MA, Krzyściak W, Szade K, Bukowska-Straková K, Kozakowska M, Hajduk K, Bystrowska B, Dulak J, Józkowicz A. (2016) Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Design, Development and Therapy* 10: 557-570. IF(2014/2015) = 3.028, 30 pkt.

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

3.2.1. Wprowadzenie

W poszukiwaniu selektywnej terapii przeciwnowotworowej zwraca się uwagę na różnice w stanie redoks między komórkami nowotworowymi, a prawidłowymi. Komórki nowotworowe, w tym białaczkowe, charakteryzują się często podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu (RFT), w stosunku do prawidłowych komórek prekursorowych (Nowicki i wsp., 2004). Wykazano, że wzrost poziomu RFT w surowicy krwi u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (ang. Acute Myeloid Leukemia, AML) koreluje ze wzrostem liczby leukocytów krążących we krwi (Zhou i wsp., 2007).

Przyczyną podwyższonego poziomu RFT w komórkach białaczkowych są między innymi onkogeny, które mogą kontrolować ekspresję i aktywność podjednostek białkowych oksydazy NADPH (ang. NADPH oxidase, NOX), co skutkuje nasileniem powstawania RFT (Irwin i wsp., 2013; Reddy i wsp., 2011). Przypuszcza się, że różnice w stanie redoks między komórkami białaczkowymi, a prawidłowymi mogą posłużyć jako cel terapeutyczny. Podwyższając poziom stresu oksydacyjnego w komórkach białaczkowych z endogennym wysokim poziomem RFT można łatwiej zaindukować w nich apoptozę stosując prooksydanty, w porównaniu z prawidłowymi komórkami ze stosunkowo niskim poziomem RFT.

Niektóre konwencjonalne leki przeciwnowotworowe, takie jak: antracykliny, cytarabina, czy też winkrystyna mogą nasilać stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych (Celik i Arinc 2008; Iacobini i wsp., 2001; Chiu i wsp., 2012). Z drugiej strony wywołują one często silne niepożądane efekty w prawidłowych komórkach, co ogranicza ich zastosowanie kliniczne (Zhou i wsp., 2001; Patel i wsp., 2012; Kaur i wsp., 2010). Przyczyną tych ubocznych efektów jest między innymi silne działanie prooksydacyjne w zdrowych tkankach.

Obecnie badania zmierzają w kierunku opracowania leków działających selektywnie na komórki nowotworowe, a nie wywierających efektu cytotoksycznego na prawidłowe komórki organizmu. Trwają także prace nad nowymi, komplementarnymi metodami leczenia

nowotworów, w celu zwiększenia indeksu terapeutycznego cytostatyków. Poszukuje się też nowych metod leczenia cytoprotekcyjnego dla ochrony prawidłowych tkanek, które stanowiłyby uzupełnienie klasycznej chemioterapii, bez negatywnego wpływu na jej skuteczność.

3.2.1.1. Polifenole jako związki modulujące działanie cytostatyków w komórkach białaczkowych

W badaniach nad metodami komplementarnymi, uwagę zwracają związki pochodzenia roślinnego z grupy polifenoli, które mogą wywierać selektywne działanie prooksydacyjne i cytotoksyczne względem komórek nowotworowych i jednocześnie wykazują słabe działanie cytotoksyczne i nie wpływają znacząco na stan redoks komórek prawidłowych w testach *in vitro* i *in vivo* (Yamamoto i wsp., 2003; Feng i wsp., 2007; Sánchez i wsp., 2010). Co istotne, niektóre polifenole mogą też selektywnie nasilać działanie niektórych cytostatyków na komórki nowotworowe, wywierając jednocześnie efekt cytoprotekcyjny w prawidłowych tkankach (Zhou i wsp., 2011; Enomoto i wsp., 2011; Du i wsp., 2010).

Polifenole są znane z ich właściwości antyoksydacyjnych, jednak w niektórych warunkach mogą działać prooksydacyjnie (Sergediene i wsp., 1999). Wykazano, iż działają one anty- lub prooksydacyjnie na drodze klasycznej, jako związki o właściwościach redukujących lub wpływają na stan redoks komórki (Lee i Lee 2006; Papież i wsp., 2008).

Przypuszcza się, że nasilanie stresu oksydacyjnego przez niektóre polifenole w komórkach białaczkowych jest związane z ich zdolnością do redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ (Oikawa i wsp., 2003; Khan i wsp., 2014). Komórki nowotworowe mają bardzo często podwyższony poziom jonów Cu^{2+} oraz zwiększoną ekspresję transportera tych jonów w porównaniu z prawidłowymi komórkami (Carpentieri i wsp., 1986; Peng i wsp., 2006), co można wykorzystać w celach terapeutycznych. Jony Cu^+ reagują z tlenem prowadząc do powstania nadtlenku wodoru (H_2O_2), a następnie rodnika hydroksylogowego ($\cdot\text{OH}$), który może wywoływać uszkodzenia DNA skutkujące apoptozą. W badaniach na liniach nowotworowych wykazano, że chelator jonów Cu^{2+} neokuproina hamuje apoptozę indukowaną różnymi polifenolami (Khan i wsp., 2014).

Właściwości prooksydacyjne w obecności Cu^{2+} wykazują przede wszystkim flawonoidy z ugrupowaniem katecholowym lub pirogalolowym (Gao i wsp., 1997), a także polifenol taki jak kurkumina posiadający strukturę beta-diketonu (Yoshino i wsp., 2004).

Mając na uwadze powyższe fakty, związki z grupy polifenoli mogłyby znaleźć zastosowanie w modyfikowaniu działania konwencjonalnych leków przeciwnowotworowych,

zwiększając ich indeks terapeutyczny oraz chroniąc komórki prawidłowe przed ubocznymi efektami lub przynajmniej ich nie nasilając.

3.2.1.2 Cytogenotoksyczne działanie etopozydu na komórki białaczkowe i prawidłowe komórki mieloidalne

Etopozyd jest cytostatykiem stosownym w niektórych protokołach w fazie indukcyjnej oraz konsolidacyjnej leczenia AML i może on wydłużyć czas trwania całkowitej remisji. Z drugiej strony etopozyd wykazuje silne działanie uboczne na prawidłowe prekursorzy komórek szpiku kostnego. U 1.6 – 12.4 % pacjentów leczonych przez długi okres czasu tym cytostatykiem, na przykład z powodu guzów litych, rozwija się leko-zależna, ostra białaczka szpikowa (ang. treatment-related Acute Myeloid Leukemia, t-AML) (Kagan i wsp., 1999). Z punktu widzenia chemioterapii istotne jest ograniczenie niepożądanych skutków działania etopozydu, przy zachowaniu jego aktywności przeciwnowotworowej.

Etopozyd jest półsyntetyczną pochodną epipodofilotoksyny, wprowadzoną do terapii w 1971 roku i stosowaną w leczeniu niektórych guzów litych, białaczek i chłoniaków (Slevin 1991). Głównym mechanizmem działania etopozydu jest stabilizacja kompleksu rozcinającego DNA-topoizomeraza II poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego z tym kompleksem, co uniemożliwia ponowne połączenie nici DNA (Berger i wsp., 1991). Taka aktywność etopozydu prowadzi do powstawania pojedynczych pęknięć nici DNA (ang. DNA single-strand breaks, SSBs) oraz najbardziej letalnych podwójnych pęknięć DNA (ang. DNA double-strand breaks, DSBs), wywołujących apoptozę komórek nowotworowych (Muslimović i wsp., 2009). Etopozyd jest metabolizowany przy udziale cytochromu P450 do metabolitów katecholowych, z których powstają następnie orto-chinony, wykazujące zdolność do hamowania aktywności topoizomerazy II, podobnie jak sam cytostatyk (Gantchev i Hunting, 1998).

W komórkach linii mieloidalnej, z wysoką konstytutywną aktywnością mieloperoksydazy (ang. Myeloperoxidase, MPO), etopozyd i jego metabolity katecholowe, ulegają jednoelektronowemu utlenianiu do bardziej genotoksycznych rodników fenoksylowych (Kagan i wsp., 2001). Z uwagi na to, że ekspresja MPO dominuje nad ekspresją cytochromu P450 w mieloidalnych komórkach progenitorowych CD34+, fenoksyłowe rodniki tego cytostatyku mogą odgrywać dużą rolę w działaniu prooksydacyjnym i genotoksycznym na te komórki (Soucek i wsp., 2005). Wielu dowodów na rolę genotoksycznego działania rodników fenoksylowych, które może odpowiadać za transformację nowotworową prekursorów mieloidalnych dostarczył zespół Kagan wykonując

badania w latach 1994-2004. Badacze ci wykazali, że fenoksyłowe rodniki etopozydu mogą utleniać tiole, takie jak GSH i sulfhydryłowe grupy białek, prowadząc do powstania rodników tyłowych i obniżając znacznie poziom GSH w prekursorach mieloidalnych (Borisenko i wsp., 2004). Tyłowe rodniki mogą wchodzić w dalsze reakcje, które powodują nasilenie produkcji RFT w środowisku z obniżonym poziomem GSH (Tyurina i wsp., 1995; Kagan i wsp., 1999). Skutkiem takiego działania są uszkodzenia makrocząstek, w tym DNA. Oksydacyjnej modyfikacji pod wpływem etopozydu może podlegać także topoizomeraza II, co będzie zwiększało prawdopodobieństwo powstawania uszkodzeń DNA (Kagan i wsp., 1999). Ponadto wolne rodniki etopozydu mogą prowadzić bezpośrednio do powstania DSBs (Nowicki i wsp., 2004; Sallmyr i wsp., 2008), zarówno w komórkach białaczki szpikowej jak i w prawidłowych prekursorowych komórkach linii mieloidalnej, potęgując efekt genotoksyczny tego cytostatyku. DSBs stwarzają wysokie ryzyko wystąpienia translokacji chromosomalnych, które często są wykrywane w komórkach białaczkowych (Richardson i Jasin 2000).

Innym rodzajem uszkodzeń DNA wywoływanym przez wolne rodniki są oksydacyjne uszkodzenia. Do najczęściej występujących oksydacyjnych uszkodzeń DNA zalicza się 8-hydrokso-2' deoksyguanozynę (8-OHdG), której poziom jest podwyższony w komórkach różnych typów nowotworów (Klaunig i wsp., 2010). Jej obecność skutkuje zaburzeniami w replikacji DNA, które mogą się przyczyniać do transwersji guaniny do tyminy w genach istotnych dla rozwoju nowotworów (Cheng i wsp., 1992). Wzrost poziomu 8-OHdG uważa się także za biomarker stresu oksydacyjnego (Valavanidis i wsp., 2009).

Etopozyd przyczynia się do powstania zarówno pęknięć nici DNA jak i 8-OHdG (Attia i wsp., 2013). Za pośrednictwem tych uszkodzeń może on wywierać efekt cytogenotoksyczny na komórki białaczki szpikowej, nasilając ich apoptozę lub wywołuje uboczne działanie w prawidłowych komórkach linii mieloidalnej.

Cytogenotoksyczne działanie etopozydu na prawidłowe komórki prekursorowe szpiku kostnego może prowadzić do mielosupresji i neutropenii, które są najczęstszymi objawami ubocznymi ograniczającymi stosowanie tego cytostatyku (Joel i wsp., 1994; Kobayashi i Ratain 1994). U osób leczonych tym cytostatykiem znacznie rzadziej może się rozwinąć wspomniana już t-AML lub zespół mielodysplastyczny (Whitlock i wsp., 1991; Buckley i wsp., 2014). W badaniach *in vitro* z użyciem ludzkich, progenitorowych komórek mieloidalnych CD34⁺ wykazano korelację między poziomem fenoksyłowych rodników etopozydu, a występowaniem translokacji genu *MLL* (ang. Mixed-Lineage Leukemia, MLL.), charakterystycznej dla t-AML (Vlasova i wsp., 2011). Biorąc pod uwagę powyższe fakty,

ograniczenie efektów ubocznych etopozydu mogłoby pozwolić na zwiększenie dawki i przyczynić się do poprawienia indeksu terapeutycznego tego leku.

W badaniach będących przedmiotem prac na stopień doktora habilitowanego skupiłam swoją uwagę na etopozydzie, gdyż interesujące dla mnie było poznanie, czy wybrane polifenole o udowodnionej aktywności prooksydacyjnej i cytotoksycznej wobec komórek białaczki szpikowej będą działały synergistyczne z etopozydem.

Z drugiej strony nasuwa się pytanie, czy polifenole będące potencjalnymi substratami (Goldman i wsp., 1999) dla MPO podobnie jak sam etopozyd, nie ograniczą przeciwnowotworowego działania tego leku na komórki białaczki wywodzącej się z linii mieloidalnej.

Kolejnym problemem, który podjęłam się wyjaśnić w swoich badaniach było poznanie wpływu wybranych polifenoli na aktywność etopozydu wobec komórek prawidłowych linii mieloidalnej, gdyż nie można wykluczyć potęgującego działania tych składników roślinnych na cytogenotoksyczną aktywność etopozydu w warunkach środowiska redoks, panującego w tych komórkach.

