

# **Autoreferat**

**Renata Kontek**

*Uniwersytet Łódzki  
Pracownia Cytogenetyki  
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Banacha 12/16  
90-237 Łódź*

**1. Imię i nazwisko:** Renata Kontek

**2. Tytuły naukowe i stopnie naukowe:**

1990 – **tytuł magistra biologii** w zakresie fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

1999 – **stopień doktora nauk biologicznych** w zakresie biologii, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

1. 10. 2012 r. – do dnia dzisiejszego – **starszy wykładowca** w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin UŁ

1.10.1999 – 30. 09.2012 r. – **adiunkt** w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin UŁ

1991 r. – 30.09.1999 r. – **asystent** w Zakładzie Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ, potem Katedrze Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ

1.12.1989 r. – 1990 r. – **asystent-stażysta** w Zakładzie Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ

**4. Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14. 03. 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowych (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Modulacja stopnia cytotoksyczności i uszkodzeń DNA przez wybrane chemioterapeutyki i antyoksydanty w układach doświadczalnych typu:**

**1. lek-potencjalny lek**

**2. lek-antyoksydant**

**w prawidłowych i nowotworowych komórkach człowieka**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 publikacji, których sumaryczny IF (według roku publikacji) wynosi 10,535, a liczba punktów MNiSW = 115 (\*124).

Współczynnik oddziaływania czasopisma impact factor (IF) podano dla roku, w którym ukazała się publikacja, punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z roku 2013 (\*liczba punktów MNiSW zgodna z rokiem publikacji), natomiast liczbę cytowań podano według bazy Web of Science bez autocytowań.

**Oświadczenia współautorów publikacji zawarte są w Załączniku nr 6.**

**B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. **R. Kontek**, K. Matławska-Wasowska, U. Kalinowska-Lis, B. Marciniak, 2010, Genotoxic effects of irinotecan combined with the novel platinum(II) complexes in human cancer cells, *Chemico-Biological Interactions* 188, 66-74.  
IF=2,832; 30 punktów MNiSW (32\*); liczba cytowań = 2 (wg. bazy Scopus = 4)

*Indywidualny wkład – 85%. Koncepcja badawcza pracy. Przeprowadzenie części doświadczalnej. Opracowanie i interpretacja wyników. Napisanie manuskryptu i główny udział w jego zredagowaniu. Autor korespondencyjny.*

2. **R. Kontek**, R. Drozda, M. Śliwiński, K. Grzegorzczak, 2010, Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamin A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients, *Toxicology in Vitro* 24, 417-424.  
IF=2,546; 25 punktów MNiSW (27\*); liczba cytowań = 6 (wg. bazy Scopus = 6)

*Indywidualny wkład – 85%. Koncepcja badawcza pracy, przeprowadzenie części doświadczalnej. Opracowanie i interpretacja wyników. Napisanie manuskryptu i główny udział w jego zredagowaniu. Autor korespondencyjny.*

3. **R. Kontek**, H. Nowicka, 2013, The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in normal lymphocytes and cancer cells, *Drug and Chemical Toxicology* 36(3): 335-342.  
IF=1,293; 15 punktów MNiSW (20\*); liczba cytowań = 1 (wg. bazy Scopus = 3)

*Indywidualny wkład – 95%. Koncepcja badawcza pracy, przeprowadzenie części doświadczalnej. Opracowanie i interpretacja wyników. Napisanie manuskryptu i główny udział w jego zredagowaniu. Autor korespondencyjny.*

4. **R. Kontek**, M. Jakubczak, K. Matławska-Wasowska, 2014, The antioxidants, vitamin A and E but not vitamin C and melatonin enhance the proapoptotic effects of irinotecan in cancer cells *in vitro*, *Toxicology in Vitro* 28, 282-291.  
IF=2,65; 25 punktów MNiSW; liczba cytowań = 0 (praca ukazała się w 2014 r.)

*Indywidualny wkład – 90%. Koncepcja badawcza pracy, przeprowadzenie części doświadczalnej. Opracowanie i interpretacja wyników. Napisanie manuskryptu i główny udział w jego zredagowaniu. Autor korespondencyjny.*

5. **R. Kontek**, B. Kontek, K. Grzegorzczak, 2013, Vitamin C modulates DNA-damage induced by hydrogen peroxide in the human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay *in vitro*, *Archives of Medical Science* 6, 1006-1012.  
IF=1,214; 20 punktów MNiSW; liczba cytowań = 0 (praca ukazała się w XII 2013 r.)

*Indywidualny wkład – 90%. Koncepcja badawcza pracy, przeprowadzenie części doświadczalnej. Opracowanie i interpretacja wyników. Napisanie manuskryptu i główny udział w jego zredagowaniu.*

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

**C. 1. Wprowadzenie**

Irinotekan (ang. 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin; synonimy: CPT-11, Camptosar<sup>®</sup>, Campto, Irinotesin) jest lekiem przeciwnowotworowym z grupy inhibitorów topoiizomerazy I, której zadaniem jest relaksacja cząsteczek DNA przez wprowadzanie okresowo powtarzających się, pojedynczych pęknięć w jednej z nici DNA i tym samym niwelowanie napięcia torsyjnego, powstającego podczas replikacji czy transkrypcji DNA. Irinotekan po związaniu z kompleksem otwartym DNA-topoiizomeraza I stabilizuje go, jednocześnie zapobiegając ponownemu połączeniu się nici. W konsekwencji, dochodzi do zatrzymania widełek replikacyjnych czy polimerazy RNA i powstania nieodwracalnych pęknięć DNA, których komórki ssaków nie potrafią skutecznie naprawiać, co ostatecznie prowadzi do zapoczątkowania apoptozy (Mathijssen i wsp., 2001). Działanie cytotoksyczne irinotekanu w komórkach ssaków *in vitro* jest najefektywniejsze w fazie S cyklu komórkowego, gdyż w niej występuje najwyższe stężenie topoiizomerazy. Irinotekan w terapiach nowotworowych kojarzony jest często z innymi lekami zwiększającymi skuteczność jego działania np. z 5-fluorouracylem, oksaliplatyną, fenobarbitem czy cyklosporyną (Jong i wsp., 2005). Równoczesne zastosowanie kilku chemioterapeutyków wiąże się z różnymi mechanizmami ich działania, profilami toksyczności oraz punktami uchwytu, które nie pokrywają się ze sobą, co z punktu widzenia nabywania oporności lekowej przez komórki nowotworowe jest niezwykle cenne, gdyż dzięki temu można oczekiwać pozytywnego efektu terapeutycznego.

Z kolei *cis*platyna stosowana w terapii wielu nowotworów od 1978 roku, wykazuje silną aktywność przeciwnowotworową, przy jednoczesnej dużej toksyczności oraz częstym występowaniem oporności na ten lek. Jej izomer *trans* nie wywołuje oporności komórek nowotworowych i charakteryzuje się niższą toksycznością, jednak wykazuje słabą aktywność przeciwnowotworową i dlatego nie jest stosowany klinicznie (Malinowska i wsp., 2007). Z powodu niezadowolających właściwości obu związków wciąż podejmowane są próby zsyntetyzowania nowych ich analogów, poprzez zastępowanie podstawników w ich cząsteczkach, innymi - rozbudowanymi przestrzennie, ligandami. W taki sposób w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zostały zsyntetyzowane nowe analogi *cis/trans*platyny o nazwie: *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] i *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>],

w których grupy  $\text{NH}_3$  zastąpiono triestrami kwasu fosforowego z pirydyną. Tak zbudowane kompleksy platyny(II) zostały wykorzystane w przedstawianym osiągnięciu naukowym.

Witaminy C, E i A oraz melatonina to znane związki o charakterze antyoksydacyjnym, które, w pewnych warunkach, wykazują zdolność do niszczenia komórek nowotworowych (Gunawardena i wsp., 2000; Soprano i Soprano, 2002; Sainz i wsp., 2003). Badacze próbują proponować mechanizmy według, których wymienione witaminy przypuszczalnie realizują swoje zadania (Lamson i Brignall, 1999). Jednak cały czas wiedza dotycząca interakcji konkretnych przeciwutleniaczy i leków jest niewystarczająca. Wiadomo, że antyoksydanty pełnią wiele ważnych funkcji w organizmie, biorą udział w wielu procesach, mają wpływ na przekazywanie sygnałów komórkowych, aktywność enzymów czy ekspresję genów uczestniczących np. w procesach apoptozy i naprawy DNA oraz mogą ściśle ze sobą współdziałać.

W prezentowanych pracach składających się na moje osiągnięcie naukowe podjęłam próbę oceny, w jakim stopniu wybrane chemioterapeutyki oraz związki zaliczane do grupy przeciwutleniaczy, w zależności od zastosowanego układu doświadczalnego (lek-potencjalny lek lub lek-antyoksydant), mogą modulować indukowane efekty cyto- i genotoksyczne w komórkach nowotworowych i prawidłowych człowieka *in vitro*. Wykorzystane w przedstawianych doświadczeniach linie nowotworowe: A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc) oraz HT29 (gruczolakorak jelita grubego), pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Tkankowych (ATCC) i różniły się między sobą stopniem wrażliwości na chemioterapię. Komórki linii HT29 są komórkami mało wrażliwymi na podawane chemioterapeutyki, w przeciwieństwie do komórek A549. Komórki prawidłowe tj. limfocyty krwi obwodowej człowieka wykorzystane w omawianych pracach, pochodziły z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi.

Celem pierwszej z prac składających się na przedstawiane przeze mnie osiągnięcie naukowe była analiza genotoksyczności i skuteczności napraw DNA po działaniu stosowanego klinicznie irinotekanu w obecności nowych kompleksów platyny(II) tj. *cis*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-pmOpe})_2]$  i *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-pmOpe})_2]$  na komórki nowotworowe A549 i HT29 przy użyciu testu kometowego. Z uwagi na fakt, że chemioterapia oparta jest głównie na kojarzeniu kilku cytostatyków, zastosowany w omawianej pracy układ: lek stosowany klinicznie-potencjalny lek, mógłby wiązać się ze zróżnicowaną odpowiedzią komórkową w zależności od typu wykorzystanych linii komórkowych:

1. **R. Kontek, K. Matławska-Wasowska, U. Kalinowska-Lis, B. Marciniak, 2010, Genotoxic effects of irinotecan combined with the novel platinum(II) complexes in human cancer cells, *Chemico-Biological Interactions* 188, 66-74.**

