

Autoreferat

dr Katarzyna Wiktorska

Narodowy Instytut Leków

Warszawa, 2017

I. Informacje o kandydacie

1. Imię i Nazwisko.

Katarzyna Wiktorska (nazwisko panieńskie: Skupińska)

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

26.06.2008r. - doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi.

Rozprawa doktorska pt. Izotiocyjaniiny jako blokery metabolizmu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Promotor, prof. dr hab. Teresa Kasprzycka-Guttman. Praca wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi.

29.01.2002r - magister fizyki, Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki.

Praca magisterska pt. Badanie oddziaływania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z albuminą. Promotor, dr Elżbieta Bojarska.

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

od 05.2002	Pracownia Mikroskopii Konfokalnej, Zakład Biologii Komórki, Narodowy Instytut Leków
od 01.2009	adiunkt
10.2006-01.2009	asystent
05.2002-10.2006	specjalista d.s. biologii komórki i mikroskopii konfokalnej
od 01.2010	Kierownik Pracowni Mikroskopii Konfokalnej
od 01.2006	Kierownik metody mikroskopii konfokalnej

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

1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Rola sulforafanu i jego analogów w terapii chorób nowotworowych – badania in vitro.

2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę habilitacji

1. Małgorzata Milczarek, Irena Misiewicz-Krzemińska, Katarzyna Lubelska, **Katarzyna Wiktorska***: Combination treatment with 5-fluorouracil and isothiocyanates shows an antagonistic effect in Chinese hamster fibroblast cells line-V79. Acta Pol Pharm, 68: 331-342, 2011. IF₂₀₁₁ 0.663, MNiSW 15.
2. Katarzyna Lubelska, Irena Misiewicz-Krzemińska, Małgorzata Milczarek, Jolanta Krzysztoń-Russjan, Elżbieta Anuszevska, Karolina Modzelewska, **Katarzyna Wiktorska***. Isothiocyanate-drug interactions in the human adenocarcinoma cell line Caco-2. Mol Cell Biochem. 2012, 367:19-29. IF₂₀₁₂ 2.329, MNiSW 15.
3. Katarzyna Lubelska, Małgorzata Milczarek, Karolina Modzelewska, Jolanta Krzysztoń-Russjan, Krzysztof Fronczyk, **Katarzyna Wiktorska***. The interactions between drugs and sulforaphane modulate the drug metabolism enzymatic system. Pharm Rep. 2012, 64: 1243-52. IF₂₀₁₂ 1.965, MNiSW 25.
4. Piotr Kiełbasiński*, Jerzy Łuczak, Tomasz Cierpień, Jarosław Błaszczuk, Lesław Sieroń, **Katarzyna Wiktorska***, Katarzyna Lubelska, Małgorzata Milczarek, Zdzisław Chilmonczyk. New enantiomeric fluorine-containing derivatives of sulforaphane: synthesis, absolute configurations and biological activity. Eur J Med Chem 2014, 76: 332-42. IF₂₀₁₄ 3.477, MNiSW 40.
5. Lidia Śliwka, **Katarzyna Wiktorska***, Piotr Suchocki, Małgorzata Milczarek, Szymon Mielczarek, Katarzyna Lubelska, Tomasz Cierpień, Piotr Kiełbasiński, Anna Jaromin, Anna Flis, Zdzisław Chilmonczyk. The Comparison of Indirect and Direct Toxicity Tests in the Assessment of the Anticancer Agents Interactions. PLOS One 2016;11(5): e0155772. IF₂₀₁₅ 3.057, MNiSW 35.
6. Katarzyna Lubelska, **Katarzyna Wiktorska***, Lidia Śliwka, Małgorzata Milczarek, Ilona Zbroińska-Bregisz, Zdzisław Chilmonczyk. Sulforaphane regulates differently Nrf2 dependent induction of phase II and phase III xenobiotics metabolism in normal and cancer colorectal cells. Nutr Cancer 2016, 03 (5). IF₂₀₁₅ 2.241, MNiSW 20.

7. Tomasz Cierpień, Jerzy Łuczak, Małgorzata Kwiatkowska, Piotr Kiełbasiński*, Lidia Mielczarek, **Katarzyna Wiktorska***, Zdzisław Chilmonczyk, Małgorzata Milczarek, Katarzyna Karwowska. New organofluorine isoselenocyanate analogs of sulforaphane: synthesis and anticancer activity ChemMedChem. 2016;11: 2398-2409. IF₂₀₁₅ 2.980, MNiSW 30.

*autor korespondencyjny

Sumaryczny impact factor i punkty MNiSW : $\Sigma IF = 16,712$, $\Sigma MNiSW = 180$

Ponadto wyniki uzyskane w ramach cyklu habilitacyjnego weszły w skład dwóch zgłoszeń patentowych:

8. Mazur M, Krug P, Wiktorska K, Chilmonczyk Z, Śliwka L. Formułacja farmaceutyczna zawierająca izotiocyjaniany i doksorubicynę do zastosowania w leczeniu nowotworów. Zgłoszenie patentowe PL414021 z dn. 21.09.2015
9. Cierpień T, Kiełbasiński P, Łuczak J, Wiktorska K, Śliwka L, Chilmonczyk Z, Milczarek M, Karwowska K. Nowe analogi sulforafanu, ich prekursorzy, sposób ich wytwarzania, ich zastosowanie oraz postać farmaceutyczna. Zgłoszenie patentowe: P414576 z dn. 27.10.2015.

Oświadczenia autora i współautorów dotyczące udziału w powstaniu publikacji znajdują się w Załączniku 4.

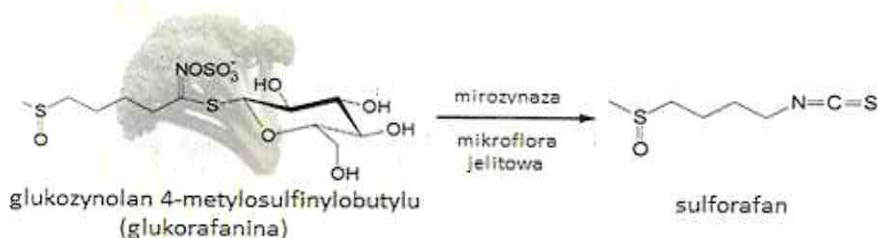
3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, a liczba tych zachorowań wzrasta nieustannie. Skuteczność klasycznej chemioterapii jest niezadowalająca, jej efekty uboczne są poważne i obniżają komfort życia pacjenta. Dlatego istotnym kierunkiem badań jest poszukiwanie nowych rozwiązań dla terapii nowotworów, w tym związków, które mogłyby samodzielnie stać się lekiem lub udoskonalić istniejącą terapię.

Natura jest źródłem wielu związków, które znalazły zastosowanie w terapii nowotworów, jak na przykład paclitaxel wyizolowany z kory cisa zachodniego czy irinotekan -półsyntetyczny analog naturalnego alkaloidu kamptotecyny¹. Natura jest również źródłem związków chemoprewencyjnych, których działanie polega na hamowaniu, opóźnieniu lub odwróceniu procesu kancerogenezy prowadzącego do rozwoju inwazyjnego raka². Liczne badania epidemiologiczne wykazały istnienie zależności pomiędzy spożywaniem diety bogatej w warzywa z rodziny kapustowatych (Brassicaceae), a zmniejszonym ryzykiem zachorowania na nowotwory³. W 1992 roku Zhang i Talalay z zespołem zidentyfikowali związek odpowiedzialny za właściwości chemoprewencyjne brokułów (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck)⁴.

Sulforafan (1-izotiocyjaniano-4-metylosulfinylobutan) jest związkiem z grupy izotiocyjanianów o właściwościach chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych. Jego naturalnym źródłem są warzywa kapustowate: brukselka, czerwona kapusta, a w szczególności brokuły i kiełki brokułu. Sulforafan powstaje w wyniku katalizowanej przez enzym β -tioglukozydazę (mirozynazę) hydrolizy metabolitu wtórnego roślin – glukorafaniny (glukozynolan 4-metylosulfinylobutyli) (Rys. 1). Mirozynaza w tkance roślinnej jest przestrzennie oddzielona od glukorafaniny. Podczas niszczenia tkanki roślinnej, np. w trakcie żucia dochodzi do ich kontaktu i zapoczątkowania reakcji hydrolizy. Proces ten jest wykorzystywany przez rośliny do ochrony przed patogenami i insektami, które niszcząc tkankę roślinną uruchamiają produkcję sulforafanu wykazującego toksyczność wobec nich. Reakcja hydrolizy glukorafaniny może także przebiegać bez udziału β -tioglukozydazy w środowisku mikroflory jelitowej (Rys. 1). Obecnie na rynku sulforafan dostępny jest również w postaci suplementu diety.



Rys. 1. Hydroliza glukorafaniny do sulforafanu⁵.

¹ Dall'Acqua S. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(20):2272-85.

² Sporn MB. *Cancer Res.* 1976;36:2699-2702.

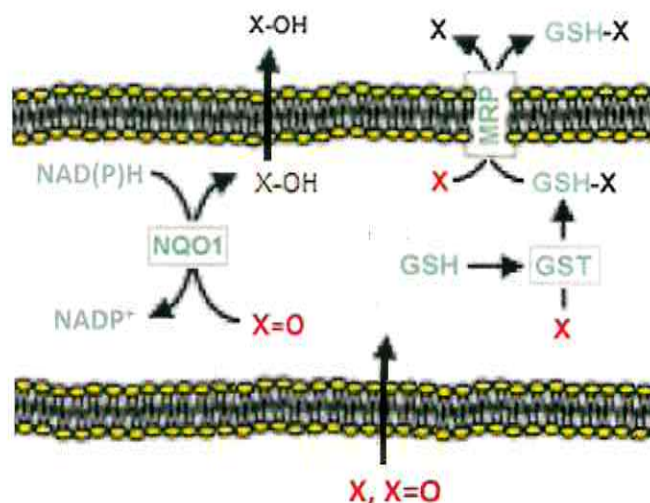
³ Bertram JS, Kolonel LN, Meyskens FL Jr. *Cancer Res.* 1987;47(11):3012-31.

⁴ Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(6):2399-403.

⁵ Boddupalli S, Mein JR, Lakkanna S, James DR. *Front Genet.* 2012;3:7.

Chemoprewencyjne własności sulforafanu są związane z jego zdolnością do pobudzania mechanizmów cytoprotekcyjnych, co prowadzi między innymi do zwiększania ochrony komórkowej przed szkodliwymi substancjami w tym kancerogenami. Zdolność sulforafanu do hamowania rozwoju kancerogenezy została potwierdzona w badaniach *in vivo*. Liczne badania wskazują, że sulforafan hamuje powstawanie indukowanych chemicznie nowotworów, m.in skóry i gruczołu sutkowego w modelach zwierzęcych.^{6,7,8} Powszechnie uważa się, że ta aktywność wynika z wpływu sulforafanu na funkcjonowanie enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków, w tym kancerogenów.

Sulforafan indukuje wzrost aktywności enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych należących do II fazy metabolizmu ksenobiotyków. Sulforafan jest silnym induktorem enzymów z rodziny S-transferaz – glutationowych (ang. glutathione S-transferases, GST) czy dehydrogenazy NAD(P)H, chinon 1 (ang. NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1). GST jest rodziną enzymów katalizujących reakcję sprzęgania związków elektrofilowych z glutationem, natomiast NQO1 odpowiada za redukcję reaktywnych chinonów do mniej toksycznych hydrochinonów (Rys. 2).



Rysunek 2. Funkcje wybranych enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków: rodziny S-transferaz – glutationowych (GST), reduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) i rodziny białek transportowych związanych z opornością wielolekową (MRP). X, ($X=O$) – ksenobiotyk, (chinon); GSH – glutation (forma zredukowana); $NADP^+$, NAD(P)H- fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona i zredukowana)^{9,10}

⁶ Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(8):3147-50.

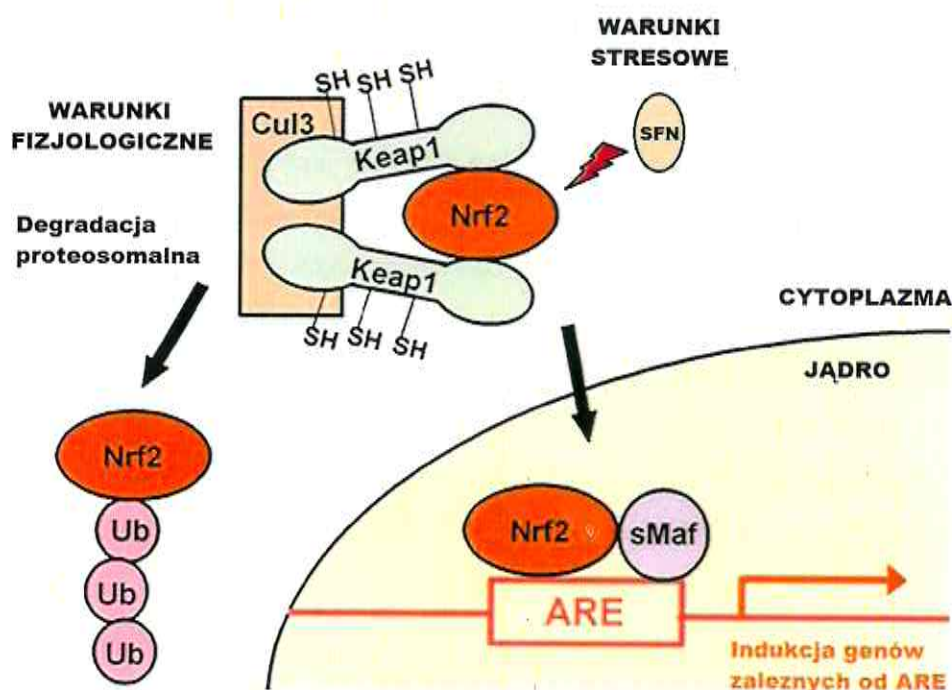
⁷ Kalpana Deepa Priya D, Gayathri R, Gunassekaran GR, Murugan S, Sakthisekaran D. Pharm Biol. 2013;51(5):621-8.

⁸ Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Kong AN. Cancer Res. 2006;66(16):8293-6.

⁹ Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53(46):12320-64..

¹⁰ Hine CM, Mitchell JR. J Clin Exp Pathol. 2012;S4(4). pii: 7329.