3.2.1.3 Kurkumina i (-)-epikatechina jako potencjalne związki modyfikujące cytogenotoksyczne działanie etopozydu

W celu modyfikowania działania etopozydu na komórki białaczkowe i prawidłowe, wybrałam (-)-epikatechinę i kurkuminę, polifenole które mogą wywierać prooksydacyjne działanie na komórki AML wykazane przez innych autorów oraz w badaniach własnych (Oikawa i wsp., 2003; Sánchez i wsp., 2010; Papież i wsp., 2014). Kurkumina jest polifenolem wyizolowanym z kłączy ostryżu długiego *Curcuma longa L* (Aggarwal i wsp., 2003). Natomiast (-)-epikatechina występuje w największej ilości w ziarnie kakaowca, a także w zielonej herbacie i winogronach (Schroeter i wsp., 2006).

Kurkumina i (-)-epikatechina nasilają produkcję RFT w komórkach linii ludzkiej białaczki szpikowej HL-60, dzięki redukcji jonów Cu^{2+} . Konsekwencją tego działania jest znamienny wzrost poziomu 8-OHdG i apoptoza komórek (Oikawa i wsp., 2003; Yoshino i wsp., 2004; Nakazato i wsp., 2005). Efekt ten wskazuje na zdolność kurkuminy i (-)-epikatechiny do zwiększania ilości H_2O_2 , co jest konsekwencją redukcji Cu^{2+} do Cu^+ . Z uwagi na to, że MPO odgrywa kluczową rolę w apoptozie indukowanej za pośrednictwem H_2O_2 w komórkach HL-60 (Wagner i wsp., 2000), można przypuszczać, że te polifenole będą pośredniczyły w nasilaniu apoptozy komórek z wysoką aktywnością tego enzymu i podwyższonym poziomem jonów Cu^{2+} , który często towarzyszy białaczce.

Takie działanie polifenoli byłoby szczególnie pożądane w przypadku AML, z uwagi na niską skuteczność terapii stosowanych w leczeniu tej białaczki. Pięcioletni okres przeżycia po leczeniu indukcyjnym osiąga tylko około 24% pacjentów z AML (Howlader i wsp., 2012). Problemem w terapii tej białaczki są nawroty choroby i pierwotna lub nabyta oporność komórek białaczkowych na leczenie.

3.2.2. Cel badań stanowiących podstawę habilitacji

Celem badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej i wchodzących w cykl 6 publikacji (**P1 – P6**) było zbadanie przeciwbiałaczkowego działania (–)-epikatechiny i kurkuminy u szczurów BNML oraz określenie wpływu tych polifenoli na działanie etopozydu na komórki ostrej białaczki szpikowej oraz prawidłowe komórki szpiku kostnego. Cel ten został zrealizowany poprzez wykonanie niniejszych badań:

1. Zbadanie stanu oksydacyjno-redukcyjnego w tkankach szczurów BNML oraz zdrowych osobników rasy BN.
2. Określenie wpływu (–)-epikatechiny na apoptozę, stan redoks, poziom alkali-labilnych pęknięć DNA i oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych w komórkach białaczkowych i prawidłowych, izolowanych ze śledziony i ze szpiku kostnego szczurów BNML.
3. Określenie wpływu (–)-epikatechiny na działanie etopozydu na komórki białaczkowe oraz komórki prawidłowe szpiku kostnego i śledziony szczurów BNML, w zakresie aktywności pro-apoptotycznej, wpływu na stan redoks i na obraz cytologiczny szpiku kostnego.
4. Określenie wpływu (–)-epikatechiny i kurkuminy na działanie genotoksyczne etopozydu oraz na zmiany w obrazie cytologicznym szpiku kostnego pod wpływem tego cytostatyku u zdrowych szczurów rasy BN.
5. Określenie wpływu kurkuminy na apoptozę i udział procentowy komórek białaczkowych w śledzionie szczurów BNML.

6. Określenie wpływu kurkuminy na pro-apoptotyczne działanie etopozydu na komórki białaczkowe i prawidłowe izolowane od szczurów BNML.
7. Zbadanie wpływu kurkuminy na cytogenotoksyczne działanie etopozydu na komórki linii HL-60 oraz na ludzkie, progenitorowe komórki mieloidalne CD34⁺ i granulocyty, w warunkach *in vitro*.
8. Określenie charakteru interakcji między kurkuminą, a etopozydem oraz wpływu tych dwóch związków na stan redoks komórek HL-60 w badaniach *in vitro*.

3.2.3. Omówienie wyników badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej

Publikacja P1 – Papież MA, Dybała M, Sowa-Kućma M, Krzyściak W, Taha H, Józkowicz A, Nowak G. (2009) Evaluation of oxidative status and depression-like responses in Brown Norway rats with acute myeloid leukemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33 (4): 596–604.

Biorąc pod uwagę, że AML często towarzyszy stres oksydacyjny, celem niniejszych badań było określenie stanu redoks w modelu białaczki szpikowej szczura rasy Brown Norway (ang. Brown Norway Myeloid Leukaemia, BNML). BNML jest przeszczepialną białaczką, rozwijającą się u immunokompetentnych zwierząt (Van Bekkum i Hagenbeek 1977), co jest atutem tego modelu eksperymentalnego. Tworząc ten model doświadczalny poprzez dożylne iniekcje dwumetylobenzoantracenu, badacze mieli na uwadze aby odzwierciedlał on jak najlepiej „problemy kliniczne” występujące w przebiegu ostrej białaczki szpikowej u ludzi (Martens i wsp., 1990). Białaczka w modelu BNML charakteryzuje się powolną progresją, przewidywalną dynamiką rozrostu i wykazuje podobieństwa do ludzkiej AML, takie jak zahamowanie prawidłowej hematopoezy, podobna wrażliwość komórek BNML na leki cytostatyczne i zaburzenia w krzepnięciu krwi (Martens i wsp., 1990; Van Bekkum i Hagenbeek 1977). Model ten okazał się pomocny w ocenie indeksu terapeutycznego, optymalizacji sposobu dawkowania cytostatyków i kombinacji chemioterapii stosowanej w AML (Martens i wsp., 1990; Van Bekkum i Hagenbeek 1977). Jak dotąd, nie opublikowano badań dotyczących stanu redoks u szczurów z BNML.

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań stanu oksydacyjno-redukcyjnego wybranych tkanek szczurów z ostrą białaczką szpikową (model BNML) i zdrowych

osobników tej samej rasy BN. Badania wykonywano w dwóch grupach szczurów z białaczką w 30 i 34 dniu po dootrzewnowym podaniu komórek BNML. Komórki BNML i przeciwciała RM-124 służące do ich identyfikacji otrzymałam od prof. A. C. Martensa (University Medical Center Utrecht, Holandia).

W ostatnich dniach eksperymentu obserwowano u szczurów objawy charakterystyczne dla pełnoobjawowej białaczki, takie jak osłabienie, krwawienia z nosa występujące u niektórych osobników oraz hepatosplenomegalię. W biochemicznych badaniach przeprowadzonych na tkance śledziony szczurów BNML potwierdzono występowanie stresu oksydacyjnego. Śledziona, jako jeden z głównych narządów kolonizowanych przez komórki BNML będzie obiektem dalszych badań nad wpływem polifenoli na komórki białaczkowe.

Symptomami stresu oksydacyjnego w śledzionie szczurów BNML był znamieny spadek poziomu GSH i niskocząsteczkowych antyoksydantów (ang. Ferric ion Reducing Ability of Plasma, FRAP) oraz wzrost poziomu produktu peroksydacji lipidów (ang. Malondialdehyde, MDA), w odniesieniu do grupy kontrolnej (Wykres 3, publikacja **P1**).

Interesujące, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (ang. Superoxide Dismutase, SOD) w śledzionie, jednego z głównych enzymów usuwających nadtlenuki, zmieniała się w zależności od stopnia rozwoju białaczki (znamieny spadek w 30 dniu rozwoju białaczki i wzrost w 34 dniu), w stosunku do zwierząt zdrowych (Wykres 4d, publikacja **P1**). Spadek aktywności SOD w 30 dniu rozwoju białaczki może wskazywać na oksydacyjne uszkodzenia w komórkach. Natomiast wzrost aktywności tego enzymu w grupie 34-dniowej może świadczyć o wytworzeniu się mechanizmu ochronnego przed stresem oksydacyjnym, który będzie chronić komórki białaczkowe w śledzionie.

Podobnie, w komórkach ludzkiej białaczki może ulegać zmianie ekspresja i aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD. Obserwuje się zarówno spadek, jak i wzrost aktywności tych enzymów (Irwin i wsp., 2013). Spadek ich aktywności skutkuje zwiększeniem poziomu RFT i nasileniem stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do pogłębienia niestabilności genetycznej, proliferacji komórek białaczkowych i progresji choroby nowotworowej (Sallmyr i wsp., 2008).

W 34 dniu rozwoju białaczki u szczurów BNML odnotowano także wzrost ekspresji oksygenazy hemowej (ang. Heme Oxygenase-1, HO-1) (Wykres 4a, publikacja **P1**), enzymu o działaniu antyoksydacyjnym (Józkowicz i wsp., 2007), który rozkłada hem do tlenku węgla, biliwerdyny i jonów żelaza. Rosła też znamienne aktywność reduktazy biliwerdyny (ang. Biliverdin Reductase, BvR) (Wykres 4b, publikacja **P1**), enzymu metabolizującego substraty wytworzone na skutek aktywności HO-1. BvR metabolizuje biliwerdynę do silnego

antyoksydantu bilirubiny (Józkowicz i wsp., 2007). Sumaryczna aktywność tych enzymów prowadzi do wzmocnienia obrony antyoksydacyjnej. Wzrost aktywności SOD, HO-1 i BvR w 34 dniu rozwoju białaczki może prowadzić do wytworzenia mechanizmu zapewniającego ochronę komórek BNML przed apoptozą. W śledzienie szczurów BNML obserwowano też znamienne spadki aktywności enzymu ferrytyny, która odpowiada za usuwanie żelaza z cytozolu (Józkowicz i wsp., 2007). Efekt ten może świadczyć o wyczerpaniu się aktywności ferrytyny (Wykres 4c, publikacja **P1**).

Uzyskane wyniki dobrze korelują z innymi badaniami przeprowadzonymi na komórkach krwi obwodowej i szpiku kostnego pacjentów z AML, u których często występuje nadekspresja HO-1, dając komórkom białaczkowym oporność na apoptozę (Lin i wsp., 2015). Model BNML można wykorzystywać w dalszej perspektywie do badań nad rolą HO-1, jako potencjalnego celu terapeutycznego w AML.

Obserwowane zmiany w stanie redoks wykazano nie tylko w śledzienie będącej magazynem komórek BNML, ale także w strukturach mózgu (Wykres 3 i 4, publikacja **P1**), co wskazuje na ogólnoustrojowe występowanie stresu oksydacyjnego u szczurów BNML. Uzyskane wyniki badań wskazują na podobieństwo modelu BNML do ludzkiej białaczki AML, gdyż podobne zmiany w badanych parametrach stanu redoks obserwuje się u pacjentów z AML w komórkach krwi i szpiku a także w surowicy, przed włączeniem leczenia (Zhou i wsp., 2007; Battisti i wsp., 2008).

Uzyskane wyniki świadczą o poważnych zaburzeniach w stanie redoks u szczurów BNML, które mogą być skutkiem wzmożonej produkcji H_2O_2 oraz innych oksydantów przez komórki białaczkowe. Potwierdzono, iż wybrany model zwierzęcy jest odpowiedni do przeprowadzenia badań nad wpływem polifenoli o potencjalnym działaniu prooksydacyjnym na komórki nowotworowe. Stres oksydacyjny towarzyszący białaczce może nasilać cytotoksyczne działanie badanych polifenoli, na co wskazują wyniki zaprezentowane w kolejnych publikacjach **P4 i P6**.

Publikacja P2 – Papież MA, Baran J, Bukowska-Straková K, Wiczowski W. (2010) Antileukemic action of (–)-epicatechin in the spleen of rats with acute myeloid leukemia. *Food Chem Toxicol* 48 (12): 3391-3397.

Biorąc pod uwagę, iż (–)-epikatechina może nasilać stres oksydacyjny w komórkach HL-60 i działać antyoksydacyjnie na prawidłowe komórki (Yamamoto i wsp., 2003), celem niniejszych badań było określenie wpływu (–)-epikatechiny na poziom oksydacyjnych

uszkodzeń zasad purynowych, pęknięć nici DNA oraz apoptozę w śledziona szczurów BNML i zdrowych osobników.

W badaniach uszkodzeń DNA zastosowano alkaliczną wersję metody kometowej, służącą do wykrywania głównie pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA, a także miejsc alkalicznie labilnych, które mogą się przekształcić w pęknięcia DNA w silnie zasadowym środowisku (300 mM NaOH). W celu identyfikacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA zastosowano formamidopirymidyno-DNA-glikozylazę (Fpg) izolowaną z *E.coli*, która „wycina” utlenione zasady purynowe, głównie 8-OHdG (Karakaya i wsp., 1997). Do wykrywania komórek apoptotycznych i nekrotycznych zastosowano znakowaną fluorescencyjnie aneksynę V i jodek propidyny. Badania apoptozy prowadzono z użyciem cytometru przepływowego i połączono je z identyfikacją komórek BNML za pomocą swoistych dla nich przeciwciał RM-124.