Test komety jest bardzo czułą techniką umożliwiającą wykrywanie różnego typu uszkodzeń DNA, takich jak: pęknięcia nici DNA (pojedyncze i podwójne), miejsca alkalicznie labilne, które przekształcane są w pęknięcia nici w alkalicznych warunkach testu, wiązania krzyżowe DNA-DNA, czy DNA-białko. W opisywanej publikacji zastosowano alkaliczną wersję testu komety (pH > 13), która pozwala na detekcję wszystkich ww. typów uszkodzeń DNA. W przeprowadzonych seriach doświadczalnych stężenia kompleksów platyny(II) zostały dobrane na podstawie wyników testu MTT, który pozwolił wyznaczyć wartość IC<sub>50</sub> czyli takie stężenie związku, które zahamowało przeżywalność komórek w 50% po 72-godzinnej inkubacji (Kalinowska i wsp., 2005). Stężenia *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] i *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] wykorzystane w niniejszej pracy, mieszczą się w przedziale dawek cisplatyny stosowanych w chemioterapii: 0,5-2,04 µg/ml. Wartości te mogą ulegać zmniejszeniu bądź zwiększeniu w zależności od formy podania leku (Baba i wsp., 2009). Z kolei ostateczne stężenia irinotekanu w poszczególnych seriach doświadczalnych zostały uściślone w oparciu o wyniki testu cytotoxycyzności uzyskanych przez Sapra i wsp. (2008) oraz Pavillard i wsp. (2002). Przeprowadzone w prezentowanej pracy badania wykazały, że Irinotekan we wszystkich testowanych stężeniach skojarzony z *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] lub *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] generował wyższy poziom uszkodzeń DNA, w obu testowanych liniach nowotworowych, w porównaniu z efektami jakie indukowały ww. związki osobno, w tych samych komórkach i układach doświadczalnych. Wyższą skuteczność dualnego wpływu testowanych związków odnotowano po 1 h inkubacji komórek linii A549 z irinotekaniem w obecności 5 µM *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>], gdzie już najniższe zastosowane stężenie irinotekanu (7,5 µM) w obecności kompleksu o konformacji „*trans*” generowało 4-krotnie więcej uszkodzeń DNA (24,17%) niż sam irinotekan (6,76%) i 2-krotnie więcej niż sam 5 µM *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] (10,52%). Poziom uszkodzeń DNA przewyższał wartość uzyskaną w próbach będących kontrolą pozytywną, a którą stanowił 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (44,23%). W komórkach HT29 zaobserwowano również wzrost stopnia genotoksyczności irinotekanu w obecności obu kompleksów platyny w porównaniu z samym irinotekaniem czy samymi kompleksami platyny(II). Podobnie jak w przypadku komórek A549 skuteczniejszy okazał się kompleks platyny o konformacji „*trans*”, który indukował wyższy stopień migracji DNA w ogonach komet komórek HT29 w porównaniu z kompleksem o konformacji „*cis*”. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że irinotekan poprzez

utworzenie kompleksu DNA-Pt-TopoI-irinotekan prowadzi do pęknięć nici DNA, dodatkowo kompleksy platyny determinują powstanie specyficznych adduktów wytwarzanych z zasadami azotowymi DNA, prowadzące również do pęknięć nici DNA. Najbardziej efektywne z ww. adduktów to połączenia bifunkcyjne, do których należą: wewnątrznicowe wiązania krzyżowe typu DNA-DNA (1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG) i 1,3-d(GXpG), międzynieciowe wiązania krzyżowe typu DNA-DNA (1,2-d(GpG) i międzycząsteczkowe wiązania krzyżowe typu DNA-białko (np. DNA-Pt-białko jądrowe lub DNA-Pt-glutation). Addukty DNA-Pt mogą wpływać na wzrost genotoksyczności irinotekanu poprzez zwiększenie poziomu kompleksów DNA-Pt-TopoI-irinotekan. Badania przeprowadzone na komórkach A549 i HT29 wykazały, że irinotekan może być skuteczny w polichemioterapii z nowymi kompleksami platyny(II), ponieważ jego profil toksyczności nie pokrywa się z profilem działania nowych kompleksów platyny, ponadto, związki te mają różne punkty uchwytu w komórce. Jednoczesne podawanie tych związków powoduje addytywny efekt ich działania, który może także zależeć od typu komórek, co potwierdziły przeprowadzone analizy, w których odnotowano silniejszy efekt genotoksyczny irinotekanu w obecności *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] i *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] w komórkach A549 niż HT29, w tych samych układach doświadczalnych. Niższy stopień uszkodzeń DNA w komórkach HT29 po działaniu testowanych związków, może wynikać również z faktu, że nowotwory jelita grubego, wykazują silniejszą oporność na chemioterapię, ze względu chociażby na częste mutacje w genie 53 czy też wydajność systemów naprawy DNA (Tsavaris i wsp., 2002).

W przeprowadzonych badaniach skuteczniejszym w działaniu okazał się kompleks o konfiguracji *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] w porównaniu z kompleksem *cis*, co dowodzi, że związki o konformacji *trans* mogą wykazywać aktywność przeciwnowotworową. Zastąpienie grup amonowych rozbudowanymi przestrzennie ligandami, skutecznie zredukowało tempo reakcji substytucji jonów chlorkowych. Elementem składowym heterocyklicznych ligandów, które budują testowane w niniejszej pracy kompleksy platyny(II), jest również pirydyna, która mogła wpłynąć na podwyższenie aktywności genotoksycznej wobec badanych komórek. Zastosowanie nowych kompleksów platyny z irinotekaniem powoduje dalszy wzrost genotoksyczności w komórkach nowotworowych. Wykorzystanie przestrzennych ligandów powoduje również zwiększenie lipofilowego charakteru kompleksów przez co ułatwione jest ich przenikanie do przestrzeni wewnątrzkomórkowych (Kalinowska-Lis i wsp., 2008; Wang i Lippard, 2005). Nie bez znaczenia wydaje się być drugi element składowy tych ligandów, czyli reszta fosforanowa. Rezultaty niektórych badań pokazują, że łączenie fosforanów czy fosfonianów

z heterocyklami pozwala na uzyskiwanie kompleksów o interesujących właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych (Matławska i wsp., 2005; Aranowska i wsp., 2006).

Efektywność napraw w komórkach A549 oraz HT29 od momentu zakończenia ekspozycji komórek na irinotekan w obecności kompleksu o konformacji „*trans*”, pomimo 2-godzinnej postinkubacji w środowisku wolnym od testowanych związków przebiegała powoli, gdyż zaobserwowany poziom uszkodzeń DNA pozostawał nadal na dość wysokim poziomie. Może to świadczyć o słabym rozpoznawaniu tego typu uszkodzeń (wewnątrz- i międzyciniowe wiązania krzyżowe typu DNA-DNA), indukowanych przez izomer „*trans*”, przez enzymy reperacyjne biorące udział w naprawie DNA. W związku z tym, mogły pozostawać nienaprawione przez długi czas (Waardenburg i wsp., 2004a; Waardenburg i wsp., 2004b).

Przeprowadzone badania sugerują, że połączenie aktywności *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmOpe)<sub>2</sub>] z irinotekaniem daje zdecydowany wzrost genotoksycznego oddziaływania obu związków w komórkach A549 i HT29, co mogłoby pozwolić na zmniejszenie dawek stosowanych chemioterapeutyków, zachowując jednocześnie zamierzony efekt terapeutyczny. Im mniejsze stężenie leku zostanie wprowadzone do organizmu, tym mniejsze będą skutki uboczne lub będą miały łagodniejszy przebieg. Rezultaty powyższych badań są również kolejnym dowodem przełamującym paradygmat, że kompleksy platyny(II) o konformacji *trans* nie wykazują właściwości biologicznych, co należy szczególnie podkreślić. Ze względu na stale rosnącą lekooporność komórek, poszukiwanie wciąż nowych związków, które odniosą sukces w walce z chorobą nowotworową wydaje się być bez wątpienia konieczne.

W chwili obecnej chemioterapia, obok leczenia operacyjnego, jest jedynym możliwym sposobem poprawienia jakości i wydłużenia życia pacjentów z chorobą nowotworową, dlatego w kolejnych publikacjach składających się na moje osiągnięcie naukowe postanowiłam kontynuować badania zmierzające do skojarzenia irinotekanu, ale tym razem, ze znanymi antyoksydantami. Uzyskanie pozytywnych wyników, mogłoby się przyczynić do polepszenia efektywności działania irinotekanu, a jednocześnie znaczną redukcję skutków ubocznych, które występują podczas chemioterapii, zwłaszcza wielolekowej, gdzie każdy lek niesie ze sobą potencjał negatywnych oddziaływań na funkcjonowanie całego organizmu. Zarówno Irinotekan jak i nowe kompleksy platyny(II) podane razem czy też osobno na pewno generowały wystąpienie niekorzystnych skutków ubocznych. Zastosowanie antyoksydantów mogłoby przyczynić się do zmniejszenia niepożądanych efektów działania irinotekanu, a jednocześnie modulować jego genotoksyczne działanie na komórki nowotworowe.



Założenia te zostały wykorzystane w kolejnych publikacjach wchodzących w prezentowane osiągnięcie naukowe:

2. **R. Kontek, R. Drozda, M. Śliwiński, K. Grzegorzczak, 2010, Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamin A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients, *Toxicology in Vitro* 24, 417-424.**

Zahamowanie replikacji DNA przyjmuje się za podstawę cytotoksycznego działania irinotekanu. Jak każdy lek i irinotekan ulega wewnątrz organizmu licznym przemianom metabolicznym podczas, których wyzwalane są reaktywne formy tlenu (RFT), uszkadzające DNA komórek i tkanek (Smith i wsp., 2006). RFT generowane są także jako następstwo aerobowego metabolizmu samych komórek. Poza produkcją RFT podczas metabolizmu irinotekanu, liczne stany zapalne przebiegające wewnątrz organizmu nasilają stres oksydacyjny, którego stopień wzrasta wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej. Proces ten powoduje również znaczne osłabienie ustrojowego systemu antyoksydacyjnego.

Podczas przyjmowania chemioterapeutyków rola witamin i innych związków o charakterze antyoksydacyjnym nie jest do końca jasna. Wciąż istnieje potrzeba zgłębiania wiedzy na temat interakcji konkretnych leków z konkretnymi antyoksydantami wewnątrz komórek nowotworowych. Mogą one wykazywać działanie synergistyczne. Jednak istnieje także możliwość obniżenia działania chemioterapeutyków, gdyż znane powszechnie antyoksydanty stabilizują cząsteczkę DNA, co z punktu widzenia skuteczności chemioterapii nie jest zjawiskiem pożądanym. Dane literaturowe wskazują, że suplementacja diety antyoksydantami podejmowana jest przez 13-87% chorych na raka (Pathak i wsp., 2002; Murray i wsp., 2006; Sugamura i wsp., 2008; Kim i wsp., 2012). W ostatnim czasie, onkolodzy, jak również lekarze innych specjalności, zwrócili szczególną uwagę na wykorzystanie witamin u pacjentów poddawanych chemioterapii z powodu obaw, że przeciwutleniacze mogą zakłócać mechanizm działania chemioterapeutyków, a w konsekwencji zmniejszyć/zwiększyć jego skuteczność (Prasad i wsp., 2002; Borek, 2004; Seely i Oneschuk, 2008; Greenlee i wsp., 2009).

Zatem, w kolejnej publikacji stanowiącej moje osiągnięcie naukowe, dokonałam oceny czy antyoksydant może modulować genotoksyczne działanie irinotekanu oraz wywierać wpływ na skuteczność napraw DNA w limfocytach krwi obwodowej pacjentów, u których zdiagnozowano nowotwór jelita grubego, będących przed zabiegiem chirurgicznym, bez cech przerzutów i nie przyjmujących wcześniej regularnej farmakoterapii, w porównaniu z dawcami zdrowymi. Badania zostały przeprowadzone *in vitro*, wykorzystując test kometowy.

