

Dr n. med. Sylwia Flis

AUTOREFERAT

*Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w
nowotworach jelita grubego – badania in vitro.*

Zakład Farmakologii
Narodowy Instytut Leków w Warszawie



Warszawa 2015

1. Imię i Nazwisko.

Sylwia Flis
Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2005 stopień doktora nauk medycznych, specjalność biologia medyczna, Instytut Farmakologii PAN, Kraków.

Praca doktorska: ‘Proapoptotyczne i antyangiogenne działanie sulindaku i jego metabolitów’.

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Sławiński

1998 tytuł magistra biologii, specjalność biologia ogólna, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych.

Promotor: Prof. dr hab. Jolanat Sotowska-Brochocka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

od 2006 adiunkt Zakładu Farmakologii, Narodowy Instytut Leków w Warszawie

2010-2012 dwuletni staż podoktorski, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, USA

1998 asystent, Zakład Neurofizjologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A. Tytuł osiągnięcia naukowego.

*Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w nowotworach jelita grubego
– badania in vitro*

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Flis S, Gnyszka A, Flis K (2014) DNA methyltransferase inhibitors improve the effect of chemotherapeutic agents in SW48 and HT 29 colorectal cancer cells. *PloS One* 9(3): e92305. doi:10.1371/journal.pone.0092305

IF₂₀₁₄: 3.234 5-letni IF: 3.702 MNiSW: 40 IC: bd liczba cytowań: 4

Flis S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, Arancibia-Avila P, Toledo F, Leontowicz H, Leontowicz M, Suhaj M, Trakhtenberg S, Gorinstein S (2012) Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 25;62: 68-78.

PMID: [22300907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22300907/).

IF₂₀₁₂: 2.947 5-letni IF: 2.853 MNiSW: 30 IC: bd liczba cytowań: 10

Flis S, Gnyszka A, Flis K, Spławiński J (2010) MS275 enhances cytotoxicity induced by 5-fluorouracil in the colorectal cancer cells. *Eur J Pharmacol* 627: 26-32. PMID: [19853597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19853597/).

IF₂₀₁₀: 2.737 5-letni IF: 2.588 MNiSW: 25 IC: bd liczba cytowań: 15

Flis S, Gnyszka A, Spławiński J (2009) HDAC inhibitors, MS275 and SBHA, enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin in the colorectal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 336-341. PMID: [19596269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19596269/).

IF₂₀₀₉: 2.548 5-letni IF: 2.720 MNiSW: 25 IC: bd liczba cytowań: 13

Flis S, Gnyszka A, Misiewicz-Krzemińska I, Spławiński J (2009) Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205. *Cancer Cell Inter* 9: 10. PMID: [19397792](#)

IF₂₀₀₉: - IF₂₀₁₁: 1.973 5-year IF: 2.471 MNiSW: - IC: bd citations: 4

Gnyszka A, Jastrzebski Z, **Flis S** (2013) DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* 33: 2989-2996. PMID: [23898051](#).

IF₂₀₁₂: 1.872 5-letni IF: 1.879 MNiSW: 20 IC: bd liczba cytowań: 24

Flis S, Flis K, Spławiński J (2007) Epigenetic modifications and cancer. *Nowotwory - Journal of Oncology* 57: 427-434. ICID: [593731](#)

bez IF MNiSW: 6 IC: 5.85 liczba cytowań: bd

Dane podano według listy Journal Citation Reports (JCR/ISI Web of Knowledge) zgodnie z rokiem opublikowania lub w zależności od dostępności danych w bazie ISI Web of Knowledge.

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 1 (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych). Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 2 (Oświadczenia współautorów).

C. Przedstawienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

**Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w nowotworach jelita grubego
– badania in vitro.**

Spośród wszystkich nowotworów złośliwych nowotwory jelita grubego zajmują trzecie miejsce pod względem częstości występowania. W 2012 roku w Europie stwierdzono 447 000 nowych przypadków zachorowań na raka jelita grubego (co stanowi 13% wszystkich nowotworów), z czego częstość zachorowań jest nieco wyższa u mężczyzn (242 000) niż u kobiet (205 000). Również pod względem śmiertelności rak jelita grubego zajmuje niechlubne, drugie miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów ze średnią zgonów 215 000 rocznie [1].

W Polsce nowotwory jelita grubego również zajmują trzecie miejsce wśród nowotworów złośliwych, zaraz po raku płuc i sutka, pod względem zachorowalności. W 2010 r. były one odpowiedzialne za ponad 20% wszystkich zgonów z powodu nowotworów. Niestety podczas gdy w Europie obserwuje się tendencje spadkowe w zachorowalności na nowotwory jelita grubego, w Polsce odsetek chorych utrzymuje się wciąż na tym samym poziomie od 11 lat [2].

Rak jelita grubego (RJG) to najczęściej gruczolakorak rozwijający się na podłożu stanów przedrakowych, do których zaliczamy gruczolaki, zespoły genetyczne (np. polipowatość rodzinna), chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Do raka jelita grubego predysponują również: niewłaściwa dieta (bogata w tłuszcz oraz czerwone mięso), alkohol, otyłość, palenie papierosów, siedzący tryb życia, zaawansowany wiek oraz różnego rodzaju mutagenne czynniki środowiskowe. Należy zaznaczyć, że w nowotworach jelita grubego częściej obserwujemy zachorowania sporadyczne (tj. niezwiązane ze znanym obciążeniem genetycznym/rodzinnym) niż rodzinne, które stanowią 15–30% wszystkich przypadków tej choroby. Niestety tak jak w przypadku większości chorób nowotworowych tak i w nowotworach jelita grubego skuteczność dostępnych metod leczenia jest wciąż niska, pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w onkologii. Utrudnieniem w terapii przeciwnowotworowej jest szybko pojawiająca się oporność na stosowane leki, polegająca na zahamowaniu transportu leku do komórki, nasileniu transportu leku na zewnątrz komórki na skutek aktywacji błonowej glikoproteiny P,

nasileniu inaktywacji leku, mutacji punktu uchwytu leku, wytworzeniu alternatywnego szlaku metabolicznego lub nasileniu naprawy uszkodzeń DNA. Inną niemniej ważną przyczyną jest późna wykrywalność choroby. Rak jelita grubego rozwija się w sposób utajony przez wiele lat. W efekcie tak że w momencie diagnozy w 70% przypadków mamy do czynienia z jego zaawansowanym stadium (III – ok. 40%, IV – ok. 30%; dane dla Polski). Stąd w ostatnich latach kładzie się duży nacisk na wczesną diagnostykę choroby poprzez upowszechnianie badań przesiewowych dla określonych grup ryzyka [2].

Przez lata, główną i niepodważalną przyczyną występowania RJG było nagromadzenie mutacji w obrębie genów kodujących onkogeny (*KRAS*, *BRAF*) lub supresory nowotworowe (*APC*, *TP53*). Takie mutacje prowadzą do rozregulowania podstawowych funkcji komórkowych inicjując w ten sposób transformację nowotworową komórek o prawidłowym fenotypie [3]. Z drugiej strony, badania prowadzone przez ostatnie dwie dekady wykazały, że nie tylko zmiany genetyczne są odpowiedzialne za rozwój nowotworów, ale również zmiany epigenetyczne t.j. hypermetylacja wysp CpG w regionach promotorowych genów oraz deacetylacja reszt lizyny na N-końcowych fragmentach histonów rdzeniowych. W wyniku tych zmian dochodzi do powstania nieaktywnej transkrypcyjnie struktury DNA, heterochromatyny, czego konsekwencją jest brak ekspresji genów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek prowadzący do kancerogenezy, w tym również RJG. Zagadnienia związane z modyfikacjami epigenetycznymi zostały szerzej opisane w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Nowotwory Journal of Oncology* (Flis S et al. 2007). W pracy szeroko przedyskutowano sposób regulacji ekspresji genów w oparciu o metylację DNA i acetylację histonów w prawidłowo funkcjonujących komórkach. Opisano rolę obydwu procesów w procesie nowotworzenia jak również zwrócono uwagę na możliwość praktycznego wykorzystania wiedzy o zmianach epigenetycznych w diagnostyce oraz w terapii przeciwnowotworowej.