Dawkę (–)-epikatechiny ustalono na podstawie wstępnych badań, które obejmowały pomiar poziomu uszkodzeń DNA i masy śledziona szczurów BNML traktowanych tym polifenolem w dawce 20 i 40 mg/kg m.c. Z uwagi na brak znamionowego wpływu (–)-epikatechiny w dawce 20 mg/kg m.c., w dalszych badaniach stosowano 40 mg/kg m.c tego polifenolu. (–)-Epikatechinę podawano szczurom BNML i zdrowym osobnikom doustnie przez 22 dni, od 2 dnia po zaszczepieniu komórkami białaczkowymi. Eksperyment był prowadzony do momentu rozwoju pełnoobjawowej białaczki u szczurów kontrolnych po wszczepieniu 10^6 komórek BNML (Prof. A.C. Martens). Traktowanie szczurów (–)-epikatechiną przez cały okres rozwoju białaczki przypomina sytuację, gdy następuje nawrót choroby po remisji, w czasie której badany polifenol ogranicza jej rozwój. Komórki białaczkowe podawano szczurom dożylnie, w celu ich szybkiej i skutecznej dystrybucji do narządów docelowych.

W osoczu krwi szczurów BNML wykrywano także stężenie (–)-epikatechiny, które było stosunkowo niskie i wynosiło średnio 7.4 μM , a metylowanej epikatechiny 7.5 μM (Wykres 1, publikacja **P2**). Z danych literaturowych wynika, że działanie prooksydacyjne (–)-epikatechiny jest osiągnięte w warunkach *in vitro*, po zastosowaniu znacznie wyższych stężeń tego polifenolu. Jednak wyniki badań prowadzonych w długoterminowych hodowlach komórek dowodzą, że niskie, „fizjologiczne,” stężenia polifenoli wywierają taki sam wpływ na ekspresję genów oraz indukują apoptozę komórek nowotworowych, jak wysokie stężenia tych związków w czasie krótkich inkubacji (Moiseeva i wsp., 2007).

Interesującą właściwością (–)-epikatechiny, którą potwierdziłam w niniejszych badaniach było selektywne działanie tego polifenolu na komórki białaczkowe.

Biorąc pod uwagę wszystkie badane parametry, (-)-epikatechina była „neutralna” w grupie szczurów zdrowych. Natomiast u szczurów BNML obserwowano przeciwbiałaczkowe działanie (-)-epikatechiny, które prowadziło do znamiennego spadku masy śledzion oraz udziału procentowego komórek BNML (Wykres 2 i 6, publikacja **P2**). W obrazie histomorfologicznym śledzion szczurów BNML można było zauważyć mniej komórek białaczkowych i więcej prawidłowych w miazdze czerwonej, będącej głównym ich siedliskiem (Wykres 3b, publikacja **P2**). Śledziony szczurów BNML po traktowaniu (-)-epikatechiną pozostawały jednak nieco powiększone, w stosunku do narządów izolowanych od zdrowych osobników kontrolnych (Wykres 2, publikacja **P2**).

Stosując metodę kometową wykazałam znamieny wzrost poziomu oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych w komórkach izolowanych ze śledziony szczurów BNML, w stosunku do zdrowych osobników (Wykres 4c, publikacja **P2**). (-)-Epikatechina nie modyfikowała znamiennego poziomu tych uszkodzeń, zarówno u szczurów BNML i zdrowych zwierząt.

Z drugiej strony (-)-epikatechina zwiększała znamienne ilości pęknięć nici DNA u szczurów BNML i nie wywierała takiego działania u zwierząt zdrowych (Wykres 4a, publikacja **P2**). Można przypuszczać, że komórki BNML są bardziej wrażliwe na powstawanie pęknięć DNA niż komórki prawidłowe z powodu niestabilności genetycznej charakterystycznej dla komórek nowotworowych, która prowadzi do rozregulowania mechanizmów naprawy DNA.

Pomimo braku wzrostu ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA pod wpływem (-)-epikatechiny, nie można wykluczyć udziału stresu oksydacyjnego w mechanizmie jej przeciwbiałaczkowego działania. Wiadomo, że wolne rodniki mogą bezpośrednio prowadzić do powstania pęknięć DNA, w tym najbardziej letalnych DSBs. Ponadto u nietraktowanych szczurów BNML występuje stres oksydacyjny, o czym świadczy podwyższony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Wykres 4c, publikacja **P2**) oraz wyniki wcześniej przeprowadzonych badań biochemicznych w tkankach szczurów BNML (publikacja **P1**). Takie warunki redoks, mogą nasilać prooksydacyjne działanie (-)-epikatechiny.

Genotoksyczne działanie (-)-epikatechiny korelowało z działaniem proapoptotycznym względem komórek białaczkowych, gdyż obserwowano znamieny wzrost udziału procentowego wczesnoapoptotycznych komórek BNML wiążących aneksynę V, w stosunku do kontroli (Wykres 5, publikacja **P2**). Działanie to było selektywne, ponieważ (-)-epikatechina nie indukowała znamiennej apoptozy niebiałaczkowych (RM-124-ujemnych) splenocytów u szczurów BNML.

W niniejszych badaniach wykazano selektywne genotoksyczne i proapoptotyczne działanie (-)-epikatechiny u szczurów BNML z podwyższonym poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. (-)-Epikatechina jako związek działający selektywnie na komórki białaczki szpikowej może być brana pod uwagę w dalszych badaniach nad jej przydatnością w terapii komplementarnej.

Publikacja P3 – Papież MA, Baran J, Bukowska-Straková K, Krośniak M. (2011) Epicatechin administration leads to necrotic cell death of rat leukemia promyelocytes *in vivo*. *In Vivo* 25 (1): 29-34.

Z uwagi na to, że w publikacji **P2** potwierdzono przeciwbiałaczkowe działanie (-)-epikatechiny w śledzienie szczurów BNML, interesujące było przeanalizowanie jej wpływu na komórki białaczki szpikowej i prawidłowe komórki hematopoetyczne w szpiku kostnym. Nie można wykluczyć, że specyficzne mikrośrodowisko panujące w śledzienie i szpiku kostnym może wpływać na działanie polifenolu na komórki białaczkowe i prawidłowe (Jensen i wsp., 2000). Ponadto (-)-epikatechina wywierała efekt cytogenotoksyczny na zmienione nowotworowo promielocyty w śledzienie szczurów (publikacja **P2**). Niezbędne było zatem określenie jej wpływu na prawidłowe komórki linii mieloidalnej z wysoką aktywnością MPO, która może czynić je podatnymi na genotoksyczne działanie niektórych związków (Kagan i wsp., 1999; Vlasova i wsp., 2011).

Celem niniejszych badań było określenie wpływu (-)-epikatechiny na poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych, pęknięć nici DNA oraz apoptozę w szpiku kostnym szczurów BNML oraz zdrowych osobników. W wykrywaniu uszkodzeń DNA posłużono się metodą kometową, a badania apoptozy i identyfikację komórek BNML przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego.

W badaniach wykazano, że (-)-epikatechina była „neutralna” dla komórek szpiku kostnego zdrowych osobników, natomiast zwiększała znamienne poziom pęknięć nici DNA u szczurów BNML (Wykres 2, publikacja **P3**). Nie obserwowano jednak znamienego wpływu tego polifenolu na ilość oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych, apoptozę i udział procentowy komórek BNML w szpiku kostnym szczurów z białaczką. Można zauważyć jedynie tendencję do wzrostu udziału apoptotycznych (aneksyno-dodatnich) komórek BNML i do spadku ich udziału procentowego po traktowaniu polifenolem, w stosunku do kontroli (Tabela 1, publikacja **P3**). Przyczyną braku znamienego wpływu (-)-

epikatechiny na apoptozę komórek BNML mogła być stosunkowo mała liczba osobników w badanych grupach.

Interesujące wyniki otrzymano analizując nekrozę komórek u szczurów z białaczką po traktowaniu (-)-epikatechiną. W tej grupie doświadczalnej obserwowano znamienne wzrost udziału procentowego nekrotycznych komórek BNML w stosunku do kontroli z białaczką (Wykres 3, publikacja **P3**). Wykazano także ujemną korelację między całkowitym udziałem procentowym komórek BNML, a ich nekrozą (Wykres 4, publikacja **P3**). Jednak znaczenie biologiczne tego rodzaju śmierci komórkowej jest prawdopodobnie niewielkie, ze względu na jej mały udział w populacji komórek białaczkowych (około 5% komórek nekrotycznych). W niniejszych badaniach potwierdzono jednak zdolność (-)-epikatechiny do indukowania nekrozy komórek białaczki szpikowej w modelu *in vivo*.

Obecnie rozważa się rolę sposobu obumierania komórek nowotworowych w skuteczności chemioterapii. Niektórzy autorzy uważają, że indukowanie nekrozy może mieć znaczenie w terapii nowotworów, gdyż jest ona procesem immunogennym w przeciwieństwie do apoptozy i nekrotyczne komórki nowotworowe nasilają odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko nim samym, gdy część z nich zostanie sfagocytowana przez komórki prezentujące antygen (Sauter i wsp. 2000).

W badaniach potwierdzono, że (-)-epikatechina wywiera selektywne działanie genotoksyczne w szpiku kostnym szczurów BNML i pozostaje neutralna dla komórek szpiku kostnego zdrowych osobników. Uzyskane wyniki są potwierdzeniem genotoksycznego działania (-)-epikatechiny na komórki szczurów z białaczką szpikową, które wykazałam w publikacji **P2**, badając śledziony szczurów BNML. Wyniki te dobrze korelują z badaniami innych autorów, który postulują, że dualny efekt działania na komórki nowotworowe i prawidłowe jest wspólną cechą niektórych związków roślinnych z grupy polifenoli.

Wyniki badań przedstawionych w publikacji **P2** i **P3** wskazują, że (-)-epikatechina może być przydatna w terapii komplementarnej. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeanalizowałam wpływ (-)-epikatechiny na działanie etopozydu, cytostatyku wchodzącego w reakcje redoks w komórkach białaczki szpikowej (Kagan i wsp., 1999). Wyniki tych badań zaprezentowałam w kolejnej publikacji **P4**.

Publikacja P4 – Papież MA, Bukowska-Straková K, Krzyściak W, Baran J. (2012) (–)-Epicatechin enhances the etoposide-induced antileukaemic effect in rats with acute myeloid leukaemia. *Anticancer Research* 32 (7): 2905-2914.

Celem niniejszych badań była ocena apoptozy i stanu redoks w komórkach szczerów BNML otrzymujących (–)-epikatechinę przed oraz w trakcie stosowania etopozydu. (–)-Epikatechina była podawana szczurom doustnie w dawce 20 lub 40 mg/kg m.c., od drugiego dnia po zaszczepieniu komórkami BNML, aż do 23 dnia rozwoju białaczki. Natomiast etopozyd był stosowany dootrzewnowo w dawce 50 mg/kg m.c., od 21 dnia eksperymentu, przez trzy kolejne dni. Dawka etopozydu została wybrana w oparciu o wyniki badań innych autorów, którzy wykazali znaczny wzrost uszkodzeń DNA w szpiku kostnym zdrowych myszy, po zastosowaniu etopozydu w dawce 50 mg/kg m.c. (Turner i wsp., 2001).

W badaniach wykazano, że (–)-epikatechina nasila przeciwbiałaczkowe działanie etopozydu, gdyż jednoczesne podawanie szczurom tych dwóch związków prowadziło do znamienego spadku masy śledzion i ilości komórek BNML (wykrywanych metodą cytometrii przepływowej), w stosunku do działania samego cytostatyku (Wykres 1 i 2, publikacja **P4**). Odwrotny efekt obserwowano w przypadku apoptozy analizowanej metodą cytometrii przepływowej. (–)-Epikatechina nasilała apoptozę komórek BNML indukowaną etopozydem w śledzionie i szpiku kostnym szczerów z białaczką (Wykres 3, publikacja **P4**). Wzmocnienie działania etopozydu przez (–)-epikatechinę potwierdzono dodatkowo w cytologicznych badaniach komórek szpiku kostnego. Podawanie (–)-epikatechiny przed i w trakcie stosowania etopozydu prowadziło do znamienego spadku udziału procentowego promielocytów, w stosunku do działania samego cytostatyku (Tabela 1, publikacja **P4**). Przeciwny efekt obserwowano w przypadku komórek prawidłowych. W grupie szczerów BNML traktowanych (–)-epikatechiną, a następnie etopozydem można było zauważyć znamieny wzrost udziału procentowego prawidłowych erytroblastów, limfocytów i monocytów/makrofagów w stosunku do działania samego etopozydu (Tabela 1, publikacja **P4**). Obserwowany efekt był prawdopodobnie spowodowany tym, że szczury BNML otrzymujące (–)-epikatechinę przed podawaniem etopozydu miały większą ilość prawidłowych komórek hematopoetycznych, w porównaniu z osobnikami traktowanymi tylko cytostatykiem. (–)-Epikatechina hamowała zatem rozrost komórek białaczkowych w szpiku kostnym, ułatwiając jednocześnie proliferację komórek prawidłowym.