Szczególną rolę w indukcji systemu detoksykacji przez sulforafan odgrywa czynnik jądrowy 2 (ang. nuclear factor, erythroid 2 -like 2, NRF2, NFE2L2)^{11,12}. W warunkach fizjologicznych poziom NRF2 w cytoplazmie jest regulowany poprzez wiązanie z białkiem wiążącym NRF2 (ang. Kelch -like ECH associated protein 1, KEAP1), które umożliwia białku Cul3 (kullina3) ubikwitynację NRF2 i degradację przez proteasom. W warunkach stresowych np. na skutek ataku sulforafanu na kompleks NRF2-KEAP1, NRF2 translokuje do jądra, gdzie tworzy heterodimer z białkiem sMaf (małe białko Maf, ang. small musculoaponeurotic fibrosarcoma) i wiąże się z DNA w regionach ARE (element odpowiedzi antyoksydacyjnej ang. antioxidant response element). W następstwie dochodzi do indukcji genów kodujących białka cytoprotekcyjne, zawierających w części promotorowej sekwencję ARE w tym NQO1 i GST (Rys 3).



Rysunek 3. Wpływ sulforafanu na system NRF2-ARE. Nrf2 - czynnik jądrowy 2 (ang. nuclear factor, erythroid 2 -like 2); Ub – ubikwityna (ang. ubiquitin); Cul3 – kullina 3 (ang. cullin 3); Keap1 – białko sensorowe/wiążące Nrf2 (ang. Kelch -like ECH associated protein 1); SFN - sulforafan; sMaf – małe białko Maf (ang. small musculoaponeurotic fibrosarcoma); ARE – element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. antioxidant response element)^{13,14}.

¹¹ Xu T, Ren D, Sun X, Yang G. Anticancer Agents Med Chem. 2012;12(9):1132-42.

¹² McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. J Nutr. 2004;134:3499S-3506S.

¹³ Ahn YH, Hwang Y, Liu H, Wang XJ, Zhang Y, Stephenson KK, Boronina TN, Cole RN, Dinkova-Kostova AT, Talalay P, Cole PA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(21):9590-5.

W 2005 roku Maher¹⁵ i współpracownicy wykazali, że NRF2 reguluje również aktywność rodziny białek transportowych związanych z opornością wielolekową (ang. multidrug resistance proteins, MRP) odpowiedzialnych za wydalanie związków przez błonę komórkową (Rys. 2). Wpływ sulforafanu na aktywność tych białek, zaliczanych do III fazy metabolizmu ksenobiotyków jest nie do końca poznany. Dane literaturowe są nadal nieliczne i nie pozwalają na wyciągnięcie uogólnionych wniosków. Już w 2001 roku Payen¹⁶ i współpracownicy wykazali, że sulforafan może podnosić ekspresję MRP2 w prawidłowych ludzkich hepatocytach, jednak w przypadku komórek nowotworowych wyniki badań wskazują, że możliwa jest zarówno indukcja jak i supresja^{17,18}. W 2008 roku opublikowana została obszerna praca przeglądowa, w której wskazano, że rola NRF2 i szlaków sygnałowych od niego zależnych w rozwoju i terapii choroby nowotworowej jest dwuznaczna. Indukcja NRF2 odgrywa istotną rolę w chemoprewencji nowotworów, z drugiej strony pacjenci z podwyższonym poziomem NRF2 mają gorsze rokowania i są oporni na chemioterapię¹⁹.

Rola sulforafanu na tym polu jest bardzo istotna dla oceny jego przydatności w terapii chorób nowotworowych. Indukcja systemu detoksykacyjnego w komórkach prawidłowych będzie prowadzić do ochrony ich przed toksycznym działaniem leków i skutkować niwelowaniem działań niepożądanych. Jednocześnie w komórkach nowotworowych wzrost aktywności enzymów detoksykacyjnych wiąże się z powstaniem zjawiska oporności wielolekowej (ang. multidrug resistance, MDR), dlatego korzystne byłoby obniżać aktywność tego systemu. W roku 2010 Quazi²⁰ i współpracownicy wykazali, że sulforafan hamował aktywność białek transportowych MRP i jednocześnie zwiększał zdolność paclitaxelu do hamowania wzrostu komórek gruczolaka przełyku (BEAC).

Możliwość modulowania tego systemu poprzez suplementację lub dostarczanie sulforafanu z dietą może mieć istotne skutki dla efektywności i bezpieczeństwa chemioterapii. W obecnych czasach ma to szczególne znaczenie, ponieważ dane epidemiologiczne wykazują, że ponad 50% pacjentów onkologicznych stosuje suplementy diety²¹. Ponadto

¹⁴ Krzysztofiak A. Postepy Hig Med Dosw 2015; 69: 140-152

¹⁵ Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Drug Metab Dispos. 2005;33(7):956-62.

¹⁶ Payen L, Courtois A, Loewert M, Guillozo A, Fardel O. Biochem Biophys Res Commun. 2001;282(1):257-63.

¹⁷ Harris KE, Jeffery EH. J Nutr Biochem. 2008;19(4):246-54.

¹⁸ Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Drug Metab Dispos. 2005;33(7):956-62.

¹⁹ Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Pharmacol Res. 2008;58(5-6):262-70.

²⁰ Qazi A, Pal J, Maitah M, Fulciniti M, Pelluru D, Nanjappa P, Lee S, Batchu RB, Prasad M, Bryant CS, Rajput S, Gryaznov S, Beer DG, Weaver DW, Munshi NC, Goyal RK, Shamma MA. Transl Oncol. 2010;3(6):389-99.

²¹ Alsanad SM, Williamson EM, Howard RL. Phytother Res. 2014;28(12):1749-55.

często pacjenci spożywają jednocześnie leki przepisane lub nieprzepisane przez lekarza²². Badań nad wpływem interakcji sulforafanu z lekami na funkcjonowanie enzymów metabolizmu komórkowego, pomimo wagi tego zagadnienia, nie prowadzono.

Nadal w literaturze brak jest również wyczerpujących badań porównawczych prowadzonych w komórkach prawidłowych i nowotworowych nad regulacją NRF2 – zależnych ścieżek sygnałowych regulujących białka cytoprotekcyjne. Praca opublikowana przez Hunakovą²³ i współpracowników dopiero w 2014 roku wskazuje, że sposób w jaki sulforafan wpływa na NRF2 zależne szlaki sygnałowe może determinować rodzaj interakcji sulforafanu z cisplatyną w komórkach raka jajnika. Poznanie mechanizmów działania i wpływu sulforafanu i jego ewentualnych interakcji z lekami na aktywność NRF2-zależnego systemu detoksykacji w komórkach prawidłowych i nowotworowych ma szczególne znaczenie w przypadku komórek układu pokarmowego, ponieważ jest on bezpośrednio narażony na kontakt ze spożywanymi substancjami. Spośród nowotworów układu pokarmowego, rak jelita grubego jest najczęstszą przyczyną zgonów w Polsce i na świecie.

Sulforafan wykazuje w badaniach *in vitro* zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych między innymi piersi, jelita, prostaty, skóry czy pęcherza moczowego. Istnieją również dane literaturowe wskazujące, że sulforafan powoduje ograniczenie tempa wzrostu guzów w modelach zwierzęcych^{24,25}. Badania wykazały, że konsumpcja brokułów (200 μ mol ITC) wystarczy do indukcji odpowiedzi komórkowej u ludzi, między innymi indukcji NQO1 i inhibicji deacetylaz histonów (ang. histone deacetylase, HDAC)²⁵. Pomimo obiecujących własności wykazanych w badaniach *in vitro* wyniki badań klinicznych, które oceniały skuteczność sulforafanu w terapii nowotworu piersi i prostaty nie są na tyle znaczące, aby sulforafan mógł być obecnie uznany za efektywny cytostatyk^{26,27}.

Izotiocyaniany, w tym sulforafan swoją aktywność zawdzięczają ugrupowaniu -NCS, którego centralny, elektrofilowy atom węgla łatwo wchodzi w reakcje z nukleofilami w komórce i w ten sposób łączy wiele wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych (Rys. 4)

²²Hanigan MH, Dela Cruz BL, Thompson DM, Farmer KC, Medina PJ. J Oncol Pharm Pract. 2008;14(3):123-30.

²³Hunakova L, Grunesova P, Horvathova E, Chalupa I, Cholujova D, Duraj J, Sedlak J. Toxicol Lett. 2014;230(3):479-86.

²⁴Myzak MC, Tong P, Dashwood WM, Dashwood RH, Ho E. Exp Biol Med (Maywood). 2007;232(2):227-34.

²⁵Kanematsu S, Yoshizawa K, Uehara N, Miki H, Sasaki T, Kuro M, Lai YC, Kimura A, Yuri T, Tsubura A. Oncol Rep. 2011;26(3):603-8.

²⁶Cornblatt BS, Ye L, Dinkova-Kostova AT, Erb M, Fahey JW, Singh NK, Chen MS, Stierer T, Garrett-Mayer E, Argani P, Davidson NE, Talalay P, Kensler TW, Visvanathan K. Carcinogenesis. 2007;28(7):1485-90.

²⁷Alumkal JJ, Slotke R, Schwartzman J, Cherala G, Munar M, Graff JN, Beer TM, Ryan CW, Koop DR, Gibbs A, Gao L, Flamiatos JF, Tucker E, Kleinschmidt R, Mori M. Invest New Drugs. 2015;33(2):480-9.



Rysunek 4. Tworzenie się koniugatów sulforafanu z białkami²⁸.

Wykazano, że nawet niewielka zmiana w strukturze cząsteczki prowadzi do zmian jej aktywności biologicznej. Dlatego zasadne jest prowadzenie badań zmierzających do określenia jakie zmiany w strukturze cząsteczki sulforafanu zwiększą jego skuteczność. W przypadku sulforafanu wykazano, że wprowadzenie grupy karbonylowej w miejsce sulfinylowej, czy zwiększanie odległości pomiędzy grupą -NCS i grupą sulfinylową poprzez wydłużenie łańcucha węglowego podniosło NRF2 zależne własności chemoprewencyjne i aktywność przeciwnowotworową sulforafanu^{29,30}.

Innym podejściem do wykorzystania potencjału związków pochodzenia naturalnego w terapii nowotworów jest łączenie ich z lekami. Znaczenie mają tu interakcje mogące doprowadzić do synergii efektu przeciwnowotworowego leku i adjuwanta. Dopiero na przestrzeni ostatnich 10 lat pojawiły się prace opisujące działanie synergistyczne sulforafanu i klasycznych terapeutów 5-fluorouracylu, oxaliplatyny, tamoxifenu, czy związków o przewidywanej aktywności przeciwnowotworowej np. PR-104^{31,32,33,34}. Podejmuje się również próby łączenia kilku związków pochodzenia naturalnego jak np. genisteiny z kurkumina³⁵ czy sulforafanu z kwercetyna i galusanem epigallokatechiny³⁶ w nadziei na uzyskanie silnego synergizmu działania przeciwnowotworowego. Jest to o tyle korzystne, że związki te charakteryzują się w porównaniu do cytostatyków niższą toksycznością układową. Pomimo intensyfikacji tych badań jak do tej pory żadne z tych połączeń z sulforafanem nie weszło w fazę badań klinicznych. Brak jest również wystarczającej literatury na temat

²⁸ Zhao L, Lee JY, Hwang DH. *Nutr Rev.* 2011;69(6):310-20.

²⁹ Elhalem E, Recio R, Werner S, Lieder F, Calderón-Montaña JM, López-Lázaro M, Fernández I, Khair N. *Eur J Med Chem.* 2014;87:552-63.

³⁰ Misiewicz I, Skupinska K, Kasprzycka-Guttman T. *Pharmacol Rep.* 2007;59(1):80-7.

³¹ Wang XF, Wu DM, Li BX, Lu YJ, Yang BF. *Phytother Res.* 2009;23(3):303-7.

³² Kaminski BM, Weigert A, Brüne B, Schumacher M, Wenzel U, Steinhilber D, Stein J, Ulrich S. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67(5):1167-78.

³³ Pawlik A, Słomińska-Wojewódzka M, Herman-Antosiewicz A. *Eur J Nutr.* 2016;55(3):1165-80.

³⁴ Erzinger MM, Bovet C, Hecht KM, Senger S, Winiker P, Sobotzki N, Cristea S, Beerenwinkel N, Shay JW, Marra G, Wollscheid B, Sturla SJ. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150219.

³⁵ Chen QH, Yu K, Zhang X, Chen G, Hoover A, Leon F, Wang R, Subrahmanyam N, Addo Mekuria E, Harinantenaina Rakotondraibe L. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(20):4553-6.

³⁶ Appari M, Babu KR, Kaczorowski A, Gross W, Herr I. *Int J Oncol.* 2014;45(4):1391-400.

mechanizmu działania i interakcji sulforafanu z cytostykami w komórkach prawidłowych. Takie badania pozwoliłyby jednoznacznie stwierdzić, czy sulforafan może działać cytoprotekcyjnie w trakcie terapii. Dopiero dane opublikowane w 2015 roku wskazują, że sulforafan może pełnić taką rolę obniżając kardiotoksyczność dokсорubicyny w kardiomioblastach ssaczyc³⁷.

W momencie rozpoczynania przeze mnie badań, które wchodzą w zakres przedstawianej rozprawy habilitacyjnej przegląd literatury pozwolił stwierdzić, że nawet niewielka modyfikacja struktury sulforafanu istotnie zmienia jego aktywność biologiczną oraz że związek ten może oddziaływać ze związkami będącymi lekami, w tym cytostatykami, zmieniając także ich efektywność w komórkach rakowych. Ponadto istniały przesłanki literaturowe wskazujące, że sulforafan w komórkach nowotworowych może inaczej niż w komórkach prawidłowych regulować funkcje czynnika transkrypcyjnego NRF2, który jest regulatorem systemu detoksykacji odpowiedzialnego za eliminację leków z komórki. Dlatego celem podjętych przeze mnie badań było zbadanie zależności aktywności izotiocyjanianów od ich struktury, określenie wpływu nowych połączeń sulforafanu z lekami na funkcjonowanie komórek nowotworowych, w szczególności na funkcjonowanie systemu detoksykacji i określenie cytoprotekcyjnych własności sulforafanu wobec komórek prawidłowych. Obiektem działania tych związków i ich połączeń miały być w szczególności komórki prawidłowe i nowotworowe jelita grubego.

Hipotezą badawczą jaką przyjąłem jest to, że sulforafan lub jego analogi mają duży potencjał aby zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo terapii przeciwnowotworowej. Aby zweryfikować tę hipotezę za cel postawiłem sobie odpowiedzieć na następujące pytania:

1. Jaki wpływ ma sulforafan, jego analogi oraz ich interakcje z innymi lekami na NRF2-zależne enzymy cytoprotekcyjne komórek nowotworowych i prawidłowych jelita grubego;
2. Czy sulforafan może pełnić rolę adjuwanta w chemoterapii nowotworów – zwiększać ochronę komórek prawidłowych i uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie leków i związków przeciwnowotworowych;
3. Czy nowe modyfikacje cząsteczki sulforafanu pozwolą uzyskać związek o lepszych własnościach przeciwnowotworowych i jednocześnie o niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych?

³⁷ Singh P, Sharma R, McElhanon K, Allen CD, Megyesi JK, Beneš H, Singh SP. Free Radic Biol Med. 2015;86:90-101.

