



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

AUTOREFERAT

Urszula Lewandowska

Zakład Biochemii
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2014

Spis treści	strona
Imię i nazwisko.....	3
Dyplomy i stopnie naukowe.....	3
Zatrudnienie w jednostkach naukowych.....	3
Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
Lista publikacji.....	4
Wprowadzenie i motywacja badań.....	5
Streszczenie kluczowych wyników.....	8
Wnioski.....	14
Pozostałe osiągnięcia naukowe.....	15
Działalność dydaktyczna.....	25

1. Imię i nazwisko

Urszula Lewandowska

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

- 2003 Stopień naukowy doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- Tytuł pracy doktorskiej: „*Badanie wpływu interleukiny-6 na zakażenie PBMC (jednojądrzastych komórek krwi obwodowej) in vitro wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV)*”
Promotor: prof. dr hab. Janusz Greger
- 1990 Tytuł zawodowy magister inżynier chemik
Wydział Chemii Spożywczej, Politechnika Łódzka
- Praca magisterska pt.: „*Otrzymywanie i zastosowanie preparatów pektynolitycznych z brzojki i grzybni po fermentacji cytrynowej*”
Promotor: prof. dr hab. Edward Galas
- 1989 Dyplom ukończenia studium pedagogicznego
Instytut Kształcenia Nauczycieli im. Władysława Spasowskiego w Warszawie
Oddział Doskonalenia Nauczycieli w Łodzi

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- | | |
|---|--|
| 01.04.2014 - obecnie
adiunkt | Zakład Biochemii
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi |
| 01.07.2013 - 31.03.2014
adiunkt | Zakład Chemii Biomolekularnej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi |
| 01.11.2009 - 30.06.2013
adiunkt | Zakład Enzymologii Medycznej
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi |
| 01.10.2004 - 31.10.2009
starszy wykładowca | |
| 01.10.2002 - 30.09.2004
wykładowca | Zakład Biochemii Lekarskiej/ Zakład Biochemii Medycznej
Akademia Medyczna w Łodzi/ Uniwersytet Medyczny w Łodzi |
| 01.02.1990 - 30.09.2002
asystent | |

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Monotematyczny cykl publikacji obejmujący zagadnienie pt:

*Wpływ ekstraktów polifenolowych z owoców pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) i z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok) na poziom ekspresji genów zaangażowanych w apoptozę, angiogenezę i metastazę w raku piersi i prostaty*

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

- 1. Lewandowska U., Szewczyk K., Owczarek K., Hrabec Z., Podsędek A., Koziółkiewicz M., Hrabec E.** Flavanols from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit human prostate and breast cancer cell line invasiveness and cause favorable changes in Bax/Bcl-2 mRNA ratio. *Nutrition and Cancer* 2013;65(2):273-285.
doi:10.1080/01635581.2013.749292.
(*impact factor – 2,47 MNiSW – 30*)
- 2. Lewandowska U., Szewczyk K., Owczarek K., Hrabec Z., Podsędek A., Koziółkiewicz M., Hrabec E.** Flavanols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit prostate cells invasiveness and cause changes in Bcl-2/Bax mRNA ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013;61(12):2987-2998.
doi: 10.1021/jf304269x.
(*impact factor – 3,107 MNiSW – 40*)
- 3. Lewandowska U., Szewczyk K., Owczarek K., Hrabec Z., Podsędek A., Sosnowska D., Hrabec E.** Procyanidins from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit invasiveness of breast cancer cells and modulate the expression of selected genes involved in angiogenesis, metastasis, and apoptosis. *Nutrition and Cancer* 2013;65(8):1219-12131.
doi: 10.1080/01635581.2013.830314.
(*impact factor – 2,47 MNiSW – 30*)
- 4. Lewandowska U., Szewczyk K., Hrabec E., Janecka A., Gorlach S.** Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013;61(50):12183-12199.
doi: 10.1021/jf404439b.
(*impact factor – 3,107 MNiSW – 40*)
- 5. Lewandowska U., Owczarek K., Szewczyk K., Sosnowska D., Koziółkiewicz M., Hrabec E.** Differentiated impact of procyanidins from evening primrose on human breast cancer cells. *Central European Journal of Biology* 2014;9(6):647-658.
doi: 10.2478/s11535-014-0299-9.
(*impact factor – 0,633 MNiSW – 20*)

6. **Lewandowska U.,** Owczarek K., Szewczyk K., Podsędek A., Koziołkiewicz M., Hrabec E. Influence of polyphenol extract from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej [Advances in Hygiene and Experimental Medicine]* 2014;68:110-118.
doi: 10.5604/17322693.1088036.
(*impact factor – 0,633 MNiSW – 15*)
7. **Lewandowska U.,** Gorlach S., Owczarek K., Hrabec E., Szewczyk K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej [Advances in Hygiene and Experimental Medicine]* 2014;68:528-40.
doi: 10.5604/17322693.1102278.
(*impact factor – 0,633 MNiSW – 15*)

Liczba punktów z pierwszym / korespondencyjnym autorem:

impact factor – 13,053 MNiSW – 190

Badania, których wynikiem są ww. publikacje, zostały wykonane w Zakładzie Enzymologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (*prof. dr hab. Elżbieta Hrabec*) oraz w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej (*prof. dr hab. Maria Koziołkiewicz*).

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

Wprowadzenie i motywacja badań

Terapie przeciwnowotworowe od lat znajdują się w centrum uwagi wielu zespołów badawczych; od wielu lat można też obserwować imponujący postęp w rozwoju nowych technik obrazowania i terapii, ale pomimo tego śmiertelność z powodu nowotworów wciąż jest wysoka. Wśród kobiet najczęściej zgonów powoduje rak piersi, płuc, żołądka, okrężnicy i/lub odbytnicy oraz szyjki macicy, natomiast wśród mężczyzn – rak płuc, żołądka, wątroby, prostaty, okrężnicy i/lub odbytnicy i przełyku. Przyczyn tego zjawiska należy upatrywać zarówno we wzroście uprzemysłowienia i zanieczyszczenia środowiska, jak i w stylu życia (palenie papierosów, wzrost konsumpcji wysoko przetworzonej żywności, długotrwały stres). Pomimo ogromnego postępu wiedzy w dziedzinie patogenezy nowotworów, leczenie chirurgiczne skojarzone z radio- i chemioterapią w dalszym ciągu jest najskuteczniejszym postępowaniem terapeutycznym.

Obiecującym i coraz bardziej docenianym podejściem w zapobieganiu nowotworom jest chemoprewencja, obejmująca stosowanie syntetycznych lub naturalnych związków w celu zapobiegania, opóźnienia, zahamowania lub odwrócenia procesu kancerogenezy, o czym świadczy liczba badań klinicznych ukierunkowanych na wykorzystanie tych związków w chemioterapii. Obecnie chemoprewencja nabiera nowego znaczenia ze względu na możliwość badania mechanizmów działania związków chemoprewencyjnych na poziomie molekularnym.

Badania epidemiologiczne wskazują na istnienie zależności między zapadalnością na choroby nowotworowe a dietą dominującą na danym obszarze. W krajach azjatyckich częstość występowania niektórych typów nowotworów (raka piersi, jelita grubego, prostaty i płuca) jest niższa niż w Europie i Stanach Zjednoczonych. Jako przyczynę tego zjawiska upatruje się fakt, że dieta azjatycka jest znacznie bogatsza w prozdrowotne polifenole roślinne niż dieta europejska czy amerykańska. Może to być związane z piciem dużej ilości zielonej herbaty, której głównym składnikiem polifenolowym jest galusan epigalokatechiny (*epigallocatechin gallate*, EGCG) oraz z konsumpcją znacznej ilości produktów sojowych zawierających genisteinę.

Badania ostatnich lat wskazują na możliwość wykorzystania naturalnych składników wyizolowanych z roślin jadalnych i leczniczych zarówno w prewencji, jak i w terapii przeciwnowotworowej, wynikającą m.in. z ich plejotropowego działania na komórki nowotworowe. Do aktywnych biologicznie związków pochodzenia roślinnego należą m.in. polifenole, triterpeny, izotiocyjaniiny, alkaloidy i nienasycone kwasy tłuszczowe. Polifenole to związki o dużym zróżnicowaniu strukturalnym, a w konsekwencji o bardzo szerokim spektrum właściwości biologicznych. Modulując niektóre szlaki transdukcji sygnału, mogą one wykazywać m.in. następujące aktywności biologiczne: antyoksydacyjną, antyproliferacyjną, proapoptotyczną, antyangiogenną i przeciwzapalną. Ponadto, związki te wpływają na aktywność niektórych enzymów i innych białek funkcjonalnych. Polifenole mogą zatem wpływać na proces nowotworowy za pośrednictwem różnych mechanizmów, co stwarza możliwość doboru odpowiedniego środka do wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Wzrasta również zainteresowanie ekstraktami polifenolowymi jako naturalnymi środkami chemoprewencyjnymi, wynikające z ich uzupełniających się aktywności i oddziaływań synergistycznych. Powyższe mechanizmy dają nadzieję na wykorzystanie związków polifenolowych oraz ich ekstraktów w prewencji i/lub inhibicji procesu nowotworzenia na etapach inicjacji, promocji i progresji.

W niniejszym autoreferacie przedstawiam moje badania nad oceną wpływu ekstraktów polifenolowych z owoców pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) i z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok) na poziom ekspresji genów zaangażowanych w apoptozę, angiogenezę i metastazę w raku piersi i prostaty. Podstawą do ich rozpoczęcia były wyniki uzyskane w Zakładzie Enzymologii Medycznej, wskazujące na zdolność hamowania aktywności kolagenaz typu IV przez ekstrakt flawanolowy z owoców pigwowca japońskiego.¹ Źródłem enzymów były ludzkie komórki białaczki promielocytowej (HL-60) oraz ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC).

W badaniach źródłem ekstraktów polifenolowych były odtłuszczone nasiona (produkt odpadowy) wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok) z firmy farmaceutycznej Agropharm S.A. (Grupa Adamed) z Tuszyna koło Łodzi oraz dojrzałe owoce pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) zebrane w okolicach Łodzi. Przeprowadzone przeze mnie badania miały charakter nowatorski, bowiem jak dotąd niewiele wiadomo na temat biologicznych aktywności (a w szczególności przeciwnowotworowej) ekstraktów polifenolowych z tych roślin.

