



AUTOREFERAT

Katarzyna Gach-Janczak

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

Łódź, 2017

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego	4
4. a). Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4. b). Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
4. c). Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników	5
I. Wprowadzenie i motywacja badań	5
II. Cel i zakres badań.....	10
III. Omówienie głównych wyników publikacji włączonych do rozprawy habilitacyjnej.....	11
IV. Wnioski	21
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	22
6. Działalność dydaktyczna.....	27
7. Podsumowanie dorobku naukowego.....	28
8. Piśmiennictwo	29

1. Imię i nazwisko:

Katarzyna Gach-Janczak

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

2010 Stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Tytuł pracy doktorskiej: „*Synteza nowych analogów morficeptyny oraz badanie ich właściwości przeciwbólowych oraz wpływu na system opioidowy w wybranych nowotworowych liniach komórkowych*”
Promotor: prof. dr hab. n med. Anna Janecka

2005 Tytuł zawodowy magister farmacji
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Tytuł pracy magisterskiej: „*Ekspresja genu MDR1 w przewlekłej białaczce limfatycznej*”
Promotor: prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1.08.2010 - obecnie Adiunkt ze stopniem doktora
Zakład Chemii Biomolekularnej,
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

13.11.2008 – 31.07.2010 Asystent
Zakład Chemii Biomolekularnej,
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Ocena aktywności przeciwnowotworowej nowych syntetycznych związków heterocyklicznych o budowie opartej na związkach naturalnych.

b) Spis publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

Podstawę osiągnięcia naukowego stanowi monotematyczny cykl pięciu publikacji oryginalnych oraz trzech artykułów poglądowych współautorstwa habilitantki.

Publikacje oryginalne

- H1.** Gach K, Szymański J, Pomorska D, Długosz A, Modranka J, Michalak M, Janecki T, Janecka A. Anticancer properties of novel 4-methylene-1,2-diphenylpyrazolidin-3-ones. Chem Biol Drug Des. 2015, 86: 961-968.
(IF₂₀₁₅ = 2.802, MNiSW = 25)
- H2.** Gach K, Szymański J, Pomorska D, Długosz A, Modraka J, Janecki T, Janecka A. Combined effects of anti-cancer drugs and new synthetic α -methylene- δ -lactones on MCF-7 cells. Tumor Biology, 2015, 36: 5971-5977.
(IF₂₀₁₅ = 2.926, MNiSW = 30)
- H3.** Gach K, Grądzka I, Wasyk I, Męczyńska-Wielgosz S, Iwaneńko T, Szymański J, Koszuc J, Janecki T, Kruszewski M, Janecka A. Anticancer activity and radiosensitization effect of methyleneisoxazolidin-5-ones in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Chem Biol Interact. 2016, 248: 68-73.
(IF₂₀₁₆ = 2.618, MNiSW = 30)
- H4.** Wyrębska A*, Pawłowska Z*, Gach K*, Komorowski P, Protas A, Walkowiak B, Janecka A. Proteomic analysis of proteins engaged in α -methylene- δ -lactone cytotoxic Effects in hormone-independent breast cancer MDA-MB-231 cells. Chem Biol Drug Des. 2014, 84: 300-306. * równy udział autorów
(IF₂₀₁₄ = 2.485, MNiSW = 25)
- H5.** Gach K*, Modranka J*, Szymański J, Pomorska D, Krajewska U, Mirowski M, Janecki T, Janecka A. Anticancer properties of new synthetic hybrid molecules combining naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione or benzo[*f*]indole-4,9-dione motif with phosphonate subunit. Eur J Med Chem. 2016, 120: 51-63. * równy udział autorów
(IF₂₀₁₆ = 3.902, MNiSW = 40)

Artykuły poglądowe

- H6.** Gach K, Janecka A. α -Methylene- γ -lactones as a novel class of anti-leukemic agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014, 14: 688-694.
(IF₂₀₁₄ = 2.469, MNiSW= 35)
- H7.** Gach K, Długosz A, Janecka A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015, 388: 477-486.
(IF₂₀₁₅ = 2.376, MNiSW= 25)
- H8.** Wyrębska A*, Gach K*, Janecka A. Combined effect of parthenolide and various anti-cancer drugs or anti-cancer candidate substances on malignant cells in vitro and in vivo. *Mini Rev Med Chem.* 2014, 14: 222-228. * równy udział autorów
(IF₂₀₁₄ = 2.903, MNiSW = 25)