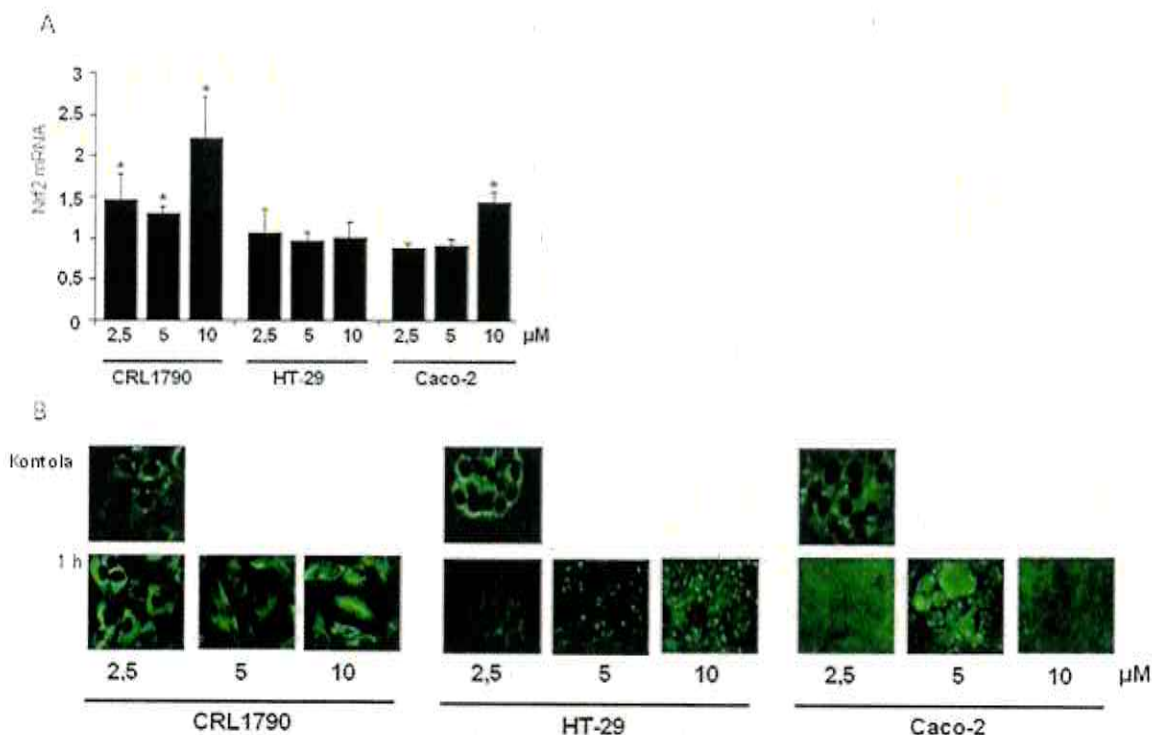
Omówienie wyników

1. Jaki wpływ ma sulforafan, jego analogi oraz ich interakcje z innymi lekami na NRF2-zależne enzymy cytoprotekcyjne komórek nowotworowych i prawidłowych jelita grubego [H2, H3, H7]?

Najnowsza literatura coraz więcej uwagi poświęca roli czynnika NRF2 w prewencji i terapii nowotworów. Wykazano, że jego nadekspresja związana jest ze złymi rokowaniami i większym ryzykiem niepowodzenia terapii przeciwnowotworowej na skutek wzrostu lekooporności komórek nowotworowych, związanej z podwyższoną ekspresją NRF2-zależnych genów detoksykacyjnych. Z kolei w komórkach z obniżonym poziomem NRF2 obserwowano wzrost efektywności leków przeciwnowotworowych.

W pracy H7 opisałam badania nad wpływem sulforafanu na czynnik jądrowy NRF2 i wybrane ścieżki sygnałowe, prowadzone jednocześnie w komórkach prawidłowych i nowotworowych jelita grubego. Nowotwory jelita grubego stanowią poważny problem zdrowotny, często rozpoznawane w późnym stadium są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce i na świecie. Ponieważ źródłem sulforafanu jest dieta, może on wchodzić w bezpośredni kontakt z tkanką jelita. Jako model badawczy posłużyły komórki jelita grubego: prawidłowe – CRL-1790 oraz najczęściej badane linie komórkowe nowotworowe reprezentujące gruczolakoraki HT-29 i Caco-2.

Wyniki opisane w pracy H7 wskazują, że wpływ sulforafanu na ścieżkę sygnałową NRF2-ARE był inny w komórkach nowotworowych i prawidłowych. W komórkach nowotworowych obserwowano translokację NRF2 do jądra, co jest zgodne z klasyczną teorią zakładającą translokację NRF2 do jądra uwolnionego z kompleksu NRF2-KEAP. W komórkach prawidłowych natomiast obserwowano jednocześnie wzrost ekspresji genu kodującego białko NRF2 (Rys. 5). To zjawisko jest zgodne z nową hipotezą, która zakłada, że następuje synteza nowej puli białka NRF2 i to ono translokuje do jądra.



Rysunek 5. Wpływ sulforafanu (2.5-10 μM) na regulację czynnika transkrypcyjnego NRF2 w komórkach nowotworowych (Caco-2 i HT-29) i prawidłowych (CRL-1790) jelita grubego. (A) Krotność zmian ekspresji genu kodującego białko NRF2 w stosunku do próbki kontrolnej, * - wyniki statystycznie istotnie różne od próbki kontrolnej ($p < 0.05$). (B) Obrazy mikroskopowe przedstawiające wpływ sulforafanu na lokalizację i poziom białka NRF2. Zielona fluorescencja odpowiada wyznakowanemu fluorescencyjnie białku NRF2. Komórki kontrolne: widoczne puste jądra, fluorescencja w cytoplazmie. Po 1 godzinie inkubacji: komórki nowotworowe – widoczny sygnał fluorescencji w jądrze komórkowym, komórek prawidłowe - widoczny sygnał fluorescencji w jądrze komórkowym, wzrost intensywności fluorescencji w cytoplazmie [H7].

W komórkach nietransformowanych CRL-1790 translokacja białka NRF2 do jądra powiązana była z indukcją regulowanych przez nie genów enzymów NQO1 i należących do rodziny MRP izoform MRP1 i MRP2. Izoformy te biorą udział w wydaleniu z komórki wielu leków przeciwnowotworowych np. winkrystyny czy daunorubicyny w postaci związanej z glutationem³⁸. W komórkach nowotworowych sulforafan indukował wzrost ekspresji genów NQO1 i MRP2. Brak indukcji MRP1 obserwowany w komórkach nowotworowych przez sulforafan należy uznać za korzystny, ponieważ białko to jest jednym z kluczowych dla rozwoju oporności wielolekowej. Wykazałam, że w tym aspekcie sulforafan wykazuje selektywność.

³⁸ Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204(3):216-37.

Uzyskane wyniki wskazują, że w komórkach jelita nietransformowanych nowotworowo CRL-1790 sulforafan zwiększył aktywność NRF2-zależnych enzymów reprezentujących II i III fazę metabolizmu ksenobiotyków, odpowiednio NQO1 i MRP. Istotnym czynnikiem dla efektywności procesu detoksykacji jest współdziałanie tych obu faz, a w szczególności ich jednoczesna indukcja. Wyniki opisane w pracy H7 wskazują, że sulforafan wykazuje doskonałe własności cytoprotekcyjne. Jest to bardzo istotne dla prewencji nowotworów, z drugiej strony w przypadku chemoterapii może wskazywać na potencjalne możliwości stosowania sulforafanu jako adjuwanta, który redukowałby działania niepożądane terapii w komórkach prawidłowych. Potwierdzają to badania opisane w publikacji H1, które wskazują, że sulforafan może wykazywać działanie antagonistyczne z 5-fluorouracylem w komórkach prawidłowych.

Wyniki otrzymane dla komórek nowotworowych wskazują, że sulforafan indukuje aktywność enzymu NQO1 w komórkach HT-29, a białek transportowych MRP w komórkach Caco-2. Choć efekt ten nie obejmuje obu faz jednocześnie może być odpowiedzialny za powstawanie zjawiska oporności wielolekowej, związanej z przyspieszoną eliminacją cytostatyków z komórki.

Poziom białka NQO1 jest wyższy w wielu typach nowotworów niż w zdrowej tkance. Obecnie w tym zjawisku upatruje się szansy na opracowanie terapii wykorzystującej NQO1 do aktywacji proleków takich jak mitomycyna C czy pozyskany z kory drzewa lapacho β -lapachon. W tym aspekcie wyniki opisane w H7 dla sulforafanu w komórkach HT-29 są bardzo obiecujące, w szczególności biorąc pod uwagę, że poziomy aktywności NQO1 wyjściowy i po dodaniu sulforafanu były istotnie wyższe niż w komórkach nietransformowanych CRL-1790. Ponadto sulforafan nie wpływał na aktywność białka transportowego MRP w komórkach nowotworowych, a znacząco zwiększał jego aktywność w komórkach prawidłowych zwiększając efektywność ich systemu detoksykacji.

Wyniki te wskazują na wysoką selektywność sulforafanu w aspekcie wspomagania takich terapii. Poszukiwanie związków, które mogłyby selektywnie wspomagać działanie cytostatyków ma ogromne znaczenie dla medycyny. Biorąc pod uwagę że sulforafan jest związkiem dobrze przebadanym i dostarczającym od zawsze z dietą wyniki te mogą mieć aspekt praktyczny.

Obecnie istotnym problemem zyskującym coraz więcej uwagi jest zjawisko interakcji między lekami, czy lekami i składnikami diety. W przypadku sulforafanu badania nad jego

interakcjami dotyczą głównie oddziaływań z substancjami pochodzenia naturalnego. Celem badań opisanych w publikacjach H2 i H3 było określenie czy sulforafan lub jego analog z dodatkową grupą $-CH_2$ mogą wchodzić w interakcje z powszechnie przyjmowanymi lekami, co w efekcie może prowadzić do zmiany aktywności wybranych enzymów regulowanych przez czynnik NRF2 biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków. Taki efekt może mieć istotny wpływ na biodostępność, a zatem efektywność działania leków.

Do badań wybrałam trzy leki należące do różnych klas BSC (System Klasyfikacji Biofarmaceutycznej) – werapamil (Klasa I), ketoprofen (klasa II) i furosemid (klasa IV). Werapamil, bloker kanałów wapniowych, jest stosowany w leczeniu chorób kardiologicznych. Lek ten jest też blokerem transporterów błonowych PGP i MRP. Ketoprofen stosowany w reumatoidalnym zapaleniu stawów w badaniach *in vitro* wykazał zdolność do blokowania aktywności MRP2. Również w przypadku furosemidu istnieją doniesienia literaturowe świadczące, że znosi on oporność wielolekową poprzez wpływ na funkcjonowanie PGP.

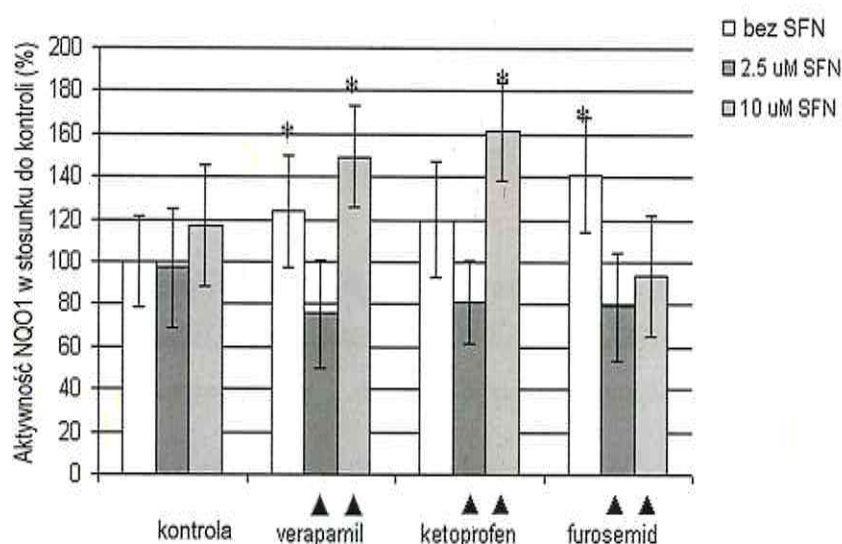
Do badań oprócz sulforafanu wprowadziłam jego analog posiadający dłuższy łańcuch węglowy o jedną grupę $-CH_2$ (alyssin, Rys. 7), ponieważ w poprzednich badaniach zespołu wykazano, że wykazuje on obiecujące własności chemoprewencyjne.

Pierwszym etapem badań było określenie wpływu badanych leków i ich podania z izotiocyjanianami na wewnątrzkomórkową lokalizację czynnika NRF2. Wśród badanych leków tylko furosemid i werapamil indukowały translokację czynnika NRF2 do jądra. Sulforafan, który jest uznanym induktorem translokacji NRF2 do jądra w obu przypadkach powodował zmniejszenie intensywności translokacji NRF2, co wskazuje na występowanie antagonistycznych interakcji, które prowadzą do osłabienia efektu wywołanego przez leki. W przypadku alyssinu nie obserwowano tak istotnego wpływu na lokalizację NRF2.

Wyniki uzyskane dla NQO1 wskazują na występowanie addytywnych interakcji między werapamilem i ketoprofenem a sulforafanem w wyższych stężeniach oraz silnych antagonistycznych interakcji w przypadku niższych stężeń sulforafanu (Rys. 6). Najnowsza literatura określa cząsteczkę sulforafanu jako związek o własnościach hormetycznych, która kieruje komórkę na drogę śmierci lub promuje przeżycie w zależności od stężenia³⁹. Wyniki opisane w pracy H3 wskazują, że te hormetyczne własności odnoszą się również do innych parametrów komórkowych na przykład NQO1.

³⁹ Pal S, Konkimalla VB. Mini Rev Med Chem. 2016;16(12):980-95.

W pozostałych przypadkach obserwowano tylko oddziaływania antagonistyczne - pomiędzy furosemidem a sulforafanem niezależnie od jego stężenia oraz pomiędzy furosemidem i werapamillem a wyższym stężeniem alyssinu. W każdym z tych przypadków obserwowano obniżenie aktywności NQO1, która była podwyższana przez te leki. Zeekpudsa⁴⁰ i współpracownicy wykazali, że brak aktywności NQO1 prowadzi do zwiększenia wrażliwości komórek na terapię w tym 5-fluorouracyl czy doksorubicynę. W tym świetle wyniki uzyskane w pracy H2 i H3 należy uznać za korzystne z punktu widzenia uwrażliwiania komórek nowotworowych na terapię.



Rysunek 6. Wpływ sulforafanu (SFN) na aktywność NQO1. * - wynik istotnie statystycznie różny od grupy kontrolnej, $p < 0.05$, ▲ - wynik dla komórek inkubowanych z lekiem i SFN istotnie statystycznie różny od wyniku uzyskanego dla samego leku ($p < 0.05$) [H3].