¹ Stręk M., Gorlach S., Podsędek A., Sosnowska D., Koziolkiewicz M., Hrabec Z., Hrabec E. Procyanidin oligomers from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55(16): 6447-6452.

Oenothera paradoxa Hudziok (wiesiołek dziwny) należy do rodziny wiesiołkowatych (*Onagraceae* Juss.). Roślina ta jest szeroko rozpowszechniona w Ameryce Północnej i Południowej, a także w Europie i Nowej Zelandii. W Polsce najbardziej znane i zarazem wykorzystywane do celów leczniczych są wiesiołek dwuletni (*Oenothera biennis* L.) i wiesiołek dziwny (*Oenothera paradoxa* L.). Badaniom nad polifenolami z nasion wiesiołka można dodać wartość praktyczną, ponieważ jest on rośliną uprawianą w Polsce w celu pozyskiwania nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasów linolowego i γ -linolenowego (*γ -linolenic acid*, GLA). Opublikowano bardzo wiele prac dokumentujących prozdrowotne działanie oleju z nasion wiesiołka, natomiast na temat polifenoli z tej rośliny można odnaleźć jedynie nieliczne prace.

Chaenomeles japonica Lindl. (pigwowiec japoński) należy do rodziny różowatych (*Rosaceae* Juss.). Roślina ta jest powszechnie uprawiana w Chinach i Japonii. W Polsce pigwowiec japoński postrzegany jest jako krzew dekoracyjny ze względu na oryginalną barwę kwiatów, a jego owoce są jadalne w postaci przetworzonej. Owoce pigwowca cechuje wysoka zawartość kwasów organicznych, błonnika, pektyn i witaminy C, a także specyficzny aromat. Obecnie w bazie PubMed pod hasłem „*Chaenomeles japonica*” indeksowanych jest tylko pięć prac, w tym dwie naszego zespołu.

Zarówno wiesiołek dziwny, jak i pigwowiec japoński stanowią bogate źródła ekstraktów polifenolowych. Co więcej, w przypadku wiesiołka ekstrakcja polifenoli nie wymaga wysokich nakładów finansowych, ponieważ surowiec (wytłoki z nasion) jest wytwarzany w dużych ilościach jako produkt odpadowy przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Pigwowiec japoński nie jest jeszcze uprawiany na skalę przemysłową, jednak jego owoce mogą być w przyszłości wykorzystywane w przemyśle spożywczym.²

Moje badania miały na celu możliwie kompleksowe przebadanie polifenoli z wiesiołka dziwnego i pigwowca japońskiego pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. W badaniach wykorzystałam następujące ekstrakty:

1. ekstrakt polifenolowy z odtłuszczonych nasion wiesiołka (*evening primrose extract*, EPE),
2. ekstrakt flawanolowy z odtłuszczonych nasion wiesiołka (*evening primrose flavanol preparation*, EPFP),
3. ekstrakt flawanolowy z owoców pigwowca (*Japanese quince fruit flavanol preparation*, JQFFP).

Ekstrakty zostały otrzymane i scharakteryzowane w ramach współpracy naukowej z zespołem prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz (z dr Anną Podsędek i dr Dorotą Sosnowską) z Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. EPE został otrzymany poprzez ekstrakcję 70% wodnym roztworem etanolu, natomiast EPFP i JQFFP otrzymano metodą ekstrakcyjno-wytrąceniową zgodnie z procedurą opisaną w polskim patencie nr 169082.³ Charakterystyka ilościowa i jakościowa ekstraktów została przeprowadzona przy użyciu metod spektrofotometrycznych oraz wysokowydajnej

² Rumpunen K. (2003) Japanese quince: Potential new fruit crop for Northern Europe. Final report FAIR-CT-97-3894. Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Balsgård [ISBN: 91-631-3765-8]

³ Oszmiański J. Sposób otrzymywania aktywnych biologicznie oligomerów proantocyjanidyn z surowców roślinnych. Polski patent nr 169082, 1992.

chromatografii cieczowej (*High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD).

Streszczenie kluczowych wyników

Analiza profili polifenolowych ekstraktów wykazała, że odtłuszczone nasiona wiesiołka dziwnego i owoce pigwowca japońskiego stanowią bogate i urozmaicone źródła polifenoli. EPE i EPFP charakteryzowały się wysoką zawartością proantocyjanidyn (flawan-3-ole) i hydrolizowalnych tanin (galo- i elagotaniny) (publikacje 6 i 2). EPE zawierał 578,15 mg polifenoli ogółem/g preparatu, w tym 28,9% flawanoli. Zawartość polifenoli ogółem w EPFP wynosiła 922,89 mg/g, z czego 45,8% stanowiły flawanole. W 2008 r. inny zespół badawczy zidentyfikował w ekstrakcie uzyskanym z odtłuszczonych nasion wiesiołka pochodzących z tego samego źródła (Agropharm S.A.) oprócz flawanoli (galusanu (–)-epikatechiny i proantocyjanidyny B3), dwie hydrolizowalne taniny (oenoteinę B i penta-O-galoilo-beta-D-glukozę) i dwa flawonole (kwercetynę i jej glukuronid).⁴ JQFFP charakteryzował się wysoką zawartością flawanoli, a zwłaszcza procyjanidyn (podgrupa proantocyjanidyn) (publikacja 1). Zawartość polifenoli ogółem w preparacie wynosiła 616,77 mg/g, z czego 48,0% stanowiły flawanole.

Po scharakteryzowaniu badanych ekstraktów następnym, a zarazem najważniejszym dla mnie celem badań była ocena ich właściwości biologicznych, a w szczególności aktywności przeciwnowotworowej. Cel ten zrealizowałam wielotorowo, a zarazem w sposób typowy dla takich badań. W badaniach zastosowałam modele *in vitro*, wykorzystując następujące stabilne linie komórkowe: unieśmiertelnioną prawidłową prostatę (PNT1A), raka prostaty (DU145) i raka sutka (MDA-MB-231 i MCF-7).

Jak wiadomo, transformacja nowotworowa jest procesem wieloetapowym i bardzo złożonym, podczas którego komórka prawidłowa przekształcana jest w nowotworową. Komórki nowotworowe nabywają wielu cech odróżniających je od prawidłowych. Jedną z nich jest niekontrolowany wzrost, wynikający z uruchamiania przez komórki nowotworowe mechanizmów chroniących je przed apoptozą.

Dlatego punktem wyjścia do przeprowadzonych badań była ocena wpływu badanych ekstraktów polifenolowych na wzrost komórek PNT1A, DU145, MDA-MB-231 i MCF-7. Bardzo istotnym aspektem tej oceny był wybór odpowiedniej metody. Wstępne wyniki badań przeprowadzonych z użyciem testu MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*) potwierdziły pojawiające się doniesienia, że polifenole w testach opartych na reakcjach redoks dają fałszywie pozytywny wynik w układzie bezkomórkowym, przekształcając sól tetrazolową do nierozpuszczalnych kryształów formazanu.⁵

⁴ Kiss A.K., Derwińska M., Dawidowska A., Naruszewicz M. Novel biological properties of *Oenothera paradoxa* defatted seed extracts: effects on metalloproteinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(17): 7845-7852.

⁵ Bruggisser R., von Daeniken K., Jundt G., Schaffner W., Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica* 2002; 68(5): 445-448.

Stwierdzono również, że kwercetyna (flawonol zidentyfikowany w ekstrakcie z nasion wiesiołka dziwnego) hamuje aktywność oksydoreduktaz.⁶ Z powyższych powodów do oceny wzrostu komórek wybrałam metodę barwienia fioletem krystalicznym, opartą na wiązaniu się barwnika zarówno z DNA, jak i z białkami komórkowymi.

Ekstrakty z wiesiołka dziwnego i pigwowca japońskiego wykazywały zdolność hamowania wzrostu komórek nowotworowych, przy czym aktywność ta w dużym stopniu zależała od rodzaju linii komórkowej oraz zastosowanego ekstraktu (publikacje 1, 2, 3, 5 i 6). Hamowanie wzrostu było znacznie skuteczniejsze w przypadku komórek MDA-MB-231 niż MCF-7 i DU145. Ponadto, dla obu linii raka sutka zaobserwowałam przejściową stymulację wzrostu przy najniższych stężeniach (25 μ M równoważników kwasu galusowego, *gallic acid equivalents*/GAE) ekstraktów z nasion wiesiołka EPE i EPFP (publikacje 3, 5 i 6). Prawdopodobnie jest to wynikiem efektu hormetycznego, w mechanizm którego mogą być włączone antyoksydacyjne aktywności polifenoli przy niskich stężeniach i prooksydacyjne przy wysokich. W literaturze zostały opisane podobne obserwacje dla garcynolu, polifenolu wyizolowanego ze skórek owoców mangostanu indyjskiego. Badane przeze mnie ekstrakty wykazywały przeciwny efekt w stosunku do komórek raka prostaty (DU145) i prawidłowych komórek prostaty (PNT1A); nie hamowały wzrostu PNT1A, lecz powodowały jego stymulację (publikacje 1, 2 i 6). Wynik ten świadczy o ochronnym i korzystnym działaniu badanych ekstraktów wobec prawidłowych komórek prostaty, a zrazem potwierdził opisywany w literaturze korzystny wpływ proantocyjanidyn na wzrost komórek prawidłowych. Z drugiej strony, należy uwzględnić fakt, że obserwowana stymulacja wzrostu prawidłowych komórek prostaty może skutkować niepożądanymi zmianami *in vivo*, prowadzącymi do łagodnego przerostu gruczołu krokowego (*Benign Prostate Hyperplasia*, BPH).

W trakcie powyższych badań pojawiło się pytanie: czy hamowanie wzrostu komórek nowotworowych wynika z aktywności cytostatycznej czy cytotoksycznej badanych ekstraktów? Wyniki przeprowadzonych badań wskazały na działanie cytotoksyczne badanych ekstraktów wobec komórek raka prostaty i sutka. Wraz z rosnącą liczbą doniesień na temat zaangażowania polifenoli w regulację procesów wewnątrzkomórkowych, stały się one podstawą do sformułowania przeze mnie kolejnego pytania: czy obserwowana aktywność cytotoksyczna była spowodowana indukcją apoptozy w ww. komórkach?