Współczynnik impact factor prac umieszczonych w dysertacji:

5 publikacji oryginalnych o współczynniku IF = 14.733

3 publikacje poglądowe o współczynniku IF = 7.748

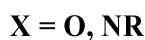
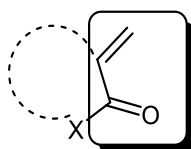
Sumaryczny współczynnik IF = 22.481

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

I. WPROWADZENIE I MOTYWACJA BADAŃ

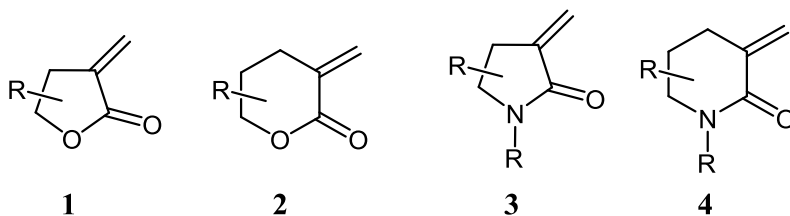
Walka z chorobami nowotworowymi jest jednym z najważniejszych wyzwań medycyny w krajach wysokorozwiniętych. Poszukując nowych środków o działaniu przeciwnowotworowym naukowcy często zwracają uwagę na związki pochodzenia naturalnego. Szacuje się, że aż 60% preparatów przeciwnowotworowych zakwalifikowanych do badań klinicznych stanowią związki pochodzenia roślinnego. Przykładem takich substancji są paklitaksel, alkaloidy barwinka różyczkowego (winblastyna i winkrystyna), kamptotecyna i etopozyd (1). Związki izolowane z roślin mogą być używane bezpośrednio lub też mogą stanowić punkt wyjścia do modyfikacji chemicznych, prowadzących niekiedy do bardziej aktywnych analogów o lepszym profilu farmakologicznym.

W ostatniej dekadzie coraz większe zainteresowanie wśród naukowców budzą związki heterocykliczne pochodzenia naturalnego zawierające w swej strukturze motyw wiązania *egzo-*metylenowego sprzężonego z grupą karbonylową (2) (Rys. 1).



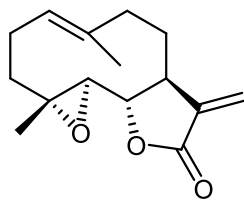
Rys. 1. Motyw strukturalny wiązania *egzo*-metylenowego sprzężonego z grupą karbonylową.

Związki takie występują w liściach i kwiatach roślin z rodziny *Asteraceae* (*Compositae*) i charakteryzują się różnorodnymi właściwościami biologicznymi. Działają przeciwbakteryjnie, przeciwzapalnie, przeciwgrzybiczo i antywirusowo. Największe nadzieje budzi ich aktywność przeciwnowotworowa (3,4). Najbardziej rozpowszechnioną grupą związków z takim ugrupowaniem są α -metyleno- γ -laktony **1** (2). Do roku 2009 opisano ponad 5000 naturalnych α -metyleno- γ -laktonów. Łącznie z syntetycznymi analogami obecnie znanych jest ponad 14000 związków zawierających ugrupowanie α -metyleno- i α -alkilideno- γ -laktonowe (2). Poza α -metyleno- γ -laktonami, w przyrodzie spotykane są również, choć znacznie rzadziej, α -metyleno- δ -laktony **2**, α -metyleno- γ -laktamy **3** i α -metyleno- δ -laktamy **4** (Rys. 2), które w ostatnich latach stały się częstym celem badań biologicznych oraz syntez i modyfikacji chemicznych.



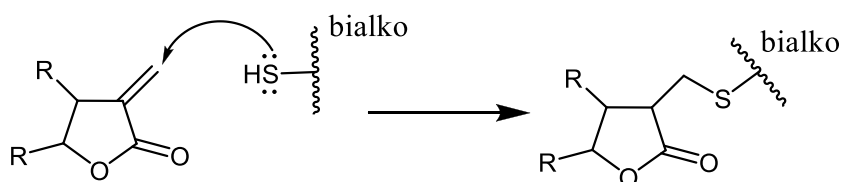
Rys. 2. Struktura α -metyleno- γ - i δ -laktonów i -laktamów.