Kolejnym etapem badania było określenie wpływu sulforafanu i jego analogu na poszczególne izoformy enzymów z rodziny GST, które katalizują reakcję przyłączenia GSH do elektrofilowych cząsteczek, w tym leków i izotiocyjanianów, które w tej formie są transportowane przez białka MRP poza komórkę. Do badań wybrałam izoformy, których ekspresja według danych literaturowych jest modyfikowana przez sulforafan - GSTM1 i GSTA3.

⁴⁰ Zeekpudsa P, Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Sripan B, Prawan A. J Exp Clin Cancer Res. 2014;33:11.

Wyniki uzyskane w pracach H2 i H3 wskazują na istnienie antagonistycznych interakcji między lekami a izotiocyanianami, co prowadzi do niwelowania efektu leków obniżających ekspresję GSTA3. Poziom ekspresji GSTM1 jest czynnikiem determinującym oporność komórki na cytostatyki. Obserwowałam obniżenie poziomu ekspresji tego enzymu przez sulforafan i jego analog w przypadku podania z ketoprofenem i furosemidem, co jest efektem pożądanym. Przeciwnie, alyssin indukował wzrost ekspresji tego enzymu w szczególności w przypadku werapamilu, co może prowadzić do zwiększenia efektywności metabolizmu leków i szybszego wydalania ich z komórki.

Szybkość wydalania ksenobiotyków z komórki zależy też od funkcjonowania enzymów III fazy metabolizmu ksenobiotyków – białek transportowych, w szczególności MRP które są odpowiedzialne za transport koniugatów z GSH poza komórkę. Do badań włączyłam również istotny z punktu widzenia oporności wielolekowej transporter PGP, który nie jest regulowany przez czynnik NRF2. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że sulforafan i alyssin oddziałując antagonistycznie z werapamilem i ketoprofenem wykazują wysoce niepożądane własności ponieważ podnoszą poziom ekspresji MRP1, który jest silnie obniżany przez te leki. W efekcie oporność komórek na działanie leków zostaje zwiększona. W przypadku PGP nie wykazano aby izotiocyanany i badane leki wywierały istotny wpływ na jego funkcje.

Opisane w publikacjach H2 i H3 wyniki wskazują na możliwość istnienia nieopisanych dotąd interakcji spożywanego z dietą sulforafanu i jego analogu alyssinu z powszechnie stosowanymi lekami. Oddziaływania te mają charakter najczęściej antagonistyczny, ale ich znaczenie jest różne w zależności od typu enzymu, oraz stężenia izotiocyanianu. Interakcje pomiędzy sulforafanem, jego analogiem a lekami w komórkach nowotworowych jelita grubego Caco-2 mogą zmienić efektywność badanych oraz innych przyjmowanych leków, poprzez zmianę tempa ich metabolizmu, co ma szczególne znaczenie w przypadku oporności na terapię przeciwnowotworową. Porównując dwa badane izotiocyaniany należy stwierdzić, że modyfikacja cząsteczki prowadzi do zwiększenia efektów cytoprotekcyjnych, które w komórkach nowotworowych są niepożądane.

2. Czy sulforafan może pełnić rolę adjuwanta w chemoterapii nowotworów jelita grubego – zwiększać ochronę komórek prawidłowych i uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie leków i związków przeciwnowotworowych [H1, H6, H8]?

Jedną ze strategii terapii przeciwnowotworowych jest poszukiwanie związków, które działałyby synergistycznie ze znanym lekiem przeciwnowotworowym. W efekcie zwiększona zostałaby efektywność jego działania i możliwe byłoby obniżenie dawki leku, co zmniejszyłoby jego działania niepożądane. Dodatkowo związek o własnościach cytoprotekcyjnych względem komórek prawidłowych dodatkowo umożliwiłby obniżenie toksycznego wpływu leków przeciwnowotworowych na tkankę zdrową.

Istnieją nieliczne doniesienia literaturowe opisujące synergistyczne oddziaływania sulforafanu z lekami przeciwnowotworowymi, co pokazuje, że ta grupa związków może mieć takie potencjalne zastosowanie⁴¹. Nadal są poszukiwane nowe obiecujące kombinacje, w których jedną z substancji aktywnych jest sulforafan lub jego analog. Brak jest w piśmiennictwie danych dotyczących wpływu takich kombinacji na komórki prawidłowe. Dlatego celem moich badań było sprawdzenie, czy sulforafan i jego analogi zmniejszają cytotoksyczność innych związków przeciwnowotworowych wobec komórek prawidłowych oraz czy będą wzmacniać ich działanie w komórkach nowotworowych. Związek wykazujący takie działanie byłby doskonałym kandydatem na adjuwant do stosowania w terapii nowotworów.

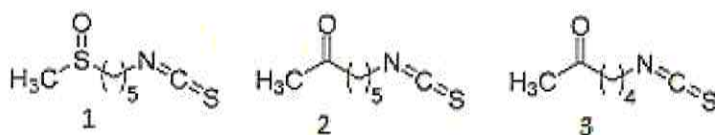
Aby stwierdzić, czy sulforafan i jego analogi wykazują takie własności przeprowadziłam badania nad wpływem sulforafanu i jego analogów podanych w kombinacji ze związkami przeciwnowotworowymi na wzrost i funkcjonowanie komórek nowotworowych i prawidłowych. Typ interakcji związków był wyznaczany za pomocą metody efektu mediany Chou-Talalaya⁴², w której wyznaczony współczynnik CI (ang. Combination Index, indeks kombinacji) pozwala ocenić rodzaj interakcji pomiędzy badanymi związkami: CI >1 oznacza antagonizm, CI <1 wskazuje na istnienie synergizmu, wartości pośrednie oznaczają występowanie oddziaływań addytywnych. Według definicji synergia lub antagonizm to oddziaływanie, które powoduje, że obserwowany efekt wspólnego podania związków jest odpowiednio większy lub mniejszy niż prosty addytywny efekt oczekiwany na

⁴¹ Tseng E, Kamath A, Morris ME. Pharm Res. 2002;19(10):1509-15.

⁴² Chou TC, Talalay P. Adv Enzyme Regul. 1984;22:27-55.

podstawie znajomości efektu pojedynczych związków⁴³. Kharif⁴⁴ i współpracownicy wskazali, że antagonistyczne interakcje w komórkach prawidłowych są wysoce pożądane ponieważ mają charakter protekcyjny.

W pracy H1 opisano wpływ sulforafanu i jego dwóch analogów węglowych (Rys. 7) na cytotoksyczność 5-fluorouracylu wobec komórek prawidłowych. W badaniu wykorzystano komórki modelowe - fibroblasty płuc chomika chińskiego V-79.



- alyssin (1-izotiocyaniano-5-metylosulfinylopentan) 1
- izotiocyanian-2-oksoheptylu 2
- izotiocyanian-2-oksoheksylu 3

Rys.7. Struktury badanych analogów sulforafanu.

5-fluorouracyl jest lekiem od lat stosowanym w terapii nowotworów takich jak rak jelita grubego, piersi czy żołądka. Należy do grupy antymetabolitów, jego mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności syntetazy tymidylowej oraz na trwałym wbudowywaniu się do DNA lub RNA. Posiada właściwości proapoptotyczne oraz blokuje fazę S cyklu komórkowego. Stosowanie 5-fluorouracylu jest jednak ograniczone przez jego działania niepożądane: uszkodzenie szpiku kostnego, błony śluzowej układu pokarmowego i ośrodkowego układu nerwowego.

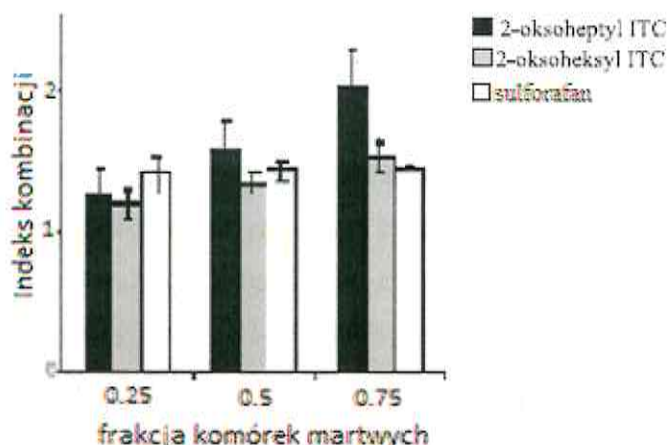
W przypadku kombinacji 5-fluorouracylu z pochodnymi sulforafanu wykazałam, że choć obserwowano nieznaczne spadki ilości komórek żywych w populacji, całkowita liczba komórek nie różniła się w sposób istotny od liczby komórek po podaniu samego cytostatyku, a była wyższa niż po podaniu samego izotiocyanianu. Uzyskane wyniki wskazują, że kombinacja 5-fluorouracylu z sulforafanem powoduje akumulacje komórek w fazie S, tak jak w przypadku podania samego cytostatyku, podczas gdy podanie samego sulforafanu prowadzi do nagromadzenia komórek w fazie G₂/M. W przypadku najkorzystniejszej kombinacji – 5-fluorouracylu z izotiocyanianem – 2- oksoheptylu podanie jednoczesne tych dwóch związków powodowało akumulacje komórek w fazie S i fazie G₂/M, podczas gdy podanie

⁴³ Foucquier J, Guedj M. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(3):e00149.

⁴⁴ Kharif A, Schantz SP, Chou TC, Edelstein D, Sacks PG. *Carcinogenesis.* 1998;19(3):419-24.

pojedyncze 5-fluorouracylu i izotiocyanianu prowadziło do akumulacji komórek w fazie S. Obserwowana akumulacja komórek w fazach S i G2/M wskazuje na zwiększenie tempa proliferacji komórek, co wyjaśnia dlaczego obserwowane efekty cytotoksyczne kombinacji związków są słabsze niż spodziewany efekt łączny (antagonizm działania tych związków).

Otrzymane w pracy H1 wyniki wskazują, że sulforafan i badane analogi wykazują antagonistyczne interakcje w podaniu łącznym z 5-fluorouracylem ($CI > 1$), co prowadzi do redukcji cytotoksycznych efektów łącznego podania tych związków. Spośród związków najkorzystniejsze wyniki otrzymano dla analogu sulforafanu - izotiocyanianu-2-oksoheptylu (Rys. 8). Takie własności są bardzo pożądane z punktu widzenia obniżania działań niepożądanych terapii przeciwnowotworowych.



Rysunek 8. Zależność indeksu kombinacji (CI) dla 5-fluorouracylu i sulforafanu lub jego analogów w zależności od wpływu kombinacji na żywotność komórek prawidłowych płuca chomika chińskiego V-79 (frakcja komórek martwych). Indeks kombinacji (CI): >1 – antagonizm, <1 – synergizm, $CI \approx 1$ – addytywizm.

W pracy H6 badałam efektywność sulforafanu i jego analogów w kombinacjach ze związkiem o własnościach przeciwnowotworowych w komórkach nowotworowych jelita grubego HT-29. Do badań wybrano obiecujący polski preparat, o podobnym mechanizmie działania do sulforafanu. Selol jest mieszaniną seleninotriglicerydów zawierających w swej strukturze selen (IV). W badaniach in vivo wykazano, że charakteryzuje się niską

toksycznością układową⁴⁵. Liczne badania *in vitro* nad mechanizmem działania wykazały, że indukuje on stres oksydacyjny selektywnie w komórkach nowotworowych, konsekwencją czego jest skierowanie komórek na drogę apoptozy poprzez szlak zależny od mitochondriów⁴⁶. Selol ma zatem podobny mechanizm działania jak sulforafan, co stwarza nadzieje na spotęgowanie ich działania przeciwnowotworowego po podaniu łącznym.

Jednocześnie celem prowadzonych badań było określenie przydatności standardowo stosowanych metod w badaniach cytotoksyczności – MTT i CVS do badania interakcji metodą Chau-Talalaya. Metoda MTT oparta jest o pomiar aktywności metabolicznej komórek (dehydrogenaz wewnątrzkomórkowych). Zasada metody CVS to pomiar ilości DNA poprzez detekcję związanego z nim barwnika.

Wyniki uzyskane metodą MTT dla kombinacji selolu z izotiocyjanianami wskazują na występowanie antagonistycznych interakcji, w szczególności dla analogów sulforafanu – izotiocyjanianu-2-oksoheptylu i izotiocyjanianu-2-oksoheksylu. Jednak wyniki uzyskane metodą CVS, która jest niezależna od aktywności metabolicznej komórek wskazują na występowanie między selolem a analogami sulforafanu interakcji o charakterze addytywnym a w przypadku sulforafanu – synergistycznym. Wyniki uzyskane metodą CVS, wskazują, że mieszaniny selolu i izotiocyjanianów można uznać jako obiecujące. Dla związków takich jak trastuzumab i genisteina czy zoledronat i docetaksel uzyskanie addytywnych interakcji w badaniach *in vitro* przełożyło się na wprowadzenie ich do terapii przeciwnowotworowych stosowanych w przypadku nowotworów sutka i prostaty^{47,48}. Za najkorzystniejszą kombinację, dla której wykazano synergizm, a więc wzajemną intensyfikację cytotoksycznego działania należy uznać mieszaninę selolu z sulforafanem.

Powodem rozbieżności w wynikach uzyskanych tymi dwiema metodami jest wpływ badanych związków na aktywność metaboliczną komórek, co prowadzi do błędnej interpretacji wyników badań otrzymanych metodą MTT. Uzyskane wyniki wskazują, że selol obniża aktywności dehydrogenaz wewnątrzkomórkowych, a w przypadku izotiocyjanianów wykazano, że izotiocyjanian 2-oksoheptylu powoduje zwiększanie tej aktywności. Te odmienne wpływy na aktywność dehydrogenaz są powodem, dla którego stosując metodę MTT obserwowano antagonistyczne interakcje między selolem i izotiocyjanianami.

⁴⁵ Jastrzebski Z, Czyżewska-Szafran H, Fijatek Z, Suchocki P, Fitak BA. *Drugs Exp Clin Res.* 1995;21(6):217-20.