Standardem w leczeniu nowotworów jelita grubego jest leczenie chirurgiczne a następnie, w zależności od stadium choroby, chemio- i radioterapia. Dwie ostatnie metody są obarczone nie tylko zróżnicowaną odpowiedzią wśród pacjentów, ale przede wszystkim wyniszczającymi organizm działaniami ubocznymi związanymi ze znaczną toksycznością cytostatyków jak i promieniowania γ . Dlatego badania naukowe ukierunkowane są na poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych lub doskonalenie postaci

farmaceutycznych obecnie stosowanych cytostatyków, czy ich modyfikację chemiczną w celu polepszenia działania.

Nowe odkrycia dotyczące mechanizmów nowotworzenia, jak również słabe efekty dotychczasowych metod leczenia zmuszają do poszukiwania nowych możliwości/rozwiązań terapeutycznych. Nowoczesne metody leczenia nowotworów opierają się obecnie na terapii wielolekowej. Celem takiej terapii jest spotęgowanie efektu leczniczego poprzez równoczesne stosowanie dwóch lub więcej leków różniących się mechanizmem działania, a więc w różny sposób oddziałujących na czynności życiowe komórek nowotworowych, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko wystąpienia objawów niepożądanych (ze względu na możliwość stosowania niższych dawek poszczególnych leków w terapii skojarzonej) oraz powstania oporności.

Standardowe metody leczenia raka jelita grubego są mało skuteczne, zapewniając przejściową poprawę stanu zdrowia u zaledwie <25 % chorych [4]. Połączenie kilku związków w takie schematy jak FOLFOX czy FOLFIRI daje nieco dłuższe przeżycia pacjentów będące wynikiem addytywnego lub synergistycznego oddziaływania łączonych ze sobą leków [5]. Dlatego duże nadzieje pokłada się w poszukiwaniu nowych bardziej efektywnych i mniej toksycznych schematów leczenia z wykorzystaniem terapii skojarzonej. Biorąc pod uwagę fakt, że jedną z przyczyn rozwoju RJG są modyfikacje epigenetyczne, postanowiono zbadać wpływ inhibitorów metylotransferaz DNA oraz deacetylaz histonów (związków odwracających efekt modyfikacji epigenetycznych) na przeżywalność/proliferaację komórek nowotworowych *in vitro*. Podjęcie tego tematu badań było tym bardziej uzasadnione, że w piśmiennictwie niewiele było doniesień naukowych dotyczących zastosowania takich związków w leczeniu guzów litych, zwłaszcza w terapii nowotworów jelita grubego.

W pracach opublikowanych w *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Flis S et al. 2009) oraz w *European Journal of Pharmacology* (Flis S et al. 2010) przedstawiono wyniki badań dotyczące możliwości wykorzystania dwóch inhibitorów deacetylaz histonów (HDACi): MS-275 (entinostat) oraz SBHA (dihydroksyaminowy kwas suberynowy) w połączeniu z 5-fluorouracylem (5-FU) oraz oxaliplatyną (OXA), cytostatykami standardowo wykorzystywanymi w terapii RJG.

Inhibitory HDAC zostały podzielone na kilka grup ze względu na strukturę chemiczną. Do badań wybrano dwa związki, MS-275 oraz SBHA, należące odpowiednio do grupy benzamidów oraz kwasów hydroksyaminowych, wykazujące selektywność względem

enzymów HDAC1 i HDAC3. Wybór związków opierał się m.in. na doniesieniach wskazujących, że w RJG oba enzymy ulegają nadekspresji [6, 7].

Przyjętą hipotezą badawczą było założenie, że wybrane inhibitory HDAC mogą potęgować działanie 5-fluorouracylu i oksaliplatyny, standardowo stosowanych w leczeniu nowotworów jelita grubego, obniżając przeżywalności komórek nowotworowych. Przeprowadzone testy cytotoksyczności potwierdziły zakładaną hipotezę. Inhibitory HDAC, w szczególności MS-275, nie tylko same działały cytotoksycznie na komórki RJG, ale również potęgowały cytotoksyczne działanie 5-FU i OXA. Aby ocenić ewentualne perspektywy zastosowania w leczeniu badanych inhibitorów HDAC, przeprowadzono badania interakcji tych związków z cytostatykami. Badania wykonano na komórkach linii RJG: SW48, HT-29 oraz Colo-205, a do oceny rodzaju interakcji zastosowano dwie metody modelowania farmakologicznego: metodę efektu mediany Chou i Talalay'a oraz metodę izobolograficzną. Pierwsza z nich umożliwia wyznaczenie wartości współczynnika CI (Combination Index) w zależności od poziomu cytotoksyczności [8], natomiast druga pozwala na wyznaczenie rodzaju interakcji pomiędzy badanymi związkami na podstawie wartości IC_{50} , po podaniu pojedynczym oraz w kombinacji. Choć obie metody potwierdziły synergistyczny charakter oddziaływań pomiędzy badanymi związkami, to na szczególną uwagę zasługuje inhibitor HDAC MS-275, ponieważ związek ten wykazywał najkorzystniejszy efekt w połączeniu z 5-FU i OXA.

Łączne podanie HDACi z cytostatykami prowadziło do zahamowania proliferacji poprzez zmiany w progresji cyklu komórkowego. Obserwowano blok w określonych fazach cyklu lub na granicy faz w zależności od rodzaju badanych związków, ich kombinacji oraz linii komórkowej. Związek MS-275, najbardziej aktywny z inhibitorów HDAC w połączeniu z oksaliplatyną, prowadził do zatrzymania komórek w fazie G1 w komórkach linii SW48, podczas gdy w komórkach linii HT-29 i Colo-205 obserwowano odpowiednio blok na granicy faz S/G₂M i G1/S. Inaczej przedstawiały się zmiany w cyklu komórkowym pod wpływem kombinacji MS-275 z 5-FU. W komórkach linii HT-29 oraz Colo-205 obserwowano blok w fazie S, podczas gdy w komórkach SW48 blok ten występował na granicy faz G1/S. Konsekwencją zaburzeń w progresji cyklu komórkowego były zmiany w poziomie takich białek jak: cyklina A, p21 czy p53. Zahamowanie proliferacji komórek często stanowi pierwszy etap zmian zapoczątkowanych cytotoksycznym działaniem substancji chemicznych. Uszkodzenia DNA, czy długotrwałe działanie czynników stresogennych w środowisku są sygnałem dla komórek do zainicjowania kolejnego procesu „obronnego” jakim jest apoptoza

– programowana śmierć komórki. Poddawanie komórek RJG działaniu cytostatyków w połączeniu z HDACi wykazało istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Koinkubacja komórek nowotworowych z obydwoma grupami leków prowadziła również do obniżenia poziomów prokaspaz 8 i 3 oraz proteolitycznej degradacji białka PARP na fragmenty 84 i 25 kDa, wskazując nie tylko na silną indukcję procesu apoptozy, ale również na jej zaawansowany przebieg. Zaobserwowane zmiany wykazały, że indukcja apoptozy w zastosowanym układzie doświadczalnym zachodziła za pośrednictwem szlaku zewnątrzpo pochodnego, nie wykluczając jednak uczestnictwa w tym procesie także szlaku mitochondrialnego. Jednym z ważniejszych parametrów określających dysfunkcję mitochondriów podczas apoptozy jest spadek potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, $\Delta\Psi_m$. Analiza poziomu błonowego potencjału mitochondrialnego $\Delta\Psi_m$, wykazała, że łączne podanie HDACi z cytostatykami prowadzi do wzrostu odsetka komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondrialną. Wykazano ponadto, że kombinacje HDACi z cytostatykami nie tylko indukują oba szlaki apoptozy równocześnie, ale że działanie obu klas związków może się wzajemnie uzupełniać i potęgować wobec komórek nowotworowych.