Stężenia irinotekanu wykorzystane w opisywanych badaniach mieściły się w przedziale 7,5  $\mu\text{M}$  – 60  $\mu\text{M}$  i były analogiczne do prezentowanych w publikacji nr 1 przedstawianego przez mnie osiągnięcia naukowego. Stężenia antyoksydantów: witaminy C (50  $\mu\text{M}$ ) i E (25  $\mu\text{M}$ ) mieściły się na ich fizjologicznym poziomie występującym w osoczu krwi: 50  $\mu\text{M}$  i 25,7  $\mu\text{M}$ . Stężenie witaminy A (10  $\mu\text{M}$ ) co prawda było wyższe od identyfikowanego w stanie fizjologicznym w osoczu (1,24  $\mu\text{M}$ ), ale pomimo to jest zaliczane do farmakologicznie niskich, gdyż nie ma wpływu na wzrost komórek prawidłowych i nowotworowych (Prasad i wsp., 2002).

W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano, że w limfocytach pacjentów chorych na nowotwór jelita grubego, poziom uszkodzeń DNA po inkubacji z samym irinotekaniem był zdecydowanie wyższy niż w serii z wykorzystaniem krwi od dawców zdrowych, co mogło być spowodowane m.in. stopniem zaawansowania choroby pacjenta. Obecność witamin A, C lub E w roztworach inkubacyjnych podziałała synergistycznie zwiększając poziom uszkodzeń DNA w komórkach wywołany ekspozycją materiału na różne stężenia irinotekanu. Jedynie po zastosowaniu witaminy C (50  $\mu\text{M}$ ), odnotowano nieznaczne tylko zwiększenie stopnia uszkodzeń DNA w porównaniu z serią z samym irinotekaniem, co może przemawiać za tym, że witamina C nie zmienia wyraźnie działania genotoksycznego irinotekanu w badanych komórkach. Jednakże w przypadku obecności witamin A (10  $\mu\text{M}$ ) lub E (15  $\mu\text{M}$ ) podczas inkubacji limfocytów od dawców chorych z irinotekaniem poziom uszkodzeń DNA znacznie przewyższał uzyskany w serii bez obecności tych witamin, zwłaszcza w przypadku zastosowania witaminy A. Wykorzystanie witamin A i E zwielokrotniło efekt genotoksyczny wywołany przez irinotekan, przy zachowaniu tych samych jego stężeń w komórkach pochodzących od osób chorych. Uzyskane wyniki sugerują, że witaminy A, C i E przy zachowaniu stałego ich stężenia, zwiększają wzrastające genotoksyczne działanie irinotekanu poprzez wzrost migracji DNA w ogonach komet badanych komórek. Komórki od dawców chorych wykazywały większą wrażliwość na podawany chemioterapeutyk, co może być spowodowane wyższym stężeniem w komórkach organizmu enzymu topoiizomerazy I, który jest celem terapeutycznym irinotekanu (Burgess i wsp., 2008). Podyktowane jest to tym, że komórki w stanach zapalnych lub w obecności ciał obcych w organizmie stymulowane są do podziałów w celu zwielokrotnienia swojej liczebności przez co może dojść do czasowego podniesienia poziomu topoiizomeraz nie tylko w komórkach rakowych, ale również w innych tkankach organizmu np. limfocytach.

Z kolei w materiale od dawców zdrowych, po dodaniu do zawiesiny komórkowej wzrastających stężeń irinotekanu oraz witaminy C (50  $\mu\text{M}$ ) nastąpił spadek poziomu

uszkodzeń DNA. W serii doświadczalnej z udziałem witaminy E (15  $\mu$ M) odnotowano nieznaczne zmniejszenie % DNA w ogonach komet w porównaniu z serią z irinotekaniem bez obecności tej witaminy. Najmniej korzystnie w tej serii doświadczalnej wypadła witamina A (10  $\mu$ M), która powodowała niewielki wzrost uszkodzeń DNA w komórkach zdrowych dawców ponad ten odnotowany dla serii z samym irinotekaniem. Otrzymane wyniki badań świadczą, o tym, że i w tym przypadku doszło do biomodulacji genotoksycznego działania irinotekanu przez witaminy A, C lub E w limfocytach pochodzących od dawców zdrowych. Relatywnie wysoka bariera antyoksydacyjna u osób zdrowych, ma wpływ na ekspresję genów biorących udział w procesach naprawy uszkodzonego DNA oraz genów hamujących śmierć komórki, co przejawiało się nieznacznym % uszkodzeń.

Po przeprowadzeniu 2 h postinkubacji limfocytów od dawców chorych w podłożu wolnym od testowanych związków zanotowano spadek wartości % DNA w ogonach komet we wszystkich próbach doświadczalnych, przy czym samo tempo napraw DNA pozostawało na umiarkowanym poziomie, pomimo 2 h okresu postinkubacji. Porównując procent DNA w ogonach komet tuż po zakończeniu inkubacji ( $T_0$ ) w badanych układach doświadczalnych, z wynikami uzyskanymi po 2 godzinnej postinkubacji, zaobserwowano, że po tym czasie uszkodzenia zostały naprawione w 30-50%, co można tłumaczyć charakterem działania irinotekanu w komórkach, który polega na indukowaniu m.in. pęknięć nici DNA, których naprawa jest procesem wieloetapowym zachodzącym przy udziale wielu białek, obejmującym wykrycie uszkodzenia, przekazanie sygnału oraz zapoczątkowanie reakcji naprawczej. Tego rodzaju odpowiedź komórkowa jest bardzo złożona i ściśle kontrolowana, jednak nagromadzenie się dużej liczby uszkodzeń DNA, zwłaszcza pęknięć jedno- i dwuniciowych, stawia komórki często w sytuacji wymagającej wyboru między przeżyciem obciążonym kosztem uszkodzonego materiału a uruchomieniem apoptozy i śmierci. Z kolei grupa osób zdrowych wykazywała wysoce skuteczne tempo napraw, do wartości zbliżonych lub równych kontroli negatywnej.

Wydaje się, że najbardziej efektywne działanie protekcyjne wykazała w naszych doświadczeniach witamina C, najmniej korzystne działanie odnotowano po ekspozycji komórek z irinotekaniem w obecności witaminy A, bo odnotowaliśmy zwiększenie poziomu uszkodzeń DNA. Jednakże z punktu widzenia chemioterapii irinotekaniem fakt ten, może okazać się bardzo pomocny, gdyż możliwe się staje obniżenie dawki zastosowanego leku, przy zachowaniu tych samych rezultatów terapeutycznych. Mniejsza ilość wprowadzanego chemioterapeutyku mogłaby się przyczynić do zmniejszenia efektów ubocznych jakie on powoduje w organizmie. Opisanie w niniejszej pracy doświadczenia przeprowadzone zostały

w układzie *in vitro* i na pewno będą istnieć różnice w biodostępności i aktywności testowanych związków stosowanych w hodowli a preparatami przyjmowanymi doustnie. Jednakże tego typu badania, z całą pewnością przyczyniają się do lepszego poznania specyfiki działania antyoksydantów łącznie z chemioterapeutykami u pacjentów z chorobą nowotworową. Badania opisane w ww. publikacji, a zwłaszcza materiał jakim mogłam dysponować dzięki współpracy z Kliniką Chirurgii Szpitala MSWiA w Łodzi, były dla mnie niezwykle ważne, a kontakt z chorymi stał się dla mnie dodatkową siłą napędową w mojej pracy naukowej/doświadczalnej.

Badając wpływ znanych antyoksydantów na genotoksyczność irinotekanu, swoją uwagę skierowałam na melatoninę, która w ostatnich latach stała się bardzo popularna, z uwagi na jej szerokie spektrum działania, w różnych dziedzinach medycyny, również jako związek o charakterze antyoksydacyjnym. Tak więc w kolejnej publikacji składającej się na moje osiągnięcie naukowe, wykorzystałam układ doświadczalny – irinotekan/melatonina:

**3. R. Kontek, H. Nowicka, 2012, The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in normal lymphocytes and cancer cells, *Drug and Chemical Toxicology* 36(3): 335-342.**

Melatonina oprócz wielu ważnych funkcji jakie pełni w organizmie, jest niezwykle silnym przeciwutleniaczem hydrofobowym i hydrofilowym, dzięki obecności w cząsteczce grup O-metylowej i N-acetylowej. Melatonina pełni rolę antyoksydanta prewencyjnego, bezpośrednio uczestnicząc w inaktywacji reaktywnych form tlenu oraz dezaktywacji reaktywnych form azotu. Melatonina posiada także zdolność do usuwania rodników nadtlenków lipidowych powstałych podczas utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych, pełniąc rolę antyoksydanta interwencyjnego działającego synergistycznie z witaminą E. Dodatkowo, poprzez oddziaływanie na zlokalizowane w błonie komórkowej i we wnętrzu komórki receptory melatoninowe, wpływa ona na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, tj. dysmutazy nadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej. Szerokie spektrum właściwości melatoniny powoduje, że jest ona wykorzystywana w leczeniu różnych stanów patologicznych począwszy od procesów zapalnych, niedokrwienych, zaburzeniach rytmu okołodobowego oraz w chemioterapii zwiększając jej skuteczność i tolerancję (Reiter i wsp., 2002; Korkmaz i wsp., 2009).

Celem badań opisanych w prezentowanej publikacji było zbadanie jaki wpływ na poziom uszkodzeń DNA i efektywność naprawy DNA ma układ melatonina-irinotekan przy użyciu testu komety w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej człowieka i liniach

nowotworowych: A549 i HT29. W eksperymentach stężenie melatoniny (50  $\mu\text{M}$ ) ustalono na podstawie danych literaturowych (Anisimov i wsp., 2006; Śliwiński i wsp., 2007), aczkolwiek jej fizjologiczne stężenie wynosi  $10^{-9}\text{M}$ , a dopuszczane farmakologiczne  $10^{-3}\text{M}$ . Stężenie melatoniny użyte w badaniach nie przekraczało rekomendowanych dawek farmakologicznych (Adamczyk-Sowa i wsp., 2013).