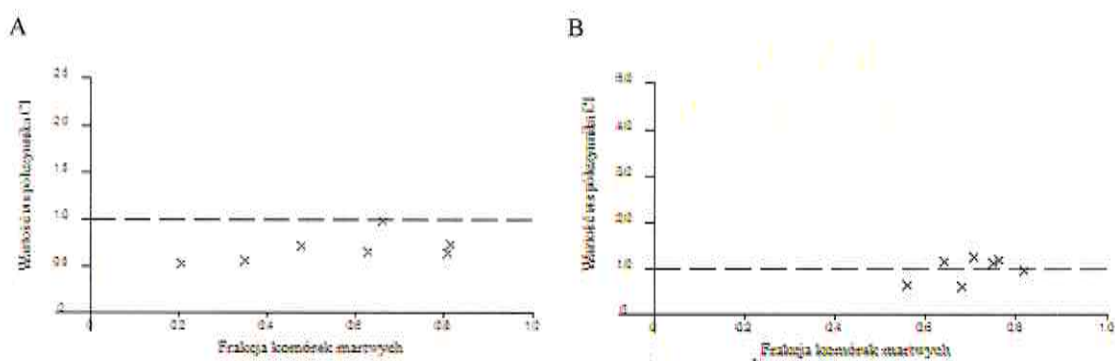
⁴⁶ Suchocki P, Misiewicz I, Skupinska K, Waclawek K, Fijalek Z, Kasprzycka-Guttman T. *Oncol Rep.* 2007;18(4):893-9.

⁴⁷ Ullén A, Lennartsson L, Harmenberg U, Hjelm-Eriksson M, Kälkner KM, Lennernäs B, Nilsson S. *Acta Oncol.* 2005;44(6): 644-50.

⁴⁸ Lattich C, Lubig J, Springwald A, Goerse R, Ortmann O, Treeck O. *Anticancer Drugs.* 2011;22(3): 253-61.

Równocześnie badałam zdolność izotiocyjanianów do wzmacniania działania doksorubicyny w komórkach raka sutka MDA-MB-231 [H8]. Doksorubicyna, (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- α -L-/z'-fukohexospiranozylo)--oksy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroksy-8-(hydroksyacetylo)-1-metoksy-5,12-naftaceno-dion, jest antybiotykiem z rzędu antracyklin, stosowanym w leczeniu między innymi raka piersi, jajnika, czy prostaty. Mechanizm jej działania obejmuje interkalację do DNA, co powoduje zatrzymanie podziałów komórkowych oraz wzrost poziomu wolnych rodników, co indukuje proces apoptozy. Mechanizm ten jest więc podobny do mechanizmu działania sulforafanu i jego analogów co wskazywało, że taka kombinacja może wykazywać zwiększoną aktywność przeciwnowotworową.

Dzięki współpracy z dr hab. Mazurem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, mieszaniny doksorubicyny z sulforafanem bądź jego analogami udało się zamknąć w lecytynowych nośnikach leków. Badania biologiczne tak opracowanych formułacji będących przedmiotem zgłoszenia patentowego [H8] wykazały istnienie korzystnych interakcji – synergistycznych ($CI < 1$) w przypadku sulforafanu i addytywnych ($CI \approx 1$) w przypadku izotiocyjanianu-2-oksoheptylu, co wskazuje, że te izotiocyjaniany zwiększają efekt przeciwnowotworowy doksorubicyny (Rys 9). Ponownie okazało się, że najkorzystniejsze własności spośród badanych związków wykazuje sulforafan.



Rysunek 9. Zależność indeksu kombinacji (CI) dla doksorubicyny i (A) sulforafanu lub (B) izotiocyjanianu 2-oksoheptylu zamkniętych w liposomach w zależności od wpływu kombinacji na żywotność komórek raka piersi MDA-MB-231 (frakcja komórek martwych). Indeks kombinacji (CI): >1 – antagonizm, <1 – synergizm, $CI \approx 1$ – addytywizm [H8].

3. Czy nowe modyfikacje cząsteczki sulforafanu pozwolą uzyskać związek o lepszych własnościach przeciwnowotworowych i jednocześnie o niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych [H1, H2, H3, H4, H5, H6]

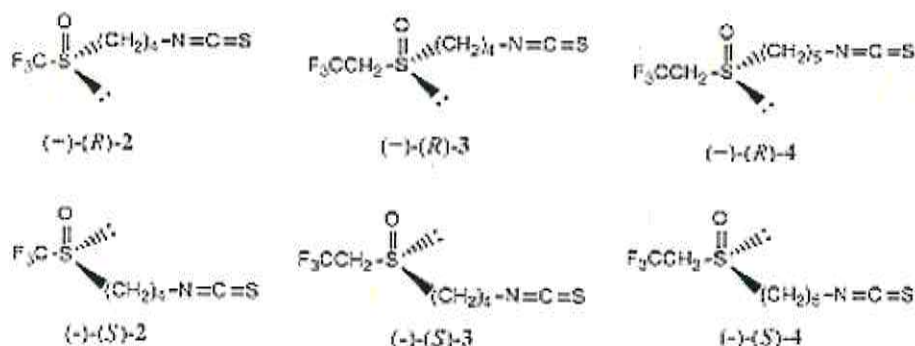
Prowadzone przeze mnie badania na liniach nowotworowych jelita HT-29 i Caco-2 dla sulforafanu i jego trzech analogów alyssinu, izotiocyjanianu-2-oksoheksylu i izotiocyjanianu-2-oksoheptylu wykazały, że analogi w szczególności posiadające w swej strukturze atom węgla zamiast siarki: izotiocyjanian-2-oksoheksylu i izotiocyjanian-2-oksoheptylu wykazują zdecydowanie silniejsze własności przeciwnowotworowe. Zmiana struktury polegająca na wydłużeniu łańcucha węglowego (alyssin) spowodowała tylko nieznaczny wzrost aktywności biologicznej powstałej cząsteczki [H2, H3, H5]. Wyniki te wskazują, że wprowadzenie atomu węgla zamiast siarki w cząsteczce sulforafanu wzmacnia cytotoksyczne własności związku, natomiast wydłużenie łańcucha węglowego nie odgrywa tak znaczącej roli.

Aby ocenić, czy związki wykazują pożądane własności w perspektywie ich przydatności dla terapii uznałam, że konieczne jest określenie ich działania wobec komórek prawidłowych. Badania takie dla wyżej opisanych analogów sulforafanu prowadziłam wykorzystując fibroblasty pochodzące z płuc chomika chińskiego (V-79) standardowo stosowane w tego typu badaniach [H1]. Wyniki tych badań pozwoliły stwierdzić, że cytotoksyczność sulforafanu jest porównywalna do efektu jaki na komórki prawidłowe wywiera stosowany w leczeniu cytostatyk 5-fluorouracyl, który jest terapeutycznym o szerokim spektrum działań niepożądanych. Pochodne o największej aktywności przeciwnowotworowej wykazują większą niż sulforafan cytotoksyczność względem komórek prawidłowych. Wyniki te wskazują, że sulforafan i jego pochodne zawierające atomy węgla charakteryzuje brak selektywności – wykazują one cytotoksyczność zarówno wobec komórek nowotworowych jak i prawidłowych. Związków tych nie można zatem traktować jako obiecujących dla terapii przeciwnowotworowych.

Następne badania mające na celu poszukiwanie cząsteczki selektywnej prowadziłam we współpracy z zespołem prof.dr hab. Piotra Kiełbasińskiego z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi [H4, H6]. Znanym jest fakt, że wprowadzenie atomu fluoru do cząsteczki sulforafanu podnosi jej aktywność biologiczną⁴⁹.

⁴⁹ Hagmann WK. J Med Chem. 2008;51(15):4359-69.

Wiele związków stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych posiada fluor w swej cząsteczce (np. 5-fluorouracyl). W zespole profesora Kielbasińskiego zsyntetyzowano trzy analogi sulforafanu w formie enancjomerów. Nowo zsyntetyzowane związki różniły się od cząsteczki sulforafanu wprowadzeniem podstawnika fluorowego w miejsce metylowego jak również ilością grup CH₂ w łańcuchu węglowym (Rys.6).

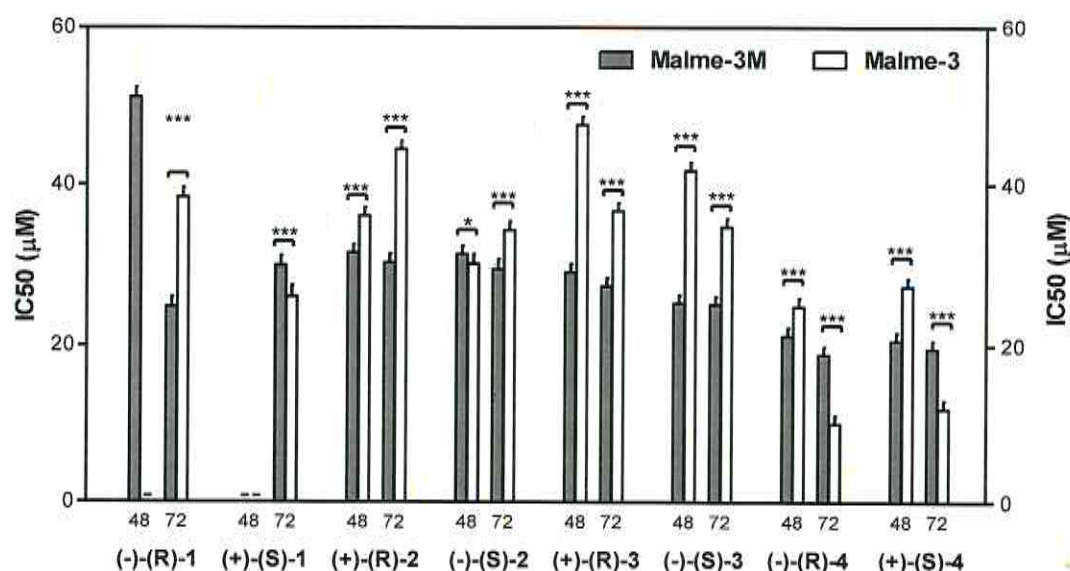


- sulfotlenek 4-izotiocyjanianobutyłowotrifluorometylowy 2
- sulfotlenek 4-izotiocyjanianobutylo-2',2',2'-trifluoroetylowy 3
- sulfotlenek 4-izotiocyjanianopentylowo-2',2',2'-trifluoroetylowy 4

Rys. 10. Struktury badanych fluorowych pochodnych sulforafanu.

W badaniach biologicznych prowadzonych przez mnie fluorowe analogi sulforafanu były testowane w komórkach czerniaka – nowotworu, który jest najczęstszą przyczyną zgonów wśród nowotworów złośliwych skóry. Poszukiwanie rozwiązań pozwalających na efektywne leczenie tego nowotworu, w szczególności w późniejszych stadiach choroby ma istotne znaczenie, zważywszy na to, że w ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się gwałtowny wzrost zachorowalności na tego typu nowotwory.

Podstawą przyjętej przeze mnie strategii było nie tylko wykonanie badań przesiewowych określających efekt przeciwnowotworowy związków, ale również ocena ich cytotoksycznego wpływu na funkcjonowanie komórek prawidłowych – a więc określenie selektywności działania. Ten aspekt badań jest często pomijany w badaniach przesiewowych, które skupiają się jedynie na ocenie zdolności związku do blokowania wzrostu komórek nowotworowych. Jako model badawczy wybrałam komórki czerniaka MALME-3M i fibroblasty MALME-3 pobrane ze skóry tego samego pacjenta. W celu określenia własności fluorowych pochodnych sulforafanu cytotoksyczność związków była oceniana jednocześnie w obu liniach komórkowych.

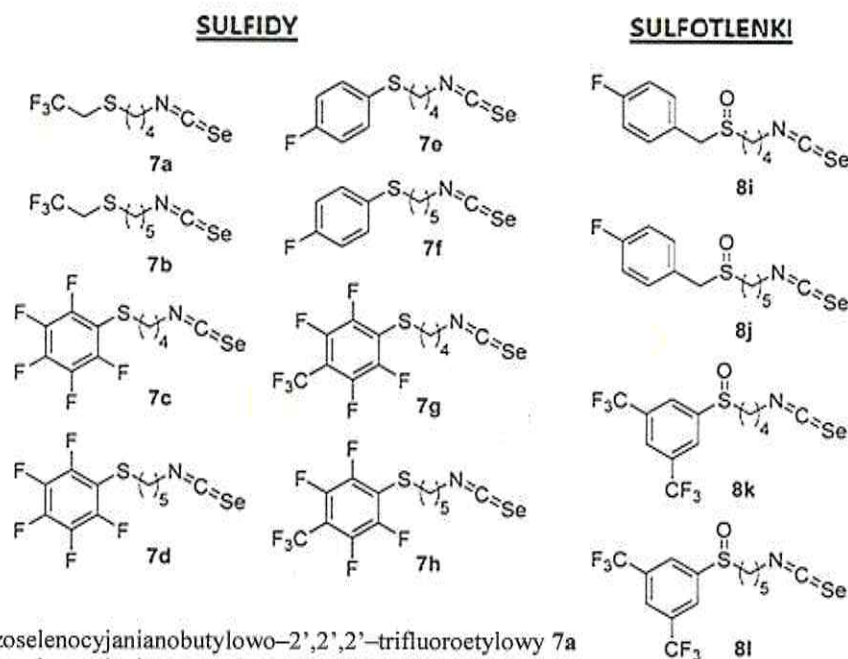


Rysunek 11. Wartości współczynnika IC₅₀ (stężenie związku, dla którego żywotność komórek spada o połowę) dla sulforafanu (1) i jego analogów (2-4) w komórkach czerniaka MALME-3M i fibroblastach skóry MALME-3, _ - brak efektu cytotoksycznego, *, *** - wyniki statystycznie istotnie różne ($p < 0.05$, $p < 0.001$) [H4].

Wyniki badań uzyskane po 48 godzinach inkubacji wskazują, że wprowadzenie atomów fluoru do cząsteczki sulforafanu podniosło aktywność przeciwnowotworową, natomiast po dłuższym czasie inkubacji aktywność analogów była porównywalna z sulforafanem (Rys. 11). Zaobserwowałam natomiast, że wydłużenie cząsteczki poprzez wprowadzenie grupy metylenowej wzmocniło przeciwnowotworowe własności związku, co było już wcześniej sygnalizowane w literaturze⁵⁰. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują również, że choć w przypadku sulforafanu konformacja absolutna jest czynnikiem decydującym o aktywności biologicznej cząsteczki, to oba izomery analogów sulforafanu wykazują podobną aktywność. Powyższe wyniki wskazują, że mechanizm działania i cele molekularne sulforafanu i jego analogów mogą być różne. W przypadku komórek prawidłowych obserwowałam taką samą zależność aktywności związku od jego struktury. Tylko sulfotlenek 4-izotiocyjanianobutyloowo 2'2'2'-trifluoroetylowy (3) wykazał słabszy efekt wobec komórek prawidłowych, niż w stosunku do komórek nowotworowych i ten związek można uznać za najbardziej obiecujący analog, w odniesieniu do komórek czerniaka.

⁵⁰ Lui VW, Wentzel AL, Xiao D, Lew KL, Singh SV, Grandis JR. Carcinogenesis. 2003;24(10):1705-12.