Pozytywne wyniki badań stały się bodźcem do zaplanowania i przeprowadzenia kolejnej serii doświadczeń z wykorzystaniem inhibitorów metylotransferaz DNA (DNMTi) w połączeniu z cytostatykami.

Podjęcie tego kierunku badań, jak wspomniano wcześniej, podyktowane było doniesieniami, w których wykazano, iż w nowotworach jelita grubego dochodzi do wyciszania aktywnych transkrypcyjnie genów kontrolujących podstawowe procesy komórkowe w wyniku nadmiernej metylacji wysp CpG ich regionów promotorowych. Hipermetylację wykryto m.in. w regionach promotorowych genów zaangażowanych w proliferację komórek (*APC*, *p16*, *p14*, *p15*, *RASSF1A*), naprawę uszkodzeń DNA (*MLH1*, *MGMT*), detoksykację komórek z niektórymi aktywnymi metabolitami kancerogennymi (*GSTP1*), oporność wielolekową (*MDR1*), inwazyjność i przerzuty (*TIMP3*), czy błonowy transport leków (rodzina transporterów *SLC*). Spośród przebadanych genów za najbardziej specyficzne, ulegające najczęściej metylacji w raku jelita grubego uznano *APC*, *p16*, *MGMT*, *MLH1* [9]. Hipermetylacja tych genów jest procesem charakterystycznym dla etapu inicjacji transformacji nowotworowej i może być czynnikiem przyczyniającym się m.in. do niekontrolowanego podziału komórek, unikania apoptozy, czy utraty systemu naprawy błędów replikacyjnych.

Założeniem kolejnych badań było wykazanie, że możliwe jest zastosowanie inhibitorów DNMT w terapii nowotworów jelita grubego, oraz że ich połączenie z cytostatykami może wpłynąć na poprawę efektywności leczenia poprzez „przywrócenie” wewnątrzkomórkowej kontroli nad takimi procesami komórkowymi jak regulacja cyklu komórkowego, naprawa DNA, czy apoptoza.

Obecnie do stosowania w lecznictwie są zatwierdzone przez FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) dwa inhibitory DNMT, będące analogami cytydyny, 5-azacytydina (Vidaza, Celgene) oraz 5-aza-2'-deoksycytydina (decytabina, Dacogen, SuperGen). Rola inhibitorów DNMT w epigenetycznej terapii przeciwnowotworowej oraz mechanizmy działania wybranych związków zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej opublikowanej w *Anticancer Research* (Gnyszka A, Jastrzębski Z, Flis S 2013). Należy jednak nadmienić, że 5-azacytydina i decytabina są już dopuszczone do leczenia zespołu mielodysplastycznego (MDS) oraz ostrej białaczki szpikowej (AML). Oba związki mają niestety swoje ograniczenia, z których najpoważniejszym jest wysoka toksyczność ogólnoustrojowa. Z tego względu poszukiwane są nowe związki charakteryzujące się niższą toksycznością, większą selektywnością i stabilnością w roztworach wodnych. Jednym z takich nowych związków jest zebularina, będąca również analogiem cytydyny, która, jak wykazały badania *in vitro* i *in vivo*, charakteryzuje się wysoką stabilnością oraz niską toksycznością. Dlatego też zebularina została wybrana do zaplanowanych doświadczeń jako jeden z dwóch inhibitorów DNMT. Drugim związkiem włączonym do badań była decytabina. Decytabinę wybrano z powodu większej selektywności, w porównaniu do 5-azacytydyny, gdyż jako analog deoksyrybozy ulega inkorporacji tylko do DNA, a nie jak 5-azacytydina do DNA i RNA, przez co jej działanie jest bardziej specyficzne, a tym samym wykazuje mniejszy efekt toksyczny wobec komórek prawidłowych.

Tak jak poprzednio schemat badań był oparty na przeprowadzeniu szeregu testów cytotoksyczności, analizie typu interakcji pomiędzy badanymi związkami jak również ocenie zmian zachodzących na poziomie podstawowych procesów komórkowych. Efektem przeprowadzonych doświadczeń są dwie publikacje w *Cancer Cell International* (Flis S et al. 2009) oraz *Plos One* (Flis S et al. 2014). Wykazano w nich, że zarówno cytostatyki jak i inhibitory DNMT podawane pojedynczo prowadzą do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych jelita grubego *in vitro* zależnie od dawki i czasu inkubacji. Efekt ten ulegał nasileniu, gdy komórki poddawano działaniu kombinacji badanych związków. Spośród

inhibitorów DNMT, decytabina wykazywała najkorzystniejszy rodzaj interakcji w połączeniu z badanymi cytostatykami tj. synergizm. Analiza rodzaju interakcji dla kombinacji zebulariny z cytostatykami wykazała, że związki te wywołują efekt addytywny lub lekko synergistyczny. Najkorzystniejszy efekt dla zebulariny uzyskano w połączeniu z oksaliplatyną.

Wybrane najkorzystniejsze połączenia badanych związków (wykazujące synergizm lub addycję) były następnie analizowane pod kątem oceny mechanizmu współdziałania. Biorąc pod uwagę sposób działania związków, dokonano analizy poziomu transkryptów wybranych genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki sugerowały, że związki te podawane pojedynczo lub w kombinacji mogą aktywować szlak kinaz ATM/ATR. Ta obserwacja została szerzej opisana w pracy opublikowanej w *Plos One* (Flis S et al. 2014). Aby ocenić stopień zaangażowania szlaku ATM/ATR dokonano oceny poziomu fosforylacji kinaz ATM na Ser1981 i ATR na Ser428. Stwierdzono podwyższony poziom fosforylacji, szczególnie kinazy ATM, świadczący o uruchomieniu mechanizmów komórkowych w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia w DNA (DSB). Dalsze badania potwierdziły podwyższony poziom fosforylacji białek zależnych od kinazy ATM zaangażowanych w mechanizmy naprawcze DNA. Swoistym potwierdzeniem podwyższonego poziomu DSB była wzmożona fosforylacja histonu H2AX na Ser139 (γ H2AX). Do substratów kinazy ATM oprócz H2AX należą również białko p53 oraz białka zaangażowane w regulację/zatrzymanie cyklu komórkowego tj. Chk2 i Chk1, których poziom fosforylacji był również podwyższony, zwłaszcza w komórkach po inkubacji ze związkami podawanymi łącznie. Wzmożona aktywność kinaz ATM/ATR powoduje aktywację białek odpowiedzialnych za naprawę DNA i zahamowanie progresji cyklu komórkowego w czasie tego procesu. Oba zjawiska zostały zaobserwowane podczas naszych badań. Połączenie cytostatyków z inhibitorami DNMT prowadziło do zaburzeń w progresji cyklu komórkowego. W zależności od badanej linii komórkowej, jak również rodzaju interakcji, obserwowano zmiany odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego wskazujących na blok komórek w fazie S/G₂M lub S. Obserwowano również zmiany w poziomie białka p21, cyklin A i D oraz w poziomie transkryptów dla genów *CCNE1* i *ATM*.