Najszerzej przebadanym przedstawicielem związków zawierających w swej strukturze motyw wiązania *egzo*-metylenowego sprzężonego z grupą karbonylową jest, wyizolowany z liści złocienia (wrotycza) maruna *Tanacetum parthenium*, partenolid. Związek ten wykazuje silne działanie cytotoksyczne na wielu liniach komórkowych, a jego lepiej rozpuszczalna pochodna, dimetyloaminopartenolid (DMAPT), znajduje się obecnie w Wielkiej Brytanii w fazie badań klinicznych jako lek na białaczkę (5).



Partenolid

Partenolid i inne związki zawierające ugrupowanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową wchodzą w reakcję typu Michaela z biologicznie ważnymi nukleofilami komórkowymi. Reagują między innymi z resztami cysteiny w enzymach, z wolnym wewnątrzkomórkowym glutationem oraz z innymi białkami funkcjonalnymi zawierającymi grupy merkaptylowe (-SH). Konsekwencją tego jest powstawanie kowalencyjnych adduktów (6) (Rys. 3).



Rys. 3. Mechanizm działania związków zawierające ugrupowanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową

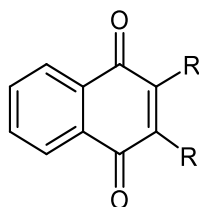
W wyniku alkilowania komórkowych tioli dochodzi do zakłócenia wielu ważnych procesów komórkowych, co może prowadzić do zahamowania proliferacji, indukcji apoptozy lub uwrażliwić komórki nowotworowe na działanie leków przeciwnowotworowych.

Na poziomie molekularnym cytotoksyczne działanie partenolidu obejmuje różne mechanizmy oraz ścieżki sygnałowe i wiąże się z obniżeniem poziomu zredukowanego glutationu (GSH), indukcją stresu oksydacyjnego, zaburzeniami potencjału błonowego mitochondrium, aktywacją białka p53, zmianami epigenetycznymi oraz hamowaniem sygnalizacji szlaku MAP (3,4). Bardzo ważnym mechanizmem jego działania jest również hamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (*ang. nuclear factor κ B*) (7). Konstytutywna aktywność tego czynnika w wielu typach nowotworów bądź jego aktywacja w wyniku stosowanej terapii (8,9), jest prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn rozwoju lekooporności i nieskuteczności stosowanych chemioterapeutyków.

Związki zawierające ugrupowanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową wpływając na różne ścieżki sygnałowe oraz hamując aktywność NF- κ B, mogą kierować komórki nowotworowe na drogę apoptozy, bądź uwrażliwiać je na działanie chemio- i radioterapii (10-13).

Ukazało się wiele prac na temat aktywności przeciwnowotworowej tych związków, zarówno na liniach komórkowych jak i modelach zwierzęcych. Jak do tej pory tylko pochodna arglabiny - dimetyloaminoarglabina, została zarejestrowana i wprowadzona do leczenia w Kazachstanie, Rosji i USA (Georgia) jako substancja przeciwnowotworowa (14).

Inną interesującą grupą związków pochodzenia naturalnego, wykazującą szerokie spektrum aktywności biologicznej, są związki zawierające ugrupowanie 1,4-naftalenodionu (naftochinonu), zwykle skondensowane w pozycji *orto* z jednym lub dwoma płaskimi pierścieniami (Rys. 4). Naturalne 1,4-naftochinony, izolowane z surowców roślinnych, takie jak plumbagina czy lapachol, od lat badane były pod kątem ich właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciw pasożytniczych, a także przeciwnowotworowych (15,16).



Rys. 4. Układ 1,4-naftalenodionu (naftochinonu)

Do najbardziej znanych pochodnych 1,4-naftochinonów należą antybiotyki antracyklinowe: daunorubicyna i doksorubicyna, izolowane z hodowli *Streptomyces peucetius*. Oba związki używane są jako leki przeciwnowotworowe i wykorzystywane w terapii wielu typów nowotworów, a zwłaszcza białaczek (17). Otrzymano też liczne syntetyczne analogi 1,4-naftochinonów i wiele z nich w badaniach *in vitro* wykazywało wysoką aktywność cytotoksyczną względem różnych linii komórkowych (16,18).