W trakcie planowania dalszej współpracy powstała koncepcja nowych analogów sulforafanu posiadających w swej strukturze atom selenu. Wyniki badań prowadzonych przeze mnie nad oddziaływaniem analogów sulforafanu i związkiem selenu – selolem wskazywały, że taka modyfikacja cząsteczki sulforafanu może okazać się korzystna. Związki selenu, w tym izotiocyjany są znane jako efektywne przeciwutleniacze, wskazuje się, że mogą mieć również działanie przeciwnowotworowe⁵¹. Ponownie, zespół prof. Kielbasińskiego zsyntetyzował serię nowych analogów sulforafanu, w których w miejsce ugrupowania izotiocyjanianowego wprowadzono ugrupowanie izoselenocyjanianowe, a w miejsce podstawnika S-metylowego wprowadzono ugrupowanie fluororganiczne (Rys.12). Analogi sulforafanu posiadające w swej strukturze zarówno atomy selenu jak i fluoru nie były dotychczas przedmiotem badań.



- sulfid 4-izoselenocyjanianobutylo-2',2',2'-trifluoroetylowy 7a
- sulfid 5-izoselenocyjanianopentylo-2',2',2'-trifluoroetylowy 7b
- sulfid 4-izoselenocyjanianobutylo-pentafluorofenylo-7c
- sulfid 5-izoselenocyjanianopentylo-pentafluorofenylo-7d
- sulfid 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-fluorofenylo-7e
- sulfid 5-izoselenocyjanianopentylo-4'-fluorofenylo-7f
- sulfid 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluoro-fenylo-7g
- sulfid 5-izoselenocyjanianopentylo-4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluorofenylo-7h
- sulfotlenek 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-fluorobenzylowy 8i
- sulfotlenek 5-izoselenocyjanianopentylo-4'-fluorobenzylowy 8j
- sulfotlenek 4-izoselenocyjanianobutylo-3',5'-bis-(trifluorometylo)fenylo-8k
- sulfotlenek 5-izoselenocyjanianopentylo-3',5'-bis-(trifluorometylo)fenylo-8l

Rys.12. Struktury badanych fluorowych pochodnych izoselenocyjanianów.

⁵¹ Selenius M, Rundlöf AK, Olm E, Fernandes AP, Björnstedt M. Antioxid Redox Signal. 2010;12(7):867-80.

Ponownie zajęłam się przeprowadzeniem badań biologicznych. Bazując na wynikach badań własnych do badań zdecydowałam się wprowadzić dodatkowo linie komórkowe raka sutka. Wybrałam linie komórkowe reprezentujące dwa podtypy. Jako model raka wrażliwego na terapię wybrałam komórki linii nowotworowej Mcf7 reprezentujące Typ luminalny A, charakteryzujący się ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych, brakiem nadekspresji receptora HER-2 (ludzki nabłonkowy czynnik wzrostu) oraz niską wartością markera proliferacji Ki-67. Druga linia komórkowa MDA-MB-231 to model raka opornego na terapię - potrójnie negatywny rak sutka (basal-like) charakteryzujący się brakiem receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz brakiem nadekspresji receptora HER-2. Dodatkowo dla wybranych związków przeprowadzono jak poprzednio badania na linii czerniaka MALME-3M. Linia fibroblastów jelitowych CRL-1790 stanowiła model tkanki zdrowej.

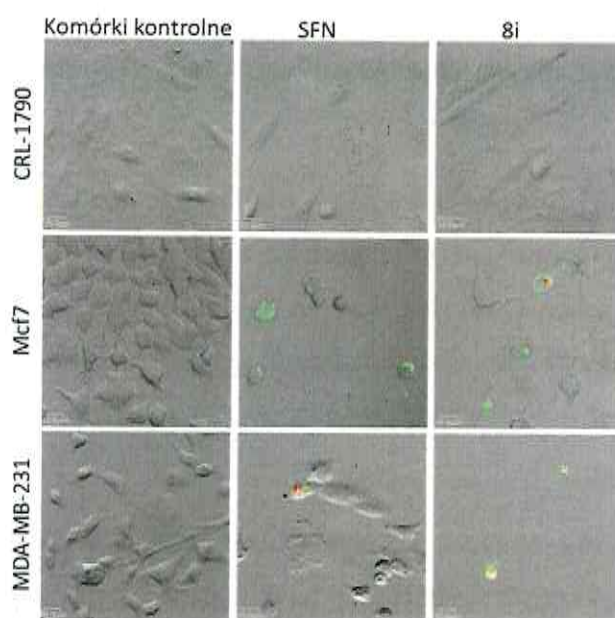
W przypadku pochodnych sulforafanu zawierających atomy selenu i fluoru uzyskałam bardzo obiecujące wyniki. W liniach komórkowych MALME-3M cytotoksyczność związków była dwu, a nawet trzykrotnie wyższa w porównaniu do pochodnych zawierających tylko atomy fluoru. Ponadto okazało się, że pochodne te wykazują silniejsze właściwości przeciwnowotworowe wobec komórek raka sutka, niż w przypadku komórek czerniaka.

Badane pochodne wykazywały różną aktywność biologiczną w zależności od struktury. Wraz ze zwiększającą się liczbą atomów fluoru w cząsteczce zwiększa się jej aktywność przeciwnowotworowa. Dodatkowo zaobserwowałam, że utlenienie siarki oraz wprowadzenie dodatkowej grupy $-CH_2$ zwiększyły aktywność powstałych cząsteczek. Takie wnioski dla izotiocyanianów zawierających w swej strukturze dodatkowy atom selenu uzyskał również Crampsie⁵² i współpracownicy w badaniach na liniach komórkowych różnych nowotworów. Wyniki własnych badań wskazują jednak, że wzrost cytotoksyczności związku w następstwie wprowadzenia do jego struktury grupy CH_2 był również obserwowany w komórkach prawidłowych, co wskazuje że ten kierunek modyfikacji cząsteczki izotiocyanianu nie jest korzystny w kontekście jego selektywności.

Selektywność według wielu badaczy jest najważniejszą cechą w badaniach rozwojowych leku. Wyniki badań opisane w H4 i H6 wskazują, że sulforafan wykazywał niską selektywność. Natomiast wyniki otrzymane dla analogów wskazują, że wprowadzenie

⁵² Crampsie MA, Pandey MK, Desai D, Spallholz J, Amin S, Sharma AK. Chem Biol Interact. 2012;200(1):28-37.

do cząsteczki sulforafanu atomów fluoru i selenu istotnie poprawiło selektywność związku. Największą selektywnością (indeks selektywności > 10) cechował się sulfotlenek 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-fluorobenzylowy (**8i**). Co istotne związek ten charakteryzuje się silniejszym działaniem wobec komórek raka sutka trójnegatywnego MDA-MB-231 niż wobec komórek lekowrażliwych Mcf7. Wstępne badania nad mechanizmem działania tego analogu wykazały, że związek ten redukuje liczbę komórek i indukuje proces apoptozy w większym stopniu w komórkach MDA-MB-231 niż Mcf7 (Rys 13). Wyniki tych badań stanowiły podstawę zgłoszenia patentowego [H9]



Rysunek 13. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające wpływ sulforafanu (SFN) i jego analogu (**8i**) na wzrost komórek prawidłowych (CRL-1790) i nowotworowych (Mcf7 i MDA-MB-231) oraz indukcję apoptozy (fluorescencja zielona – fosfatydyloseryna po zewnętrznej stronie błony komórkowej jako marker wczesnej apoptozy, fluorescencja czerwona – jodek propidyny barwiący jądra martwych komórek) [H6].

Uzyskane dane są szczególnie istotne z punktu widzenia terapii potrójnie negatywnego raka sutka. W przypadku tego typu nowotworu nie jest możliwe wdrożenie terapii hormonalnej lub celowanej. Stosowane są leki toksyczne takie jak doksorubicyna czy tamoksyfen, które cechują się poważnymi działaniami ubocznymi. W badaniach *in vitro* w

komórkach raka sutka indeks selektywności dla tych leków wynosi poniżej 2^{53,54} jest więc 5 razy gorszy niż dla badanych przeze mnie pochodnych sulforafanu. Uzyskane wyniki wskazują, że analogi sulforafanu zawierające selen i fluor, w szczególności sulfotlenek 4-izoselenocyjanianobutylo-4'-fluorobenzylowy mogą być obiecującymi kandydatami na leki stosowane w terapii raka sutka, w tym również potrójnie negatywnego.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazują, że charakter działania sulforafanu i jego pochodnych nie jest jednoznaczny. Obserwowane w trakcie badań niekorzystne własności sulforafanu w komórkach nowotworowych - zdolność do aktywacji systemu detoksykacji i niepożądane interakcje z lekami wskazują, że powinno wprowadzić się wytyczne dla jego bezpiecznego stosowania w trakcie terapii. Jednocześnie uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że sulforafan lub jego analogi węglowe mogą być rozpatrywane jako kandydaci na adjuwant w chemioterapii, a jego wybrane analogi zawierające selen i fluor jako potencjalne, nowe leki przeciwnowotworowe.

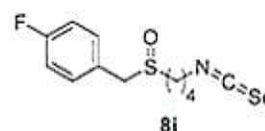
Najważniejsze osiągnięcia i wnioski z przeprowadzonych badań:

1. Sulforafan wykazuje doskonałe własności cytoprotekcyjne w komórkach prawidłowych jelita grubego – zwiększa aktywności zależnych od NRF2 enzymów 2 i 3 fazy metabolizmu ksenobiotyków.
2. Sulforafan w sposób selektywny wpływa na aktywność białka transportowego MRP1 pełniącego kluczową rolę w eliminacji ksenobiotyków komórki i rozwoju zjawiska oporności lekowej — podnosi jego ekspresję tylko w komórkach prawidłowych jelita grubego.

⁵³ Weldon DJ, Saulsbury MD, Goh J, Rowland L, Campbell P, Robinson L, Miller C, Christian J, Amis L, Taylor N, Dill C, Davis W Jr, Evans SL, Brantley E. Bioorg Med Chem Lett. 2014;24(15):3381-4.

⁵⁴ Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, Cooperwood JS, Latinwo LM, Goodman CB. Anticancer Res. 2009;29(8):2993-6.

3. Własności sulforafanu w komórkach nowotworowych jelita grubego są niejednoznaczne i zależą od badanej linii komórkowej. Indukcja aktywności MRP w komórkach Caco-2 może prowadzić do zwiększenia oporności komórek na chemioterapię, wzrost aktywności NQO1 i brak wpływu na aktywność MRP w komórkach HT-29 może sugerować, że sulforafan mógłby znaleźć zastosowanie w innowacyjnych terapiach onkologicznych wykorzystujących aktywność enzymu NQO1, do przekształcania proleków w aktywne metabolity.
4. Wykazano istnienie w komórkach nowotworowych jelita grubego Caco-2 nieopisanych dotąd interakcji sulforafanu i jego analogu z wydłużonym łańcuchem węglowym z powszechnie stosowanymi lekami, prowadzących do zmiany aktywności NRF2-zależnych enzymów biorących udział w metabolizmie leków. Oddziaływania te mają charakter najczęściej antagonistyczny, ale ich znaczenie jest różne w zależności od typu enzymu, oraz stężenia izotiocyanianu. Modyfikacja cząsteczki sulforafanu prowadzi do zwiększenia własności cytoprotekcyjnych, które w komórkach nowotworowych są niepożądane.
5. Sulforafan i jego węglowe analogi wykazują w modelu komórek prawidłowych antagonistyczne interakcje w podaniu łącznym z 5-fluorouracylem, co prowadzi do redukcji cytotoksycznych efektów łącznego podania tych związków.
6. Interakcję między sulforafanem, a dokсорubicyną i selolem mają charakter synergizmu i prowadzą do zwiększenia efektu przeciwnowotworowego kombinacji w komórkach nowotworowych jelita grubego i sutka. Zgłoszona została do Urzędu Patentowego RP nowa strategia dla chemioterapii, w której sulforafan pełni rolę adjuwanta
7. Analogi sulforafanu zawierające selen i fluor, w szczególności sulfotlenek 4-izoselenocyjanianobutylowo-4'-fluorobenzyłowy mogą być kandydatami na nowe, potencjalne leki stosowane w terapii raka sutka, w szczególności potrójnie negatywnego. To rozwiązanie zostało zgłoszone do Urzędu Patentowego RP.



III. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

1. Wykaz publikacji

a. Przed doktoratem

Badanie własności izotiocyanianów jako blokerów metabolizmu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (tematyka doktoratu):

1. Skupińska K, Misiewicz I and Kasprzycka-Guttman T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Pol Pharm-Drug Research*. 2004;61(3):233-240.
2. Skupińska K, Zylm M, Misiewicz I and Kasprzycka-Guttman T. Interaction of anthracene and its oxidative derivatives with human serum albumin. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(1):101-112.
3. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. A comparison of the concentration-effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells. *Arch Tox*. 2007;81(3):183-200.

Badanie własności proapoptotycznych i detoksykacyjnych sulforafanu:

4. Misiewicz I, Skupińska K and Kasprzycka-Guttman T. Sulforaphane and 2-oksoheksyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells. *Oncol Rep*. 2003;10(6):2045-2050.
5. Misiewicz I, Skupińska K, Kowalska E, Lubinski J, Kasprzycka-Guttman T. Sulforaphane-mediated induction of phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H: quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cells. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(3):711-721.
6. Misiewicz I, Kozar A, Skupińska K, Kowalska E, Lubinski J, Kasprzycka-Guttman T. Inhibition of cell cycle and induction of apoptosis by sulforaphane in cell lines carrying various inherited BRCA1 mutations. *Oncol Rep*. 2005;13(4):659-665.
7. Misiewicz I, Kozar A, Skupińska K, Kowalska E, Lubinski J, Kasprzycka-Guttman T. Inhibition of cell cycle and induction of apoptosis by 2-oxoheksyl isothiocyanate and alysin in cell lines carrying various inherited BRCA1 mutations. *Drug Dev Res*. 2005;65(2):84-92.

8. Misiewicz I, Skupińska K and Kasprzycka-Guttman T. Differential response of human healthy lymphoblastoid and CCRF-SB leukemia cells to sulforaphane and its two analogues: 2-oxohexyl isothiocyanate and alyssin. *Pharmacol Rep.* 2007;59(1):80-87.

Badanie mechanizmu działania leków i związków przeciwnowotworowych:

9. Suchocki P, Misiewicz I, Skupinska K, Wacławek K, Fijałek Z, Kasprzycka-Guttman T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. *Oncol Rep.* 2007;18(4):893-899.
10. Gruber BM, Anuszevska EL, Bubko I, Kasprzycka-Guttman T, Misiewicz I, Skupińska K, Priebe W, Fokt I. Constitutive activation of transcription factor NFκB as a possible marker of sensitivity of neoplastic cells to anthracyclines. *Acta Pol Pharm-Drug Research.* 2005;62(1):17-23.
11. Gruber BM, Anuszevska EL, Bubko I, Kasprzycka-Guttman T, Misiewicz I, Skupińska K, Fokt I, Priebe W. NFκB activation and drug sensitivity in human neoplastic cells treated with anthracyclines. *Acta Pol Pharm-Drug Research.* 2008;65(2):267-271.

b. Po doktoracie (poza cyklem habilitacyjnym)

Badanie własności izotiocyanianów jako blokerów metabolizmu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (tematyka doktoratu):

1. Skupinska K, Misiewicz-Krzeminska I, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in Mcf7 cells. *Toxicol In Vitro*, 2009;23(5):763-771.
2. Skupinska K, Misiewicz-Krzeminska I, Stypulkowski R, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by benzo[a]pyrene. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009;23(1):18-28.