W badaniach cytologicznych komórek szpiku kostnego potwierdzono dodatkowo przeciwbiałaczkowe działanie samej (–)-epikatechiny u szczerów BNML, które wykazano już

wcześniej innymi metodami w publikacji **P2** i **P3**. Potwierdzeniem tego działania jest zmniejszenie udziału procentowego białaczkowych promielocytów i wzrost udziału prawidłowych komórek w szpiku kostnym (erytroblastów, limfocytów i monocytów/makrofagów) (Tabela 1, publikacja **P4**).

Jednym z mechanizmów, który odpowiada za modyfikowanie działania etopozydu przez (-)-epikatechinę jest prawdopodobnie stres oksydacyjny. Za rolę tego mechanizmu przemawia fakt, iż traktowanie szczurów dwoma badanymi związkami prowadziło do znamiennego spadku poziomu niskocząsteczkowych antyoksydantów (FRAP) i aktywności SOD oraz wzrostu poziomu produktu peroksydacji lipidów MDA w tkance wątroby szczurów BNML, w stosunku do działania samego cytostatyku (Wykres 4, 5 i 6, publikacja **P4**).

Badania te pozostają w zgodzie z wynikami innych autorów, którzy wykazali, że inny związek z grupy katechin galusanu epigallokatechiny (EGCG) nasila cytotoksyczne działanie trójtlenku arsenu w komórkach HL-60, działając poprzez mechanizm wolnorodnikowy. EGCG była utleniana przez MPO w komórkach HL-60, co prowadziło do generowania H₂O₂ i rodnika hydroksylowego, nasilając w efekcie apoptotyczną aktywność trójtlenku arsenu (Nakazato i wsp., 2005).

Należy dodać, że sama (-)-epikatechina wywierała działanie prooksydacyjne u szczurów BNML, gdyż powodowała znamienny wzrost poziomu MDA, spadek poziomu FRAP i aktywności SOD w wątrobie tych osobników (Wykres 4, 5 i 6, publikacja **P4**). Obserwowany spadek aktywności SOD mógł być spowodowany oksydacyjnymi uszkodzeniami wywołanymi długotrwałym stosowaniem wysokiej dawki (-)-epikatechiny. (-)-Epikatechina nie wpływała znamienne na stan redoks w tkankach zdrowych szczurów (wyniki, publikacja **P4**), co jest potwierdzeniem dla wyników uzyskanych w publikacji **P2**.

Prooksydacyjna aktywność (-)-epikatechiny może leżeć u podłoża jej proapoptotycznego działania na komórki białaczkowe z podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego. Oikawa i wsp. (2003) wykazali, że (-)-epikatechina podlega procesowi jednoelektronowego utleniania przy udziale MPO, prowadząc do nasilanie produkcji H₂O₂ i wzrostu poziomu uszkodzeń DNA w komórkach linii białaczki szpikowej HL-60. Z kolei w innych badaniach potwierdzono, że (-)-epikatechina jest bardzo dobrym donorem elektronów dla peroksydaz hemowych i preferencyjnie może ulegać utlenieniu, nawet będąc w mieszaninie z innymi substratami MPO, takimi jak azotyny i halogenki (Spalteholz i wsp., 2008). Biorąc także pod uwagę zdolność do autooksydacji (-)-epikatechiny w obecności jonów Cu²⁺, których poziom jest często podwyższony w komórkach nowotworowych, można przypuszczać, że (-)-epikatechina będzie przejawiała silniejsze działanie cytotoksyczne w

komórkach białaczki szpikowej z podwyższonym poziomem RFT, wysoką aktywnością MPO i prawdopodobnie mniej sprawnymi mechanizmami naprawy DNA, niż w prawidłowych komórkach mieloidalnych z niskim poziomem RFT.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z badaniami Li i wsp. (2010), którzy obserwowali podobne działanie EGCG w modelu humanizowanych myszy z wszczepionymi komórkami linii niedrobnokomórkowego raka płuc. EGCG indukowała w guzach znamieny wzrost poziomu markera stresu oksydacyjnego 8-OHdG, zwiększała poziom podwójnoniciowych pęknięć DNA oraz indukowała apoptozę, prowadząc do spadku ich masy. Przy czym, katechina ta nie wywierała wpływu na niezmienną chorobowo narządy zwierząt.

W niniejszych badaniach wykazano po raz pierwszy, że (-)-epikatechina nasila przeciwbiałaczkowe działanie etopozydu w szpiku kostnym i śledzionie szczurów BNML, chroniąc prawidłowe komórki przed mielotoksyczną aktywnością tego cytostatyku. W pracy tej potwierdzono także prooksydacyjne działanie samej (-)-epikatechiny u szczurów z ostrą białaczką szpikową oraz wskazano na udział stresu oksydacyjnego w synergistycznym działaniu dwóch badanych związków.

Ochronny wpływ (-)-epikatechiny przed mielotoksyczną aktywnością etopozydu u szczurów BNML (publikacja **P4**) skłonił mnie do przeprowadzenia kolejnych badań dotyczących poziomu uszkodzeń DNA u zdrowych szczurów tej samej rasy BN, otrzymujących badany polifenol i etopozyd. Uzyskane wyniki przedstawiłam w kolejnej publikacji **P5**.

Publikacja P5 – Papież MA. (2013) The influence of curcumin and (-)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. *Drug and Chemical Toxicology* 36 (1): 93-101.

Celem tych badań było porównanie wpływu (-)-epikatechiny i kurkuminy na cytogenotoksyczne działanie etopozydu wobec komórek szpiku kostnego zdrowych szczurów rasy BN. W badaniach zastosowałam także kurkuminę, gdyż w innych pracach udowodniono ochronne działanie tego polifenolu przed skutkami chemioterapii w tkankach niektórych narządów. Poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych i pęknięć nici DNA analizowałam w komórkach szpiku kostnego przy użyciu metody kometowej.

(-)-Epikatechinę (20 lub 40 mg/kg m.c.) i kurkuminę (100 lub 200 mg/kg. m.c.) podawano doustnie przez 7 dni, natomiast etopozyd był stosowany dootrzewnowo w dawce

50 mg/kg m.c. przez 3 kolejne dni, od piątego dnia eksperymentu. Dawki kurkuminy wybrano w oparciu o wyniki badań wskazujących na protekcyjne działanie tego polifenolu u myszy traktowanych mitomycyną C (Zhou i wsp., 2009). Z kolei dawki (-)-epikatechiny i etopozydu wyznaczono na podstawie wyników wcześniej przeprowadzonych badań własnych (publikacja **P4**).

W badaniach wykazałam, że dwa badane polifenole, niezależnie od dawki, znamienne zmniejszały ilość oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych wywołanych działaniem etopozydu w komórkach szpiku kostnego szczurów, w porównaniu z samym cytostatykiem (Wykres 1, publikacja **P5**). Natomiast ilość pęknięć nici DNA indukowanych etopozydem ograniczała znamienne tylko kurkumina (Wykres 3, publikacja **P5**).

Mielotoksyczne działanie etopozydu prowadziło do znamienego spadku udziału procentowego limfocytów i wszystkich prekursorów mieloidalnych (Wykres 5, 8 i 9, publikacja **P5**). W szpiku kostnym szczurów traktowanych etopozydem dominowały tylko dojrzałe komórki takie jak erytrocyty i granulocyty (Wykres 6, Fotografia 10 b, publikacja **P5**). (-)-Epikatechina nie wywierała znamienego wpływu na mielotoksyczne działanie etopozydu. Natomiast kurkumina chroniła komórki szpiku kostnego przed skutkami działania badanego cytostatyku, o czym świadczy znamieny wzrost udziału procentowego prekursorów granulocytów i dojrzałych limfocytów, w stosunku do grupy traktowanej samym cytostatykiem (Wykres 5 i 8, Fotografia 10, publikacja **P5**). W rezultacie, szpik kostny szczurów traktowanych jednocześnie kurkumina i etopozydem zawierał więcej blastów, niż u zwierząt otrzymujących tylko cytostatyk.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż badane polifenole jako potencjalne substraty MPO nie wywierają znaczącego działania prooksydacyjnego w prawidłowych komórkach mieloidalnych, mających sprawny mechanizm obrony antyoksydacyjnej. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że w szpiku kostnym szczurów, w którym linia mieloidalna stanowi zdecydowaną przewagę nad innymi typami komórek, dominuje raczej antyoksydacyjne działanie polifenoli. Świadczy o tym spadek poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem w szpiku kostnym szczurów, które otrzymały jednocześnie osłonę w postaci jednego z badanych polifenoli, w porównaniu z działaniem samego cytostatyku. Alternatywnie, badane polifenole mogą wywierać działanie podobne do opisanego przez innych autorów, którzy wykazali, że kurkumina usuwa na drodze apoptozy komórki z uszkodzeniami DNA wywołanymi benzopirenem, przyczyniając się w ten sposób do zmniejszenia ilości adduktów DNA w komórkach myszy (Garg i Maru 2009).

W taki sposób polifenole mogą się przyczyniać do ograniczenia niestabilności genetycznej powodowanej czynnikami, które wywołują uszkodzenia DNA.

W niniejszych badaniach wykazano, że kurkumina i (-)-epikatechina chronią komórki szpiku kostnego przed potencjalnie mutagennymi, oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Kurkumina silniej chroni prawidłowe komórki szpiku kostnego szczurów przed genotoksycznym i mielosupresywnym działaniem etopozydu, niż (-)-epikatechina. Uzyskane wyniki wskazują na to, że kurkumina może być brana pod uwagę jako kandydat do terapii adjuwantowej, w celu ochrony prawidłowych komórek szpiku kostnego przed najczęstszym powikłaniem po leczeniu etopozydem, jakim jest mielosupresja. Nasuwa się jednocześnie pytanie, czy kurkumina nie będzie chroniła komórek białaczki szpikowej przed genotoksycznym działaniem etopozydu. Odpowiedzi na to pytanie dostarczyły wyniki badań zaprezentowane w kolejnej publikacji **P6**.

Publikacja P6 – Papież MA, Krzyściak W, Szade K, Bukowska-Straková K, Kozakowska M, Hajduk K, Bystrowska B, Dulak J, Józkowicz A. Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Design, Development and Therapy* 10: 557-570.

Z danych literaturowych wynika, że kurkumina wywiera selektywne działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych i jednocześnie może być mniej toksyczna dla wielu typów komórek prawidłowych. Istnieją też wyniki badań potwierdzające, że kurkumina może wybiórczo nasilać działanie niektórych cytostatyków na komórki nowotworowe i jednocześnie chroni prawidłowe komórki przed cytotoksyczną aktywnością tych leków. Za ten przeciwstawny efekt kurkuminy mogą odpowiadać różnice w metabolizmie, stanie redoks i absorpcji tego polifenolu, między komórkami prawidłowymi a nowotworowymi (Ravindran i wsp., 2009). Wpływ tego polifenolu na działanie etopozydu nie jest jeszcze dobrze zbadany. Istnieją wyniki badań, które potwierdzają synergizm działania kurkuminy i etopozydu wobec komórek niektórych typów nowotworów. Jednak nieliczne dane literaturowe wskazują na występowanie antagonizmu między tymi związkami. W fachowej literaturze nie ma informacji dotyczących interakcji między kurkumina, a etopozydem w linii mieloidalnej.

Mając na uwadze, że rodzaj interakcji może zależeć od typu komórek, na które działają te związki, celem niniejszych badań było określenie wpływu kurkuminy na cytogenotoksyczne działanie etopozydu względem komórek ostrej białaczki szpikowej oraz prawidłowych komórek linii mieloidalnej.

Badania te obejmowały dwa etapy. W pierwszym etapie wykonałam eksperymenty *in vitro* z wykorzystaniem komórek linii HL-60, wyprowadzonej z ludzkiej białaczki promielocytowej, stosowanej rutynowo w badaniach nad ostrą białaczką szpikową oraz ludzkich prekursorowych komórek linii mieloidalnej CD34+ i granulocytów obojętnochłonnych inkubowanych z kurkumina i/lub etopozydem. Z innych badań wynika, że progenitorowe komórki mieloidalne CD34+ są predysponowane do transformacji nowotworowej indukowanej etopozydem, z powodu wysokiej aktywności MPO utleniającej etopozyd do toksycznych rodników (Kagan i wsp., 1999; Vlasova i wsp., 2011). Badałam także rolę stresu oksydacyjnego w cytotoksycznym działaniu kurkuminy. Drugi etap badań polegał na zweryfikowaniu uzyskanych wyników w modelu BNML *in vivo*.

Analiza działania kurkuminy i kombinacji kurkuminy oraz etopozydu w modelu in vitro.