Apoptoza jest procesem stanowiącym naturalną barierę dla rozwoju nowotworu, pozwalającym na eliminację zmienionych nowotworowo komórek bez wywoływania procesu zapalnego i uszkodzenia sąsiadujących komórek. Do jej przebiegu nieodzowna jest aktywacja wielu genów, ekspresja białek regulatorowych i wykonawczych. Proces ten podlega precyzyjnej regulacji, w której uczestniczą głównie białka z rodziny Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym (*B-cell leukemia-2*, Bcl-2) i proapoptotycznym (*Bcl-2-associated protein X*, Bax). Wzajemne oddziaływania pomiędzy tymi białkami są odpowiedzialne za uruchomienie procesów prowadzących do apoptozy zależnej od mitochondriów. Nadekspresja Bcl-2 występuje w wielu typach złośliwych nowotworów i jest odpowiedzialna za ich oporność na radio- i chemioterapię. Dowiedziono, że w ponad połowie (57%) nowotworów piersi i w 42% nowotworów prostaty występuje nadekspresja genu Bcl-2. Z powyższych powodów białka pro- i antyapoptotyczne są ważnym celem terapii przeciwnowotworowych.

⁶ Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 2000;52: 673–751.

Stosując ilościową technikę amplifikacji w czasie rzeczywistym (*quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) oceniłam wpływ badanych ekstraktów na poziom ekspresji genów *Bcl-2* i *Bax* w komórkach PNT1A, DU145, MDA-MB-231 i MCF-7. Zaobserwowałam istotne statystycznie i zarazem dużo silniejsze hamowanie ekspresji genu *Bcl-2* niż *Bax* w komórkach pod wpływem ekstraktów (publikacje 1, 2, 3 i 5). Warto w tym miejscu dodać, że induktory apoptozy nie zawsze powodują wzrost ekspresji białka *Bax*, ponieważ jest ono zgromadzone w cytoplazmie w wystarczającej ilości, aby ten proces mógł być zainicjowany. Ponadto, flawanolowe ekstrakty redukowały ekspresję *Bcl-2* w dużo większym stopniu w komórkach raka prostaty niż w prawidłowych (publikacje 1 i 2). EPFP w komórkach raka sutka MCF-7, oprócz silnego hamowania ekspresji *Bcl-2*, stymulował ekspresję *Bax* (publikacje 3 i 5). Biorąc pod uwagę różnice w poziomach ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych wywołane przez JQFFP i EPFP, obliczyłam stosunek mRNA *Bcl-2* do mRNA *Bax*, odpowiednio dla każdej linii komórkowej i stosowanych stężeń ekstraktów. Ekstrakty flawanolowe, wraz ze wzrostem stężenia, powodowały spadek wartości *Bcl-2/Bax* w komórkach raka prostaty i raka sutka, co świadczy o wysokiej wrażliwości tych komórek na działanie JQFFP i EPFP jako czynników proapoptotycznych. Pod wpływem inkubacji z EPFP w stężeniu 75 μ M GAE wartość współczynnika *Bcl-2/Bax* w komórkach MDA-MB-231 i DU145 spadła odpowiednio do 0,09 i 0,03 (publikacje 2 i 3). Co istotne, przeciwny wynik otrzymałam w przypadku prawidłowych komórek prostaty, co wyjaśnia ich odporność na działanie proapoptotyczne ekstraktów flawanolowych. Współczynnik *Bcl-2/Bax* wzrósł 2,5-krotnie w komórkach PNT1A pod wpływem EPFP zastosowanego w stężeniu 75 μ M GAE (publikacja 2).

Detekcja apoptozy na podstawie barwienia komórek fluorochromem wiążącym się z DNA (4',6-diamidyno-2-fenylindol, 4',6-diamidino-2-phenylindole/DAPI) potwierdziła aktywność proapoptotyczną ekstraktów flawanolowych w stosunku do komórek raka prostaty. Po 24 h inkubacji z ekstraktami w komórkach DU145 dochodziło do zmian morfologicznych charakterystycznych dla programowanej śmierci komórkowej, takich jak: kurczenie cytoplazmy, kondensacja i fragmentacja chromatyny, fragmentacja jądrowego DNA i tworzenie ciałek apoptotycznych (publikacje 1 i 2).

Analiza cytometryczna, którą przeprowadziłam we współpracy z Centralnym Laboratorium Naukowym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (CoreLab) potwierdziła aktywność proapoptotyczną ekstraktu flawanolowego z nasion wiesiołka w stosunku do obu linii raka sutka. Liczba komórek apoptotycznych w mało agresywnej linii MCF-7 wzrosła 2-krotnie, a w wysoce agresywnej MDA-MB-231 ponad 3-krotnie dla 100 μ M GAE (publikacje 3 i 5). Proapoptotyczną aktywność EPFP potwierdziłam również na poziomie ekspresji białka *Bcl-2* techniką Western blot dla MDA-MB-231 (publikacja 3).

Ponadto, w komórkach raka sutka oceniłam wpływ EPFP na ekspresję uniwersalnego markera proliferacji *Ki67*. Z danych literaturowych wiadomo, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy poziomem ekspresji *Ki67* a wielkością guza, agresywnością raka piersi i przeżywalnością chorych. Wysoki poziom jego ekspresji świadczy o złej prognozie dla chorych na raka piersi. Wykazałam, że EPFP silnie hamował ekspresję *Ki67* w sposób zależny od dawki i statystycznie istotny w obu liniach raka sutka (publikacje 3 i 5).

Moje wyniki potwierdziły wcześniejsze obserwacje naszego i innych zespołów badawczych dotyczące antyproliferacyjnych i proapoptotycznych właściwości polifenoli, w tym również polifenoli z wiesiołka dziwnego, w różnych modelach eksperymentalnych. Są one również zgodne z doniesieniami, że wiele polifenoli indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych przy równoczesnym działaniu ochronnym wobec komórek prawidłowych.

Jako pierwsza wykazałam, że ekstrakty flawanolowe z pigwowca japońskiego i wiesiołka dziwnego działają proapoptotycznie na komórki raka sutka i raka prostaty poprzez modulowanie ekspresji genów zaangażowanych w ten proces: *Bcl-2* i *Bax*. Wyniki te wskazują również, że ekstrakty JQFFP i EPFP różnią się aktywnościami biologicznymi, w tym zdolnością do wywoływania apoptozy, co może wynikać z różnic w ich składzie oraz we wrażliwości badanych linii komórkowych na działanie ww. ekstraktów. Może to również wynikać z oddziaływań synergistycznych między polifenolami; omówiłam je w publikacji przeglądowej (publikacja 7).

Na kolejnym etapie badań oceniłam wpływ badanych ekstraktów na inwazyjność linii komórkowych raka piersi i raka prostaty oraz prawidłowych komórek prostaty. Wykorzystując komorę Boydena wyposażoną w sztuczną błonę podstawną, zawierającą w składzie m.in. kolagen typu IV, wykazałam po raz pierwszy, że ekstrakty polifenolowe z wiesiołka dziwnego i z pigwowca japońskiego hamowały inwazyjność komórek w zastosowanych modelach *in vitro*. Wszystkie badane ekstrakty dużo skuteczniej i w sposób zależny od stężenia hamowały inwazyjność komórek PNT1A i MDA-MB-231 niż komórek DU145 (publikacje 1, 2, 3 i 6). EPE, ekstrakt polifenolowy z wiesiołka, nie powodował żadnych statystycznie istotnych zmian w inwazyjności DU145 (publikacja 6). Wyniki te sugerują, że linia DU145 jest bardziej oporna na działanie ekstraktów polifenolowych w aspekcie hamowania inwazyjności niż linie PNT1A i MDA-MB-231. Co istotne, EPFP, ekstrakt flawanolowy z wiesiołka, hamował inwazyjność wysoce agresywnych komórek raka sutka MDA-MB-231 (65% w stosunku do kontroli dla stężenia 75 μ M GAE) równie skutecznie jak EGCG, związek polifenolowy z grupy flawanoli o dobrze udokumentowanych właściwościach przeciwnowotworowych (publikacja 3). Jak wspomniałam wcześniej, badania przeprowadzone w innym ośrodku naukowym wykazały obecność w ekstraktach z nasion wiesiołka dziwnego galusanu (-)-epikatechiny (ECG), flawanolu strukturalnie podobnego do EGCG. Zatem może to sugerować, że za hamowanie inwazyjności komórek MDA-MB-231 przez EPFP w pewnej mierze odpowiada ECG. Ponadto, EPFP hamował również migrację komórek MCF-7 (48% w stosunku do kontroli dla stężenia 75 μ M GAE) (publikacja 5). Powyższe wyniki świadczą o wysokim potencjale antyinwazyjnym badanych ekstraktów, a w szczególności ekstraktu flawanolowego z nasion wiesiołka dziwnego, w stosunku do wysoce agresywnej linii raka sutka MDA-MB-231.