Badania nad nowymi nośnikami leków:

4. Kijewska K, Głowala P, Wiktorska K, Pisarek M, Stolarski J, Kepińska, D, Gniadek M, Mazur M. Bromide-doped polypyrrole microcapsules modified with gold nanoparticles. *Polymer.* 2012;53(23):5320-5329.
5. Kijewska K, Jarzębińska A, Kowalska J, Jemielity J, Kępińska D, Szczytko J, Pisarek M, Wiktorska K, Stolarski J, Krysiński P, Twardowski A, Mazur M. Magnetic-Nanoparticle-

Decorated Polypyrrole Microvessels: Toward Encapsulation of mRNA Cap Analogues. *Biomacromolecules*, 2013;14(6):1867-1876.

6. Kijewska K, Głowala P, Kowalska J, Jemielity J, Kaczyńska K, Janiszewska K, Stolarski J, Blanchard GJ, Kępińska D, Lubelska K, Wiktorska K, Pisarek M, Mazur M. Gold-decorated polymer vessel structures as carriers of mRNA cap analogs. *Polymer*. 2015;57:77-87.

Badania nad nowymi lekami i terapiami przeciwnowotworowymi:

7. Misiewicz-Krzemińska I, Skupińska K, Graczyk A, Kasprzycka-Guttman T. Influence of protoporphyrin IX amino acid substituents on affinity to human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Biotech Histochem*. 2009;84(1):17-23.
8. Suchocki P, Misiewicz-Krzemińska I, Skupińska K, Niedźwiecka K, Lubelska K, Fijałek Z, Kasprzycka-Guttman T.: Selenitetriglicerydes affect CYP1A1 and QR activity by involvement of reactive oxygen species and Nrf2 transcription factor. *Pharm Rep*. 2010;62(2): 352-336.
9. Nowak-Stępniewska A, Wiktorska K, Małecki M, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Cytotoxicity of PP(Arg)(2)- and Hp(Arg)(2)-mediated photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in prostate carcinoma in vitro. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):497-505.
10. Nowak-Stępniewska A, Małecki M, Wiktorska K, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)2-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cell lines. Part I. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011;8(1):39-48.
11. Krogul A, Cedrowski J, Wiktorska K, Ozimiński WP, Skupińska J, Litwinienko G. Crystal structure, electronic properties and cytotoxic activity of palladium chloride complexes with monosubstituted pyridines. *Dalton Trans*. 2012;41(2):658-666.
12. Nowak-Stępniewska A, Wiktorska K, Małecki M, Milczarek M, Lubelska K, Padzik-Graczyk A. Cytotoxicity of PP(Arg)2- and PP(Ala)2(Arg)2-based photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in human breast cancers in vitro. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(4):603-611.
13. Krogul A, Cedrowski J, Wiktorska K, Oziminski WP, Skupińska J, Litwinienko G. Biological activity of Pd(II) complexes with mono- and disubstituted pyridines- Experimental and theoretical studies. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(9):2765-2768.
14. Naumczuk B, Wiktorska K, Lubelska K, Kawęcki R, Bocian W, Bednarek E, Sitkowski J, Chilmonczyk Z, Kozerski L. New generation of camptothecin derivatives spontaneously alkylating DNA. *New J Chem*. 2016; 40(9): 7978-7985.

15. Drozd E, Krzysztoń-Russjan J, Marczevska J, Drozd J, Bubko I, Bielak M, Lubelska K, Wiktorska K, Chilmonczyk Z, Anuszevska E, Gruber-Bzura B. Up-regulation of glutathione-related genes, enzyme activities and transport proteins in human cervical cancer cells treated with doxorubicin. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:397-406.
16. Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Vicente-Dueñas C, Krzeminski P, Wiktorska K, Corchete LA, Quwaider D, Rojas EA, Corral R, Martín AA, Escalante F, Báñez A, García JL, Sánchez-García I, García-Sanz R, San Miguel JF, Gutiérrez NC. Post-transcriptional Modifications Contribute to the Upregulation of Cyclin D2 in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(1):207-217.

Inne:

17. Wiktorska K. Mikroskopia konfokalna w naukach farmaceutycznych. *Gazeta Farmaceutyczna.* 2010;XIX: 30-33.
18. Mazur P, Magdziarz T, Bak A, Chilmonczyk Z, Kasprzycka-Guttman T, Misiewicz-Krzeminska I, Skupińska K, Polanski J. Does molecular docking reveal alternative chemopreventive mechanism of activation of oxidoreductase by sulforaphane isothiocyanates? *J Mol Model.* 2010;16(7):1205-1212.

2. Rozdziały w książkach

1. Misiewicz I, Skupińska K: Odpady stałe, ciekłe i gazowe. Zapobieganie, powstawanie, utylizacja. Wydanie 1. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Forest, 2009. 978-83-60450-11-6. Odpady szpitalne, 155-173.

2. Zgłoszone i uzyskane patenty

1. Kasprzycka-Guttman T, Fijałek Z, Litwinienko G, Misiewicz I, Skupińska K. Nowe związki, analogi sulforafanu i środek farmaceutyczny. PL 209623 B1, złożony 24.11.2004, przyznano 30.09.2011, WUP 09/11.
2. Kozerski L, Kawęcki R, Naumczuk B, Hyz K, Bocian W, Sitkowski J, Bednarek E, Wiktorska K, Lubelska K. Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use. Zgłoszenie patentowe: EP2912039 (25.10 2013), US20150266888 (25.10 2013) WO2014064654 (25.10 2013), P401 345 (25.10.2012).

3. Cierpień T, Kiełbasiński P, Łuczak J, Wiktorska K, Śliwka L, Chilmonczyk Z, Milczarek M, Karwowska K. Nowe analogi sulforafanu, ich prekursorzy, sposób ich wytwarzania, ich zastosowanie oraz postać farmaceutyczna. Zgłoszenie patentowe: P-414576 (27.10.2015).
4. Wiktorska K, Śliwka L, Krug K, Mazur M, Chilmonczyk Z. Formulacja farmaceutyczna zawierająca izotiocyjaniany i doksorubicynę do zastosowania w leczeniu nowotworów. Zgłoszenie patentowe: P. 414021 (25.10.2015).

3. Kierowanie i udział w projektach badawczych

1. 2015/17/N/ST4/03926 Wielofunkcyjne cząstki hybrydowe do zastosowań w teranostyce. NCN, 2016-2018.
2. N2012/07/N/ST4/01836: Nano- i mikrokapsułki z polipirolu jako potencjalne nośniki w kontrolowanym dostarczaniu leków. NCN, 2013-2016.
3. 2012/05/N/NZ5/02634 Badanie wpływu izotiocyjanianów na właściwości cytostatyczne i cytotoksyczne 5-fluorouracylu w komórkach nowotworowych in vitro. NCN, 2013-2015.
4. R13009706: Badania nad opracowaniem metod alternatywnych do badań nad biodostępnością leków. NCBiR, 2009-2012.
5. N405302236: Badania interakcji pomiędzy sulforafanem a wybranymi lekami na podstawie badań in vitro na układzie modelowym. NCN, 2009-2011. Kierownik
6. N 404 047 32/11119: Izotiocyjaniany jako blokery metabolizmu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. KBN, 2007-2008. Kierownik
7. 2P05F 01927 Badanie własności chemoprewentynnych i mechanizmu działania analogów sulforafanu. KBN, 2004-2007.
8. 2P05F 05427 Badanie cytotoksyczności Selololu na komórki wykazujące oporność wielolekową. KBN, 2004-2007.

4. Współpraca naukowa

1. Zakład Technologii Optoelektronicznych Instytut Optoelektroniki Wojskowa Akademia Techniczna, prof. dr hab. A. Graczyk, dr A. Stępniewska
– badanie własności antyproliferacyjnych protoporfiryn syntetyzowanych i opracowanych w WAT (publikacje → III.1.b: 1,9,10,12)

2. Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, dr Agnieszka Krogul
– badanie własności przeciwnowotworowych pochodnych palladu (publikacje → III.1.b: 11,13)
3. Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, dr hab. M. Mazur
– mikroskopowe badanie jakości mikrokapsulek do transportu leków, badanie ich własności cytotoksycznych i penetracji komórkowej (publikacje → III.1.b: 4,5,6, patent → H8).
4. Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, dr hab. P. Suchocki
– badania własności przeciwnowotworowych selolu (publikacje → III.1.a: 9, III.1.b: 8, H5), opiekun, promotor pomocniczy prac magisterskich i doktorskich (→ punkt III.2 i III.3)
5. Zakład Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych (CBMM) PAN w Łodzi, prof. dr hab. P. Kiełbasiński
– badanie własności przeciwnowotworowych nowych pochodnych sulforafanu syntetyzowanych w CBMM (publikacje → H4, H7, patent → H9)
6. Instytut Chemii Organiczej, Zakład Leków Sfałszowanych i Używek NIL, prof. dr hab. L. Kozerski
- badanie własności przeciwnowotworowych pochodnych kamptotecyny syntetyzowanych w ICHO, (publikacja → III.1.b: 14, patent → III.2:2)
7. Servicio de Hematología, Hospital Universitario, Salamanka, Hiszpania, dr Irena Misiewicz-Krzemińska
- mikroskopowa identyfikacja izoform mRNA cykliny D₂ (CCND2) w szpiczaku mnogim (publikacja → III.1.b: 16).

5. Nagrody i stypendia

1. Best Poster Award – International Conference on Enzyme Technology, Varadero, Cuba 20-23.06.2007
2. Stypendystka programu Pomost (wsparcie dla kobiet w ciąży), C/28. FNP, 09.2010-02.2011.

6. Szkolenia naukowe:

1. The Third International School of Cytometry, Uniwersytet Jagielloński, Krakow. 26-31.10. 2002
2. Techniki immunocytochemiczne i hybrydyzacji in situ na poziomie mikroskopu, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń. 2 - 4. 02. 2009
3. 1st European short course on "Time-Resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy", PicoQuant GmbH, Berlin, Niemcy. 17 – 19. 02. 2009.

7. Podsumowanie dorobku

	PRZED DOKTORETEM (11)			PO DOKTORACIE (25)		
	IF	MNiSW	IC	IF	MNiSW	IC
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	11,624	134	117,64	64,196	641	84,99
Opisy przypadków	-	-	-	-	-	-
Prace poglądowe	-	5	6,97	-	6	4,09
RAZEM	11,624	139	124,61	64,196	647	89,08

Łącznie:

IF= 75,820; MNiSW = 786; IC = 213,69

LICZBA CYTOWAŃ z bazy Web of Science z dn. 6.03.2017, (bez autocytowań) = 204

Indeks Hirscha z bazy Web of Science z dn. 6.03.2017 = 10

III. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

1. Recenzje prac naukowych

3 recenzje (Studies in Natural Products Chemistry, Food and Chemical Toxicology, Disease Markers)

Opieka nad doktorantami

Promotor pomocniczy:

1. mgr Aleksandra Dąbrowska: Nowe związki anty-HIV. Aktywność i mechanizm działania – modelowanie molekularne, synteza, badania biologiczne. Wydział Farmaceutyczny Warszawski Uniwersytet Medyczny. 2016 -
2. mgr Lidia Śliwka. Biologiczne interakcje Selolu z izotiocyjanianami. Wydział Farmaceutyczny Warszawski Uniwersytet Medyczny. 2015 -

Opiekun naukowy:

1. mgr Pamela Krug: Nośniki leków antynowotworowych do terapii celowanej. Międzywydziałowe Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych. 2015-

2. Opieka nad studentami

Promotor prac magisterskich:

1. Karolina Zakrzewska: Badanie interakcji izotiocyjanianów z 5 – fluorouracylem w linii komórkowej raka prostaty PC-3. Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW. 2009-2010.
2. Dominika Rogulska: Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW. 2016-

Opiekun prac magisterskich:

1. Monika Zylm: Wyznaczanie stałych wiązania antracenu i jego pochodnych tlenowych z albuminą. (Wydział Chemii UW), 2004.
2. Anna Adamiec: Wpływ sulforafanu na aktywność enzymów I fazy indukowaną związkami aromatycznymi w komórkach ludzkiej hepatomy. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2005.
3. Rafał Stypułkowski: Zastosowanie analogów sulforafanu jako inhibitorów aktywności enzymów cytochromu P450. (Wydział Chemii UW), 2006.
4. Karolina Waclawek: Ocena cytotoksyczności Selolu 5% i 7% na komórkach linii HL-60, HL-60/DOX i HL-60/VINC. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2006

5. Marta Kargol: Kompleksy chlorku palladu z podstawionymi pirydynami-aktywność katalityczna i cytotoksyczna (Wydział Chemii UW), 2008
6. Małgorzata Błaszczyk: Wyznaczanie stałych wiązania izotiocyjanianów z białkiem na przykładzie albuminy. (Wydział Chemii UW) 2008
7. Marek Papaj: Badanie właściwości chemoprewentynowych izotiocyjanianów na linii komórkowej MDA-MB-231 pozbawionej receptora estrogenowego. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2009.
8. Jakub Cędrawski: Aktywność przeciwnowotworowa związków kompleksowych palladu (II) o budowie płaskiego kwadratu. (Wydział Chemii UW), 2011
9. Alicja Blichta: Aktywność antyproliferacyjna i mechanizm działania kombinacji izotiocyjanianów i 5-fluorouracylu w komórkach raka piersi. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2014
10. Magdalena Wesołowska: Badanie interakcji Selolu 5% z izotiocyjanianami w linii komórkowej raka jelita grubego HT-29. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2014
11. Maksym Żegota: Badanie interakcji Selolu z izotiocyjanianami wobec linii komórkowych raka jelita grubego Caco-2 oraz raka piersi MCF-7. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2014
12. Małgorzata Danielak: Badanie interakcji Selolu z izotiocyjanianami wobec linii komórkowych raka piersi MDA-MB-231 oraz komórek prawidłowych CRL-1790. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2015
13. Pamela Krug: Opracowanie i ocena aktywności przeciwnowotworowej nośników lipidowych zawierających nowe połączenia cytostatyków z Selołem i izotiocyjanianami. (Wydział Chemii UW), 2015
14. Katarzyna Karwowska: Badanie własności przeciwnowotworowych nowej klasy związków siarkowych i fluorowych, pochodnych izoselenocyjanianów. (Wydział Farmaceutyczny WUM), 2015