Mechanizm przeciwnowotworowego działania chinonów jest dość złożony. Ze względu na swoją budowę chinony uczestniczą w procesach redoks. Mogą one ulegać jedno lub dwu-elektronowej redukcji, co prowadzi do tworzenia się reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak rodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, a ostatecznie rodnik hydroksylowy (19). ROS odgrywają istotną rolę w regulacji procesów komórkowych, takich jak ekspresja genów, metabolizm, różnicowanie i podział komórek oraz apoptoza. Ich nadmiar może prowadzić jednak do stresu oksydacyjnego wskutek utleniania makrocząsteczek komórkowych, takich jak lipidy, białka i DNA. Wysokie stężenie ROS jest niebezpieczne i indukuje śmierć komórek poprzez różne ścieżki sygnałowe (20).

Chinony są również akceptorami w reakcji Michaela i mogą powodować uszkodzenie komórek poprzez alkiłowanie kluczowych białek komórkowych i/lub DNA (19). Generowanie stresu oksydacyjnego w komórce oraz uszkodzeń struktur komórkowych powoduje zahamowanie proliferacji, zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy. Związki, które tak jak 1,4-naftochinony modulują równowagę redoks w komórkach nowotworowych są potencjalnymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe.

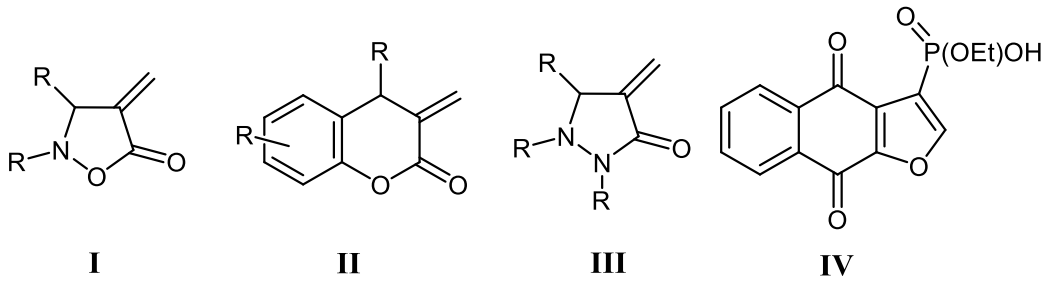
Zarówno związki zawierające ugrupowanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową, jak i związki zawierające układ 1,4-naftalenodionu mają duży potencjał farmakologiczny. Wiele z nich wykazuje aktywność przeciwnowotworową. Różnice w ich działaniu wynikają z obecności dodatkowych pierścieni lub/i innych podstawników, które zmieniają lipofilowość, geometrię cząsteczki oraz mają wpływ na efekty elektronowe.

W wielu laboratoriach na świecie z dużą intensywnością prowadzone są badania mające na celu zoptymalizowanie wybranych struktur w celu otrzymania analogów o zwiększonej aktywności biologicznej i zmniejszonej toksyczności.

W Zakładzie Chemii Biomolekularnej od szeregu lat zajmujemy się badaniem właściwości przeciwnowotworowych oraz zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną związków heterocyklicznych, syntetyzowanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej.

W niniejszym autoreferacie przedstawiam moje badania dotyczące aktywności przeciwnowotworowej oraz molekularnych mechanizmów działania nowych związków heterocyklicznych zawierających wiązanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową (struktury **I-III**) lub ugrupowanie 1,4-naftalenodionu (struktura **IV**). Związki te można zaliczyć do kilku grup:

- α -metyleno- γ -laktony zawierające dodatkowy atom azotu w pierścieniu **I**
(4-metylenoizoksazolidyn-5-ony)
- α -metyleno- δ -laktony **II** (3-metylenochroman-2-ony)
- α -metyleno- γ -laktamy zawierające dodatkowy atom azotu w pierścieniu **III**
(4- metylenopirazolidyn-3-ony)
- hybrydy zawierające motyw naftalenodionu w połączeniu z grupą fosfonianową (**IV**)