Z danych literaturowych wiadomo, że MMP (*matrix metalloproteinases*, MMPs), w tym kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9), dzięki zdolności do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej i błon podstawnych likwidują strukturalne bariery umożliwiając tym samym inwazję komórek, miejscowy wzrost nowotworów, jak również powstawanie odległych przerzutów (metastazę). Zatem związek MMP z rozrostem nowotworowym budzi zrozumiałe zainteresowanie i obecnie ta grupa enzymów stanowi ważny cel dla nowych leków antymetastatycznych. O ile mi wiadomo, pierwsza praca na temat wpływu wybranych związków polifenolowych na aktywność MMP ukazała się w 1997 roku i dotyczyła polifenoli zielonej i czarnej herbaty: EGCG, teaflawiny i digalusanu teaflawiny.⁷ Następnie ukazały się kolejne prace dotyczące inhibicji MMP nie tylko przez indywidualne związki polifenolowe, ale również przez ekstrakty bogate w polifenole oraz ich frakcje. Jak wcześniej wspomniałam, badania naszego zespołu wykazały, że ekstrakt flawanolowy z owoców pigwowca (a zwłaszcza jego frakcje bogate w wyższe oligomery procyjanidyn) hamowały aktywność kolagenaz typu IV wydzielanych przez komórki HL-60 i PBMC. Inny zespół badawczy

⁷ Sazuka M., Imazawa H., Shoji Y., Mita T., Hara Y., Isemura M. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1997;61(9):1504-1506.

wykazał, że ekstrakt polifenolowy z nasion wiesiołka dziwnego hamował aktywność aminopeptydazy N, enzymu uczestniczącego m.in. w metastazie i angiogenezie.^{8,9} Przytoczone powyżej fakty oraz wyniki moich badań zachęciły mnie do podjęcia próby wyjaśnienia mechanizmów działania badanych ekstraktów polifenoli w procesach związanych z inwazyjnością i metastazą komórek. Aby zrealizować postawiony cel, sprawdziłam, czy ekstrakty wpływają na poziom ekspresji następujących genów: *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-14*, *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), *c-Fos* i *c-Jun* (czynniki transkrypcyjne).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że JQFFP i EPFP obniżały ekspresję *MMP-1*, *MMP-9* i *MMP-14* w komórkach raka prostaty DU145, a *MMP-2* i *MMP-14* w prawidłowych komórkach prostaty (PNT1A). Otrzymane wyniki sugerują, że *MMP-14* jest zaangażowana w hamowanie inwazyjności obu ww. linii komórkowych przez JQFFP i EPFP. Oprócz *MMP-14*, w komórkach prawidłowych uczestniczy w tym procesie *MMP-2*, natomiast w nowotworowych – *MMP-1* i *MMP-9*. Wart podkreślenia jest fakt, że zarówno JQFFP, jak i EPFP silnie redukowały ekspresję *MMP-9* w komórkach raka prostaty, a nie wpływały na poziom ekspresji tego genu w komórkach prawidłowych prostaty (publikacje 1 i 2).

W celu wyjaśnienia powyższych wyników oceniłam wpływ flawanolowego ekstraktu z wiesiołka dziwnego na ekspresję czynników transkrypcyjnych *c-Fos* i *c-Jun* (podjednostki czynnika transkrypcyjnego AP-1, *activating protein-1*) w obu typach komórek. Z danych literaturowych wiadomo, że AP-1 jest dimerycznym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję genów zawierających w regionach promotorowych sekwencję TRE (*TPA responsive element*; TGA(C/G)TCA).¹⁰ Liczne obserwacje potwierdzają, że AP-1 uczestniczy w aktywacji wielu szlaków sygnałowych zaangażowanych w takie procesy jak proliferacja, apoptoza, metastaza i angiogeneza. Zatem hamowanie aktywacji AP-1 może stanowić istotny cel terapeutyczny. Wiadomo również, że w regionach promotorowych niektórych metaloproteinaz (w tym *MMP-1* i *MMP-9*) występuje ww. sekwencja TRE wiążąca AP-1.¹¹ Zmiany w składzie dimerów AP-1 mogą wpływać na jego powinowactwo do specyficznych miejsc wiążących, zatem prawdopodobna jest regulacja transkrypcji *MMP-9* i *MMP-1* za pośrednictwem AP-1 (wiązanie ze specyficzną sekwencją TRE) poprzez zmianę ekspresji onkogenów *c-Fos* i *c-Jun*.

Przeprowadzona analiza qRT-PCR potwierdziła moje założenie: EPFP w komórkach raka prostaty silnie redukował ekspresję *c-Jun* i *c-Fos* (odpowiednio 4-krotnie i ponad 5-

⁸ Kiss A.K., Derwińska M., Dawidowska A., Naruszewicz M. Novel biological properties of *Oenothera paradoxa* defatted seed extracts: effects on metalloproteinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(17): 7845-7852.

⁹ Zhang X., Fang H., Zhang J., Yuan Y., Xu W. Recent advance in aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor research. *Current Medicinal Chemistry* 2011;18(32):5011-5021.

¹⁰ Nakabeppu Y., Ryder K., Nathans D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 1988;55(5):907-915.

¹¹ Sato H., Kita M., Seiki M. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268(31):23460-23468.

krotnie przy stężeniu 25 μ M GAE). Natomiast w komórkach prawidłowych stymulował ekspresję *c-Jun* (1,3-krotnie; 25 μ M GAE), a na ekspresję *c-Fos* nie wpływał w sposób statystycznie istotny (publikacja 2). Tym samym udowodniłam, że ekstrakt flawanolowy z wiesiołka dziwnego moduluje ekspresję *MMP-1* i *MMP-9* w komórkach DU145 i PNT1A poprzez zmianę poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych *c-Jun* i *c-Fos*. Wykazałam również, że podobny mechanizm regulacji transkrypcji *MMP-9* i *MMP-1* może zachodzić w komórkach raka sutka MDA-MB-231, w których EPFP redukuje ekspresję *c-Jun* i *c-Fos* na poziomie mRNA (qRT-PCR) i na poziomie białka (technika Western blot) (publikacja 3). Wyniki te są zgodne z doniesieniami na temat hamowania aktywacji AP-1 przez EGCG, resweratrol i kurkuminę w różnych modelach eksperymentalnych.

Na dalszym etapie badań wykazałam, że zarówno JQFFP, jak i EPFP w komórkach raka prostaty i raka sutka hamowały transkrypcję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*VEGF*), głównego stymulatora neowaskularyzacji, jak również czynnika indukującego ekspresję MMP (publikacje 1, 2, 3 i 5). Stosując technikę Western blot potwierdziłam również, że EPFP hamował ekspresję *VEGF* na poziomie białka w komórkach MDA-MB-231 (publikacja 3). Biorąc pod uwagę fakt, że ekstrakty hamowały w komórkach nowotworowych ekspresję *VEGF* oraz *MMP-14*, błonowej metaloproteinazy o kluczowym znaczeniu w aktywacji MMP-2, można sugerować ich działanie antyangiogenne.

Ponieważ wcześniej wykazałam, że badane ekstrakty silnie obniżały ekspresję mRNA *MMP-9* w komórkach raka prostaty i raka sutka, celem kolejnych doświadczeń było sprawdzenie, czy taki efekt będzie również zachodził na poziomie białka MMP-9. Wyniki analizy zymograficznej (ilościowej) potwierdziły hamowanie przez EPE, JQFFP i EPFP syntezy i sekrecji białka MMP-9 w komórkach. Hamowanie to było zależne od stężenia i statystycznie istotne. Najbardziej skuteczne hamowanie aktywności MMP-9 badane ekstrakty wykazały w stosunku do komórek MDA-MB-231 (publikacje 1, 3 i 6). Dla najwyższych stosowanych stężeń ekstraktów aktywność MMP-9 wydzielanej do medium przez MDA-MB-231 zmalała 5-, 10- i 20-krotnie pod wpływem odpowiednio EPE, EPFP i JQFFP. Dane literaturowe donoszą, że zwiększona aktywność MMP towarzyszy m.in. wzmożonym procesom powstawania nowych naczyń krwionośnych (angiogenezie). W związku z tym, powyższe wyniki jednoznacznie wskazują na działanie antyangiogenne badanych ekstraktów. Należy również podkreślić fakt, że MMP poza tym, że mają kluczowe znaczenie w rozwoju i progresji nowotworów, włączone są także w patogenezę nadciśnienia tętniczego oraz wielu innych chorób, m.in. sercowo-naczyniowych, o podłożu zapalnym oraz autoimmunologicznym (cukrzyca typu I, stwardnienie rozsiane). Tak więc potencjalne korzyści wynikające ze zdolności hamowania ekspresji i aktywności MMP przez badane ekstrakty sięgają znacznie dalej poza procesy nowotworowe.

Uzupełnieniem tematycznym opisanych przeze mnie badań jest praca przeglądowa, w której omówiłam wybrane aspekty wchłaniania, metabolizmu i biodostępności związków polifenolowych (publikacja 4). Inspiracją do jej napisania była dla mnie między innymi dyskusja z recenzentami podczas procesu publikacji wyników badań nad aktywnościami ekstraktów polifenolowych z wiesiołka dziwnego i pigwowca japońskiego. Znaczną część pracy poświęciłam strategiom wzmacniającym biodostępność polifenoli, ponieważ ich niska biodostępność jest istotnym aspektem związanym zarówno z badaniami *in vivo*, jak i z wykorzystaniem tych związków jako czynników chemoprewencyjnych i/lub terapeutycznych. Obecnie w wielu laboratoriach naukowych prowadzone są badania nad zwiększeniem biodostępności polifenoli, mające na celu pokonanie trudności związanych z osiągnięciem ich stężenia terapeutycznego w docelowych tkankach. Wiele z tych badań ukierunkowanych jest

również na zwiększenie skuteczności działania związków i ekstraktów polifenolowych w profilaktyce i terapii raka piersi oraz raka prostaty.

Wnioski

Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych na kilku liniach komórkowych wykazały zdolność ekstraktów polifenolowych z nasion wiesiołka dziwnego i z owoców pigwowca japońskiego do indukowania apoptozy, hamowania inwazyjności i ekspresji wielu genów o kluczowym znaczeniu w rozwoju i progresji raka sutka oraz raka prostaty. Obecnie badania te są kontynuowane i stały się podstawą do przygotowania projektu, który ma na celu scharakteryzowanie aktywności przeciwnowotworowej ekstraktów flawanolowych z nasion wiesiołka dziwnego i owoców pigwowca japońskiego w mysim modelu raka sutka.