3. Uczestnictwo w konferencjach

Autor i współautor ponad 50 doniesień na 15 konferencjach międzynarodowych i 11 krajowych:

Konferencje międzynarodowe:

1. Skupińska K, Bojarska E, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Determination of the Affinity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons toward Serum Albumin. 8th International Congress on Amino Acids and Protein, Rzym, Włochy, 5-9 września 2003

2. Misiewicz I., Skupinska K. and Kasprzycka-Guttman T. Effect of sulforaphane on human lymphoblastoid cells. 8th International Congress on Amino Acids and Protein, Rzym, Włochy, 5-9 września 2003
3. Misiewicz I, Skupinska K, Kasprzycka-Guttman T. The influence of BRCA1 mutation on the response of cells to chemopreventive substances. 30th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS)/9th IUBMB Conference, Budapeszt, Węgry, 2-5 lipca 2005
4. Skupińska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. CYP1A1 and CYP1A2 enzymes induction in MCF7 cells after exposure to various polycyclic aromatic hydrocarbons. 5th Parnas Conference 'Molecular Mechanisms of Cellular Signaling', Kijów, Ukraina, 26-29 kwietnia 2005
5. Misiewicz I, Skupińska K, Kasprzycka-Guttman T. Differential response of human healthy lymphoblastoid and ccrf-sb leukemia cells to sulforaphane and its two analogues: 2-oxohexyl isothiocyanate and alyssin. 5th Parnas Conference 'Molecular Mechanisms of Cellular Signaling', Kijów, Ukraina, 26-29 kwietnia 2005
6. Skupińska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Isothiocyanates inhibit CYP1A1 and CYP1A2 enzymes induced by polycyclic aromatic hydrocarbon. International Conference on Enzyme Technology Relatenz 2007, Varadero, Kuba, 20-23 czerwca 2007
7. Misiewicz I, Skupińska K, Kasprzycka-Guttman T. Differences in the mechanism of phase II induction in lymphocytes and leukemia. International Conference on Enzyme Technology Relatenz 2007, Varadero, Kuba, 20-23 czerwca 2007
8. Misiewicz-Krzemińska I, Skupińska K, Kasprzycka-Guttman T. The differences in chemopreventive activity of structurally-related isothiocyanates. 12th World Congress on Advanced in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine and Chemoprevention, Hersonissos, Grecja, 11-13 października 2007
9. Skupińska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. The effect of sulforaphane and its two synthetic analogues on cyp1a1 and cyp1a2 activity. 12th World Congress on Advanced in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine and Chemoprevention, Hersonissos, Grecja, 11-13 października 2007
10. Misiewicz-Krzemińska I, Skupinska K, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. Molecular targets of sulforaphane and its analogues .(wystąpienie ustne) 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Grecja, 9-11 października 2008
11. Skupinska K, Misiewicz-Krzemińska I, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T. Inhibition of catalytic activity of cyp1a1 and cyp1a2 enzymes by isothiocyanates. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Grecja, 9-11 października 2008
12. Skupinska K, Misiewicz – Krzemińska I, Kasprzycka- Guttman T. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in live cells. Focus On Microscopy, Kraków, 5-8 kwietnia 2009
13. Skupińska K, Lubelska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Isothiocyanates as chemopreventive agents against polycyclic aromatic hydrocarbons. Natural Compounds in Cancer Prevention and Treatment, Smolenice Castle, Słowacja, 13-15 października 2009 (wystąpienie ustne)

14. Lubelska K, Skupińska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Sulforaphane and alyssin as chemopreventive agents. Natural Compounds in Cancer Prevention and Treatment, Smolenice Castle, Słowacja, 13-15 października 2009
15. Milczarek M., Misiewicz I., Skupińska K., Lubelska K., Kasprzycka-Guttman T. Analysis of interaction of isothiocyanates with 5-fluorouracyl in Chinese Hamster Lung Fibroblasts cell Line. Natural Compounds in Cancer Prevention and Treatment, Smolenice Castle, Słowacja, 13-15 października 2009
16. Milczarek M, Wiktorska K, Lubelska K, Śliwka L, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. Selective, synergic and additive interaction types between 5-fluorouracil and 2-oxohexyl isothiocyanate after sequential treatment in colon cancer cell lines. 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Hiszpania, 25-28 czerwca 2014
17. Śliwka L, Lubelska K, Milczarek M, Mielczarek S, Gilbert A, Flis A, Suchocki P, Wiktorska K. Combined administration of 5-fluorouracil as well as 2-oxohexyl isothiocyanate with selol give synergistic toxic effect on HT -29 colorectal cancer cell lines. 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Hiszpania, 25-28 czerwca 2014.
18. Lubelska K, Wiktorska K, Śliwka L, Milczarek M, Chilmonczyk Z. Isothiocyanates are chemopreventive compounds and reduce the MDR phenomenon - study on normal and colon cancer cells. 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Hiszpania, 25-28 czerwca 2014
19. Śliwka L, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, Danielak M, Żegota M, Suchocki P, Wiktorska K. The synergic and additive interaction between Selol and sulphoraphane in breast and colon cancer cell lines. 9th International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Grecja, 6-10 października 2014.
20. Lubelska K, Wiktorska K, Milczarek M, Śliwka L, Chilmonczyk Z. New analog of sulforaphane – ITC 2-oxoheptyl reduce the MDR phenomenon - study on normal and colon cancer cells. 9th International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Grecja, 6-10 października 2014
21. Milczarek M, Wiktorska K, Śliwka L, Lubelska K, Dąbrowska K, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. The mechanism of synergism between 5-fluorouracil and 2-oxohexyl isothiocyanate in the colon cancer cell Line HT-29. Ninth International Conference of Anticancer Research. Sithonia, Grecja, 6-10 października 2014
22. Naumczuk B, Kawęcki R, Bednarek E, Bocian W, Sitkowski J, Lubelska K, Wiktorska K, Kozerski L. NMR monitoring of dna alkylation by camptothecin derivatives, VIIIth Symposium, Nuclear Magnetic Resonance In Chemistry, Physics And Biological Sciences, Warszawa, 24 – 26 czerwca 2014.
23. Naumczuk B, Kawęcki R, Bednarek E, Bocian W, Sitkowski J, Kozerski L, K. Lubelska, K. Wiktorska. New camptothecin derivatives alkylating DNA oligomers: the synthesis, physicochemical data and application as Topo I inhibitors. Euromar 2014, Zürich, Szwajcaria, 29 czerwca – 03 lipca 2014.
24. Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete, ME, Vicente-Duenas C, Krzeminski P, Wiktorska, K et al. Post-Transcriptional Modifications Explain the Overexpression of CCND2 in Multiple Myeloma, 56th Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology, San Francisco, USA, 06-09 grudzień 2014.

25. Cierpiał T, Kielbasiński P, Łuczak J, Wiktorska K, Chilmonczyk Z, Śliwka L. Fluorinated isoselenocyanate analogs of Sulforaphane – synthesis and biological Activity. 11th International Conference on Heteroatom Chemistry, Caen, France, 14-19czerwca 2015.
26. Wiktorska K, Krug P, Lubelska K, Mielczarek L, Milczarek M, Chilmonczyk Z. Anti-cancer potential of sulforaphane and its analogs. XVIII International Symposium on "Advances in Chemistry of Heteroorganic Compounds", Łódź, 25 listopada 2016.

Konferencje krajowe

1. Skupińska K. Mikroskopia konfokalna w mikrobiologii i farmacji. Mikrobiologia farmaceutyczna, Zakopane, 15- 17października 2009 (wystąpienie ustne)
2. Wiktorska K, Milczarek M, Anuszevska E, Dutkiewicz-Wilczyńska J. Confocal microscopy – a novel tool in drug analysis. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Zakopane, 10-12 maja 2010 (wystąpienie ustne)
3. Lubelska K, Misiewicz-Krzemińska I, Milczarek M, Wiktorska K. The possible effect of Sulforaphane on the bioavailability of drugs. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Zakopane, 10-12 maja 2010
4. Krogul A, Cędrovski K, Skupińska J, Milczarek M, Lubelska K, Wiktorska K. Anticancer activity of new coordinative palladium (II) complexes. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Zakopane, 10-12 maja 2010
5. Milczarek M, Misiewicz-Krzemińska I, Lubelska K, Wiktorska K. Antiproliferative and cytotoxic effect of 5-fluorouracil and sulforaphane in chinese hamster lung fibroblast cell Line. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Zakopane, 10-12 maja 2010
6. Wiktorska K, Lubelska K, Milczarek M. Interaction of sulforaphane with drugs. 45th Meeting of the Polish Biochemical Society, Wisła, 20 – 23 września 2010
7. Lubelska K, Modzelewska KB, Śliwka L, Milczarek M, Wiktorska K. Diverse effect of sulforaphane and 2-oxohexyl on normal and tumor intestinal cells. The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, 5-9 września 2011
8. Milczarek M, Lubelska K, Wiktorska K. The combined effect of 5-fluorouracil and alyssin in normal cellline and prostate cancer cell line. The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, 5-9 września 2011
9. Lubelska K, Milczarek M, Modzelewska KB, Krzysztoń-Russjan J, Anuszevska E, Wiktorska K. Modulation of phase 2 detoxification enzymes by alyssin in Caco-2 cells. The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, 5-9 września 2011
10. Nowak-Stępniewska A, Wiktorska K, Małecki M, Milczarek M, Lubelska K, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Cytotoksyczność PDT z wykorzystaniem fotouczulaczy porfirynewych PPAArg2, HpArg2 i PPAAla2Arg2 oraz indukcja wczesnej fazy apoptozy w komórkach raka sutka i prostaty. III Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Medycyny Fotodynamicznej i Laserowej „Światło w medycynie”, Polczyn Zdrój, 16-18 października 2011.
11. Wiktorska K, Lubelska K, Milczarek M. Sulforaphane – a modulator of detoxifying enzymem can alter medicines effectiveness. VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki

- o Leku, Hotel Ossa & Spa k. Rawy Mazowieckiej, 30 maja – 01 czerwca 2012
(wystąpienie ustne)
12. Lubelska K, Zbroińska I, Milczarek M, Matosiuk D, Chilmonczyk Z, Wiktorska K. Sulforaphane modulates MRP expression and activity in Caco-2 cells. VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Hotel Ossa & Spa k. Rawy Mazowieckiej, 30 maja – 01 czerwca 2012
 13. Wiktorska K, Lubelska K, Milczarek M, Chilmonczyk Z. Formation of Caco-2 monolayer – model for the prediction of intestinal drug absorption; metod validation. VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Hotel Ossa & Spa k. Rawy Mazowieckiej, 30 maja – 01 czerwca 2012
 14. Milczarek M, Szelańska A, Lubelska K, Bieńko M, Matosiuk D, Chilmonczyk Z, Wiktorska K. The combined effect of 5-fluorouracil and sulforaphane in prostate cancer cell Line. VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Hotel Ossa & Spa k. Rawy Mazowieckiej, 30 maja – 01 czerwca 2012
 15. Milczarek M, Wiktorska K, Lubelska K, Śliwka L, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. Comparison of combined effects of 5-fluorouracil and allysin after concurrent treatment in colon and breast cancer cells lines. W. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 12-14 maja 2014
 16. Śliwka L, Milczarek M, Lubelska K, Mielczarek S, Gilbert A, Flis A, Suchocki P, Wiktorska K. Effect of MTT and CVDE evaluation methods of cytotoxic action of compounds on the results of interaction studies of new, organic selenium compound (IV) with Alyssin. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 12-14 maja 2014
 17. Lubelska K, Wiktorska K, Śliwka L, Milczarek M, Gilbert A, Chilmonczyk Z. New analog of sulforaphane 2-oxoheptyl isothiocyanate as a compound with selective effect on the normal and colon cancer cells. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 12-14 maja 2014
 18. Śliwka L, Mielczarek S, Lubelska K, Milczarek M, Suchocki P, Wiktorska K. Intensification of the cytotoxic effect of Selol by sulforaphane and allysin observed on Caco-2 and HT-29 colorectal cancer cell lines, 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, Warszawa, 9-12 września 2014
 19. Lubelska K, Wiktorska K, Śliwka L, Milczarek M, Chilmonczyk Z. Regulation of Nrf2-dependent pathway in normal and tumor cells of the digestive system by ITC-2-oxoheptyl. 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, Warszawa, 9-12 września 2014
 20. Milczarek M, Wiktorska K, Lubelska K, Śliwka L, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. Synergic and additive types of interaction between 5-fluorouracil and 2-oxohexyl isothiocyanate in concurrent treatment in Breast cancer cells and not in colon cancer cells. 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, Warszawa, 9-12 września 2014
 21. Śliwka L, Wiktorska K, Koronkiewicz M, Milczarek M, Lubelska K, Mielczarek S, Suchocki P, Chilmonczyk Z. Selol and sulforaphane in the colon cancer cell line HT-29. VII Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 17-19 września 2015

22. Milczarek M, Wiktorska K, Lubelska K, Śliwka L, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. p-21 mediated synergic cytostatic effects of combined treatment with 5-fluorouracil and sulforaphane. VII Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 17-19 września 2015
23. Cierpień T, Kiełbasiński P, Łuczak J, Wiktorska K, Chilmonczyk Z, Śliwka L. Fluorowane isoselenocyjanianowe analogi sulforafanu – synteza i aktywność biologiczna. X Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej, Łódź, 16-18 kwietnia 2015
24. Śliwka L, Wiktorska K, Koronkiewicz M, Milczarek M, Lubelska K, Suchocki P, Chilmonczyk Z. The Mechanism Of Synergism Between Selol And Sulforaphane In The Breast Cancer Cell Line MCF-7. X Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 15-19 maja 2016.
25. Milczarek M, Wiktorska K, Lubelska K, Śliwka L, Matosiuk D, Chilmonczyk Z. Mechanism Of Synergic Interaction Between Sulforaphane And 5-Fluorouracil In The Breast Cell Line Mda-Mb-231. X Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 15-19 maja 2016.
26. Lubelska K, Wiktorska K, Śliwka L, Milczarek M, Chilmonczyk Z. Sulforaphane Regulates Differently Nrf2 Dependent Induction Of Detoxification Enzymes In Normal And Cancer Colorectal Cells. X Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 15-19 maja 2016.
27. Wiktorska K, Śliwka L, Lubelska K, Milczarek M, Krug P, Cierpień T, Kiełbasiński P, Suchocki P, Mazur M, Chilmonczyk Z. Sulforaphane Analogs – New Perspectives In Cancer Treatment? X Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Szydłów, 15-19 maja 2016. Prezentacja ustna.

IV. Działalność organizacyjna i społeczna

Członek Rady Naukowej NIL – kadencja 2016-2020.

Członek Komisji Ekonomiczno-Finansowej Rady Naukowej NIL - kadencja 2016-2020.

Członek Komisji konkursowej ds. Funduszu dla Młodych Naukowców NIL (2017).