Uzyskane wyniki badań wskazują, że wzrost stężeń irinotekanu (od 7,5  $\mu\text{M}$  do 60  $\mu\text{M}$ ) przy jednoczesnym zachowaniu stałego stężenia melatoniny (50  $\mu\text{M}$ ) w badanych próbach, spowodował wzrost poziomu migracji DNA w ogonach komet badanych komórek. Wyższy poziom uszkodzeń DNA zaobserwowano w komórkach HT29 w porównaniu z komórkami A549, z kolei najniższy stopień uszkodzeń DNA odnotowano w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej człowieka. Zależność ta była opisana już we wcześniejszych prezentowanych publikacjach i jest ona spowodowana najprawdopodobniej wyższym stężeniem topoizomerazy w komórkach nowotworowych niż w komórkach prawidłowych. Naprawa DNA obserwowana w prawidłowych limfocytach jak i w komórkach HT29, A549 po 60 min i 120 min postinkubacji w środowisku wolnym od testowanych związków, przebiegała w efektywnym tempie. Po 120 min postinkubacji badane komórki naprawiły ok. 45-50% uszkodzeń DNA w porównaniu z poziomem uszkodzeń DNA odnotowanym bezpośrednio po inkubacji z badanymi związkami. Może to być związane z tym, że działanie melatoniny nie jest ograniczane przez morfofizjologiczne bariery organizmu, a w jądrze komórkowym melatonina może prowadzić do uruchomienia szlaku przekazywania sygnałów i za pośrednictwem białkowej kinazy C może indukować syntezę enzymów naprawy DNA i szybkiej naprawy uszkodzeń (Vijayalaxmi i wsp., 1996; Vijayalaxmi i wsp., 2004).

Modulacja genotoksycznej aktywności irinotekanu przez melatoninę jest w znacznym stopniu uzależniona od typu komórek nowotworowych oraz od mechanizmów działania chemioterapeutyku. Biorąc pod uwagę małą toksyczność melatoniny i jej zdolność do zmniejszania skutków ubocznych może przyczynić się do uzyskania efektów terapeutycznych, porównywalnych do uzyskanych dla samego chemioterapeutyku, ale przy znacznie mniejszych jego dawkach. Melatonina poprzez swoje zdolności antyoksydacyjne zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowany cytostatyk oraz odgrywa rolę w hamowaniu aktywności telomerazy co ma znaczenie w przewyciężaniu oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki (Fugatami i wsp., 2001). Melatonina ma także zdolność hamowania glikoproteiny P, która uczestniczy w usuwaniu leku z komórek

nowotworowych (Goldman, 2000), czym również można tłumaczyć jej synergistycznie działanie z irinotekaniem.

Obiecujące wyniki dotyczące modulacji genotoksyczności irinotekanu w obecności antyoksydantów skłoniły mnie do podjęcia dalszych badań mających na celu zbadanie efektów proapoptotycznych bądź nekrotycznych w ww. opisanych układach doświadczalnych. Wyniki tych analiz zostały zebrane w kolejnej publikacji:

**4. R. Kontek, M. Jakubczak, K. Matławska-Wąsowska, 2014, The antioxidants, vitamin A and E but not vitamin C and melatonin enhance the proapoptotic effects of irinotecan in cancer cells in vitro, *Toxicology in Vitro* 28: 282-291.**

W pracy podjęto próbę oceny czy antyoksydanty (witaminy A, C i E oraz melatonina) mają wpływ na zdolność do indukcji apoptozy przez irinotekan w komórkach A549 i HT29 przy użyciu testu TUNEL i cytometrii przepływowej. Dodatkowo w celu wizualizacji zmian morfologicznych jakie występują w komórkach podczas apoptozy i/lub nekrozy zastosowano podwójne barwienie fluorochromami: oranżem akrydyny i bromkiem.

Na temat właściwości proapoptotycznych witamin A, C i E oraz melatoniny opublikowano wiele prac, w których zauważono ich zdolności do eliminowania komórek nowotworowych w określonych warunkach (Rietjens i wsp. 2002). Wykazano, że witamina C indukuje apoptozę w komórkach poprzez aktywację interleukiny 1 $\alpha$ , zwiększenie poziomu białka p53 oraz p21, powodując spadek potencjału transbłonowego mitochondriów czy też poprzez indukcję czynnika AIF (białko uwolnione z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy) (Sakagami i wsp., 2000; Lin i wsp., 2006; Hong i wsp., 2007). Jednak, inne doniesienia literaturowe wskazują, że witamina C wpływa na ekspresję genów uczestniczących w procesie apoptozy, hamując ten proces m.in. poprzez supresję kaspazy 3 oraz wzrostem ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę interleukin 2, 4, 12 i 15, które są czynnikami hamującymi śmierć komórki (Campbell i wsp., 1999; Wittenberg i wsp., 1999; Huang i wsp., 2002). Z kolei, witamina E indukuje apoptozę poprzez hamowanie kinaz tyrozynowych (OTKs), które w komórkach nowotworowych hamują proces apoptozy oraz stymulują niezależną od czynników wzrostu, proliferację komórkową (Claycombe i Meydani, 2001; Ricciarelli i wsp., 2002). Ponadto ma zdolność regulowania transkrypcji wielu genów, m.in. związanych z przekazywaniem sygnałów i kontrolą cyklu komórkowego (Azzi i wsp., 2004). Badania *in vitro* pokazują, że  $\alpha$ -tokoferol wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego m.in. w liniach raka stercza (Venkateswaran i wsp., 2004). Witamina A indukuje apoptozę przez kwas 9-*cis*-retinowy lub kwas *trans*-retinowy (np. rak prostaty), jak również przez indukcję proapoptycznej kaspazy 7 i 9 (Donato i Noy, 2005).

Z kolei melatonina wykazuje działanie onkostatyczne i antyproliferacyjne, a także proapoptotyczne w stosunku do wielu rodzajów nowotworów (Garcia-Santos i wsp., 2006; Rubio i wsp., 2007; Bejarano i wsp., 2011). Wykazano również pozytywny wpływ melatoniny na skuteczność chemioterapii i jej lepszą tolerancję podczas terapii (Cerea i wsp., 2003); Lissoni i wsp., 2003). W prezentowanych wynikach pracy z wykorzystaniem testu TUNEL, najwyższą liczbę komórek TUNEL pozytywnych zaobserwowano po 24-godzinnym działaniu irinotekanu w obecności 25  $\mu\text{M}$  witaminy E lub 10  $\mu\text{M}$  witaminy A, w porównaniu z serią z samym irinotekaniem. W obu przypadkach wykazano korelację pomiędzy ilością komórek wyznakowanych fluoresceiną a zastosowanym stężeniem irinotekanu. W przypadku obecności w roztworach inkubacyjnych witaminy C (50  $\mu\text{M}$ ) lub melatoniny (50  $\mu\text{M}$ ) odnotowano nieznaczny wzrost frakcji komórek apoptotycznych w porównaniu z serią z samym irinotekaniem. Wiadomo, że w teście TUNEL fluoresceina znakuje końce 3'-OH fragmentów ssDNA oraz dsDNA generowanych podczas apoptozy. Jednakże należy zwrócić uwagę, że fragmentacja DNA towarzyszy również innym procesom biologicznym, np. nekrozie, rekombinacji homologicznej, naprawie uszkodzeń DNA. Z drugiej jednak strony, intensywność zielonej fluorescencji w teście TUNEL jest proporcjonalna do poziomu pęknięć nici DNA, a jak wiadomo, tylko podczas apoptozy dochodzi do specyficznej fragmentacji DNA na liczne oligonukleosomalne odcinki, co zwiększa niejako prawdopodobieństwo, że komórki wyznakowane w teście TUNEL są komórkami apoptotycznymi (Loo, 2011). Wyniki uzyskane w teście TUNEL znalazły potwierdzenie w analizie cytometrycznej, gdzie w komórkach A549 pojawiająca się frakcja komórek późnoapoptotycznych była zdecydowanie liczniejsza niż ta obserwowana w komórkach HT29. Może to wynikać z faktu, że komórki we wczesnej fazie apoptozy charakteryzujące się niskim poziomem fragmentacji DNA mogą być niewyznakowane w teście TUNEL (Negoescu i wsp., 1996; Vermes i wsp., 2001), gdzie dodatkowo podczas etapu permabilizacji błon komórkowych, małe fragmenty DNA mogą być niejako gubione i w konsekwencji czego zostać także niewyznakowane. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy dla testu TUNEL wskazują wyższy stopień apoptozy w komórkach A549, niż w komórkach HT29. Analiza cytometryczna dowiodła, że najskuteczniejsza w indukowaniu apoptozy w komórkach A549 i HT29 jest witamina A oraz E. Poziom apoptozy wynosił dla 60  $\mu\text{M}$  irinotekanu w obecności witaminy A w komórkach A549: 38,2% (wczesna apoptoza) i 10,4% (późna apoptoza). W przypadku komórek HT29 uwagę zwraca fakt, że w przeciwieństwie do analogicznej serii przeprowadzonej na komórkach A549, irinotekan (60  $\mu\text{M}$ ) w obecności witaminy A indukował znaczący wzrost tylko frakcji wczesnoapoptotycznej osiągając wartość 29,5%. Natomiast komórek późnoapoptotycznych

było zdecydowanie mniej (3,8%) w porównaniu z komórkami A549. Z kolei inkubacja komórek A549 i HT29 irinotekaniem o wzrastającym stężeniu w obecności 25  $\mu\text{M}$  witaminy E, zwłaszcza przy najwyższym stężeniu irinotekanu indukuje znaczący wzrost populacji komórek będących we wczesnej apoptozie osiągając wartości: 29,4% dla A549 oraz 25,6 % dla komórek HT29, a także będących w późnej apoptozie, gdzie procent ten wynosił 16,3% w komórkach A549 i tylko 2% w komórkach HT29. Mniej efektywne działanie proapoptotyczne wykazała 50  $\mu\text{M}$  witamina C lub 50  $\mu\text{M}$  melatonina w połączeniu z irinotekaniem, chociaż i w tym przypadku odnotowano wzrost stopnia indukcji apoptozy w porównaniu z próbami z samym irinotekaniem. Catani i wsp. (2002) wykazali, że kwas askorbinowy indukuje syntezę białka MLH1 (Mut L homologue-1) biorącego udział w naprawie błędnie sparowanych zasad (mismatch repair) oraz białka p73, indukującego apoptozę. Poprzez indukcję ekspresji genów *MLH1* i *p73* witamina C może wzmacniać antyneoplastyczną aktywność niektórych chemioterapeutyków. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA (spowodowane irinotekaniem) MLH1 uaktywnia drogę przekazywania sygnałów, która prowadzi do aktywacji białka c-Abl, następnie białka p73, a w ostateczności do śmierci komórki.