Za najważniejsze osiągnięcia w mojej pracy uważam:

1. Wykazanie, że ekstrakty polifenolowe z nasion wiesiołka dziwnego i z owoców pigwowca japońskiego działały cytotoksycznie na komórki raka prostaty i raka sutka, a wobec komórek prawidłowych prostaty wykazywały działanie ochronne.
2. Udokumentowanie aktywności antyinwazyjnej badanych ekstraktów. Ekstrakty hamowały inwazyjność komórek raka sutka i raka prostaty poprzez zmianę poziomu ekspresji różnych *MMP*.
3. Wykazanie, że ekstrakty flawanolowe (JQFFP i EPFP) silnie hamowały ekspresję *MMP-9* w komórkach raka prostaty, a nie wpływały na poziom ekspresji tego genu w komórkach prawidłowych prostaty.
4. Udokumentowanie aktywności proapoptotycznej ekstraktów flawanolowych wobec komórek raka sutka i raka prostaty poprzez modulowanie ekspresji *Bcl-2* i *Bax* na poziomie mRNA oraz *Bcl-2* na poziomie białka. Potwierdzenie ww. aktywności poprzez stwierdzenie zmian morfologicznych charakterystycznych dla programowanej śmierci komórkowej w komórkach raka prostaty oraz wzrost liczby komórek apoptotycznych w liniach raka sutka.
5. Wykazanie aktywności antyproliferacyjnej w stosunku do obu linii raka sutka (MDA-MB-231 i MCF-7) ekstraktu flawanolowego z wiesiołka dziwnego (EPFP), działającego poprzez hamowanie ekspresji uniwersalnego markera proliferacji, *Ki67*.
6. Wykazanie, że ekstrakt flawanolowy z wiesiołka dziwnego (EPFP) reguluje transkrypcję *MMP-9* i *MMP-1* w komórkach raka sutka i prostaty oraz w komórkach prawidłowych prostaty za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego AP-1, poprzez zmianę ekspresji onkogenów *c-Fos* i *c-Jun*.
7. Udokumentowanie aktywności antyangiogennej wobec komórek raka sutka i raka prostaty ekstraktów flawanolowych (JQFFP i EPFP) działających poprzez hamowanie ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*VEGF*) oraz hamowanie *MMP-9* na poziomie mRNA i białka.

Moje badania nad ekstraktami polifenolowymi z wiesiołka dziwnego i pigwowca japońskiego przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat ich potencjału chemoprewencyjnego/przeciwnowotworowego. Uzyskane wyniki czynią te ekstrakty interesującymi obiektami dalszych badań na zwierzętach, a następnie być może również badań klinicznych. W przyszłości może to doprowadzić do ich zastosowania w chemoprewencji i/lub staną się integralną częścią klasycznej terapii skierowanej przeciwko nowotworom piersi i prostaty.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Dane bibliometryczne

Sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania: 28,575

Suma punktów MNiSW: 364

Łącznie 45 cytowań, indeks Hirscha wynosi 3

(Źródło: ISI Web of Science)

Łącznie 72 cytowania, indeks Hirscha wynosi 4

(Źródło: Scopus)

Pozostałe osiągnięcia naukowe

Pracę naukową rozpoczęłam w 1990 roku w zespole prof. Janusza Gregera w Zakładzie Biochemii na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Łodzi. W początkowym okresie współpracowałam z dr Hanną Modrzejewską uczestnicząc w badaniach nad cytostatycznymi właściwościami alloksymetylo pochodnych puryn i pirymidyn. Badania były przeprowadzone z wykorzystaniem modeli *in vitro* (ludzkie komórki raka szyjki macicy HeLa) i *in vivo* (wątrobiak Kirkmana-Robbins chomika). Celem badań było oszacowanie działania siedmiu pochodnych zasad azotowych na aktywność kinaz deoksynukleozydów: kinazy tymidynowej (*deoxythymidine kinase*, dTK) i kinazy deoksyguanozynowej (*deoxyguanosine kinase*, dGK). Moim zadaniem była ocena wpływu badanych pochodnych na aktywność dTK i dGK w modelu *in vitro* z wykorzystaniem komórek HeLa. Powyższą aktywność oznaczałam metodą radiochemiczną. Wykazaliśmy, że najwyższą zdolność hamowania aktywności kinaz w obu modelach posiadały alloksymetylotymina (*allyloxymethylthymine*, AMT) i alloksymetylouracyl (*allyloxymethyluracil*, AMU). Związki te poprzez obniżanie aktywności kinaz deoksynukleozydów hamowały wzrost wątrobiaka Kirkmana-Robbins i komórek nowotworowych HeLa, co może świadczyć o ich potencjale przeciwnowotworowym.

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. Modrzejewska H., Greger J., **Lewandowska U.**, Fidek W. *In vivo* phosphorylation of alloxymethyl purine and pyrimidine acyclonucleosides and the inhibitory effect of these compounds on thymidine and deoxyguanosine kinases. *Acta Biochimica Polonica* 1994;41(2):185-7.

2. Modrzejewska H., Greger J., **Lewandowska U.**, Fidek W. Badania nad cytostatycznymi właściwościami alloksymetylo pochodnych puryn i pirymidyn. Streszczenia XXIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. str.208, 15-17 września, 1993, Wrocław, Polska.

Po pięcioletniej przerwie w pracy wynikającej z powodów osobistych (urlop wychowawczy na dwójkę dzieci), dzięki współpracy z dr Małgorzatą Sidorkiewicz zaangażowana byłam w badania nad molekularną patogenezą przewlekłych zapaleń wątroby typu B (*hepatitis B virus*, HBV) i typu C (*hepatitis C virus*, HCV). Uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w ramach współpracy z zespołem Kliniki Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej w Łodzi, których celem była ocena klinicznej przydatności obecności HCV RNA w surowicy, a także w świeżo izolowanych i hodowanych PBMC u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, odpowiadających na leczenie interferonem- α 2b (*interferon-alpha2b*, IFN- α 2b), po zakończonym leczeniu. Moją rolą było izolowanie PBMC z krwi pacjentów, a następnie zakładanie i prowadzenie hodowli. Badania te wykazały, że eliminacja HCV RNA z surowicy po 42 miesiącach od zakończenia leczenia nie jest jednoznaczna z eradykacją wirusa, którego obecność wykryto zarówno w świeżo izolowanych, jak i w hodowanych PBMC. Ponadto zaobserwowaliśmy, że oznaczanie HCV RNA w PBMC u chorych na HCV z trwałą odpowiedzią na leczenie przeciwwirusowe może być wykorzystane dla celów rokowniczych. Równocześnie uczestniczyłam w badaniach (udział w realizacji projektu KBN nr PO5A 094 15 oraz tematu AM nr 502-11-491), których celem było opracowanie ilościowej metody oznaczania HBV DNA oraz metody umożliwiającej identyfikację replikacyjnej formy genomu HBV, czyli kolistego kowalencyjnie zamkniętego DNA (*covalently closed circular DNA*, cccDNA). Zdaniem wielu autorów cccDNA jest syntetyzowane jedynie po wnikięciu wirusa do komórki i stanowi bezpośredni dowód na zachodzącą tam replikację HBV. Opracowana metoda została wykorzystana do wykrycia cccDNA w PBMC u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B.

Udział w powyższych badaniach był dla mnie okazją do poznania i doskonalenia warsztatu badawczego w zakresie hodowli PBMC oraz metod molekularnych takich jak: izolowanie całkowitego DNA i cccDNA z komórek, oznaczanie aktywności endogennej DNA polimerazy (*polymerase DNA*, pDNA), techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej (*polymerase chain reaction*, PCR) oraz technik elektroforetycznych. Zdobytą wiedzę i doświadczenie wykorzystałam do realizacji pracy doktorskiej, której promotorem był prof. Janusz Greger, a opiekunem naukowym – dr Małgorzata Sidorkiewicz. Moje badania dotyczyły sposobu zakażenia, przeżywania i możliwości replikacji HBV w PBMC w modelu *in vitro*. Jak wiadomo, organem docelowym wirusa HBV jest wątroba, jednak antygeny wirusa, DNA i pośrednie produkty jego replikacji wykryto również w komórkach innych tkanek (grasica, śledziona, trzustka, szpik kostny), w tym również w PBMC, które postrzegano jako miejsce przetrwałej replikacji stanowiące pozawątrobowy rezerwuuar HBV. Wykazano również, że HBV łączy się z PBMC za pośrednictwem sekwencji preS1, dla której interleukina-6 (IL-6) zawiera specyficzne miejsce wiązania, co sugerowało, że cytokina ta może pośredniczyć w interakcji HBV – komórka. W pracy zaprojektowałam modelowy system *in vitro* do badań zakażenia PBMC przez HBV oraz zoptymalizowałam warunki tego procesu. Stosując kompetycyjną technikę PCR wykazałam, że IL-6 stymulowała wnikanie HBV do PBMC i istotnie zwiększała (10-krotnie) powielanie DNA wirusa.

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. Sidorkiewicz M., Józwiak B., Greger J., **Lewandowska U.** The effect of interleukin-6 on hepatitis B virus replication in peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Acta Virologica* 2004;48(3):153-158.
2. Sidorkiewicz M., Bzorska A., Józwiak B., Jabłkowski M., Szemraj J., **Lewandowska U.** A competitor DNA template for the molecular quantification of the hepatitis B virus. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2003;8(3):799-808.
3. Piekarska A., Sidorkiewicz M., **Lewandowska U.**, Kuydowicz J. Evaluation of persistence of IFN- α treatment response in chronic hepatitis C patients according with HCV-RNA presence in PBMC. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2001;106(4):939-944.
4. Sidorkiewicz M., Józwiak B., Szemraj J., Wrodycki W., Piekarska A., Jabłkowski M., Omulecka A., **Lewandowska U.** HBV persistence that occurs among Polish chronic hepatitis B patients after IFN therapy depends on HBV DNA subtype. Abstracts of The 2006 International Meeting: The molecular biology of hepatitis B viruses, Vancouver, Canada, September 17-20, 2006, p.165.
5. Sidorkiewicz M., **Lewandowska U.**, Józwiak B. Intracellular localisation of HBV DNA in peripheral blood mononuclear cells. Abstracts of The 2001 Meeting on The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, University of Massachusetts, Amherst, USA, July 29-August 2, 2001, p.73.
6. Sidorkiewicz M., Sułowska Z., Józwiak B., Wrodycki W., **Lewandowska U.** Analysis of peripheral lymphocyte subsets in patients with chronic viral hepatitis B and different level of viral replication. *Journal of Hepatology*, 34 (suppl.1), Abstracts of the 36th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Prague, the Czech Republic, April 18-22, 2001, p.175.
7. Sidorkiewicz M., Sułowska Z., Józwiak B., Wrodycki W., **Lewandowska U.** Charakterystyka limfocytów krwi obwodowej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby. Streszczenia XXXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. str.195, 10-14 września, 2001, Toruń, Polska.
8. Sidorkiewicz M., Bzorska A., **Lewandowska U.**, Józwiak B. Konstrukcja standardu DNA do ilościowego określania poziomu DNA wirusa zapalenia wątroby typu B w łańcuchowej reakcji polimerazy. Streszczenia XXXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. str.395, 14-15 września, 2000, Poznań, Polska.