W pierwszej kolejności zbadalam cytotoksyczne działanie samej kurkuminy. W badaniach tych zastosowano barwienie komórek jodkiem propidyny, a komórki analizowano na cytometrze przepływowym. Wykazano, że kurkumina wywiera silniejsze działanie cytotoksyczne na komórki białaczki szpikowej HL-60, niż na prawidłowe komórki progenitorowe linii mieloidalnej CD34+. Potwierdzeniem takiego działania kurkuminy jest fakt, iż progowe stężenie tego polifenolu (20 μ M) wywierające cytotoksyczne działanie wobec komórek HL-60, nie wykazuje takiego działania na prekursory mieloidalne CD34+ izolowane z krwi pępowinowej oraz na ludzkie granulocyty (Wykres 1a, c i d, publikacja **P6**).

Następnie określono wpływ kurkuminy na cytotoksyczne działanie etopozydu. Stosując kombinację różnych stężeń dwóch badanych związków wykazano, że kurkumina nasila cytotoksyczne działanie etopozydu na komórki HL-60 (Wykres 1a, publikacja **P6**). Z kolei analizując rodzaj interakcji między kurkumina a etopozydem z wykorzystaniem programu CalcuSyn, potwierdzono synergizm ich działania w komórkach HL-60 (Wykres 1b, publikacja **P6**). Podobne synergistyczne działanie w komórkach białaczki wyprowadzonej z linii mieloidalnej wywierała kurkumina w kombinacji z daunorubicyną (Rao i wsp. 2011). Potęgujący efekt kurkuminy na cytotoksyczne działanie etopozydu obserwowano także w liniach komórkowych retinoblastomy i nowotworów mózgu (Ramachandran i wsp., 2012; Sreenivasan i Krishnakumar 2014).

Z uwagi na to, że etopozyd może wywoływać zagrażające życiu objawy uboczne takie jak mielosupresja, a u kilku procent pacjentów t-AML, zbadano wpływ kurkuminy na cytotoksyczne działanie etopozydu we wczesnych prekursorach mieloidalnych CD34+. Wykazano, że progowe stężenie kurkuminy (20 μ M), które nasilało cytotoksyczny efekt

etopozydu w komórkach HL-60, nie wpływało znamienne na działania tego leku na prawidłowe prekursorzy linii mieloidalnej (Wykres 1c, publikacja **P6**). Wiadomo, że leczenie etopozydem wiąże się także z neutropenią, która jest głównym powodem niepowodzenia terapii (Buckley i wsp., 2014). Przyczyną neutropenii powodowanej etopozydem może być nie tylko mielosupresja, ale także indukowanie apoptozy w dojrzałych neutrofilach. Wprawdzie aktywność topoizomerazy II DNA jest niska w dojrzałych granulocytach, lecz etopozyd może indukować apoptozę tych komórek na drodze mechanizmu wolnorodnikowego. W niniejszej pracy wykazano, że w dojrzałych, spoczynkowych granulocytach kurkumina nie nasilała cytotoksycznego działania etopozydu (Wykres 1d, publikacja **P6**).

W poszukiwaniu mechanizmu działania kurkuminy, zwróciłam uwagę na rolę stresu oksydacyjnego. Wiele badań wskazuje na udział mechanizmu wolnorodnikowego w cytotoksycznym działaniu kurkuminy na komórki nowotworowe. Istotne zatem było zbadanie wpływu kombinacji kurkuminy i etopozydu na stan redoks komórek białaczkowych. Badania pokazały, że kurkumina w kombinacji z etopozydem nasila jego prooksydacyjne działanie na komórki HL-60, prowadząc do znamiennego obniżenia poziomu GSH i zwiększenia poziomu wolnych rodników, w stosunku do samego etopozydu (Wykres 3 a, b i c, publikacja **P6**). Prooksydacyjna aktywność kurkuminy niewątpliwie odegrała rolę w nasilaniu działania etopozydu, gdyż zastosowanie antyoksydantu N-acetylocysteiny (ang. N-acetylcysteine, NAC) zmniejszało znamienne cytotoksyczne działanie kombinacji badanych związków względem komórek HL-60 (Wykres 3 d, e, publikacja **P6**). Interesujące, że stres oksydacyjny odgrywał większą rolę w działaniu kurkuminy niż etopozydu, gdyż preinkubacja z NAC znamienne ograniczała cytotoksyczny efekt samej kurkuminy, ale nie miała takiego wpływu na działanie etopozydu (Wykres 3 d, e, publikacja **P6**). Dużą rolę w prooksydacyjnym działaniu kurkuminy mógł odgrywać spadek poziomu GSH powodowany tym polifenolem, stąd ochronny wpływ NAC przed działaniem cytotoksycznym kurkuminy. Z innych badań wynika, że NAC może się przyczyniać do regeneracji GSH (Feng i wsp., 2007). Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami innych autorów, którzy potwierdzili udział mechanizmu wolnorodnikowego w synergistycznym działaniu kurkuminy i trójtlenku arsenu na komórki linii wyprowadzonej z białaczki szpikowej (Sánchez i wsp., 2010).

Zważywszy na to, że głównym mechanizmem działania etopozydu, jako leku topoaktywnego jest indukowanie pęknięć nici DNA, przeanalizowano wpływ kurkuminy na poziom DSBs indukowanych etopozydem w badanych komórkach białaczkowych i prawidłowych, stosując metodę cytometrii przepływową. W celu identyfikacji DSBs,

wykrywano marker tych uszkodzeń, którym jest ufosforylowany histon H2AX (γ H2AX). W badaniach tych wykazano, że kurkumina potęguje apoptotyczne działanie etopozydu, poprzez nasilenie jego aktywności genotoksycznej względem komórek HL-60. Wskazuje na to znamieny wzrost poziomu fosforylacji H2AX po inkubacji komórek z kurkumina w stężeniu 20 μ M i etopozydem, któremu towarzyszył wzrost udziału procentowego frakcji subdiploidalnej (sub-G1), w stosunku do samego cytostatyku (Wykres 2, publikacja **P6**). Ponadto nie wykazano analogicznego wpływu kurkuminy na działanie etopozydu wobec prawidłowych komórek CD34+ i granulocytów (Wykres 2, publikacja **P6**). Ponownie uzyskano zatem potwierdzenie, że to samo stężenie kurkuminy (20 μ M), które potęguje genotoksyczny efekt etopozydu na komórki białaczkowe, nie wywiera analogicznego działania względem komórek prawidłowych. Nasilenie genotoksyczności etopozydu przez kurkumina mogło być związane z jej prooksydacyjnym działaniem na komórki linii HL-60.

Oprócz zdolności do nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach białaczkowych, kurkumina wykazuje szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego, takie jak hamowanie proliferacji, indukowanie apoptozy lub hamowanie kinaz tyrozynowych, serynowo/treoninowych, genów antyapoptotycznych oraz czynnika transkrypcyjnego NF κ B (Aggarwal i wsp., 2003; Hussain i wsp., 2008). Poszukując „punktów uchwytu” kurkuminy analizowano jej wpływ na poziom ufosforylowanego NF κ B i ekspresję surwiwiny w komórkach HL-60. Badania nie wykazały znamienego wpływu kurkuminy na ekspresję tych białek (Wykres 6 c, S 2- supplementary data, publikacja **P6**).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można stwierdzić, że prooksydacyjna aktywność kurkuminy jest istotnym mechanizmem jej działania na badane komórki białaczkowe. Odmienne działanie kurkuminy na komórki białaczkowe i prawidłowe może wynikać z różnicy w poziomie wolnych rodników oraz w sprawności mechanizmów naprawy DNA, między tymi komórkami. Podobne do obserwowanego w niniejszych badaniach, dualistyczne działanie względem komórek białaczkowych i prawidłowych wykazano dla cyjanidyno-3-rutynozydu. Polifenol ten zwiększał produkcję RFT oraz indukował apoptozę komórek HL-60 i nie wywierał takiego efektu w prawidłowych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej z niskim poziomem RFT (Feng i wsp. 2007).

Dowody na synergistyczne działanie kurkuminy i etopozydu na komórki białaczkowe potwierdzone w modelu in vivo.

Z uwagi na to, że wyniki uzyskane w badaniach *in vitro*, wskazują na wybiórcze synergistyczne działanie kurkuminy i etopozydu na komórki białaczki szpikowej, nasuwa się pytanie czy badany polifenol będzie wywierał podobny wybiórczy wpływ wobec komórek BNML *in vivo*, przyczyniając się do ich eliminacji na drodze apoptozy.

W celu zbadania tej hipotezy, przeanalizowano wpływ kurkuminy na apoptozę komórek BNML indukowaną etopozydem w śledzionie szczurów.

Wyniki uzyskane w badaniach na szczurach z BNML były zgodne z wynikami badań *in vitro*. Kurkumina nasilała działanie etopozydu u tych szczurów, na co wskazuje znamieny spadek masy śledzion i nasilenie apoptozy komórek BNML, które korelowało ze spadkiem ich udziału procentowego, w stosunku do działania samego etopozydu (Wykres 4 e, 5 b, d, publikacja **P6**). W komórkach BNML u szczurów traktowanych kurkuminą i etopozydem, w stosunku do grupy otrzymującej tylko badany cytostatyk obserwowano także nieznamieny, ale znaczny spadek ekspresji genu dla surwiwiny ($p < 0.07$, Wykres 6 a, publikacja **P6**), czynnika promującego przeżywalność komórek. Podobnie jak obserwowano w badaniach *in vitro*, także *in vivo*, u szczurów BNML traktowanych kurkuminą lub dwoma badanymi związkami nie obserwowano nasilenia ich działania cytotoksycznego wobec prawidłowych limfocytów B, izolowanych ze śledziony. Przeciwnie, stosowanie kurkuminy (200 mg/kg m.c.) przed i w trakcie podawania etopozydu zmniejszało znamienne apoptozę prawidłowych limfocytów B w śledzionach szczurów BNML (Wykres 5 e, publikacja **P6**).

W przedstawionych badaniach *in vitro* i *in vivo* potwierdzono, że kurkumina wywiera działanie cytotoksyczne względem komórek białaczki szpikowej i nasila działania etopozydu na te komórki. Testowanie wpływu antyoksydantu NAC na cytotoksyczne działanie kombinacji kurkuminy i etopozydu oraz analizowanie poziomu wolnych rodników i GSH w komórkach HL-60, pozwoliło na wykazanie roli stresu oksydacyjnego w synergistycznym działaniu tych związków. Co istotne potwierdzono, iż prawidłowe progenitorowe komórki mieloidalne CD34+ są odporniejsze na działanie kombinacji kurkuminy i etopozydu, niż komórki białaczkowe. Wyniki uzyskane w tych badaniach mogą okazać się przydatne z klinicznego punktu widzenia. Stosownie kurkuminy w połączeniu z etopozydem mogłoby bowiem pozwolić na zmniejszenie dawki etopozydu, przy zachowaniu jego skuteczności i w konsekwencji mogłoby przyczynić się do ograniczenia działań niepożądanych etopozydu w szpiku kostnym.

3.2.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej oraz ich ewentualne wykorzystanie

W zaprezentowanych badaniach stanowiących podstawę pracy habilitacyjnej dokonałam analizy wpływu (-)-epikatechiny i kurkuminy na przeciwbiałaczkowe działanie etopozydu oraz uboczne cytogenotoksyczne działanie tego cytostatyku na prawidłowe komórki mieloidalne. Wpływ polifenoli, jako związków o potencjalnej aktywności anty- lub prooksydacyjnej na przeciwnowotworowe działanie cytostatyków wciąż nie jest dobrze poznany i budzi kontrowersje. W świetle obecnego stanu wiedzy, wyniki przedstawionych badań przyczyniają się do zrozumienia wpływu kurkuminy i (-)-epikatechiny na działanie etopozydu wobec komórek ostrej białaczki szpikowej. Znaczna część tych badań została zrealizowana w ramach projektu badawczego finansowanego przez KBN (2P05A 162 30).