W badaniach zakładano również, że zastosowanie inhibitorów DNMT pozwoli na przywrócenie prawidłowej ekspresji wyciszonych genów. Z tego powodu, dokonano analizy stopnia metylacji wybranych genów, takich jak *p16^{INK4a}*, *APC*, *p14^{ARF}*, *DAPK* i *MLH1*, metodą MSP (*methylation specific PCR*), w której zmodyfikowane chemicznie DNA służyło

jako matryca w reakcji PCR. Uzyskane wyniki były porównywalne z wynikami otrzymanymi przez Deng i Ling [10, 11]. W obu badanych liniach komórkowych stwierdzono bialleliczną metylację regionu promotorowego genów *p16^{INK4a}* and *MLH1*, natomiast bialleliczny charakter metylacji genu *p14^{ARF}* obserwowano tylko w komórkach linii SW48. Na szczególną uwagę zasługują geny *p16^{INK4a}* i/lub *p14^{ARF}*, których produkty białkowe biorą udział w regulacji cyklu komórkowego. Pierwszy z nich powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, poprzez hamowanie kinaz zależnych od cykliny D, uniemożliwiając ich aktywację i fosforylowanie przez nie białka Rb (retinoblastoma). Aktywność p16 skutkuje brakiem aktywacji czynnika transkrypcyjnego E2F1, a w efekcie brakiem przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego [12]. Z kolei drugi produkt, białko p14, reguluje cykl komórkowy podczas przejścia z fazy G1 do S oraz z fazy G2 do fazy M działając stabilizująco na białko p53 za pośrednictwem regulatorowego białka MDM2. Brak lub nieprawidłowa ekspresja kluczowych dla cyklu komórkowego białek p16 i p14 może prowadzić w konsekwencji do utraty kontroli nad wyżej wspomnianymi procesami i do rozwoju nowotworu [13, 14].

Analiza transkryptów wyciszonych genów w komórkach po inkubacji z inhibitorami DNMT podawanymi pojedynczo oraz w kombinacji z cytostatykami nie potwierdziła w pełni postawionej hipotezy. Zaobserwowano wyłącznie przywrócenie ekspresji genu *p14* po inkubacji komórek SW48 z decytabiną oraz w mniejszym stopniu po inkubacji 5-FU z decytabiną. Zmian takich nie zaobserwowano w komórkach linii SW48 i HT-29 dla genu *p16*.

Uzyskane wyniki wskazują, że zahamowanie proliferacji w komórkach inkubowanych z inhibitorami DNMT podawanymi pojedynczo lub w kombinacji nie jest efektem reaktywacji wyciszonych genów, lecz właściwości cytotoksycznych DNMTi związanych z wbudowywaniem tych związków do DNA i/lub RNA prowadzącym do hamowania replikacji DNA czy też syntezy białek.

Jednakże obserwowane zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego wynikające z aktywacji procesów naprawczych uszkodzonego DNA po długotrwałej inkubacji komórek z badanymi związkami i ich kombinacjami mogły być jedynie pierwszym etapem całej kaskady procesów komórkowych prowadzących w konsekwencji do apoptozy. Zjawisko takie jest często obserwowane, gdy naprawa uszkodzeń DNA jest niemożliwa. Dlatego dokonano oceny stopnia indukcji apoptozy. Badania wykazały wzrost odsetka komórek apoptotycznych po inkubacji komórek z cytostatykami podawanymi łącznie z inhibitorami DNMT. Stopień

indukcji apoptozy był zależny od rodzaju kombinacji i linii komórkowej. Co więcej, wykazano zmiany w poziomie białek p53, bax a także kaspazy-3. Ponieważ poziom kaspazy-8, szczególnie w przypadku komórek HT-29, nie wydawał się dużo wyższy w porównaniu z kontrolą, świadczyć to mogło o tym, że dochodziło do indukcji procesu apoptozy przede wszystkim za pośrednictwem szlaku mitochondrialnego. Dlatego dokonano oceny poziomu potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej $\Delta\Psi_m$. Wyniki dwuparametrowej analizy cytometrycznej komórek SW48 i HT-29 poddawanych działaniu cytostatyków oraz inhibitorów DNMT jak również ich wzajemnej kombinacji wyraźnie świadczą o depolaryzacji błony mitochondriów. Efekt ten był szczególnie nasilony po poddaniu komórek działaniu kombinacji leków. Silną depolaryzację błony obserwowano po łącznym podaniu oxaliplatyny z decytabiną (komórki SW48) oraz 5-FU z decytabiną lub zebulariną (komórki HT-29). Ponadto dodatkowym markerem zależnego od kaspaz procesu apoptozy w komórkach traktowanych kombinacjami badanych związków była detekcja produktów proteolitycznej degradacji białka PARP (fragment 84kDa). Obserwowano również podwyższony poziom samego białka PARP (113kDa), którego zaangażowanie w procesy naprawy DNA związane jest przede wszystkim z wykrywaniem oraz sygnalizacją obecności pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA, co może mieć związek z opisywanymi wcześniej procesami.

Wyniki badań potwierdziły możliwość otrzymania korzystnych interakcji pomiędzy cytostatykami a inhibitorami HDAC lub DNMT w terapii nowotworów jelita grubego. Zdobyta wiedza o mechanizmie działania badanych kombinacji leków na poziomie komórkowym może być pomocna w zastosowaniu obu grup inhibitorów w rozszerzonych badaniach przedklinicznych. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań mają nie tylko istotne znaczenie poznawcze, ale także praktyczne stanowią podstawę do przyszłych zastosowań terapeutycznych.

W trakcie pracy naukowej związanej z poszukiwaniem nowych, bardziej efektywnych sposobów leczenia nowotworów jelita grubego pojawiła się również możliwość prowadzenia badań nad przeciwnowotworowymi właściwościami produktów pochodzenia naturalnego w ramach międzynarodowego zespołu badawczego kierowanego przez Prof. S. Gorinstein z *Zakładu Chemii Medycznej i Produktów Pochodzenia Naturalnego, Wydziału Farmacji, Uniwersytetu Hebrajskiego w Jerozolimie.*

Jak wspomniano wcześniej, rak jelita grubego jest drugą pod względem częstości przyczyną śmierci z powodu chorób nowotworowych w krajach uprzemysłowionych. Jedną z przyczyn tego stanu upatruje się w złych nawykach żywieniowych ze znacznym udziałem żywności przetworzonej przemysłowo. Populacja w której stwierdza się raka jelita grubego stosuje najczęściej dietę ubogą błonnikową z dużą ilością białka, tłuszczów i cukrów prostych. Dlatego też owoce będące bogatym źródłem substancji bioaktywnych mogą odgrywać istotną rolę w chemoprewencji oraz wspomaganie chemioterapii tego nowotworu.