Skojarzenie antyoksydantów z irinotekaniem wpłynęło na znaczne zwiększenie procentu komórek apoptotycznych w porównaniu z serią bez antyoksydantów przy zachowaniu tych samych stężeń chemioterapeutyku. Zwraca uwagę fakt, że w komórkach A549 oprócz apoptozy odnotowano wzrost stopnia nekrozy, który jednak nie przekroczył poziomu 8,5% (irinotekan 60  $\mu\text{M}$  + witamina A). Dla porównania procent nekroz w komórkach HT29 po inkubacji z 60  $\mu\text{M}$  irinotekaniem w obecności witaminy A wyniósł 1,2%. Niski stopień indukcji nekrozy jest niezwykle ważnym czynnikiem, gdyż treść zdegradowanych komórek nekrotycznych często pozostaje w przestrzeni międzykomórkowej generując lokalne uszkodzenia i czynniki zapalne (Perez i wsp., 2000; Bernstein i wsp., 2002). Dodatkowo przy pomocy fluorescencyjnej analizy mikroskopowej dokonano wizualizacji morfologicznych zmian zachodzących w komórkach A549 i HT29 podczas apoptozy (kondensacja chromatyny, kurczenie się komórki, fragmentacja jądra, tworzenie ciałek apoptotycznych) po działaniu irinotekanu w obecności antyoksydantów wykorzystując podwójne barwienie oranżem akrydyny i bromkiem etydyny. Irinotekan, jak wiele innych ksenobiotyków generuje wysoki poziom stresu oksydacyjnego w układach biologicznych, a wytwarzane reaktywne formy tlenu w pierwszej kolejności atakują błonę komórkową, gdzie dochodzi do procesu peroksydacji lipidów błonowych. Produktami peroksydacji lipidów są m.in. liczne aldehydy, które mogą uszkodzić składniki komórkowe i zakłócać funkcje



życiowe komórki np.: dialdehyd malonowy (MDA), aldehyd akrylowy, aldehyd krotonowy, 4-hydroksy-nonenal – 4-HNE. Wytwarzanie aldehydów odbywa się w wyniku hamowania aktywności kaspazy, co może przyczyniać się do zmniejszonej skuteczności chemioterapeutyków podczas stresu oksydacyjnego. Antyoksydanty poprzez indukcję proapoptotycznych kaspaz (3, 7, 8, 9) skojarzone z lekiem mogą zwiększać aktywność cytotoksyczną leku poprzez ograniczenie peroksydacji lipidów i związane z tym wytwarzanie aldehydów, na skutek stresu oksydacyjnego występującego w trakcie chemioterapii (Conklin, 2000; Dotan i wsp., 2004; Dwivedi i wsp., 2007). Ponadto wzrost wskaźnika apoptotycznego może wynikać z ich wpływu na hamowanie ekspresji białka Bcl-2 (Bast i Haenen, 2002). Przedstawione wyniki sugerują, że antyoksydanty odgrywają ważną rolę w zwiększaniu wrażliwości komórek nowotworowych na działanie cytotoksyczne chemioterapeutyków, zwłaszcza że istnieje niewiele badań, w których oceniano wrażliwość nowotworów na zastosowanie antyoksydantów w skojarzeniu z chemioterapeutykami.

W prezentowanych 4 publikacjach wykorzystano w przeprowadzonych doświadczeniach najbardziej znane związki o charakterze antyoksydacyjnym. W grupie witamin, A i E okazały się być najbardziej efektywne w aspekcie chemioterapii irinotekaniem. Natomiast witamina C wykazała w przeprowadzonych eksperymentach największe działanie antyoksydacyjne – protekcyjne. Pozostałe wykorzystane przeciwutleniacze takiego charakteru nie wykazywały. To skłoniło mnie do podjęcia próby zbadania działania samej witaminy C w układzie z wzorcową reaktywną formą tlenu czyli nadtleniem wodoru w komórkach HT29. Wyniki badań z przeprowadzonych eksperymentów zostały opisane w publikacji:

**5. R. Kontek, B. Kontek, K. Grzegorzczak, 2013, „Vitamin C modulates DNA-damage induced by hydrogen peroxide in the human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro”, *Archives of Medical Science* 6, 1006-1012.**

Celem pracy była analiza wpływu wzrastających stężeń witaminy C na uszkodzenia DNA indukowane nadtleniem wodoru w komórkach gruczolakoraka jelita grubego HT29. Dodatkowo dokonano pomiaru efektywności napraw DNA oraz oceniono charakter indukowanych uszkodzeń przy pomocy glikozydazy formamido-pirymidynowej (Fpg). Uzyskane wyniki dowiodły, że 1 h preinkubacja komórek HT29 z witaminą C o wzrastającym stężeniu (10  $\mu$ M-100  $\mu$ M), pod koniec której materiał poddano 10 min ekspozycji na 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, powoduje znaczący wzrost stopnia migracji DNA w ogonach komet we wszystkich eksperymentalnych seriach. Dla 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M oraz 100  $\mu$ M witaminy C poziom uszkodzeń DNA w komórkach HT29 wyniósł odpowiednio: 18,6%,

21,1%, 25,3% i 27,2%, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (3,26%, podłoże wolne od testowanych związków). W porównaniu z poziomem uszkodzeń DNA po działaniu samego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (29,2%) zaobserwowano spadek tychże uszkodzeń, ale w miarę wzrostu stężenia witaminy C wzrastał też poziom uszkodzeń DNA w testowanych komórkach. Komórki HT29 były zdolne do skutecznej naprawy DNA po 60 min i 120 min postinkubacji w podłożu wolnym od testowanych związków, a wyniki uzyskane po zastosowaniu enzymu naprawczego Fpg potwierdziły oksydacyjny charakter indukowanych uszkodzeń DNA. Dane literaturowe wskazują, że witamina C może charakteryzować się dwoistością działania. I tak, witamina C w zakresie stężeń 100–200 µM może generować znaczącą degradację DNA w ludzkich limfocytach oraz indukować apoptozę w komórkach nowotworowych (Prasad i wsp., 2002; Williams, 2013). Z kolei Błasiak i wsp. (2002a) zaobserwowali, że witamina C w połączeniu z idarubicyną zmniejszała liczbę uszkodzeń DNA w prawidłowych limfocytach, ale w komórkach nowotworowych zwiększała tę liczbę. Ten sam autor (Błasiak i wsp., 2002b) badając modulujący wpływ witaminy C oraz kwercetyny na uszkodzenia indukowane przez MNNG (N-metylo-n-nitro-N-nitrozoguanidyna) w limfocytach człowieka *in vitro* wykazali, że obecność witaminy C o stężeniu 50 µM wpływa hamująco na uszkadzające działanie MNNG, ale w wysokich stężeniach (250 µM) witamina C działa prooksydacyjnie zwiększając poziom uszkodzeń w komórkach. Woźniak i wsp. (2004) odnotowali, że i niższe stężenie witaminy C (50 µM) skojarzonej z cisplatyną zwiększa jej działanie genotoksyczne w prawidłowych i nowotworowych komórkach człowieka. Wyniki uzyskane we wcześniejszych pracach dowiodły, że witamina C o stężeniu 50 µM wykazywała najwyższą aktywność antyoksydacyjną, zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych. Z badań Rehmana i wsp. (1998) wynika, że uzupełnianie diety witaminą C było korzystne u osób, z małym wyjściowym stężeniem tej witaminy w osoczu (mniejsze niż 50 µM), natomiast odwrotny skutek odnosiło, gdy stężenie to było większe niż 70 µM. Rezultaty opisywanej pracy dowodzą, że witamina C zastosowana w niższych stężeniach (10 µM i 25 µM) wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne, które słabną wraz ze wzrostem stężenia witaminy C (50 µM i 100 µM). Autorzy publikacji, które ukazały się w „Science Translational Medicine” (Ma i wsp., 2014; McConnell i Herst, 2014) zwrócili uwagę na ważną rolę antyoksydantów w onkologii, głównie witaminy C. Autorzy publikacji, zwrócili uwagę, że przyjmowanie wysokich dawek witamin C (dożylnie, >200 mg/dobę) znacznie podnosi efektywność chemioterapii w raku jajnika, jednocześnie redukując jej skutki uboczne. Okazało się, że przy odpowiednio wysokim stężeniu witaminy C w przestrzeniach międzykomórkowych formują się cząsteczki nadtlenu wodoru, który uszkadzał DNA

komórek nowotworowych z jednoczesnym upośledzeniem ich metabolizmu oraz wzrostu. Ten sam związek nie wpływał niekorzystnie na zdrowe komórki. Ten odmienny wpływ nadtlenu wodoru na komórki rakowe wynikał z ich trudności przy zamianie glukozy w energię, z czym doskonale poradziły sobie komórki prawidłowe. Wysokie dawki witaminy C doprowadziły w komórkach rakowych do swoistego rodzaju „kryzysu energetycznego”, co poskutkowało zahamowaniem ich proliferacji. Autorzy badań, a także niezależni eksperci są zdania, że tego typu wyniki budzą duże nadzieje i wyraźnie przemawiają za tym, żeby włączyć kwas askorbinowy w terapię onkologiczną.

### **Wykorzystanie wyników:**

Przeprowadzone badania *in vitro* mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli antyoksydantów w czasie trwania chemioterapii, gdyż efekty stosowania suplementacji antyoksydantami pozostają cały czas niejasne. Związki antyoksydacyjne nie tylko bezpośrednio uczestniczą w reakcjach wolnorodnikowych, ale również wpływają na aktywność enzymów oraz ekspresję genów uczestniczących np. w procesach apoptozy i naprawy DNA. Mogą one wykazywać działanie synergistyczne, dzięki czemu możliwe stałoby się zmniejszenie dawki przyjmowanego leku, przy utrzymaniu efektu terapeutycznego na tym samym poziomie. Z drugiej strony, istnieje możliwość obniżenia skutków ubocznych działania chemioterapeutyków na komórki zdrowe, bez wpływu na skuteczność chemioterapii, gdyż antyoksydanty stabilizują cząsteczkę DNA i wpływają na podwyższenie bariery antyoksydacyjnej, co z punktu widzenia chemioterapii jest zjawiskiem niezwykle pożądanym.

Farmakologiczne uzupełnianie niedoborów witamin zwykle skutkuje podniesieniem poziomu tych związków w osoczu, ale nie zawsze wpływa na obniżenie poziomu uszkodzeń w DNA. Chorzy dotknięci chorobą nowotworową, poddawani chemioterapii, powinni mieć określone dawki wyselekcjonowanych preparatów witaminowych, jakie mogą być przyjmowane, zwłaszcza w skojarzeniu z konkretnym lekiem onkologicznym. Wiedza o wzajemnych oddziaływaniach antyoksydantów i innych czynników odżywczych, a także ksenobiotyków, w układach modelowych, a zwłaszcza w organizmie jest bardzo potrzebna i służy bardziej racjonalnemu ich wykorzystaniu w leczeniu i życiu codziennym. Należy brać pod uwagę stan organizmu zwłaszcza, na co wskazują otrzymane w niniejszej pracy wyniki, w trakcie podawania leków wykorzystywanych w chemioterapii.

Z kolei, wykorzystanie nowych kompleksów platyny (II) w połączeniu z irinotekanem dowiodły ich skuteczności w indukcji uszkodzeń DNA w komórkach rakowych. Ponadto

rezultaty badań z kompleksami platyny(II) są dowodem, który przełamuje paradygmat, że kompleksy o konformacji „*trans*” nie wykazują właściwości biologicznych, co należy szczególnie podkreślić. W świetle omówionych wyników, można przyjąć, że strategia otrzymywania nowych kompleksów platyny(II) polegająca na manipulacji cząsteczką *cis/trans*platyny poprzez wprowadzanie zamiast grup amonowych rozmaitych ligandów jest jak najbardziej słuszna. Rezultaty te mogą również stanowić pewne wytyczne w procesie syntetyzowania kolejnych kompleksów na bazie *cis/trans*platyny.