Najważniejsze wnioski wynikające z badań stanowiących podstawę habilitacji:

- W badaniach tych wykazano po raz pierwszy, że (-)-epikatechina wywiera genotoksyczne działanie w warunkach podwyższonego poziomu stresu oksydacyjnego *in vivo*, u szczurów z ostrą białaczką szpikową, zwiększając poziom alkali-labilnych pęknięć DNA (publikacja **P2** i **P3**) i prowadząc do apoptozy komórek białaczkowych w śledzionie i szpiku kostnym oraz ograniczając splenomegalię.
- Cytogenotoksyczne działanie (-)-epikatechiny obserwowano tylko w odniesieniu do komórek białaczkowych i nie dotyczyło ono komórek prawidłowych szpiku kostnego, co wskazuje na selektywną aktywność tego polifenolu (publikacja **P2** i **P3**).
- Nowym elementem zaprezentowanych prac jest także wykazanie, iż (-)-epikatechina i kurkumina potęgują działanie etopozydu na komórki ostrej białaczki szpikowej *in vivo* (publikacja **P4** i **P6**). Uzyskane wyniki mogą mieć implikacje praktyczne, ze względu na selektywne nasilenie działania etopozydu przez badane polifenole wobec komórek białaczki szpikowej i brak takiego efektu względem prawidłowych komórek mieloidalnych (publikacja **P4**, **P5**, **P6**).
- Na podstawie przedstawionych wyników badań można zaproponować nową strategię nasilenia działania etopozydu na komórki białaczki szpikowej, opartą o prooksydacyjną aktywność polifenoli (publikacja **P4** i **P6**).
- Uzyskane wyniki dostarczają cennych informacji z terapeutycznego punktu widzenia, gdyż wskazują na możliwe wykorzystanie badanych polifenoli w celu obniżenia dawki etopozydu, przy zachowaniu skuteczności jego działania. Z kolei obniżenie

dawki tego cytostatyku może się przyczynić do zmniejszenia objawów niepożądanych. Alternatywnie, zwiększenie dawki etopozydu w obecności polifenoli może chronić komórki prawidłowe przed dalszym nasilaniem objawów ubocznych. Dla lepszej oceny przydatności obserwowanego efektu w chemioterapii należy wykonać szereg dodatkowych badań w innych modelach doświadczalnych. Wyniki tych badań mają szczególne znaczenie ze względu na małą skuteczność stosowanych obecnie metod leczenia AML (poza podtypem M3).

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

4.1. Badania przed doktoratem

Moje zainteresowania naukami biologicznymi zadecydowały o wyborze klasy o profilu biologiczno-chemicznym w liceum, a następnie studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ, na kierunku biologia ogólna. Studia dały mi możliwość dalszego poszerzania zainteresowań, ukierunkowanych już wyraźnie na nauki biologiczno-medyczne.

Szczególne interesowała mnie problematyka związana z biologią nowotworów. Podczas pracy na zastępstwie w Zakładzie Wirusologii, Instytutu Mikrobiologii UJCM napisałam pierwszy artykuł naukowy (pracę przeglądową) o tematyce związanej z nowotworami. W publikacji tej podsumowałam aktualny stan wiedzy na temat mechanizmu transformacji nowotworowej limfocytów T pod wpływem wirusa ludzkiej białaczki z komórek T (ang. Human T-cell Leukemia/lymphoma Virus, HTLV-1) (załącznik 4, pkt. II D 8).

Pierwsze, własne badania naukowe prowadziłam w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii pod kierunkiem Profesora Józefa Niwelińskiego, który zwrócił moją uwagę na związki pochodzenia roślinnego o działaniu hormonopodobnym. W trakcie tych badań analizowałam działanie wyciągu z kwiatów malwy czarnej, polecanej w medycynie ludowej jako *emmenagogum*. Opisane działanie mogło wskazywać na estogenną aktywność tego surowca roślinnego. Biorąc pod uwagę, że estrogeny mogą wywierać wpływ na funkcję reprodukcyjną u płci męskiej (O'Donnell i wsp., 2001), interesujące było zbadanie działania wyciągu z kwiatów malwy czarnej na aktywność enzymów steroidogennych i poziom hormonów steroidowych u samców szczurów. Po nawiązaniu współpracy naukowej z Prof. dr hab. Barbarą Bilińską (Pracownia Endokrynologii i Hodowli Komórek, Instytut Zoologii, UJ) oraz Jej zespołem, poszerzyłam te badania o analizę *in vitro* i *in vivo* poziomu hormonów

steroidowych oraz ekspresji ich receptorów. Kolejnym wątkiem moich badań było zanalizowanie wpływu wyciągów z kwiatów malwy czarnej na funkcje tarczycy. W badaniach wykazałam pobudzenie wczesnych etapów steroidogenezy u szczurów, manifestujące się wzrostem aktywności dehydrogenazy 3- β steroidowej w komórkach Leydiga oraz słabe działanie hamujące na końcowych etapach steroidogenezy, powodowane działaniem wyciągów. Hamujące działanie przejawiało się spadkiem ekspresji receptora estrogenowego beta (ER β) i aktywności aromatazy w skrawkach z jąder i w komórkach Leydiga inkubowanych z wyciągiem *in vitro*. Spadek wydzielania estradiolu i testosteronu przez komórki Leydiga inkubowane z testowanymi wyciągami potwierdził zahamowanie steroidogenezy na końcowych etapach tego procesu. Podawane wyciągi nie wywierały znamionnego wpływu na przebieg spermatogenezy u szczurów. Wykazałam także słabą aktywność przeciwtruczycową wyciągów wodnych z kwiatów malwy czarnej, która przejawiała się zmianami histomorfometrycznymi w tarczycach szczurów. Ponadto metodą HPLC wykazano w badanych wyciągach obecność flawonoidów (kwercetyny, kemferolu, luteoliny i naryngeniny), które mogą wywierać wpływ na aktywność gruczołów dokrewnych (Baker 1998). Uzyskane wyniki dostarczyły dowodów na inne potencjalne działanie wyciągu z kwiatów malwy czarnej niż zalecane w ziołolecznictwie w osłonie błon śluzowych i leczeniu stanów zapalnych. Badania te zaowocowały rozprawą doktorską oraz 3 publikacjami w czasopiśmie naukowym opublikowanymi w latach 2001-2004 (załącznik 4, pkt. II A 10-12) oraz doniesieniami konferencyjnymi (załącznik 4, pkt. III C 25-28, 47). Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w roku 2002 na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

Podczas pracy w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii uczestniczyłam także w badaniach prowadzonych przez ten Zakład we współpracy z Katedrą Ceramiki Specjalnej Akademii Górniczo-Hutniczej. Dotyczyły one analizy odpowiedzi tkankowej po wszczepieniu do mięśnia szkieletowego szczura materiałów węglowych, różniących się właściwościami fizycznymi i chemicznymi grup powierzchniowych. Badania te miały na celu wybór najbardziej optymalnej metody modyfikacji powierzchni materiałów węglowych, pod kontem ich wykorzystania do konstrukcji różnego rodzaju implantów. Moje badania polegały na monitorowaniu przebiegu stanu zapalnego w preparatach histologicznych, w różnym czasie po wszczepieniu materiałów węglowych. W badaniach tych wykazano, że proces gojenia i regeneracji mięśnia występował najszybciej po wszczepieniu materiałów, których powierzchnie zostały wzbogacone w węgiel, tlen, wapń i sód, w porównaniu z materiałami bogatymi jedynie w tlen lub zawierającymi niewielkie ilości tego pierwiastka. Jednocześnie spośród testowanych materiałów wybrano ten, którego struktura jest najkorzystniejsza dla

procesu regeneracji. Wyniki tych badań zaprezentowano na konferencjach naukowych (załącznik 4, pkt. II K 3; pkt. III C 30, 31, 48).

Brałam także udział w badaniach statutowych prowadzonych przez Zakład Cytobiologii i Histochemii, dotyczących ludzkiego łożyska, jako obiektu badań biomonitoringowych środowiska. Badania skupiały się na analizie związku między zmianami w rozmiarach przestrzeni międzykosmkowej, będącej miejscem krążenia krwi matczynej, a zawartością ołowiu i kadmu, aktywnością dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz ilością mastocytów w łożyskach pochodzących od mieszkank terenów miejsko-przemysłowych, w porównaniu z łożyskami z terenów wsi bieszczadzkich. Uzyskane wyniki zaprezentowano na międzynarodowych konferencjach naukowych (załącznik 4, pkt. II K 2; pkt. III C 32).

4.2. Badania po doktoracie

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej. Jednocześnie rozpoczęłam nowe prace eksperymentalne związane z moimi zainteresowaniami problematyką nowotworów i połączyłam je z badaniami nad przeciwnowotworowym działaniem związków roślinnych z grupy polifenoli.

W ramach badań związanych z tematem doktoratu, analizowałam wpływ wybranych polifenoli na aktywność wydzielniczą i metaboliczną jądra i tarczycy szczura. Wyniki tych badań zaprezentowałam w publikacjach (załącznik 4, pkt. II A 8; D 6) oraz na konferencjach naukowych (załącznik 4, pkt. III C 42-45).

Interesujące wyniki uzyskałam analizując związek między wiekiem a działaniem kurkuminy w tarczycy szczurów. Na ich podstawie wykazałam, że działanie kurkuminy w tarczycy szczurów zależy od stanu fizjologicznego tego narządu, który zmienia się z wiekiem. U starych osobników, z obniżonym poziomem wolnej (niezwiązanej z białkami) tyroksyny (FT4) i trójiodotyminy (FT3), kurkumina wywierała działanie przeciwtarczycowe, które przejawiało się w obrazie morfologicznym wzrostem wysokości nabłonka wydzielniczego oraz ilości PAS pozytywnych wakuoli w tyreocytach. Zmianą tym towarzyszył spadek poziomu FT3 w osoczu krwi. Natomiast ilość wykrywanej FT4 pozostawała na poziomie zbliżonym do kontroli, co może wskazywać na potęgowanie przez kurkuminę pojawiającego się z wiekiem spadku aktywności dejodynazy. Co ciekawe, w tarczycy młodych osobników kurkumina wywierała działanie stymulujące. Obserwowano wzrost poziomu FT4 u młodych szczurów traktowanych kurkuminą w stosunku do kontroli. W gruczołach tarczycy starych osobników otrzymujących kurkuminę można było także zaobserwować znaczne zmniejszenie

się ilość leukocytów naciekających tkankę otaczającą pęcherzyki oraz ich wnętrze w porównaniu z grupą kontrolną, co może wskazywać na działanie przeciwwzapalne tego polifenolu (załącznik 4, pkt. II A 8).

Do rozpoczęcia nowego tematu badań zainspirowały mnie doniesienia literaturowe, wskazujące na chemoprewencyjne działanie składników roślinnych z grupy polifenoli. W tym czasie nawiązałam współpracę naukową z Dr hab. Marią Kapiszewską z Zakładu Biochemii Ogólnej Wydziału Biotechnologii UJ. W ramach tej współpracy uczestniczyłam w badaniach nad wpływem kwercetyny na uszkodzenia DNA wywołane etopozydem w komórkach szpiku kostnego szczurów. W badaniach tych wykazano, że kwercetyna podawana doustnie lub podskórną przed zastosowaniem jednorazowej dawki etopozydu zmniejsza znamienne ilość uszkodzeń DNA w stosunku do grupy otrzymującej sam etopozyd (załącznik 4, pkt. II A 9; D7; pkt. III C 46). Dzięki tej współpracy zapoznałam się z metodą kometową, którą stosowałam w dalszych badaniach własnych.

Moje zainteresowania koncentrowały się na wpływie wybranych polifenoli na działanie etopozydu w komórkach białaczki szpikowej. Po konsultacji z Profesorem A.C. Martens (University Medical Center Utrecht, Holandia), wieloletnim badaczem szczurów z BNML, zdecydowałam się na zastosowanie tych zwierząt w dalszych eksperymentach. O wyborze modelu BNML zadecydowało wiele jego cech, które wymieniłam we wcześniejszym rozdziale autoreferatu (ppkt 3.2.3., str. 11). Badania te uzyskały finansowanie w ramach kierowanego przeze mnie grantu KBN (2P05A 162 30), zatytułowanego "Badanie uszkodzeń DNA, apoptozy i proliferacji komórek w śledzionie oraz szpiku kostnym szczurów z białaczką promielocytową po podaniu związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym". Część tych badań stała się podstawą mojej pracy habilitacyjnej.

Współpracę z Zakładem Biochemii Ogólnej UJ kontynuowałam w ramach wspomnianego wcześniej projektu badawczego. W badaniach tych wykazano, że kwercetyna chroni komórki szpiku kostnego szczurów BNML przed genotoksycznym działaniem etopozydu (załącznik 4, pkt. III C 23, 24). Interesujące, że kwercetyna wywierała przeciwny efekt w komórkach śledziony szczurów z białaczką, w których nasilała działanie etopozydu (załącznik 4, pkt. III C 23). Nasunęło mi to przypuszczenie, że na obserwowany efekt może wpływać mikrośrodowisko komórek szpiku i śledziony, takie jak różnica w aktywności MPO. W szpiku kostnym było znacznie więcej komórek z wysoką aktywnością MPO, w porównaniu ze śledzioną tylko częściowo skolonizowaną przez komórki białaczki szpikowej. Kwercetyna może hamować aktywność tego enzymu

(Pincemail i wsp., 1988), prowadząc do zmniejszenia ilości metabolitów etopozydu, które pełnią funkcje inhibitorów topoizomerazy II, podobnie jak sam etopozyd. W badaniach własnych wykazałam, iż zahamowanie MPO przy użyciu swoistego inhibitora – hydrazynu kwasu aminobenzoowego (ang. 4-aminobenzoic acid hydrazide, ABAH) prowadzi do znamienego spadku poziomu γ -H2AX, markera podwójnych pęknięć DNA indukowanego etopozydem (załącznik 4, pkt. II D 2). Zatem, kwercetyna mogłaby osłabiać działanie etopozydu poprzez zahamowanie jego utleniania przez MPO.