W latach 2004-2010 współpracowałam z prof. Andrzejem Bednarkiem, kierownikiem Zakładu Kancerogenezy Molekularnej Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Dzięki tej współpracy uczestniczyłam w badaniach (udział w realizacji projektów: KBN nr P05A 113 23, MNiSW nr NN 402-448-439 oraz tematu UM nr 502-19-840), których celem było scharakteryzowanie roli genu supresorowego *WWOX* (*WW domain- containing OXydoreductase*) w kancerogenezie raka piersi i raka jelita grubego. Gen *WWOX* jest zlokalizowany w powszechnym łamliwym miejscu chromosomu 16 (16q23.3-24.1), FRA16D. *WWOX* należy do „nowej generacji” genów supresorowych nowotworów, w przypadku których inaktywacja jednego z alleli może być wystarczająca do rozwoju procesu nowotworowego. Obserwacje ostatnich lat wykazały, że zwiększenie jego ekspresji w komórkach z obniżonym poziomem lub brakiem

transkryptów *WWOX* zmniejsza agresywność komórek raka piersi, jajnika i innych nowotworów. Jednym z celów powyższych projektów było zwiększenie poziomu ekspresji genu *WWOX* w unieśmiertelnionych komórkach sutka (HBL-100), komórkach raka sutka (MDA-MB-231) i komórkach raka jelita (HT29, SW480) oraz ocena jej wpływu na poziom ekspresji innych genów i biologię komórek. Moim zadaniem było przygotowanie wektorów retrowirusowych pLNCX2 zawierających cDNA *WWOX* oraz „puste” retrowirusy (pLNCX2) i przeprowadzenie stabilnej transdukcji ww. komórek w celu zwiększenia w nich ekspresji *WWOX*. Ponadto, analizowałam w transdukowanych komórkach wpływ profilu transkrypcyjnego na właściwości biologiczne mające znaczenie w kontekście procesu nowotworowego, wykonując testy oceniające: migrację komórek przez błonę podstawną, tworzenie kolonii w miękkim agarze oraz wzrost komórek w Matrigelu. Otrzymane wektory retrowirusowe oraz stabilnie transdukowane komórki posłużyły do dalszych badań nad kancerogenezą raka sutka i jelita, z wykorzystaniem macierzy o niskiej gęstości oraz genomowych, co dało podstawę do powstania prac doktorskich dr Karoliny Pospiech i dr Magdaleny Nowakowskiej z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej.

W powyższych badaniach wykazaliśmy, że zwiększenie ekspresji *WWOX* w liniach komórkowych raka piersi i raka jelita obniża zdolność komórek nowotworowych do tworzenia kolonii w miękkim agarze, ale stymuluje ich migrację przez błonę podstawną. Zmiany poziomu ekspresji *WWOX* w raku piersi i jelita są istotnym czynnikiem procesu nowotworzenia i progresji choroby. W przypadku raka piersi wysoki poziom mRNA *WWOX* jest bardzo korzystnym czynnikiem prognostycznym i stwarza podstawy do wypróbowania tego genu w modelach terapii genowej. Stwierdziliśmy również, że *WWOX* prawdopodobnie nie jest typowym genem supresorowym nowotworów, lecz może być zaangażowany w prawidłowe różnicowanie komórek i tworzenie prawidłowych struktur gruczołu sutkowego, co wykazał test wzrostu w Matrigelu.

W kolejnych badaniach podjęliśmy próbę wyjaśnienia roli genu *WWOX* w tkankach regulowanych estrogenem, takich jak tkanki pochwy i macicy (temat UM nr 502-11-567). Wcześniejsze badania wykazały, że *WWOX* ulega ekspresji we wszystkich tkankach, jednak w niektórych organach poziom mRNA jest szczególnie wysoki (jajniki, prostata). Stosunkowo wysoka ekspresja w narządach, w których metabolizm regulowany jest hormonami sterydowymi wraz z charakterystyczną budową miejsca wiązania substratu sugerowały, że *WWOX* może wykazywać aktywność dehydrogenazy steroidowej. Przeprowadzona przez nasz zespół analiza wykazała zróżnicowanie ekspresji mRNA i białka *WWOX* w badanych tkankach szczurów rasy Wistar. Najwyższą ekspresję genu *WWOX* wykryliśmy w tkankach pochodzących od samic ciężarnych i po leczeniu estradiolem, a niską w tkankach od samic po owariektomii i nieleczonych. Nie wykryliśmy białka *WWOX* w grupie samic po owariektomii i nieleczonych estradiolem, w odróżnieniu do pozostałych grup. Powyższe wyniki wskazują na udział białka *WWOX* w metabolizmie steroidów, w którym bezpośrednio uczestniczyć może domena krótkołańcuchowej oksydoreduktazy (*short-chain dehydrogenase/reductase*, SDR), posiadająca cechy dehydrogenazy steroidowej. Oprócz zaangażowania w część eksperymentalną mój udział obejmował również planowanie doświadczeń, opracowanie części wyników i przygotowanie ich do publikacji.

Współpraca z prof. Andrzejem Bednarkiem oraz Jego Zespołem była dla mnie okazją do poznania i udoskonalenia warsztatu badawczego w zakresie inżynierii genetycznej, hodowli komórek i ich transdukcji, genów supresorowych oraz technik analizy ich ekspresji na poziomie mRNA i białka. Zdobyta wiedza i doświadczenie w dużej mierze ułatwiły mi dalszą pracę naukową.

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. Nowakowska M., Pospiech K., **Lewandowska U.**, Piastowska-Ciesielska A.W., Bednarek A.K. Diverse effect of *WWOX* overexpression in HT29 and SW480 colon cancer cell lines. *Tumour Biology*. 2014;35(9):9291-301.
2. **Lewandowska U.**, Zelazowski M., Seta K., Byczewska M., Pluciennik E., Bednarek A.K. *WWOX*, the tumour suppressor gene affected in multiple cancers. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(1):47-56.
3. Nowakowska M., Pospiech K., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Kośla K., Bednarek A.K. The influence of *WWOX* tumor suppressor gene on colorectal carcinogenesis – a microarray study on SW480 colon cancer cell line. Abstracts of the 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Barcelona, Spain, July 7-10, 2012, p.168.
4. Nowakowska M., Seta K., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Żelazowski M., Kośla K., Bednarek A.K. The role of *WWOX* tumor suppressor gene in colorectal cancerogenesis; a microarray-based study on HT29 colon cancer cell line The role of *WWOX* tumor suppressor gene in colorectal cancerogenesis; a microarray-based study on HT29 colon cancer cell line. Abstracts of the 14th Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, November 26-27, 2010, p.39.
5. Seta K., Nowakowska M., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Żelazowski M., Bednarek A.K. The role of *WWOX*, a tumour suppressor gene, in breast cancer; a microarray-based study on MDA-MB-231 cell line. Abstracts of the 14th Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, November 26-27, 2010, p.54.
6. Nowakowska M., Seta K., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Żelazowski M., Kośla K., Bednarek A.K. The role of *WWOX* tumour suppressor gene in colorectal cancerogenesis – a microarray on HT29 colon cancer cell line. Abstracts of the 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, Oslo, Norway, June 26-29, 2010. *European Journal of Cancer* Vol. 8, Issue 5 p.186.
7. Seta K., Nowakowska M., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Żelazowski M., Kośla K., Bednarek A.K. The role of *WWOX* tumour suppressor gene in breast cancer – a microarray study of MDA-MB-231 cell line. Abstracts of the 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, Oslo, Norway, June 26-29, 2010. *European Journal of Cancer* Vol. 8, Issue 5, p.173.
8. Seta K., Nowakowska M., **Lewandowska U.**, Pluciennik E., Żelazowski M., Bednarek A.K. Profilowanie zmian ekspresji genów indukowanych przez gen supresorowy nowotworów *WWOX* w linii komórkowej raka piersi MDA-MB-231. Konferencja Komisji Patologii Molekularnej Komitetu Genetyki Człowieka i Patologii Molekularnej Polskiej Akademii Nauk. Mikromacierze w badaniu ekspresji genów: narzędzie w naukach podstawowych i klinicznych. 2009; 19 listopada, Gliwice, Polska. Materiały konferencyjne str.19.
9. **Lewandowska U.**, Górlach S., Piastowska A., Hrabec E., Bednarek A.K. The role of *WWOX* in estrogen-regulated tissues. Abstracts of the Central European Congress of Life Sciences "EUROBIOTECH 2008", Kraków, Poland, October 17-19, 2008. *Acta Biochimica Polonica* 2008 Vol. 55 suppl. 4, p.26.
10. **Lewandowska U.**, Hrabec E., Bednarek A.K. Role of *WWOX* in normal immortalized human mammary epithelial cell line HBL-100. Abstracts of the Central European

Congress of Life Sciences "EUROBIOTECH 2008", Kraków, Poland, October 17-19, 2008. *Acta Biochimica Polonica* 2008 Vol. 55 suppl. 4, p.16.

11. **Lewandowska U.**, Seta K., Byczewska M., Płuciennik E., Hrabec E., Bednarek A.K. Role of *WWOX* in pathways of breast cancerogenesis. Abstracts of the 24th Congress of the Polish Physiological Society Lublin, Poland, September 11-13, 2008. *Jouranal of Physiology and Pharmacology* 2008 Vol. 59 suppl. 1 p.155.
12. **Lewandowska U.**, Płuciennik E., Czyż M., Hrabec E., Bednarek A.K. The role of *WWOX* in normal and pathological cell metabolism. Abstracts of the 42nd Meeting of the Polish Biochemical Society, Szczecin, Poland, September 18-21, 2007. *Acta Biochimica Polonica* 2007 Vol. 54 suppl. 4 p.53.