Obserwacje epidemiologiczne wskazują na szczególnie istotne znaczenie modyfikacji żywieniowych w profilaktyce nowotworów przewodu pokarmowego. Ma to prawdopodobnie związek z bezpośrednim kontaktem substancji bioaktywnych występujących w jadalnych produktach roślinnych z tkanką nowotworową. Liczne dane literaturowe wskazują na przeciwnowotworowe działanie wyciągów roślinnych obfitujących w polifenole. W badaniach *in vitro* w warunkach hodowli komórkowych stwierdzono, że mechanizm przeciwnowotworowej aktywności polifenoli nie wiąże się jedynie z ich powszechnie znanymi właściwościami antyoksydacyjnymi neutralizującymi działanie substancji rakotwórczych, lecz polega również na oddziaływaniu na takie procesy biologiczne jak przekazywanie sygnałów komórkowych, proliferacja i różnicowanie komórek, apoptoza, angiogeneza, aktywacja genów supresorowych transformacji nowotworowej i hamowanie aktywności kluczowych enzymów komórkowych takich jak kinazy białkowe, metaloproteazy macierzy, metylotransferazy DNA, cyklooksygenazy i lipooksygenaza [15, 16].

Flawonoidy, stanowiące najliczniejszą grupę polifenoli roślinnych obejmującą ponad 4000 związków, stały się na świecie przedmiotem intensywnych badań pod względem działania przeciwnowotworowego w raku jajnika, piersi, szyjki macicy, trzustki i prostaty. Wykazano, że związki te na poziomie molekularnym mogą wpływać hamująco na każdy etap kancerogenezy tj. zarówno na inicjację, promocję jak i progresję tego procesu. Można więc oczekiwać, że produkty roślinne obfitujące we flawonoidy a zwłaszcza preparaty lecznicze zawierające wyciągi z tych produktów znajdą zastosowanie nie tylko w prewencji chorób nowotworowych ale również dla zwiększania skuteczności ich standardowej terapii, w tym terapii raka jelita grubego.

Wśród szerokiej gamy owoców dostępnych na rynku polskim i światowym dużym zainteresowaniem, ze względu na walory smakowe oraz działanie prozdrowotne, cieszą się owoce jagodowe, które mogą stanowić bardzo cenne uzupełnienie diety ubogiej w substancje bioaktywne pochodzenia roślinnego z powodu złych nawyków żywieniowych.

Korzystając z możliwości otrzymania z Chile unikalnego materiału badawczego przeprowadzono w warunkach *in vitro* badania porównawcze działania przeciwnowotworowego wyciągów z owoców czterech roślin jagodowych.

Celem badań było:

(i) określenie zawartości substancji bioaktywnych z grupy polifenoli w wyciągach z owoców polskiej i chilijskiej borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus*) oraz z owoców krzewów chilijskich z rodziny mirtowatych: murtilla („Murtilla”; *Ugni molinae*) i mirteola („Murtilla-like”; *Myrteola nummularia*) stosowanych tradycyjnie w fitoterapii chorób przewodu pokarmowego;

(ii) ocena właściwości antyproliferacyjnych i proapoptotycznych ekstraktów z tych owoców wobec komórek raka jelita grubego.

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że wszystkie analizowane ekstrakty z jagód zawierają znaczną ilość substancji bioaktywnych z grupy polifenoli i charakteryzują się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym.

Spośród czterech ekstraktów owoców jagodowych najbardziej aktywnym okazał się wyciąg z jagody chilijskiej Murtilla (MT), o wysokiej całkowitej zawartości polifenoli (78.0 mg GAE/g) w tym flawonoidów (27.3 mg CE/g) i flawanoli (7788 µg CE/g). Ekstrakty z MT charakteryzowały się również największą aktywnością antyoksydacyjną. Ze względu na kontrowersje dotyczące miarodajności poszczególnych metod oznaczania potencjału antyoksydacyjnego w materiale biologicznym, do badań wybrano cztery najczęściej stosowane na świecie metody szacowania tego parametru oparte na: ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)], DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl), FRAP (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*) oraz CUPRAC (ang. *cupric reducing antioxidant capacity*) [17]. Niezależnie od zastosowanej metody oznaczeń, wykazano ścisłą zależność

między poziomem polifenoli a aktywnością antyoksydacyjną. Wzrostowi zawartości polifenoli towarzyszył wzrost aktywności antyoksydacyjnej. Takie właściwości mogą okazać się szczególnie przydatne w chemoprewencji i/lub leczeniu nowotworów. Jednym z czynników odpowiedzialnych za transformację nowotworową komórek są reaktywne formy tlenu (RTF) odgrywające kluczową rolę nie tylko na etapie inicjacji, ale również promocji i progresji procesu kancerogenezy. Permanentny stres oksydacyjny w komórkach prowadzi do zaburzenia integralności i stabilności DNA oraz uszkodzenia innych makrocząsteczek prowadząc do zaburzenia podstawowych funkcji biologicznych komórek takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza [18]. Neutralizacja wolnych rodników, zahamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za ich powstawanie (oksydaza ksantynowa), inaktywacja enzymów zaangażowanych w procesy replikacji DNA (Pol ϵ , TOP2) wpływ na aktywność białek zaangażowanych w regulację przebiegu cyklu komórkowego czy indukcję apoptozy są głównym celem przeciwnowotworowej aktywności polifenoli [19].

W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazano, że komórki nowotworowe jelita grubego poddane *in vitro* działaniu wyciągu MT w stężeniu równym wartości IC_{50} , wynoszącej $751\mu\text{g/ml}$ dla komórek linii HT-29 i $858\mu\text{g/ml}$ dla komórek linii SW48 wykazują zaburzenia w progresji cyklu komórkowego. Zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek w fazie G1 przy jednoczesnym wzroście odsetka komórek w fazie S (komórki SW48) lub na granicy faz S/G2-M (komórki HT-29). Pod wpływem ekstraktu z MT dochodziło nie tylko do zahamowania proliferacji, ale również do indukowania śmierci komórek nowotworowych na poziomie 70-80% w zależności od badanej linii komórkowej i czasu inkubacji.

Warto również zaznaczyć, że badane ekstrakty MT, MTL oraz BBP charakteryzowały się wysokim stężeniem polifenoli zaliczanych do flawanoli. Grupę tę stanowią związki zwane katechinami, które oprócz właściwości antyoksydacyjnych mogą również regulować poziom modyfikacji epigenetycznych w komórkach nowotworowych poprzez hamowanie aktywności enzymów metylotransferaz DNA (DNMT). Zastosowanie produktów naturalnych bogatych w katechiny może mieć istotne znaczenie w nowotworach jelita grubego, w których obniżona ekspresja genów supresorowych wynika nie tylko z mutacji ale również z modyfikacji epigenetycznych takich jak metylacja wysp CpG w sekwencjach promotorowych [20, 21]. Badania z zastosowaniem galusanu epigallokatechiny (EGCG) wykazały reaktywację genów *p16* oraz *RAR β* w komórkach raka jelita grubego [22]. Być może również w przeprowadzonych przez nas doświadczeniach dochodziło do reaktywacji genów

wyciszonych w wyniku metylacji. Obie badane linie charakteryzują się m.in. metylacją genów $p16^{INK4a}$ oraz $p14^{ARF}$, co opisano we wcześniejszej części autoreferatu. Obserwowane zahamowanie progresji cyklu komórkowego komórek SW48 i HT-29 poddanych działaniu ekstraktów z owoców jagód MT, MTL i BBP mogło wynikać również z przywrócenia aktywności wyciszonych genów poprzez ich demetylację.