### **Literatura:**

- Adameczyk-Sowa M., Sowa P., Zwirska-Korczala K., Pierzchala K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I.,** 2013, Role of melatonin receptor MT(2) and quinine reductase II in the regulation of the redox status of 3T30-L1 preadipocytes *in vitro*, *Cell Biol. Int.* 37 (8): 835-842
- Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Anisimov S.V., Vesnushkin G.M., Vinogradova I.A.,** 2006, Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen, *Bioch. et Bioph. Acta* 1757: 573-589
- Aranowska K., Graczyk J., Chęcińska L., Pakulska W., Ochocki J.,** 2006, Antitumor effect of Pt(II) amine phosphonate complexes on sarkoma sa-180 in mice. Crystal structure of *cis*-dichlorobis(diethyl-4-pyridylmethylphosphonate- $\kappa N$ )platinum(II) hydrate, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmpe)<sub>2</sub>]H<sub>2</sub>O, *Pharmazie*, 61(5): 457-460
- Azzi A., Gysin R., Kempna P., Munteanu A., Negis Y., Villacorta L., Visarius T., and Zingg J.M.,** 2004, Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031: 86-95
- Baba E., Fujishima H., Kusaba H., Esaki T., Ariyama H., Kato K., Tanaka R., Mitsugi K., Shibata Y., Harada M., Nakano S.,** 2009, Phase I study of the sequential administration of S-1 and cisplatin for metastatic gastric cancer, *Anticancer Res.* 29(5): 1727-1732
- Bast A. and Haenen G.R.,** 2002, The toxicity of antioxidants and their metabolites, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11 (3-4): 251-258
- Bejarano I., Espino J., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., and Rodriguez A.B.,** 2011, Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108 (1): 14-20
- Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H.,** 2002, DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis, *Mutat. Res.* 511: 145-178
- Błasiak J., Gloc E., Woźniak K., Młynarski W., Stolarska M., Skórski T., Majsterek I.,** 2002a, Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine, *Chem. Biol. Interact.* 140: 1-18
- Błasiak J., Trzeciak A., Gąsiorowska A., Drzewoski J., Małecka-Panas E.,** 2002b, Vitamin C and quercetin modulate DNA-damaging effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), *Plant Foods for Hum. Nutr.* 57: 53-61
- Borek C.,** 2004, Dietary Antioxidants and Human Cancer, *Integr. Cancer Therapies* 3(4):333-341
- Burgess D.J., Doles J., Zender L., Xue W., Ma B., McCombie W.R., Hannon G.J., Lowe S.W., Hemann M.T.,** 2008, Topoisomerase levels determine chemotherapy response *in vitro* and *in vivo*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105(26): 9053-9058
- Campbell D., Cole M., Bundittravorn B., and Vella A.T.,** 1999, Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis, *Cell Immunol.* 194 (1): 1-5
- Catani M.V., Costanzo A., Savini I., Levrero M., de Laurenzi V., Wang J.Y., Melino G., Avigliano L.,** 2002, Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage, *Biochem. J.* 364: 441-447

- Cerea G., Vaghi M., Ardizzoia A., Villa S., Bucovec R., Mengo S., Gardani G., Tancini G., and Lissoni P.**, 2003, Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations, *Anticancer Res.* 23 (2C): 1951-1954
- Claycombe K.J. and Meydani S.N.**, 2001, Vitamin E and genome stability, *Mutat. Res.* 475 (1-2): 37-44
- Conklin K.A.**, 2000, Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects, *Nutr. Cancer* 37 (1): 1-18
- Donato L.J. and Noy N.**, 2005, Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling, *Cancer Res.* 65 (18): 8193-819
- Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I.**, 2004, Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 43: 200-227
- Dwivedi S., Sharma A., Patrik B., Sharma R., Awasthi Y.C.**, 2007, Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling, *Redox Rep.* 12: 4-10
- Futagami M., Sato S., Sakamoto T., Yokoyama Y., Saito Y.**, 2001, Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells, *Gynecol. Oncol.* 82: 544-549
- Garcia-Santos G., Antolin I., Herrera F., Martin V., Rodriguez-Blanco J., del Pilar Carrera M. and Rodriguez C.**, 2006, Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells, *J. Pineal Res.* 41: 130-35
- Goldman J.M.**, 2000, Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia, *Lancet* 355: 1031-1032
- Greenlee H., Hershman D.L., Jacobson J.S.**, 2009, Use of antioxidant supplements during breast cancer treatment: a comprehensive review, *Breast Cancer Res. Treat.* 115: 437-452
- Gunawardena K., Murray D. K., and Meikle A. W.**, 2000, Vitamin E and other antioxidants inhibit human prostate cancer cells through apoptosis, *Prostate* 44 (4): 287-295
- Hong S.W., Jin D.H., Hahm E.S., Yim S.H., Lim J.S., Kim K.I., Yang Y., Lee S.S., Kang J.S., Lee W.J., Lee W.K., and Lee M.S.**, 2007, Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducing factor in human breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 18 (4): 811-815
- Huang R.F., Huang S.M., Lin B.S., Hung C.Y., and Lu H.T.**, 2002, N-Acetylcysteine, vitamin C and vitamin E diminish homocysteine thiolactone-induced apoptosis in human promyeloid HL-60 cells, *J. Nutr.* 132 (8): 2151-2156
- Jong F.A., Jonge M.J.A., Verweij Jaap, Mathijssen R.H.J.**, 2005, Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy, *Cancer Letters* 234: 90-106
- Kalinowska U., Matławska K., Lilianna Chęcińska L., Domagała M., Kontek R., Osiecka R., Ochocki J.**, 2005, Synthesis, spectroscopy and antiproliferative activity of cis- and trans-platinum(II) complexes with diethyl(pyridin-4-ylmethyl)phosphate. X-ray crystal structure of trans-Pt(II) complex, *J. Inorganic Biochemistry* 99: 2024-2031
- Kalinowska-Lis U., Ochocki J., Matławska-Wasowska K.**, 2008, Trans geometry in platinum antitumor complexes, *Coordination Chemistry Reviews* 252: 1328-1345
- Kim J.H., Jeong S.J., Kim B., Yun S.M., Choi Y., and Kim S.H.**, 2012, Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells, *J. Pineal Res.* 52 (2): 244-252
- Korkmaz A., Reiter R.J., Topal T., Manchester L.C., Oter S., Tan D.X.**, 2009, Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials, *Mol. Med.* 15: 43-50
- Lamson D.W. and Brignall M.S.**, 1999, Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies, *Altern. Med. Rev.* 4 (5): 304-329
- Lin S.Y., Lai W.W., Chou C.C., Kuo H.M., Li T.M., Chung J.G., and Yang J.H.**, 2006, Sodium ascorbate inhibits growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells, *Melanoma Res.* 16 (6): 509-519
- Lissoni P., Chillelli M., Villa S., Cerizza L., and Tancini G.**, 2003, Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial, *J. Pineal Res.* 35 (1): 12-15

- Loo D.T.**, 2011, In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques, *Methods Mol. Biol.* 682: 3-13
- Malinowska K., Modranka R., Kędziora J.**, 2007, Leki przeciwnowotworowe stosowane w leczeniu oraz będące w fazie badań klinicznych, *Polski Mercuriusz Lekarski XXIII* 135, 165-169
- Mathijssen R.H., van Alphen R.J., Verweij J., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., and Sparreboom A.**, 2001, Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11), *Clin. Cancer Res.* 7 (8): 2182-2194
- Matlawska K., Kalinowska U., Erxleben A., Osiecka R., Ochocki J.**, 2005, Novel analogues of 5-fluorouracil – synthesis, X-ray crystallography and cytotoxic effects in normal human peripheral blood lymphocytes and colon adenocarcinoma HT29, *Eur. J. Inorg. Chem.* 15: 3109-3117
- McConnel M.J. and Herst P.M.**, 2014, Ascorbate combination therapy: new tool in the anticancer toolbox?, *Sci. Transl. Med.* 5: 1-3
- Ma Y., Chapman J., Levine M., Polireddy K., drisko J., Chen Q.**, 2014, High-dose parental ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy, *Sci. Transl. Med.* 6: 1-10
- Murray B.K., Brown B., Scherer P.M., Tomer D.P., Garvin K.R., Hughes B.G., O'Neill K.L.**, 2006, Induction of apoptosis in HT 29 human colon adenocarcinoma cells by 13-cis-retinoic acid and vitamin E succinate, *Nutrition Res.* 26: 186-192
- Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Drouet C., Robert C., Guillermet C., Brambilla C., and Brambilla E.**, 1996, In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations, *J. Histochem. Cytochem.* 44 (9): 959-968
- Pathak A.K., Singh N., Khanna N., Reddy V.G., Prasad K.N., and Kochupillai V.**, 2002, Potentiation of the effect of paclitaxel and carboplatin by antioxidant mixture on human lung cancer h520 cells, *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (5): 416-421
- Pavillard V., Agostini C., Richard S., Charasson V., Montaudon D., Robert J.**, 2002, Determinant of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49: 329-335
- Perez J.M., Miguel A., Fuertes M.A., Alonso C., Navarro-Ranninger C.**, 2000, Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs, *Critic. Rev. Oncol./Hematol.* 35: 109-120
- Prasad K.N., Cole W.C., Kumar B., Prasad K.C.**, 2002. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy, *Can. Treat. Rev.* 28: 79-91
- Rehman A., Collis C.S., Yang M., Kelly M., Diplock A.T., Halliwell B., Rice-Evans C.**, 1998, The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 293-298
- Reiter R.J., Tan D.X., Sainz R.M., Mayo J.C., Lopez-Burillo S.**, 2002, Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs, *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1299-1321
- Ricciarelli R., Zingg J.M., and Azzi A.**, 2002, The 80th anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties, *Biol. Chem.* 383 (3-4): 457-465
- Rietjens I.M., Boersma M.G., Haan L.D., Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N.H., van Zanden J.J., Woude H.V., Alink G.M., and Koeman J.H.**, 2002, The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11: 321-333
- Rubio S., Estevez F., Cabrera J., Reiter R.J., Loro J., and Quintana J.**, 2007, Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells, *J. Pineal Res.* 42: 131-38
- Sainz R.M., Mayo J.C., Rodriguez C., Tan D.X., Lopez-Burillo S., and Reiter R.J.**, 2003, Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells, *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1407-26
- Sakagami H., Satoh K., Hakeda Y. and Kumegawa M.**, 2000, Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K, *Cell Mol. Biol.* 46 (1): 129-143
- Sapra P., Zhao H., Mehlig M., Malaby J., Kraft P., Longley C., Greenberger L.M., Horak I.D.**, 2008, Novel Delivery of SN38 Markedly Inhibits Tumor Growth in Xenografts, Including a Camptothecin-11- Refractory Model, *Clinical Cancer Research* 14(6): 1888-1896
- Seely D. and Oneschuk D.**, 2008, Interactions of natural health products with biomedical cancer treatments, *Cur. Oncology* 15, supp. 2: S81-S86