Równocześnie uczestniczyłam także w realizacji projektu we współpracy z dr hab. Elżbietą Pastwą, kierownikiem Zakładu Genetyki Molekularnej Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (projekt KBN nr 401 117 32). Celem projektu było określenie roli naprawy uszkodzeń DNA powodowanych przez cytostatyki (etopozyd i cisplatynę) za pomocą niehomologicznego łączenia końców (*non-homologous end joining*, NHEJ) w komórkach glejaka mózgu. W badaniach oceniono synergizm kombinacji leków, wpływ leków na cykl komórkowy, aktywność naprawy DNA i ekspresję genów naprawy NHEJ. W powyższym projekcie opracowałam parametry hodowli oraz testu na przeżywalność dla każdej badanej linii komórkowej nowotworu mózgu (MO59K, MO59J, T98G), a także oceniłam wpływ leków i ich kombinacji na wzrost ww. komórek. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały m.in., że wortmanina podwyższała efekt synergistyczny kombinacji leków w komórkach glejaka mózgu. Oba cytostatyki powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, a efekt ten był stymulowany przez wortmaninę. Aktywność naprawy DNA nie obniżała się znacznie po dodaniu cytostatyków i wortmaniny. W przyszłości wortmanina jako swoisty inhibitor DNA-zależnej kinazy białek (*DNA-dependent protein kinase*, DNA- PKcs) może okazać się znaczącym narzędziem w chemioterapii ludzkiego glejaka.

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. Pastwa E., Popławski T., **Lewandowska U.**, Somiari S.B., Błasiak J., Somiari R.I. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;53:423-431.
2. Pastwa E., **Lewandowska U.**, Somiari R.I. Non-homologous DNA end joining and DNA repair genes expression in MO59 human glioma cells after anticancer agents treatment. Abstracts of the 13rd Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, November 20-21, 2009, p.20.
3. **Lewandowska U.**, Sobczak M., Pastwa E. Wortmannin potentiates the cytotoxicity of etoposide and cisplatin in two human glioma T98G cell sublines. Abstracts of the 44th Meeting of the Polish Biochemical Society, September 16-19, 2009, Łódź, Poland. *Acta Biochimica Polonica* 2009 Vol. 56 suppl. 3, p.9.
4. Pastwa E., and **Lewandowska U.** Cytotoxicity of etoposide and cisplatin is synergistically increased by wortmannin in human glioma cells. Abstracts of the 12th Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, November 21-22, 2008.
5. **Lewandowska U.**, and Pastwa E. Wortmannin chemosensitization in human glioma

MO59K and MO59J cells. Abstracts of the 43rd Congress of Biochemistry and 10th Conference of Polish Cell Biology Society, Olsztyn, Poland, September 7-11, 2008. *Acta Biochimica Polonica* 2008 Vol. 55 suppl. 3, p.65.

6. **Lewandowska U.**, and Pastwa E. Inhibition of DNA-PKcs enhances chemosensitivity of human glioma cells. Abstracts of the 10th Biennial Meeting of the German Society for Research on DNA Repair, Berlin, Germany, September 2-5, 2008, p.83.
7. **Lewandowska U.**, and Pastwa E. DNA-PKcs inhibition sensitizes human glioma cells to etoposide. Abstracts of The International Ataxia-Telangiectasia Workshop. 2008; April 22-26, Otsu, Japan. p4.

Miałam również przyjemność współpracować z dr hab. Agnieszką Lachowicz-Ochędalską kierownikiem Zakładu Endokrynologii Porównawczej Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Celem badań była ocena działania angiotensyny II (*Angiotensin II*, AngII) na aktywność białkowych kinaz tyrozynowych dwóch linii raka sutka: hormonozależnej MCF-7 i hormononiezależnej MDA-MB-231. Oceniliśmy również wpływ 17 β -estradiolu na zmiany w aktywności kinaz tyrozynowych wywołane angiotensyną II (udział w realizacji tematów UM nr UM nr 502-16-301 i NN403 2935 36). AngII jest głównym peptydem układu renina-angiotensyna, uczestniczącym w regulacji równowagi wodno-elektrolitowej oraz ciśnienia krwi, a także związkem wpływającym na proliferację komórek tkanek zdrowych i nowotworowych. Peptyd ten oddziałuje na komórki głównie za pośrednictwem dwóch receptorów angiotensynowych: typu pierwszego i typu drugiego (*angiotensin type-I receptor*, AT1R; *angiotensin type-II receptor*, AT2R). Mój udział w badaniach polegał na prowadzeniu hodowli komórkowych (MCF-7 i MDA-MB-231), izolowaniu mRNA, otrzymaniu cDNA, ocenie ekspresji *AT1R* i *AT2R* oraz na opracowaniu tych wyników i przygotowaniu części manuskryptu. Potwierdziliśmy obecność AT1R w obydwu badanych liniach raka piersi, natomiast obecność AT2R wykryliśmy jedynie w komórkach MDA-MB-231. Wykazaliśmy, że AngII silnie hamowała aktywności kinaz tyrozynowych w linii MDA-MB-231, natomiast 17 β -estradiol tylko w stężeniu 10⁻⁶ M wzmacniał efekt jej działania. W linii MCF-7 AngII hamowała aktywność badanych enzymów w obecności estradiolu 10⁻⁶ M, ale w mniejszym stopniu niż w MDA-MB-231. Otrzymane wyniki wskazują, że AngII może modulować aktywność kinaz tyrozynowych w badanych komórkach raka gruczołu sutkowego.

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. **Lewandowska U.**, Lachowicz-Ochędalska A., Domińska K., Kaszewska D., Rębas E. Angiotensin II as a factor modulating protein tyrosine kinase activity in two breast cancer lines - MCF-7 and MDA-MB-231. *Endokrynologia Polska*. 2011;62(2):151-158.
2. **Lewandowska U.**, Rębas E., Kaszyńska D., Domińska K., Lachowicz-Ochędalska A. The new perspectives of the angiotensin II action as a factor modulating the proliferation of breast cancer cellular lines. Abstracts of the Central European Congress of Life Sciences "EUROBIOTECH 2008" Kraków, Poland, October 17-19, 2008. *Acta Biochimica Polonica* 2008 Vol. 55 suppl. 4, p.26.

W 2011 roku dzięki współpracy z prof. Anną Janecką, kierownikiem Zakładu Chemii Biomolekularnej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, uczestniczyłam w badaniach nad właściwościami α -metyleno- δ -laktonów, zsyntetyzowanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej (udział w realizacji tematu UM 503/1-156-02/503-

01). Celem badań była ocena aktywności przeciwnowotworowej tych związków w raku sutka. Moim zadaniem było scharakteryzowanie aktywności antyinwazyjnej badanych analogów w dwóch liniach raka sutka: MCF-7 i MDA-MB-231. Badania wykazały, że z czterech przebadanych analogów najwyższy potencjał przeciwnowotworowy posiada 1-izopropyl-2-metyleno-1,2-dihydrobenzochromen-3-on (DL3).

Wyniki powyższych badań zostały upowszechnione poprzez:

1. Wyrębska A., Gach K., **Lewandowska U.**, Szewczyk K., Hrabec E., Modranka J., Jakubowski R., Janecki T., Szymański J., Janecka A. Anticancer activity of new synthetic α -methylene- δ -lactones on two breast cancer cell lines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013;113(6):391–400.

W latach 2004-2013 pracowałam w zespole prof. Elżbiety Hrabec w Zakładzie Enzymologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie uzyskałam szeroką wiedzę na temat metaloproteinaz, a w szczególności kolagenaz typu IV, oraz doświadczenie w technikach i analizach ich ekspresji, sekrecji i aktywności (PCR, zymografia, Western blot, ELISA). Praca w zespole prof. Elżbiety Hrabec była dla mnie również inspiracją i podstawą do podjęcia badań nad aktywnościami polifenoli pochodzenia naturalnego. Uczestniczyłam jako główny wykonawca w następujących projektach badawczych zrealizowanych w Zakładzie Enzymologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej:

1. *Potencjał chemoprewencyjny związków polifenolowych wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca*. NCN nr NN 312-446-840 (2011-2014).
2. *Ocena właściwości chemoprewencyjnych związków polifenolowych wyizolowanych z roślin jadalnych i leczniczych*. MNiSW nr NN 321-357-434 (2008-2010).

Opublikowane wyniki badań przeprowadzonych w ramach powyższych projektów stanowią podstawę mojego wniosku habilitacyjnego.

Obecnie pracuję w zespole dr. hab. Jakuba Fichny w Zakładzie Biochemii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie podjęłam badania nad ekstraktami polifenolowymi w modelach chorób zapalnych i czynnościowych układu pokarmowego. Dotychczas w badaniach na myszach C57/B1/6 scharakteryzowaliśmy aktywność przeciwzapalną ekstraktu polifenolowego z nasion wiesiołka. Wykazaliśmy, że ekstrakt posiada silne działanie przeciwzapalne w mysim modelu choroby Leśniowskiego-Crohna, wywołanej doodbytniczym podaniem kwasu 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowego (2,4,6-TriNitroBenzeneSulfonic acid, TNBS), o czym świadczył m.in. obniżony wynik makroskopowy stanu zapalnego oraz obniżona aktywność mieloperoksydazy (*MyeloPerOxidase*, MPO). Wyniki powyższych badań opublikowaliśmy w:

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2014 Jul 31) Polyphenol extract from evening primrose pomace alleviates experimental colitis after intracolonic and oral administration in mice. Sałaga M., **Lewandowska U.**, Sosnowska D., Zakrzewski P.K., Cygankiewicz A.I., Piechota-Polańczyk A., Sobczak M., Mosinska P., Chen C., Krajewska W.M., Fichna J.