Potencjał preparatów pochodzenia roślinnego w zapobieganiu i/lub wspomaganiu terapii chorób nowotworowych jest wciąż niedoceniany. Taki stan rzeczy wynika z faktu, że mechanizm przeciwnowotworowego działania roślinnych substancji bioaktywnych w tym polifenoli nie został jak dotychczas dostatecznie wyjaśniony. Wiadomo, że polifenole, posiadają właściwości antyoksydacyjne i immunomodulujące, wykazują również wpływ na aktywność białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego (np. cyklin), białek pro- i antyapoptotycznych (np. p21, p53, czy Bcl-2) oraz enzymów odpowiedzialnych za biotransformację mutagenów. Efekty tego działania mogą być jedną ze składowych szerokiego spektrum aktywności przeciwnowotworowej polifenoli.

Wyniki potwierdzające przeciwnowotworową aktywność ekstraktów badanych owoców jagodowych wobec komórek raka jelita grubego zostały opublikowane w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Flis S et al. 2012).

Podsumowanie:

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych prac uważam:

- Potwierdzenie możliwości uzyskania korzystnych interakcji (synergizm lub addycja) między cytostatykami (5-FU, oxaliplatyna) a inhibitorami HDAC lub DNMT.
- Wykazanie, że synergistyczne działanie ocenianych kombinacji leków ma związek z nasileniem sygnałów komórkowych odpowiedzialnych za indukcję procesu apoptozy.
- Wykazanie, że inhibitory HDAC oraz DNMT mogą znaleźć zastosowanie w terapii wielolekowej nowotworów jelita grubego.
- Dostarczenie zweryfikowanych doświadczalnie podstaw do opracowania nowych schematów terapii wielolekowej w nowotworach jelita grubego.

- Potwierdzenie w warunkach *in vitro* hipotezy, że niektóre gatunki owoców roślin jagodowych, wykorzystywane w diecie jako naturalne źródło antyoksydantów, mogą nie tylko zapobiegać rozwojowi chorób nowotworowych poprzez neutralizację wolnych rodników i przywracanie równowagi procesów oksydoredukcyjnych w organizmie, ale mogą także skutecznie blokować cykl życiowy komórek nowotworowych oraz indukować proces apoptozy sprzyjając zmniejszeniu ryzyka nowotworów jelita grubego.

Piśmiennictwo:

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49: 1374–1403.
2. Sytuacja zdrowotna ludności polskiej i jej uwarunkowania. PZH NIZP, pod red. Bogdana Wojtyniaka, 2012 Warszawa.
3. Krakowczyk Ł, Strzelczyk JK. Epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów w rozwoju raka jelita grubego. *Wsp Onkol.* 2007;11: 289-294.
4. Sharma S, Saltz LB. Oral chemotherapeutic agents for colorectal cancer. *Oncologist.* 2000;5:99-107.
5. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, Tveit KM, Gibson F. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2015;14:1-10.
6. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem.* 2006; 281: 13548-58.
7. Weichert W, Röske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 1669-1677.
8. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22: 27-55.
9. Zitt M, Zitt M, Müller HM. DNA methylation in colorectal cancer--impact on screening and therapy monitoring modalities? *Dis Markers.* 2007; 23: 51-71.

10. Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86: 574-579.
11. Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 2004;11:3:28.
12. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996;16: 859-867.
13. Skrzypski M, Jassem E, Jassem J. Alterations of locus P16INK4a/P14ARF in non-small cell lung cancer. *Pneumonol. Alergol. Pol* 2003: 71: 471-478.
14. Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S. p14^{ARF} induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene.* 2003;22: 1822-1835.
15. Majewska M, Czczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farm Pol* 2009: 65: 369-377.
16. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem.* 2013: 24: 1415-1422.
17. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005: 53: 1841-1856.
18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000: 7:100: 57-70.
19. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives *3 Biotech.* 2013;3: 439–459.
20. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics.* 2011;3: 503-518.
21. Ong TP, Moreno FS, Ross SA. Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011: 4: 275-292.
22. Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, Haslberger A. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components - the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol.* 2012;167: 279-297.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A. Publikacje naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Flis S, Statkiewicz M (2015) DNA Methylation in Colon Cancer: Challenges and Opportunities. *Epigenetic Diagnosis & Therapy* 1(1):14-18.

IF: brak MNiSW: - IC: bd

Nieborowska-Skorska M, **Flis S**, Skorski T (2014) AKT-induced reactive oxygen species generate imatinib-resistant clones emerging from chronic myeloid leukemia progenitor cells. *Leukemia* 28:2416-2418 PMID [25151958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25151958/).

IF₂₀₁₄: 10.431 5-letni IF: 9.158 MNiSW: 45 IC: bd

Bolton-Gillespie E, Schemionek M, Klein HU, **Flis S**, Hoser G, Lange T, Nieborowska-Skorska M, Maier J, Kerstiens L, Koptyra M, Müller MC, Modi H, Stoklosa T, Seferynska I, Bhatia R, Holyoake TL, Koschmieder S, Skorski T (2013) Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* 121: 4175-4183 PMID: [23543457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23543457/).

IF₂₀₁₃: 9.775 5-letni IF: 9.609 MNiSW: 45 IC: 103

Jastrzębska E, **Flis S**, Rakowska A, Chudy M, Jastrzebski Z, Dybko A, Brzózka Z (2013) A microfluidic system to study the cytotoxic effect of drugs: the combined effect of celecoxib and 5-fluorouracil on normal and cancer cells. *Microchim Acta* 180, 895-901. PMID: [23805007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805007/)

IF₂₀₁₃: 3.719 5-letni IF: 3.118 MNiSW: 25 IC: bd

Slupianek A, Falinski R, Znojek P, Stoklosa T, **Flis S**, Doneddu V, Pytel D, Synowiec E, Blasiak J, Bellacosa A, Skorski T (2013) BCR-ABL1 kinase inhibits uracil DNA glycosylase UNG2 to enhance oxidative DNA damage and stimulate genomic instability. *Leukemia* 27: 629-634. PMID: [23047475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23047475/).

IF₂₀₁₃: 9.379 5-letni IF: 8.657 MNiSW: 45 IC: bd

Nieborowska-Skorska M, Kopinski PK, Ray R, Hoser G, Ngaba D, **Flis S**, Cramer K, Reddy MM, Koptyra M, Penserga T, Glodkowska-Mrowka E, Bolton E, Holyoake TL, Eaves CJ, Cerny-Reiterer S, Valent P, Hochhaus A, Hughes TP, van der Kuip H, Sattler M, Wiktor-

Jedrzejczak W, Richardson C, Dorrance A, Stoklosa T, Williams DA, Skorski T (2012). Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 119: 4253-4263. PMID: [22411871](#).