Hipotezę tą potwierdziłam pośrednio w badaniach *in vitro* wykonanych na komórkach linii białaczki szpikowej HL-60. Zahamowanie aktywności MPO przy użyciu ABAH powodowało, że kwercetyna w mniejszym stopniu chroniła komórki przed apoptozą indukowaną etopozydem (załącznik 4, pkt. II A 3; pkt. III C 4).

Innym mechanizmem ochronnego działania kwercetyny w komórkach szpiku kostnego mogą być jej antyoksydacyjna aktywność, na co wskazują wyniki moich kolejnych eksperymentów. W badaniach tych wykazałam, iż podawanie szczurom kwercetyny przed i w trakcie stosowania etopozydu prowadzi do znamienego spadku poziomu markera stresu oksydacyjnego 8-OHdG, w komórkach szpiku kostnego szczurów, w porównaniu z działaniem samego cytostatyku (załącznik 4, pkt. II A 4), (załącznik 4, pkt. III C 3). Z kolei we współpracy z Prof. Alicją Józkowicz i Jej zespołem z Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ wykazaliśmy, iż kwercetyna indukuje w śledzionie szczurów HO-1, potwierdzając jednocześnie wyniki testów *in vitro* przeprowadzonych przez innych autorów (Yao i wsp. 2007, załącznik 4, pkt. II A 7).

W kolejnych wstępnych badaniach, prowadzonych we współpracy ze wspomnianym Zakładem Biotechnologii Medycznej (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ) potwierdziliśmy, iż kurkumina może selektywnie uwrażliwiać komórki BNML na działanie etopozydu poprzez obniżanie ekspresji genu transportera błonowego *MRP-3* (ang. Multidrug Resistance Related Protein 3), indukowanej tym cytostatykiem. Kurkumina nie modyfikowała ekspresji *MRP-3* w prawidłowych komórkach, wyodrębnionych z populacji spelnocytów szczurów BNML na drodze sortowania (załącznik 4, pkt. III C 34). W ramach tych badań wyróżnił się nowy mechanizm wpływu kurkuminy na działanie etopozydu, który wymaga dalszego pogłębienia.

W celu lepszego poznania modelu BNML, uczestniczyłam także w badaniu symptomów depresji u tych szczurów pod kierunkiem Prof. dr hab. Gabriela Nowaka (Zakład Cytobiologii, Katedra Farmakobiologii, Wydział Farmaceutyczny CM UJ). Punktem wyjścia w tych badaniach był udokumentowany w literaturze fakt, że u osób z chorobą nowotworową,

w tym AML, częściej rozwija się depresja niż w populacji nie cierpiącej na nowotwór (Zhou i wsp., 2007). Ponadto u osób z AML i depresją wykrywa się poważniejsze zaburzenia w stanie redoks, niż u pacjentów cierpiących na tę białaczkę lecz nie mających depresji (Zhou i wsp., 2007). W naszych badaniach zaobserwowano aktywację receptora NMDA w strukturach mózgu dwóch badanych grup szczurów BNML (30 i 34 dzień rozwoju białaczki) oraz up-regulację receptora 5-HT_{2A} w 30-dniowej grupie szczurów (załącznik 4, pkt. I B 1). Podobne zmiany biochemiczne wykrywa się u szczurów poddanych działaniu chronicznego stresu, który uważa się za model depresji (Nowak i wsp., 1998). Z danych literaturowych wynika, że nadmierna aktywność receptora NMDA może się przyczyniać do zwiększenia produkcji RFT i osydacyjnych uszkodzeń neuronów (Shelat i wsp., 2008). Mając także na uwadze, iż BNML towarzyszą zaburzenia w stanie redoks w mózgu szczurów, wyniki naszych badań wskazują na związek między BNML, aktywnością glutaminergiczną i stresem oksydacyjnym (załącznik 4, pkt. I B 1).

W ostatnich latach uczestniczyłam także w badaniach dotyczących roli peptydów antybakteryjnych śliny, w hamowaniu wzrostu i zdolności biofilmotwórczych bakterii uczestniczących w rozwoju próchnicy u dzieci. Badania te, prowadzone przez dr Wirginię Krzyściak z Zakładu Diagnostyki Medycznej (Wydział Farmaceutyczny UJ CM) są dla mnie szczególnie interesujące nie tylko ze względu na trwające obecnie poszukiwania nowych, skutecznych związków przeciwbakteryjnych, ale także z uwagi na potencjalne przeciwnowotworowe działanie tych peptydów. W przeprowadzonych eksperymentach potwierdzono wzrost stężenia histatyny-5 i beta-defensyny-2 u osób z próchnicą, który korelował z zaawansowaniem choroby. Wykazano także zdolność histatyny-5 do hamowania wzrostu bakterii próchnicotwórczych na przykładzie szczepów bakterii *Streptococcus mutans* izolowanych z płytki nazębnej dzieci z próchnicą (załącznik 4, pkt. II A 1, 2; pkt. II D 1).

Dużą rolę w moich badaniach prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora odegrała także współpraca z innymi jednostkami badawczymi. Dzięki współpracy z Dr hab. Jarosławem Baranem i Dr Karoliną Bukowską-Strakową z Zakładu Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CM UJ oraz Dr Małgorzatą Bzowską z Zakładu Immunologii, Wydziału Biotechnologii UJ zapoznałam się z metodą cytometrii przepływowej i wdrożyłam ją do moich badań. Współpraca ta zaowocowała kilkoma publikacjami wchodzącymi w cykl prac na stopień doktora habilitowanego oraz innymi pracami (załącznik 4, pkt. I B 2-4, 6, pkt. II A 7). Współpraca z dr Wirginią Krzysiak z Zakładu Diagnostyki Medycznej, Wydziału Farmaceutycznego CM UJ wzbogaciła moje badania o biochemiczną analizę stanu redoks i przyczyniła się do opublikowania kilku prac w czasopismach

międzynarodowych i krajowych (załącznik 4, pkt. I B 1, 4, 6, pkt. II A 3, 7, D 2, 3). Współpraca z Prof. dr hab. Mariuszem Piskulą i Dr Wiesławem Wiczowskim z Zakładu Chemii i Biodynamiki Żywności, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie oraz współpraca z Dr Beatą Bystrowską z Zakładu Toksykologii, Wydziału Farmaceutycznego CM UJ umożliwiła mi wykonanie analizy stężenia (-)-epikatechiny, kwercetyny i kurkuminy oraz ich metabolitów metodą HPLC, w materiale pochodzącym od szczurów lub w komórkach HL-60 traktowanych tymi polifenolami (załącznik 4, pkt. I B 2, 6; pkt. II 7). Natomiast współpraca z Prof. Alicją Józkowicz i Jej zespołem z Zakładu Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ dała mi możliwość wykonania analizy ekspresji genów HO-1, BvR, ferrytyny i MRP3 metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) (załącznik 4, pkt. I B 1, 6, pkt. II A 7).

5. Plany dotyczące badań

Obecnie kontynuuję badania nad wpływem polifenoli na komórki białaczkowe. Prowadzone badania dotyczą interakcji różnych polifenoli. Różne kombinacje tych związków roślinnych, dodanych do pożywki hodowlanej kształtują w rozmaity sposób odpowiedź komórek białaczkowych, silnie hamują proliferację lub działają bardziej pro-apoptotycznie. Przy użyciu niektórych kombinacji można skuteczniej modyfikować działanie etopozydu względem komórek białaczkowych, w porównaniu z pojedynczo stosowanymi składnikami.

Ponadto w trakcie badań prowadzonych przeze mnie po obronie doktoratu wyłoniły się nowe interesujące kierunki, które zamierzam podjąć w najbliższym czasie. Będzie nimi określenie roli MPO w działaniu kurkuminy i (-)-epikatechiny na komórki białaczki szpikowej. Innym kierunkiem będzie badanie roli ekspresji różnych białek błonowych należących do transporterów wiążących ATP (ang. ATP-binding cassette (ABC) transporters), głównie z podrodziny ABCC, w nasilaniu działania etopozydu przez kurkuminę i (-)-epikatechinę, z użyciem linii białaczki szpikowej odpornej na cytostatyki. Badania te będą prowadzone między innymi we współpracy z Zakładem Biotechnologii Medycznej (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ). W celu poprawienia biodostępności kurkuminy, planuję poddać badaniu nanocząstki wypełnione kurkuminą, a także kurkuminą i etopozydem we współpracy z Wydziałem Chemii UJ.

6. Piśmiennictwo

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies *Anticancer Res* 2003;23:363–398.
- Attia SM, Ahmad SF, Harisa GI, Mansour AM, El Sayed el SM, Bakheet SA Wogonin attenuates etoposide-induced oxidative DNA damage and apoptosis via suppression of oxidative DNA stress and modulation of OGG1 expression *Food Chem Toxicol* 2013;59:724-30.
- Baker M. Flavonoids as hormones In: *Flavonoids in the living system* Manthey JA, Busling BS [Eds], Plenum Press, New York 1998:249-264.
- Battisti V, Maders LDK, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* 2008;41:511–28.
- Berger NA, Chatterjee S, Schmotzer JA and Helms SR: Etoposide (VP-16-213)-induced gene alterations: potential contribution to cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 8740-8743.
- Borisenko GG, Martin I, Zhao Q, Amoscato AA, Tyurina YY and Kagan VE. Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(22):23453–23462.
- Buckley SA, Othus M, Vainstein V, et al. Prediction of adverse events during intensive induction chemotherapy for acute myeloid leukemia or high-grade myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 2014;89:423–428.
- Carpentieri U, Myers J, Thorpe L, Daeschner ChW, and Haggard ME. Copper, Zinc, and Iron in Normal and Leukemic Lymphocytes from Children. *Cancer Research* 1986;46:981 -984.
- Celik H and Arinc E. Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *J Pharm Sci* 2008;11: 68–82.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions *J Biol Chem* 1992;267,166–72.
- Chiu WH, Luo SJ, Chen CL. et al., “Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells,” *Biochemical Pharmacology* 2012;83:1159–1171.
- Du G, Lin H, Wang M, Zhang S, Wu X, Lu L, Ji L, Yu L. Quercetin greatly improved therapeutic index of doxorubicin against 4T1 breast cancer by its opposing effects on HIF-1 α in tumor and normal cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:277-287.
- Enomoto R, Koshiba Ch, Suzuki Ch, Lee E. Wogonin potentiates the antitumor action of etoposide and ameliorates its adverse effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67:1063–1072.
- Feng R, Ni HM, Wang SY, Tourkova IL, Shurin MR, Harada H, Yin XM. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2007;282(18):13468-76.

- Gantchev TG, Hunting DG. The ortho-quinone metabolite of the anticancer drug etoposide (VP-16) is a potent inhibitor of the topoisomerase II/DNA cleavable complex. *Mol Pharmacol* 1998;53:422-428.
- Gao G, Sofic E, Perior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure –activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;22:749-760.
- Garg R, Maru G. Dietary curcumin enhances benzo(a)pyrene-induced apoptosis resulting in a decrease in BPDE-DNA adducts in mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2009;28(2):121-31.
- Goldman R, Claycamp GH, Sweetland MA, Sedlov AV, Tyurin VA, Kisin ER, Tyurina YY, Ritov VB, Wenger SL, Grant SG, Kagan VE Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells *Free Radic Biol Med* 1999;27(9-10):1050-63.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, (eds). SEER Cancer Statistics Review. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1975–2009 http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012.
- Hussain AR, Ahmed M, Al-Jomah NA, Khan AS, Manogaran P, Sultana M, Abubaker J, Plataniias LC, Al-Kuraya KS, Uddin S. Curcumin suppresses constitutive activation of nuclear factor-KB and requires functional Bax to induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2008;7(10):3318–29.
- Iacobini M, Menichelli A, Palumbo G, Multari G, Werner B, and Del Principe D. Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61: 1033–1040.
- Irwin ME, Valle NR, and Chandra J. Redox Control of Leukemia: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2013;18,1349–1383.
- Jensen P, Mortensen BT, Hodgkiss RJ, Iversen PO, Christensen IJ, Helledie N, Larsen JK Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. *Cell Prolif* 2000;33:381-395.
- Joel SP, Shah R, Slevin ML. Etoposide dosage and pharmacodynamics. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;34:S69–S75.
- Józkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:2099–118.
- Kagan VE, Kuzmenko AI, Tyurina YY, Shvedova AA, Matsura T, Yalowich JC. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase. *Cancer Res.* 2001;61(21):7777-84.
- Kagan VE, Yalowich JC, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Thampatty P and Fabisiak JP. Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach. *Mol Pharmacol* 1999;56: 494-506.
- Karakaya A, Jaruga P, Bohr VA, Grollman AP Dizdaroglu M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein *Nucleic Acids Res* 1997;25:474–479.