Kierowanie projektami badawczymi:

- *Określenie roli genu WWOX w rearanzacji tkanek regulowanych estrogenem.* UM nr 502-11-567 (2007-2009)

oraz udział w takich projektach:

- *Inhibition of enzymatic degradation of endogenous opioids and cannabinoids as a novel target for treatment of functional and inflammatory disorders of the gastrointestinal tract.* MNiSW nr 0107/IP1/2013/72, (2013-2015)
- *Potencjał chemoprewencyjny związków polifenolowych wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca.* NCN nr NN 312-446-840 (2011-2014)
- *Ocena właściwości chemoprewencyjnych związków polifenolowych wyizolowanych z roślin jadalnych i leczniczych.* MNiSW nr NN 321-357-434 (2008-2010)
- *Badanie aktywności przeciwnowotworowej oraz molekularnych mechanizmów działania syntetycznych pochodnych laktonów seskwiterpenowych.* UM 503/1-156-02/503-01
- *Ocena wpływu roli regulacyjnej angiotensyny drugiej i genistyny na profil ekspresyjny genów powiązanych z działaniem receptorów ER i AT w hormonozależnych i hormononiezależnych nowotworach gruczołu sutkowego.* MNiSW nr NN 403-293-536 (2008-2013)
- *Rola genu supresorowego nowotworów WWOX na kancerogenezę raka jelita grubego. Wpływ zróżnicowania ekspresji WWOX na transkrypcję genów apoptozy, proliferacji i regulacji szlaków sygnałowych w liniach komórkowych raka jelita.* MNiSW nr N N402 448439 (2009-2012)
- *Wpływ poziomu ekspresji genu supresorowego nowotworów WWOX na zróżnicowanie poziomu ekspresji innych genów i biologię linii komórkowej raka piersi MDA-MB-231.* UM nr 502-19-840 (2008-2010)
- *Znaczenie naprawy uszkodzeń DNA powodowanych przez cytostatyki za pomocą niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) w komórkach glejaka mózgu.* KBN nr 401-117-32 (2007-2009)
- *Wpływ hormonów steroidowych na aktywność białkowych kinaz tyrozynowych w guzach przysadki w obecności czynników stymulujących i hamujących proliferację guzów.* UM nr 502-16-301 (2005-2007)
- *Charakterystyka WWOX, nowego genu supresorowego nowotworów. Analiza występowania i udziału w kancerogenezie nieprawidłowego transkryptu WWOXdelta 6-8.* KBN nr P05A 113 23 (2002-2005)
- *Ocena zmian poziomu replikacji wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby i analiza czynników wpływających na trwałość intermediatu replikacyjnego HBV (cccDNA).* KBN nr PO5A 094 15 (1998-2001)
- *Rola pośredniej formy replikacyjnej wirusa zapalenia wątroby typu B (cccDNA) w mechanizmie przetrwania zakażenia HBV.* AM nr 502-11-491 (1998-2000)

Nagrody za działalność naukową:

- Nagroda Rektora I stopnia dla nauczycieli akademickich za rok 2013 za cykl prac: „Ocena właściwości biologicznych flawanoli z pigwowca japońskiego i wiesiołka dziwnego”
- Nagroda Rektora I stopnia dla nauczycieli akademickich za rok 2013 za cykl prac: „Badanie przeciwnowotworowych właściwości nowych syntetycznych α -metyleno- γ - i δ -laktanów i laktamów’
- Nagroda Rektora III stopnia dla nauczycieli akademickich za rok 2013 za pracę: „Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols”

Opieka nad doktorantami, magistrantami i stażystami oraz udział w realizacji części eksperymentalnej ich prac dyplomowych.

Doktoranci:

- dr n. med. inż. Karolina Pospiech, Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2011
- Promotor: prof. dr hab. Andrzej Bednarek
Temat pracy: *Rola WWOX, genu supresorowego nowotworów w gruczole mlekowym i jego kancerogenezie.*
- dr n. techn. Sylwia Gorlach, Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka oraz Zakład Enzymologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2011
Promotor: prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz
Współpromotor: prof. dr hab. Elżbieta Hrabec
Temat pracy: *Polifenole z owoców pigwowca japońskiego i z nasion wiesiołka dziwnego – charakterystyka i aktywność przeciwnowotworowa w testach in vitro.*
- dr n. med. Magdalena Nowakowska, Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2012
Promotor: prof. dr hab. Andrzej Bednarek

Temat pracy: *Rola genu supresorowego WWOX w kancerogenezie raka jelita grubego. Wpływ zróżnicowania ekspresji WWOX na transkrypcję genów apoptozy, proliferacji i regulacji szlaków sygnałowych w liniach komórkowych raka jelita.*

- dr n. med. Anna Wyrębska, Zakład Chemii Biomolekularnej, Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2012

Promotor: prof. dr hab. Anna Janecka

Temat pracy: *Badanie aktywności przeciwnowotworowej i molekularnych mechanizmów działania nowych syntetycznych α -metylenolaktonów i laktamów.*

- dr n. med. inż. Karolina Szewczyk, Zakład Enzymologii Medycznej, Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2013

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Hrabec

Temat pracy: *Ocena aktywności biologicznej polifenoli wyizolowanych z roślin jadalnych i leczniczych.*

- mgr Marta Sobczak, Zakład Biochemii, Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2012 – w trakcie realizacji

Promotor: dr hab. Jakub Fichna

Temat pracy: *Endogenny układ opioidowy i nocycetynowy jako potencjalne cele farmakologiczne dla terapeutyków działających w układzie pokarmowym.*

Magistrantka:

- pani Paula Mosińska, studentka biotechnologii na Wydziale Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 2014 – w trakcie realizacji

Promotor: dr hab. Jakub Fichna

Temat pracy: *Scharakteryzowanie roli tkanki tłuszczowej w patofizjologii zespołu jelita nadwrażliwego na podstawie oznaczenia poziomu wybranych jej hormonów: rezystyny, adiponektyny i leptyny w odniesieniu do danych klinicznych.*

Stażystka:

- W 2008 roku mgr inż. Sylwia Gorlach (była doktorantka w Instytucie Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej) odbyła dwumiesięczny staż w Zakładzie Enzymologii Medycznej, podczas którego uczestniczyła w realizacji kierowanego przeze mnie projektu finansowanego przez UM w Łodzi (nr 502-11-567; 2007-2009) pt. „Określenie roli genu WWOX w reorganizacji tkanek regulowanych estrogenem”, analizując ekspresję genów na poziomie białek techniką Western blot.

Działalność dydaktyczna

Od 1 lutego 1990 roku, od momentu zatrudnienia w Akademii Medycznej (następnie przekształconej w 2002 r. wraz z Wojskową Akademią Medyczną w Uniwersytet Medyczny w Łodzi), pracuję jako nauczyciel akademicki. Moja działalność dydaktyczna obejmuje prowadzenie zajęć z przedmiotu biochemia ze studentami kilku wydziałów i kierunków studiów:

- 1990-1994
Dla studentów Wydziału Lekarskiego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- 1999-2006
Dla studentów Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- 2007-2009
Dla studentów Wydziału Lekarskiego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
Dla studentów Wydziału Nauk o Zdrowiu:
 - kierunek *Zdrowie Publiczne*: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
 - kierunek *Pielęgniarstwo i Położnictwo*: ćwiczenia laboratoryjne
 - kierunek *Ratownictwo Medyczne*: ćwiczenia laboratoryjneOdział Studiów w Języku Angielskim: ćwiczenia laboratoryjne i komputerowe
 - kierunek *Lekarski 4-letni*
 - kierunek *Lekarski 6-letni*
 - kierunek *Lekarsko-Stomatologiczny*
- 2009 – do chwili obecnej
Dla studentów II roku Wydziału Lekarskiego: seminaria, ćwiczenia laboratoryjne i komputerowe; od 2012 – wykłady
- W latach 2006-2009 sprawowałam opiekę nad kierunkami:
 - *Pielęgniarstwa* I roku studiów – studia stacjonarne I stopnia
 - *Położnictwa* I roku studiów – studia stacjonarne I stopnia
- Od 2011 roku jestem koordynatorką systemu Uczelnia.XP (UXP) na Wydziale Lekarskim z przedmiotu biochemia.

Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

- Jestem współautorką skryptu dla studentów II roku Wydziału Studiów Anglojęzycznych:
Biochemical laboratory manual. Boczek T., Hrabec E., Hrabec Z., Kargas Ch., Lewandowska U., Rębas E., Sidorkiewicz M., Szemraj J., Taha J., Żylińska L. Łódź 2007, ISBN 978-83-61058-12-0.
- Współuczestniczyłam w prowadzeniu warsztatów pt. „*Analiza ekspresji techniką mikromacierzy białkowych*” w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Łódź, 14-18 maja 2007 r.).
- Uczestniczyłam w organizacji VII Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej „SUPERHELISA 2010” dla studentów II roku Wydziałów Lekarskich Uczelni Medycznych, który odbył się w Zakładzie Enzymologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Łódź, 14-15 maja 2010 r.).

- Byłam inicjatorką i współorganizatorką jednodniowej praktyki dla uczniów z XXVI Liceum Ogólnokształcącego im. K. K. Baczyńskiego w Łodzi, w ramach Ogólnopolskiego Dnia Przedsiębiorczości pod patronatem Prezydenta RP, która odbyła się 31 marca 2011 r. Uczniowie liceum objętego patronatem UM w Łodzi wykonywali ćwiczenia laboratoryjne z biochemii wspólnie ze studentami II roku Wydziału Lekarskiego.

Działalność ekspercka

1. Recenzent w czasopismach z listy Filadelfijskiej; w latach 2013-2014 zrecenzowałam:
 - 7 prac w *Nutrition and Cancer*, ISSN: 0163-5581
 - 1 pracę w *Central European Journal of Biology*, ISSN: 1895-104X
2. Członek jury w:
 - VIII Ogólnopolskim Konkursie Wiedzy Biochemicznej dla studentów II roku Wydziałów Lekarskich Uczelni Medycznych „SUPERHELISA 2011” zorganizowanym w Katedrze Biochemii Ogólnej w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (Zabrze, 13-14 maja 2011 r.);
 - IX Ogólnopolskim Konkursie Wiedzy Biochemicznej dla studentów II roku Wydziałów Lekarskich Uczelni Medycznych „SUPERHELISA 2012” zorganizowanym w Katedrze Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu (Wrocław, 11-12 maja 2012 r.).

Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Biochemiczne (PTBioch.); od 2000 r.
- European Federation of Biotechnology (EFB); od 2007 r.
- Członek Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) z prawem wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nr 04473-10114; od 2003 r.

Urszula Lewandowska