IF₂₀₁₂: 9.060 5-letni IF: 9.338 MNiSW: 45 IC: 103

Jędrych E., Flis S., Sofińska K., Jastrzębski Z., Chudy M., Dybko A., Brzózka Z (2011) Evaluation of cytotoxic effect of 5-fluorouracil on human carcinoma cells in microfluidic system. *Sensors and Actuators B* 160: 1544-1551

IF₂₀₁₁: 3.898 5-letni IF: 3.751 MNiSW: 40 IC: bd

Flis S, Spławiński J (2009) Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cells survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res.* 29: 435-442. PMID: [19331183](#)

IF₂₀₀₉: 1.428 5-letni IF: 1.449 MNiSW: 20 IC: bd

Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk D, Jędrych A, Jastrzębski Z, Remiszewska M, Spławiński J (2006) Angiogenic effect of sulindac sulfide could be secondary to induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Anticancer Res.* 26: 3033-3042. PMID: [16886631](#)

Brak w bazie IF z roku 2006; IF 2008: 1.390 5-letni IF: 1.472 MNiSW: 20 IC: bd

Elwich-Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2003) Antiangiogenic and apoptotic effects of metabolites of sulindac on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). *Hybrid Hybridomics* 22: 55-60. PMID: [12713691](#)

Brak w bazie IF z roku 2000; IF₂₀₀₈: 0.321 5-letni IF: 0.357 MNiSW: 15 IC: bd

Elwich S (Flis), Spławiński J (2000) Czy istnieje związek pomiędzy prolaktyną a rakiem piersi u człowieka? *Polish Journal of Endocrinology* 51: 149–157.

bez IF; MNiSW: 15 IC₂₀₀₂: 2.63

Elwich S (Flis), Nowakowska A, Pokorski M (1998) Neuromelanin – hypothetical modifier of the redox reactions in the carotid body. *Aktualia w fizjopatologii i klinice oddychania* 17-24.

bez IF; MNiSW: brak IC: bd

B. Summaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania:	62.507
C. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS):	181
D. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS):	10

E. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.

Od 2007 – kierownik projektów badawczych realizowanych w Narodowym Instytucie Leków w ramach działalności statutowej.

Wniosek nr N N405 139139 "Inhibitory metylotransferaz DNA a cytostatyki - poszukiwanie nowych kombinacji leków w terapii nowotworów jelita grubego". Umowa nr 1391/B/PO1/2010/ 39, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowy Instytut Leków, kierownik projektu (zakończony).

Wniosek nr N N204 145040 "Opracowanie i wykonanie mikrosystemu typu lab-on-a-chip do badań aktywności związków o potencjalnym działaniu cytostatycznym" Umowa nr 1450/B/H03/2011/40, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Politechnika Warszawska, główny wykonawca (zakończony).

Wniosek nr 2013/09/D/ST5/03887 „Badanie wpływu modyfikacji powierzchni poli(dimetylosiloksanu) na jego właściwości fizykochemiczne oraz oddziaływanie z materiałem biologicznym”. Umowa nr UMO-2013/09/D/ST5/03887, Narodowe Centrum Nauki, Politechnika Warszawska, wykonawca (w trakcie realizacji).

Wniosek nr 2013/11/B/NZ7/02248 „Zahamowanie aktywności kinazy białkowej PAK jako nowy cel terapeutyczny w przewlekłej białaczce szpikowej (CML)”. Umowa nr UMO-2013/11/B/NZ7/02248, Narodowe Centrum Nauki, Narodowy Instytut Leków, kierownik projektu (w trakcie realizacji).

F. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych.

Flis S, Spławiński J (2008) “Unexpected influence of sulindac sulfide on cytostatic activity of 5-FU and oxaliplatin on colon cancer cells”. 10th Warsaw Days of Cardiological Pharmacotherapy, Warsaw, Poland.

Spławiński J, **Flis S** (2008) ”Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis by sulindac and its metabolites in human endothelial cells” 8th International Conference of Anticancer Research, Kos, Greece, Anticancer Research 24: 5D.

Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2006) ”Proapoptotyczne i antyangiogenne działanie sulindaku i jego metabolitów” 8th Warsaw Days of Cardiological Pharmacotherapy, Warsaw, Poland.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2001) ”Effects of sulindac, non-steroidal anti-inflammatory drug, on angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane”. XXXVII Polish Biochemical Society Meeting, Toruń, Poland.

6. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta:

A. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.

Konferencje międzynarodowe

Nieborowska-Skorsk M, **Flis S**, Skorski T (2014) “Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells (LSCs) and Leukemia Progenitor Cells (LPCs) Display Overlapping and Unique Mechanisms of Genomic Instability: The Role of PI3k-AKT and PI3k-Rac2-PAK Pathways” 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, USA.
<https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper70161.html>

Flis S, Flis K, Statkiewicz M (2013) “DNA methyltransferase 1 inhibitors can enhance the effect of chemotherapeutic agents in colotectal cancer cells” The 11th International Congress on Targeted Anticancer Therapies" (TAT), Annals of Oncology 24 (Supplement 1): i23–i26, Paryż, Francja.

Bolton E, Schemionek M, Klein HU, Hoser G, **Flis S**, Lange T, Kerstiens L, Nieborowska-Skorska M, Muller MC, Modi H, Bhatia R, Koschmieder S, Skorski T (2012) “Genomic Instability in CML-CP originates From the Most Primitive Imatinib-Refractory Leukemia Stem Cells” 54th Annual Meeting and Exposition of the American-Society-of-Hematology (ASH), Atlanta, GA, USA, BLOOD 120:21: Abstract: 909.

Gorinstein S, **Flis S**, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Tashma Z, Arancibia-Avila P, Poorvarodom S, Suhaj M, Trakhtenberg S (2012) „Nutritional and pharmaceutical applications of bioactive compounds of some edible berries and tropical fruits”. 244th National Fall Meeting of the American-Chemical-Society (ACS), Philadelphia, PA, USA.

Cramer K, Bolton E, Nieborowska-Skorska M, **Flis S**, Skorski T (2011) “Targeting DNA Repair Gene, RAD52, Induces Exhaustion of the Proliferating CML-CP Leukemia Stem Cells Carrying Oxidative DNA Damage”. 53rd Annual Meeting and Exposition of the American-Society-of-Hematology (ASH)/Symposium on the Basic Science of Hemostasis and Thrombosis, San Diego, CA, USA, BLOOD 118: 21: pp 206.

Nieborowska-Skorska M, Kopinski P, Ray R, Hoser G, Ngaba D, **Flis S**, Cramer K et al. (2011) “Targeting Rac2-Mitochondrial Respiratory Chain Complex III Signaling to Prevent Genomic Instability in Leukemia Stem and Progenitor Cells”. 53rd Annual Meeting and Exposition of the American-Society-of-Hematology (ASH)/Symposium on the Basic Science of Hemostasis and Thrombosis, San Diego, CA, USA, BLOOD 118: 21: pp 1176-1177.

Jędrych E, Sofińska K, **Flis S**, Chudy M, Jastrzębski Z, Brzózka Z (2010) “Cytotoxicity Tests with 5-fluorouracil in a Microanalytical System”. Drug Analysis - International Symposium on Drug Analysis Antwerp, Belgium.

Jędrych E, Sofińska K, **Flis S**, Chudy M, Jastrzębski Z, Brzózka Z (2010) “Carcinoma cell-based 5-fluorouracil evaluation In microfluidic system”. The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, The Netherlands.

Spławiński J, **Flis S** (2008) ”Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis by sulindac and its metabolites in human endothelial cells” 8th International Conference of

Anticancer Research, Kos, Greece, Anticancer Research 24: 5D.

Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk , Spławiński J (2004) "Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis by sulindac and its metabolites in human endothelial cells" 7th International Conference of Anticancer Research, Corfu, Greece, Anticancer Research 24: 5D.

Popiołkiewicz J, **Flis S**, Polkowski K, Skierski J, Mazurek A (2004) "Activity and mechanism of action of genisein glycoside against colon cancer cell lines". 7th International Conference of Anticancer Research, Corfu, Greece, Anticancer Research 24: 5D.