- Smith N.F., Figg W.D., and Sparreboom A.**, 2006, Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update, *Toxicol. In Vitro* 20 (2): 163-175
- Soprano K.J. and Soprano D.R.**, 2002, Retinoic acid receptors and cancer, *J. Nutr.* 13 (12): 3809S-3813S
- Sugamura K., Gibbs J.F., Belicha-Villanueva A., Andrews C., Repasky E.A., and Hylander B.L.**, 2008, Synergism of CPT-11 and Apo2L/TRAIL against two differentially sensitive human colon tumor xenografts, *Oncology* 74 (3-4): 188-197
- Śliwiński T., Rożej W., Morawiec-Bajda A., Morawiec Z., Reiter R.J., Błasiak J.**, 2007, Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair, *Mutat. Res.* 634: 220-227
- Tsavaris N.B., Polyzos A., Gennatas K., Kosmas Ch., Vadiaka M., Dimitrakopoulos A., Macheras A., Papastratis G., Tsiaras H., Margaritis H., Papalambros E., Giannopoulos A., Koufos Ch.**, 2002, Irinotecan (CPT-11) in patients with advanced colon carcinoma relapsing after 5-fluorouracil-leucovorin combination, *Chemotherapy* 48(2): 94-99
- van Waardenburg R.C., de Jong L.A., van Delft F., van Eijndhoven M.A., Bohlander M., Bjornsti M.A., Brouwer J., Schellens J.H.**, 2004a, Homologous recombination is a highly conserved determinant of the synergistic cytotoxicity between cisplatin and DNA topoisomerase I poisons, *Mol. Cancer Ther.* 3(4): 393-402
- van Waardenburg R.C., de Jong L.A., van Eijndhoven M.A., Verseyden C., Pluim D., Jansen L.E., Bjornsti M.A., Schellens J.H.**, 2004b, Platinated DNA adducts enhance poisoning of DNA topoisomerase I by camptothecin, *J. Biol. Chem.* 279(52): 54502-54509
- Venkateswaran V., Fleshner N.E., and Klotz L.H.**, 2004, Synergistic effect of vitamin E and selenium in human prostate cancer cell lines, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7(1): 54-56
- Vermes I., Haanen C., and Reutelingsperger C.**, 2000, Flow cytometry of apoptotic cell death, *J. Immunol. Methods* 243 (1-2): 167-190
- Vijayalaxmi, Reiter R.J., Herman T.S., Meltz M.L.**, 1996, Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers, *Mutat. Res.* 371: 221-228
- Vijayalaxmi, Reiter R.J., Tan D.X., Herman T.S., Thomas C.R.Jr.**, 2004, Melatonin as a radioprotective agent: a review, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59: 639-653
- Wang D., Lippard S.J.**, 2005, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 307-320
- Williams C.D.**, 2013, Antioxidants and prevention of gastrointestinal cancers, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29 (2):195-200
- Wittenberg B., Kalir H.H., Raviv Z., Kletter Y., Kravtsov V., and Fabian I.**, 1999, Inhibition by ascorbic acid of apoptosis induced by oxidative stress in HL-60 myeloid leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.* 57 (7): 823-832
- Woźniak K., Czechowska A., Błasiak J.**, 2004, Cisplatin – evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and tyrosine kinase inhibitor ST1571, *Chem. Biol. Interact.* 147: 309-318

#### **D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:**

##### **Praca magisterska**

Działalność naukową na Uniwersytecie Łódzkim rozpoczęłam będąc na V roku studiów magisterskich. Kierująca wówczas Zakładem Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ Pani prof. dr hab. Maria Olszewska zaproponowała mi przyjęcie stanowiska asystenta-stażysty w ww. jednostce naukowej, którą to propozycję przyjąłam. Pracę magisterską pt. „Wpływ dodyny na cykl komórkowy komórek merystemu korzeniowego *Vicia faba susp. minor*” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Hübnera oraz prof. dr hab. Reginy Osieckiej, którą

obroniłam w 1990 r. z wynikiem bardzo dobrym W pracy tej stwierdziłam, że substancja czynna wielu fungicydów – dodyna, wywiera efekt cytotoksyczny/mitodepresyjny na badane komórki i wpływa na przebieg cyklu komórkowego merystemów korzeniowych *Vicia faba susp. minor* i jego poszczególnych faz. Po uzyskaniu stopnia magistra biologii, moje zainteresowania skoncentrowały się na zagadnieniach dotyczących cytogenetyki, a konkretnie mutagenyzy. Prof. dr hab. Regina Osiecka przyjęła mnie do swojego zespołu i od tej pory pod Jej ścisłym kierunkiem poznawałam metody badania chromosomów roślinnych. Pani Profesor, osobiście krok po kroku, zapoznawała mnie ze wszystkich rodzajami testów cytogenetycznych (indeks mitotyczny i fazowy, test mikrojądrowy, test aberracji chromosomowych, test aberracji ana-telofazowych), a także ich prawidłową analizą, które wykorzystywałam podczas prowadzonych doświadczeń. Jednocześnie z pracą naukową koncentrującą się na cytogenetyce, zaczęłam prowadzić zajęcia dydaktyczne, ściśle związane z genetyką, cytogenetyką i biologią komórki. Moja praca eksperymentalna dotyczyła cytotoksycznego i genotoksycznego wpływu insektycydów fosforoorganicznych oraz aminofosfonianów na materiał genetyczny komórek roślinnych. W tym czasie byłam kierownikiem i wykonawcą wielu grantów z funduszu badań własnych UŁ, które dotyczyły tych właśnie zagadnień (zał. 4, pkt 1). Oprócz ww. testów cytogenetycznych, dokonywałam również pomiaru zawartości C DNA w komórkach roślinnych, przy zastosowaniu cytofotometru. W 1996 roku podjęłam współpracę z Katedrą Ekologii Stosowanej Uniwersytetu Łódzkiego kierowaną przez prof. dr hab. Macieja Zalewskiego. Dotyczyła ona interesującego zagadnienia zakwitów sinicowych w zaporowych zbiornikach wodnych, które m.in. dostarczały wodę pitną dla miejskiej aglomeracji łódzkiej. Na ten cel otrzymaliśmy grant finansowany przez Komitet Badań Naukowych na lata 1996-1998 nr 6-PO4C-009410, zatytułowany „Badania mutageniczności toksyn pochodzących z zakwitów sinic w wybranych zbiornikach zaporowych”, którego byłam jednym z głównych wykonawców. W ramach ww. grantu, który podzieliliśmy na część cytogenetyczną i ekologiczną, wykonałam analizy wpływu toksyny sinicowej tj. mikrocystyny-LR, na materiał genetyczny komórek roślinnych, przy użyciu metod cytogenetycznych (analiza indeksów podziałowych, test aberracji chromosomowych, zaburzenia ana-telofazowe, test mikrojądrowy, cytofotometryczna analiza cyklu komórkowego). Warto w tym miejscu podkreślić, że testy roślinne jako jedyne zostały zaadaptowane do badań zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i „*in situ*”, ponadto są doskonałymi wskaźnikami cytotoksycznych, cytogenetycznych i mutagenicznych efektów wywołanych działaniem mutagenów środowiskowych. Można je wykorzystywać w celu określenia genotoksyczności



jednego związku chemicznego lub ich mieszaniny. Ponadto, stwierdzono wysoką korelację między rezultatami dotyczącymi mutagenności związków chemicznych w kulturach *in vitro* ssaków, a tymi uzyskanymi w komórkach roślin *in vivo*.

### Praca doktorska

Owoce ww. badań stała się moja rozprawa doktorska pt. „Ocena mutageniczności i cytotoksyczności toksyn produkowanych przez sinice tworzące zakwity w Sulejowskim Zbiorniku Zaporowym w porównaniu z efektem insektycydu fosforoorganicznego dichlorfosu”. Promotorem pracy była prof. dr hab. Regina Osiecka, a recenzentami prof. dr hab. Zofia Walter (Uniwersytet Łódzki) oraz prof. dr hab. Maria Klein (Akademia Rolnicza w Krakowie).

Głównymi osiągnięciami mojej dysertacji było, że:

- dichlorfos, podobnie jak i zbadane ekstrakty z sinic, działa mitodepresyjnie na merystemy korzeniowe *Vicia*
- dichlorfos okazał się być słabym klastogenem, o czym świadczyła nieznaczna (lecz statystycznie wyższa w porównaniu z kontrolą negatywną) częstość indukowanych przez ten insektycyd mikrojąder i aberracji chromosomalnych
- ekstrakty z sinic indukowały znaczną liczbę mikrojąder oraz aberracji chromosomalnych (pęknięcia chromosomów i chromatyd, wymiany interchromatydowe, chromosomy dicentryczne, translokacje)
- cytofotometryczne pomiary zawartości C DNA w merystemach kontrolnych i po działaniu dichlorfosu wykazały, że związek ten hamuje wejście komórek w fazę S i wydłuża czas jej trwania
- w merystemach poddanych działaniu ekstraktów z sinic, przy zastosowaniu metody cytofotometrycznej, zaobserwowano, przedłużenie czasu trwania fazy G<sub>2</sub> i w związku z tym opóźnienie wejścia komórek w mitozę, a także nieznaczne skrócenie fazy S
- dichlorfos był cytotoksyczny dla komórek merystemów korzeniowych *Vicia*, o czym świadczyło nie tylko silne hamowanie aktywności mitotycznej, lecz także drastyczne zmiany w strukturze chromosomów (zlepianie się i zbijanie w grupę oraz tzw. „mglistość” chromosomów) i jąder interfazowych (karioreksja)
- ekstrakty z sinic okazały się również cytotoksyczne dla komórek *Vicia*, chociaż nie stwierdzono tak drastycznych zmian w komórkach, jak po działaniu dichlorfosu
- ekstrakty z sinic zaburzały przebieg cytokinezy (obecność komórek dwujądrowych).

Obrona mojego doktoratu w lipcu 1999 roku, została oceniona bardzo wysoko przez Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, która wnioskowała o wyróżnienie mojej pracy doktorskiej nagrodą Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Łódzkiego. Wyniki analiz cytogenetycznych zostały częściowo opublikowane (zał. 3) oraz były przedstawiane na licznych konferencjach naukowych w Polsce i poza granicami kraju (zał. 3).

### **Praca naukowa po doktoracie**

W trakcie pracy nad ww. grantem, zaczęłam interesować się wykonaniem analiz cytogenetycznych, podobnych do tych, które wykonywałam na materiale roślinnym, ale na komórkach ludzkich, konkretnie limfocytach krwi obwodowej człowieka. Popularyzacja wyników naszych badań budziła ogromne zainteresowanie, jednak często spotykałam się z sugestiami poszerzenia badanego materiału o aspekt ludzki, w różnych układach doświadczalnych, gdyż pomimo korelacji z testami roślinnymi, podanie wyników badań *in vitro* na komórkach ludzkich było bardziej przekonujące i wiarygodne. Od tego momentu równoległe z doświadczeniami na materiale roślinnym, zaczęłam prowadzić badania z wykorzystaniem komórek ludzkich w układzie *in vitro*, gdzie małymi krokami poznawałam interesujący świat cytogenetyki człowieka. Do zmian w profilu moich badań, przyczyniły się nie tylko zainteresowania naukowe, ale także zmiany w strukturze Zakładu Cytologii i Cytochemii Roślin, później Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin, z której 1 października wyłonił się Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, który to w 2008 roku przekształcił się w Katedrę Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin. W ramach Katedry została wyłoniona Pracownia Cytogenetyki, w której pracuję do dnia dzisiejszego.