- Kaur G, Jaggi AS, Singh N. Exploring the potential effect of *Ocimum sanctum* in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury* 2010;5:3.
- Khan HY, Zubair H, Faisal M, Ullah MF, Farhan M, Sarkar FH, Ahmad A and Hadi SM. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol. Nutr. Food Res* 2014;58:437–446.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, and Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 2010;38:96-109.
- Kobayashi K, Ratain MJ. Pharmacodynamics and long-term toxicity of etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;34:S64–S68.
- Lee KW, Lee HJ. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 2006;26:105-121.
- Li GX, Chen YK, Hou Z, Xiao H, Jin H, Lu G, Lee MJ, Liu B, Guan F, Yang Z, Yu A, Yang ChS. Pro-oxidative activities and dose–response relationship of (2)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study *in vivo* and *in vitro* Carcinogenesis 2010;31(5):902–910.
- Lin X, Fang Q, Chen S, Zhe N, Chai Q, Yu M, Zhang Y, Wang Z, Wang J. Heme oxygenase-1 suppresses the apoptosis of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway *Leuk Res* 2015;39(5):544-52.
- Martens ACM, Van Bekkum DW, Hagenbeek A. The BN acute myelocytic leukemia (BNML) (a rat model for studying human acute myelocytic leukemia (AML). *Leukemia* 1990;4:241-257.
- Moiseeva EP, Almeida GM, Jones GD, Manson MM. Extended treatment with physiologic concentrations of dietary phytochemicals results in altered gene expression, reduced growth, and apoptosis of cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3071-3079.
- Muslimović A, Nyström S, Gao Y, Hammarsten O. Numerical Analysis of Etoposide Induced DNA Breaks. *PLoS ONE* 2009;4(6):10.
- Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, Kinjo K, Yamada T, Hozumi N, Ikeda Y and Kizaki M. Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells *via* modulation of reactive oxygen species production *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Haematologica* 2005;90:317-325.
- Nowak G, Ossowska G, Jopek R, Papp M. Strychnine-intensive glycine/NMDA sites are altered in two stress models of depression. *Pol J Pharmacol* 1998;50:365–9.
- Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, et al. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double strand breaks. *Blood*. 2004;104:3746-3753.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER Estrogen and spermatogenesis *Endocr Rev* 2001;22:289-318.
- Oikawa S, Furukawa A, Asada H, Hirakawa K and Kawanishi S. Catechins Induce Oxidative Damage to Cellular and Isolated DNA through the Generation of Reactive Oxygen Species. *Free Radical Research* 2003;37(8):881–890.

- Papież MA, Cierniak A, Krzyściak W, Bzowska M, Taha HM, Józkowicz A, Piskula M. (2008) The changes of antioxidant defense system caused by quercetin administration do not lead to DNA damage and apoptosis in the spleen and bone marrow cells of rats. *Food Chem Toxicol* 46 (9): 3053-3058.
- Papież MA, Krzyściak W, Bystrowska B. Rola stresu oksydacyjnego w synergistycznym działaniu kurkuminy i etopozydu. Streszczenia XLVIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, 2014, Wisła, 67.
- Patel RS, Rachamalla M, Chary NR, Shera FY, Tikoo K, Jena G. Cytarabine induced cerebellar neuronal damage in juvenile rat: correlating neurobehavioral performance with cellular and genetic alterations. *Toxicology* 2012;293(1-3):41-52.
- Peng F, Lu X, Janisse J, Muzik O. et al. PET of human prostate cancer xenografts in mice with increased uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$. *J. Nucl. Med.* 2006;47:1649–1652.
- Pincemail J, Deby C, Thirion A, de Bruyn-Dister M, Goutier R. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin Comparison with three related compounds. *Experientia* 1988;44:450-453.
- Ramachandran C, Nair SM, Escalon E, Melnick SJ. Potentiation of etoposide and temozolomide cytotoxicity by curcumin and turmeric forceTM in brain tumor cell lines. *J Complement Integr Med* 2012;9:Article 20.
- Rao J, Xu DR, Zheng FM, et al. Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Transl Med* 2011;9:71.
- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *J AAPS* 2009;11(3):495-510.
- Reddy MM, Fernandes MS, Salgia R, Levine RL, Griffin JD, and Sattler M. NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia* 2011;25:281–289.
- Richardson Ch, Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 2000;405(8):697-700.
- Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim KT, Grosu D, Shapiro P, Small D, and Rassool F. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. 2008; 111:3173-3182.
- Sánchez Y, Simón GP, Calviño E, et al. Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335:114–123.
- Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S and Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191:423-434.
- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1024- 1029.

- Sergediene E, Jönsson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IM, Cenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett.* 1999;462(3):392-6.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 2008;106:45–55.
- Slevin ML. The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer* 1991;67:319–329.
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalová I, et al. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells.* 2005;23:1417–1422.
- Spalteholz, H, Furtmuller, PG, Jakopitsch, Ch, Obinger, Ch, Schewe, T, Sies, H, Arnhold, J. Kinetic evidence for rapid oxidation of (–)-epicatechin by human myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:810–813.
- Sreenivasan S, Krishnakumar S. Synergistic Effect of Curcumin in Combination with Anticancer Agents in Human Retinoblastoma, *Cancer Cells Lines Curr Eye Res* 2014;11:1-13.
- Turner SD, Wijnhoven SWP, Tinwell H, Lashford LS, Rafferty JA, Ashby J, Vrieling H and Fairbairn LJ. Assays to predict the genotoxicity of the chromosomal mutagen etoposide – focusing on the best assay. *Mutation Res* 2001;493:139-147.
- Tyurina YY, Tyurin VA, Yalowich JC, Quinn PJ, Claycamp HG, Schor NF, Pitt BR, Kagan VE. Phenoxyl radicals of etoposide (VP-16) can directly oxidize intracellular thiols: protective versus damaging effects of phenolic antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;131(2):277-88.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27(2):120-39.
- van Bekkum DW, Hagenbeek A. Relevance of the BN leukemia as a model for human acute myeloid leukemia *Blood Cells* 1977;3:565–579.
- Vlasova II, Feng WH, Goff JP, Giorgianni A, Do D, Gollin SM, Lewis DW, Kagan VE, Yalowich JC Myeloperoxidase-dependent oxidation of etoposide in human myeloid progenitor CD34+ cells. *Mol Pharmacol* 2011;79:479–487.
- Wagner BA, Buettner GR, Oberley LW, Darby ChJ, Burns CP. Myeloperoxidase is involved in h2o2-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(29):22461–22469.
- Whitlock JA, Greer JP, Lukens JN. Epipodophyllotoxin related leukemia. Identification of a new subset of secondary leukemia. *Cancer* 1991;68:600–604.
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(1):230-6.
- Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeie, A, Nussler N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol* 2007;47:253–261.

- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Htay HH, Tsubouchi R, Qiao SL, Li WH, Murakami K, Yokochi T. Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicology in Vitro* 2004;18:783–789.
- Zhou F, Zhang W, Wei Y, Zhou D, Su Z, Meng X, et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase 1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leukemia Res* 2007;31:387–93.
- Zhou QM, Wang XF, Liu XJ, Zhang H, Lu YY, Huang S, Su SB. Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects. *Eur J Cancer* 2011;47:2240–7.
- Zhou QM, Zhang H, Lu YY, Wang XF, Su SB. Curcumin reduced the side effects of mitomycin C by inhibiting GRP58-mediated DNA cross-linking in MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Sci* 2009;100:2040–2045.
- Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett.* 2001;121(3):151-7.

7. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

- a. Łącznie jestem autorem 29 prac, w tym 21 oryginalnych, 3 pokonferencyjnych, 2 przeglądowych, 1 popularno-naukowej i 2 rozdziałów w skrypcie dla studentów
- b. Przed doktoratem opublikowałam 3 prace (1 oryginalną, 1 pokonferencyjną i 1 przeglądową). We wszystkich jestem pierwszym autorem. Opublikowałam też 1 artykuł popularno-naukowy.
- c. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam 23 prace naukowe, w tym 20 oryginalnych, 2 pokonferencyjne i 1 przeglądową. Mam także w dorobku 2 rozdziały w skrypcie dla studentów.
- d. W 11 publikacjach naukowych jestem pierwszym autorem i zarazem autorem korespondencyjnym, a w 7 jestem jedynym autorem publikacji.
- e. Sumaryczny *impact factor*, zgodnie z listą Journal Citation Reports (JCR), wynosi: **29.080**
- f. Sumaryczna wartość punktacji MNiSW: **370**
- g. Liczba cytowań publikacji zgodnie z bazą Web of Science Core Collection: **86**, zgodnie z bazą Scopus: **104**.
- h. Indeks Hirscha zgodnie z bazą Web of Science Core Collection: **5**, według bazy Scopus: **6**

8. Kierowanie i udział w projektach badawczych

Byłam kierownikiem i zarazem głównym wykonawcą 1 grantu KBN i 8 projektów finansowanych przez Collegium Medicum UJ ze środków MNiSW.

Kierowanie projektami:

Granty

2P05A 162 30, “Badanie uszkodzeń DNA, apoptozy i proliferacji komórek w śledzionie oraz szpiku kostnym szczurów z białaczką promielocytową po podaniu związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym”, kierownik grantu KBN

Badania własne

1. WŁ/224/P/F, “Badania składników wyciągu z kwiatów malwy czarnej (*Althaea rosea Cav. var. nigra*)”, kierownik projektu
2. WŁ/262/P/F, “Wpływ wybranych fitoestrogenów na funkcje komórek Leydiga i spermatogenezy u szczura”, kierownik projektu
3. WŁ/349/P/F, “Wpływ wybranych polifenoli pochodzenia roślinnego na funkcję tarczycy i poziom uszkodzeń DNA w komórkach szpiku szczura”, kierownik projektu
4. K/ZBW/000223, “Wpływ związków o działaniu anty- lub prooksydacyjnym na dynamikę rozwoju białaczki mieloblastycznej szczura”, kierownik projektu
5. K/ZBW/000471, “Wpływ (-)-epikatechiny na cytostatyczne działanie etopozydu u szczurów z białaczką promielocytową”, kierownik projektu
6. K/ZDS/003318, „Badanie wpływu wybranych polifenoli na przeciwnowotworowe działanie cytarabiny i etopozydu w komórkach ostrej białaczki szpikowej”, kierownik projektu
7. K/ZDS/004679, „Wpływ polifenoli roślinnych na cyto-genotoksyczne działanie etopozydu przy udziale mieloperoksydazy”, kierownik projektu
8. K/ZDS/005620, „Genotoksyczne i proapoptotyczne działanie kombinacji kurkuminy i etopozydu w komórkach białaczkowych i prawidłowych prekursorowych komórkach hematopocyticznych”, kierownik projektu

Udział w projektach badawczych:

Uczestniczyłam w projekcie finansowanym ze środków Unii Europejskiej: WND POIG.01.03.01-12-174/09, „Kompleksy wanadu - innowacyjne metalofarmaceutyki w leczeniu cukrzycy”, wykonawca zadania badawczego

9. Udział w konferencjach:

Brałam czynny udział w 22 naukowych konferencjach międzynarodowych i w 11 konferencjach krajowych. Mam w swoim dorobku 35 doniesień na konferencjach międzynarodowych i 17 na konferencjach krajowych.

Wygłosiłam także wykład na zaproszenie Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (Epikatechina jako modulator działania etopozydu – badania na modelu szczurów z ostrą białaczką szpikową).

10. Nagrody, wyróżnienia:

2002: wyróżnienie Rady Wydziału za pracę doktorską

2012: nagroda Dziekana Wydziału za dorobek naukowy w 2012 r.

11. Członkostwo w towarzystwach naukowych:

Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików:

2003 – 2008: członek towarzystwa,

2009 – obecnie: członek Zarządu Oddziału Krakowskiego,

New York Academy of Science USA, 2006-2007, członek towarzystwa

European Association for Cancer Research, 2007- 2013, członek towarzystwa

Polskie Towarzystwo Onkologiczne, 2013 – obecnie, członek towarzystwa

12. Członkostwo w radach redakcyjnych czasopism naukowych:

Journal of Unexplored Cancer Data, OAE Publishing Inc., od roku 2016 - członek Rady Redakcyjnej

13. Recenzje prac:

23 recenzje publikacji naukowych:

- Recenzent wolontariusz publikacji dla czasopism wydawanych przez Dove Medical Press: 3 recenzje dla *Drug Design Development and Therapy* (IF 3.028), 4 recenzje dla *International Journal of Nanomedicine* (IF 4.383), 1 recenzja dla *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*.
- Inne recenzje:
 - *Drug and Chemical Toxicology* (IF 1.098) - 4 recenzje
 - *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2008: IF 1.2; 2015: IF 4.429) – 3 recenzje
 - *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (IF 3.516) – 1 recenzja
 - *Integrative Cancer Therapies* (IF 2.361) – 1 recenzja
 - *Drug Delivery* (IF 4.843) – 1 recenzja
 - *Drug Development and Industrial Pharmacy* (IF 2.101) – 1 recenzja
 - *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (IF 0.854) – 1 recenzja
 - *African Journal of Agricultural Research* (IF 0.263) – 1 recenzje
 - *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* – 1 recenzja
 - *International Scholarly Research Notices* – 1 recenzja

2 recenzje prac magisterskich wykonanych w Zakładzie Radioligandów (Wydział Farmaceutyczny UJ CM, 2007)