Flis S, Stachnik K, Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2003) "Proapoptotic effect of metabolites of sulindac on colon cancer cells". FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction, Brussels, Belgium, EJB 270: supp. 1.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2002) "Down-regulation of expression of angiogenic factor receptors parallels the maturation of the vessels of chick chorioallantoic membrane". 7th IUBMB Conference "Receptor-Ligand Interactions, Molecular, Physiological and Pharmacological Aspects, Bergen, Norway.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2001) "Effects of sulindac on angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane". 27th FEBS Meeting 2001, Lisbon, Portugal, EJB 268: supp. 1

Konferencje krajowe

Jędrych E, Sofińska K, **Flis S**, Chudy M, Jastrzębski Z, Brzózka Z (2010) „Microsystem do oceny cytotoksyczności związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym”. VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej – „Analityka dla społeczeństwa XXI wieku". Kraków, Polska.

Flis S, Gnyszka A, Spławiński J (2009) "HDAC inhibitors, MS275 and SBHA, enhance activity of oxaliplatin in human colorectal cancer cells". 11th Warsaw Days of Cardiological Pharmacotherapy, Warsaw, Poland.

Flis S, Spławiński J (2008) “Unexpected influence of sulindac sulfide on cytostatic activity of 5-FU and oxaliplatin on colon cancer cells”. 10th Warsaw Days of Cardiological Pharmacotherapy, Warsaw, Poland

Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2006) “Proapoptotic and antiangiogenic effects of sulindac and its metabolites”. 7th Warsaw Days of Cardiological Pharmacotherapy, Warsaw, Poland

Flis S, Sołtysiak-Pawluczuk D, Stachnik K, Spławiński J (2004) „Effect of sulindac and its metabolites on apoptosis and cell cycle of human endothelial cells”. 4th Multidisciplinary Conference on Drug Research, Gdańsk, Polska.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2002) ”Ekspresja czynników wzrostu i ich receptorów w procesie angiogenezy w rozwijającej się błonie kosmówkowo-omoczniowej (CAM) zarodka kurzego”. XXXVIII Polish Biochemical Society Meeting, Wrocław, Poland.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Spławiński J (2001) ”Effects of sulindac, non-steroidal anti-inflammatory drug, on angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane”. XXXVII Polish Biochemical Society Meeting, Toruń, Poland.

Elwich S (Flis), Sołtysiak-Pawluczuk D, Dąbrowska J, Spławiński J (2000) ” Wpływ pochodnych sulindaku, niesteroidowego leku przeciwzapalnego (NLPZ) na proces angiogenezy w błonie kosmówkowo-omoczniowej (CAM) zarodka kurzego”. XXXVI Polish Biochemical Society Meeting, Poznań, Poland.

B. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych.

Polskie Towarzystwo Cytometrii – 2013, członek

Polskie Towarzystwo Biochemii – 2004, członek

C. Opieka naukowa nad studentami w toku specjalizacji.

Promotor pracy magisterskiej Pani Agnieszki Jagodzińskiej (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, kierunek

Biotechnologia). Tytuł pracy: „Ocena interakcji wybranych cytostatyków ze związkami odwracającymi modyfikacje epigenetyczne w warunkach *in vitro* wobec komórek raka okrężnicy linii Colo-205” - obrona z wynikiem bardzo dobrym w styczniu 2007 r. Praca realizowana w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie.

Opieka naukowa nad pracą magisterską Katarzyny Merkel (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, kierunek Biotechnologia). Promotor – dr Dorota Sołtysiak-Pawluczuk.

Tytuł pracy: „Wpływ hipoksji na ekspresję endogennego czynnika VEGF i jego receptora (Flk-1) w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego” – obrona 2002 r.

Opieka naukowa nad pracą magisterską Kamili Sieczkowskiej (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolniczy, kierunek Biologia). Promotor – dr Dorota Sołtysiak-Pawluczuk.

Tytuł pracy: „Wpływ hipoksji na wybrane angiogenne czynniki wzrostu VEGF i FGF-2 oraz receptory VEGFR-2, FGFR-2 oraz EGFR w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego” – obrona 2003 r.

Opieka naukowa nad pracą magisterską Moniki Zaręby (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolniczy, kierunek Biologia). Promotor – dr Dorota Sołtysiak-Pawluczuk.

Tytuł pracy: „Wpływ sulindaku i jego pochodnych oraz SC-58125 na cykl komórkowy i apoptozę komórek raka okrężnicy Colo-205” – obrona 2003 r.

Opieka naukowa nad studentami Wydziałów Farmaceutycznych odbywającymi praktyki w Zakładzie Farmakologii Narodowego Instytutu Leków.

D. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego.

Promotor pomocniczy (2009-2015) pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Gnyszki (Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny).

Tytuł pracy: „Badania *in vitro* interakcji inhibitorów metylotransferaz DNA (DNMTi) oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDACi) z 5-fluorouracylem w komórkach raka jelita

grubego” – praca obroniona 17 czerwca 2015 r. Praca realizowana w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie.

E. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.

2010-2012 dwuletni staż podoktorski, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, USA

F. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych.

1. European Journal of Pharmacology
2. Current Medical Chemistry
3. PlosOne

G. Inne osiągnięcia.

Współpraca naukowa

1. Prof. dr hab. Tomasz Skórski, Temple University, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Philadelphia, USA.

Od 2012 r. – współpraca jest efektem odbytego stażu podoktorskiego i dotyczy poszukiwania nowych celów terapeutycznych w przewlekłej białaczce szpikowej (CML).

Efektem współpracy jest również grant otrzymany w ramach konkursu OPUS 6 (NCN).

2. Prof. dr hab. Zbigniew Dybko, dr Elżbieta Jastrzębska, Zakład Mikrobioanalitiky, Wydział Chemii Politechniki Warszawskiej.

Od 2009 r. – współpraca dotyczy konstrukcji i wykonywania miniaturowych systemów przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych (*Lab-on-a-chip*), a także oceny ich przydatności, jako metody alternatywnej, do badań cytotoksyczności nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym.

Efektem współpracy są dwie publikacje w *Microchimica Acta* oraz *Sensors and Actuators B*, 3 doniesienia zjazdowe oraz dwa projekty badawcze: N N204 145040 oraz 2013/09/D/ST5/03887.

3. Prof. Shela Gorinstein, Zakład Chemii Medycznej i Produktów Pochodzenia Naturalnego, Wydziału Farmacji, Uniwersytetu Hebrajskiego w Jerozolimie.

Od 2009 – współpraca dotyczy wykorzystania ekstraktów pochodzenia roślinnego w terapii przeciwnowotworowej.

Efektom współpracy jest publikacja w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* oraz doniesienie zjazdowe, jak również grant złożony w ramach konkursu OPUS 7 (NCN).

4. Dr. Krzysztof Flis, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Od 2009 – współpraca dotyczy wykonywania i analizy wyników z zakresu biologii molekularnej w ramach badań nad zastosowaniem związków odwracających efekt modyfikacji epigenetycznych w nowotworach jelita grubego.

Efektom współpracy są dwie publikacje w *PloS One* oraz *European Journal of Pharmacol*, doniesienie zjazdowe oraz projekt badawczy N N405 139139.

5. Mjr lek. Tomasz Chojnacki Klinika Chorób Wewnętrznych i Hematologii, Wojskowy Instytut Medyczny.

Od 2014 - współpraca dotyczy pozyskiwania materiału biologicznego od pacjentów do prowadzonych projektów badawczych.

dr n. med. Sylwia Flis
SFlis
adiunkt Zakładu Farmakologii