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam badania dotyczące mutageniczności mikrocystyny-LR, jak również kierowałam i byłam wykonawcą grantów z funduszu badań własnych UŁ, które dotyczyły określania stopnia cytotoksyczności i genotoksyczności anatoksyny-A oraz różnych dodatków do żywności. Przez cały czas intensywnie doskonaliłam swój warsztat pracy, poprzez wprowadzanie do Pracowni nowych metod cytogenetycznych, takich jak: test kometowy, test TUNEL, test MTT, mikroskopia fluorescencyjna (podwójne barwienia fluorochromami), które wykorzystywałam w swoich badaniach. W tym okresie rozpoczęłam współpracę z Katedrą Biochemii Ogólnej UŁ, gdzie włączyłam się w cykl badań dotyczących wpływu insektycydów fosforoorganicznych na aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz transferaz S-glutationowych u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Wpływ insektycydów na różne układy

doświadczalne, był mi dobrze znany z moich wcześniejszych badań. Ponadto, przy okazji tych analiz mogliśmy wykorzystać liczne szczepy *Drosophila melanogaster*, hodowane w Pracowni Cytogenetyki, a wykorzystywane jako materiał doświadczalny do prowadzonych przez nas z Zespołem ćwiczeń z genetyki ogólnej. Współpraca z Katedrą Biochemii Ogólnej UŁ zaowocowała cyklem publikacji w monografiach (zał. 3) i jest kontynuowana do dnia dzisiejszego. Prace nad insektycydami fosforoorganicznymi skłoniły mnie do napisania wspólnie z dr B. Kontkiem, pracy przeglądowej dotyczącej wpływu pestycydów na środowisko naturalne i układ krwionośny człowieka (zał. 3). Dodatkowo, współpracy tej towarzyszyły liczne prezentacje wyników badań poprzez udział w konferencjach naukowych (zał. 3).

Następnie włączyłam się do cyklu badań prowadzonych przez dr ha. A. Błaszczyk prof. nadzw. UŁ dotyczących wpływu etoksyquinu (dodatek m.in. do paszy i karmy dla zwierząt, mączki rybnej, sproszkowanej papryki, chili) na komórki merystematyczne *Vicia* oraz limfocyty krwi obwodowej człowieka, w których zaczęłam łączyć pracę na materiale roślinnym z ludzkim. Wyniki tych badań ukazały się w publikacjach oraz doniesieniach konferencyjnych (zał. 3).

Kolejnym, niezwykle ciekawym tematem moich badań, był wpływ antocyjanów ekstrahowanych z kapusty czerwonej na uszkodzenia indukowane miedzią. Temat badań: „Antyoksydacyjna i antygenotoksyczna aktywność ekstraktów z kapusty czerwonej; hamujący wpływ antocyjanów na uszkodzenia indukowane miedzią”, był wynikiem współpracy podjętej z dr hab. M. Posmyk prof. nadzw. UŁ. oraz prof. dr hab. K. Janas z Katedry Ekofizjologii i Rozwoju Roślin UŁ. Projekt ten, został sfinansowany przez Komitet Badań Naukowych (nr PO4G-044-26), w którym byłam jednym z głównych wykonawców. Eksperymenty cytologiczne i cytogenetyczne przeprowadziłam z wykorzystaniem dwóch modeli doświadczalnych: komórek merystemów korzeniowych *Vicia faba subsp. minor* oraz komórek ludzkich (limfocyty krwi obwodowej człowieka).

W części cytogenetycznej wykazałam, pozytywny wpływ ekstraktu antocyjanów (ATH) z czerwonej kapusty na aktywność mitotyczną komórek merystematycznych *Vicia* eksponowanych na  $\text{Cu}^{2+}$  oraz hamujący wpływ ATH na cytotoksyczne działanie roztworu  $\text{Cu}^{2+}$  na limfocyty krwi obwodowej człowieka. We wszystkich seriach doświadczalnych, w których stosowane były ATH, wartości indeksów mitotycznych były wyższe od tych uzyskanych po inkubacji wyłącznie w roztworze  $\text{Cu}^{2+}$ . Po ekspozycji badanych komórek na roztwory antocyjanów we wszystkich testowanych układach doświadczalnych, odnotowano spadek częstości występowania mikrojąder w porównaniu z materiałem inkubowanym

w roztworze  $\text{Cu}^{2+}$ . Testy komety i TUNEL, potwierdziły pozytywne działanie antocyjanów na komórki roślinne oraz limfocyty człowieka. Eksperymenty wykonane w ramach ww. projektu wykazały, że, wzmożona synteza związków fenolowych takich jak antocyjany w siewkach kapusty czerwonej jest skuteczną taktyką obronną przeciw aktywnym formom tlenu i innym uszkodzeniom, w tym materiału genetycznego, prowokowanym wysokimi stężeniami  $\text{Cu}^{2+}$ . Mieszanina antocyjanów ekstrahowana z siewek i liści główki kapusty czerwonej wykazała znaczące własności antyutleniające, redukcyjne, antygenotoksyczne i detoksyfikujące, co może przeciwdziałać, ograniczać bądź naprawiać zaburzenia biochemiczne i cytogenetyczne wywołane działaniem toksycznych stężeń  $\text{Cu}^{2+}$ . Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w publikacjach oraz były prezentowane na polskich i międzynarodowych konferencjach naukowych (zał. 3). Ponadto, za cykl publikacji pt. „Poszukiwanie i badanie oddziaływań nowych, naturalnych biostymulatorów wspomagających rozwój roślin w warunkach abiotycznych stresów środowiskowych” otrzymałam jako członek zespołu badawczego, Nagrodę Naukową Zespołową Stopnia Pierwszego Rektora Uniwersytetu Łódzkiego (zał. 4).

W roku 2005 kolejny raz poszerzyłam przedmiot swoich badań, o prace na liniach nowotworowych, których hodowle udało się wdrożyć do naszej Pracowni. Dzięki licznej współpracy z wieloma zespołami naukowymi, zarówno na Uniwersytecie Łódzkim, jak i poza nim (zał. 4) mogliśmy wyposażyć Pracownię Hodowli Komórkowych w sprzęt niezbędny do prawidłowego jej funkcjonowania. Wprowadzenie dodatkowego materiału badawczego, zaowocowało podjęciem kolejnej współpracy, tym razem z Zakładem Chemii Bionieorganicznej, Wydziału Farmacji, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w ramach której przebadalam nowosyntetyzowane analogi cisplatyny, w której cząsteczce zostały wprowadzone heterocykliczne ligandy w pozycji *cis* oraz *trans* będące triestrami kwasu fosforowego z pirydyną oraz atomem palladu zamiast platyny. Oceny cytotoksyczności i genotoksyczności *trans*palladu(II) dokonałam z wykorzystaniem dwóch linii nowotworowych oraz komórek prawidłowych człowieka. Wyniki badań zostały opublikowane i zaprezentowane na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych (zał. 3), a jednocześnie skłoniły do dalszych poszukiwań. I tak, na lata 2009 – 2013 przypadła realizacja kolejnego grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (N405 303236): „Poszukiwanie związków o działaniu przeciwnowotworowym w grupie kompleksów jonów metali Pt(II), Pd(II), Ru(II), Cu(II) z fosforoorganicznymi pochodnymi wybranych heterocykli. Synteza, charakterystyka i ocena aktywności cytotoksycznej”, w którym byłam jedynym wykonawcą części biologicznej. Przeprowadzone badania

dowodły, że nowosyntetyzowane kompleksy wykazują zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną zarówno w stosunku do komórek nowotworowych jak i prawidłowych (zał. 3). W 2006 roku otrzymałam Nagrodę Naukową Zespołową Stopnia Pierwszego Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji dotyczących nowych kompleksów platyny(II), a także w 2012 roku po raz drugi przyznano mi Nagrodę Naukową Zespołową Stopnia Pierwszego Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, tym razem za cykl publikacji: „Koordynacyjne właściwości fosforanowych pochodnych pirydyny z wybranymi bimetalami oraz ocena genotoksyczności kompleksów platyny(II) w ludzkich komórkach nowotworowych” (zał. 4).

Równoległe do tych badań, prowadziłam analizy dotyczące genotoksyczności irinotekanu, i jego metabolitu SN-38 w obecności antyoksydantów i nowych kompleksów platyny(II), których wyniki w znacznej części złożyły się na przedstawiane przez mnie osiągnięcie naukowe.

Wykonując badania związane z moją rozprawą habilitacyjną oraz realizując zadania w ramach projektów badawczych nawiązałam współpracę naukową z pracownikami wymienionych w Autoreferacie jednostek Uniwersytetu Łódzkiego oraz Medycznego, jak również Zakładem Molekularnych Podstaw Medycyny UM w Łodzi, Katedrą Chemii Organicznej UŁ, Pracownią Endoskopii Szpitala im. Biegańskiego w Łodzi oraz University of New Mexico Health Sciences Center, Department of Pediatrics, Division of Hematology and Oncology, Albuquerque, NM, USA. Dzięki tej ostatniej wymienionej współpracy udało mi się dopracować wykorzystywane w Pracowni metody cytogenetyczne, ponadto stanowi dla mnie duże wsparcie merytoryczne.

Aktualnie, we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej UŁ oraz Politechniką w Libercu (Czechy), prowadzę badania, nad wpływem nanocząstek węglowych (nanodiamentów, nanorurek, grafemu i ich modyfikacji) na nowotworowe i prawidłowe komórki człowieka, również w aspekcie nośników leków. W ramach tych badań, zespół naukowy będzie aplikował w bieżącym roku o dofinansowanie projektu ze środków Horyzont 2020. Ponadto, pracuję nad analizą właściwości biologicznych nowych związków aminofosfonowych, mających charakter potencjalnych chemioterapeutyków. Z kolei, we współpracy z Pracownią Endoskopii Szpitala im. Biegańskiego w Łodzi, planujemy rozpocząć cykl badań na wybranej grupie pacjentów z nowotworem jelita grubego dotyczące stopnia polimorfizmów genetycznych (SNP).

Jestem również zapraszana do recenzowania manuskryptów naukowych kierowanych do redakcji czasopisma *Drug and Chemical Toxicology*.

Moja działalność dydaktyczna oraz organizacyjna została opisana w Załączniku nr 4.

**Reasumując na cały mój dorobek naukowy składają się:**

- ✓ **publikacje – 25 (w tym wydzielone jako osiągnięcie naukowe – 5),**
- ✓ **komunikaty zjazdowe – 47**

Łączna wartość wskaźnika IF – **20,438 (w tym dla prac wydzielonych IF – 10,535)**

Łączna wartość punktacji MNiSW – **304 (na wydzielone prace 124)**

Suma cytowań na podstawie bazy Web of Science – **106**

h-indeks (Index Hirsch'a): **4 (na podstawie bazy Web of Science)**

Łódź, 8 IV 2014 r.



podpis