II. CEL PRACY I ZAKRES BADAŃ:

Celem niniejszej pracy było:

1. Zbadanie aktywności cytotoksycznej nowych heterocyklicznych analogów na wybranych ludzkich nowotworowych liniach komórkowych:
 - raka piersi MCF-7
 - białaczki promielocytowej HL-60
 - raka wątroby HepG2oraz dla wybranych związków na komórkach dwóch ludzkich linii nie-nowotworowych:
 - nabłonka gruczołu mlekowego MCF-10A
 - śródbłonka naczyniowego żyły pępowinowej HUVEC
2. Wyselekcjonowanie związków o największej cytotoksyczności.
3. Określenie mechanizmu działania badanych związków poprzez zbadanie ich wpływu na:
 - proliferację komórek nowotworowych
 - cykl komórkowy
 - proces apoptozy
 - zdolność do generowania uszkodzeń DNA
 - zmiany potencjału błonowego mitochondrium
 - zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego
4. Określenie synergistycznego działania wybranych związków w połączeniu ze znanymi lekami przeciwnowotworowymi o różnych molekularnych mechanizmach działania.
5. Przeprowadzenie analizy proteomicznej białek zaangażowanych w aktywność cytotoksyczną.

III. OMÓWIENIE GŁÓWNYCH WYNIKÓW PUBLIKACJI WŁĄCZONYCH DO ROZPRAWY HABILITACYJNEJ:

W pierwszej kolejności zajmowałam się związkami zawierającymi ugrupowanie *egzo*-metylenowe sprzężone z grupą karbonylową (struktury **I-III**). W trzech kolejnych pracach omówionych poniżej (**H1-H3**) opisałam wpływ wybranych analogów na wymienione powyżej procesy, mogące indukować śmierć komórek nowotworowych.

Ważnym aspektem tych prac było również badanie ewentualnego synergistycznego działania tych analogów w połączeniu ze znanymi chemioterapeutykami lub z promieniowaniem jonizującym.

Stosowana obecnie terapia przeciwnowotworowa oparta jest w dużej mierze na lekach cytotoksycznych. Duża toksyczność tych leków oraz ich liczne działania niepożądane, a także wrodzona lub nabyta oporność komórek nowotworowych na stosowane związki, przyczyniają się do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Obecnie coraz większe nadzieje pokłada się w zastosowaniu terapii skojarzonej, opartej na łączeniu różnych typów terapii, np. chemioterapii z radioterapią lub jednoczesnym podawaniu co najmniej dwóch związków o różnym mechanizmie działania. Zastosowanie związków o różnych punktach uchwytu w komórce jest szczególnie ważne w przypadku wrodzonej bądź nabytej oporności komórek nowotworowych na stosowane leki. Taka łączona terapia znacznie zwiększa skuteczność leczenia oraz zmniejsza działania niepożądane.

Naukowcy i lekarze stale podejmują próby łączenia znanych chemioterapeutyków z nowymi związkami w nadziei na pokonanie lekooporności. Jak dotąd niewiele jest prac na temat synergistycznego działania związków zawierających α,β -nienasycone ugrupowanie karbonylowe stosowanych w skojarzeniu z lekami przeciwnowotworowymi. Synergistyczne działanie przeciwnowotworowe partenolidu w połączeniu np. z paklitakselem, 5-fluorouracylem czy geldanamycyną wykazano w badaniach *in vitro* jak i na kilku modelach zwierzęcych (11).

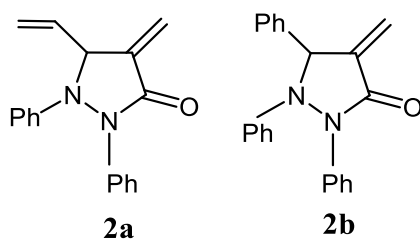
Włączając się w nurt poszukiwań nowych strategii leczenia chorób nowotworowych, w opisanych poniżej pracach badałam, czy wybrane syntetyczne metylenolaktony i metylenolaktamy mogą nasilać *in vitro* przeciwnowotworowe działanie znanych chemioterapeutyków.

Na podstawie literatury wybrałam chemioterapeutyki o różnych molekularnych mechanizmach działania: 5-fluorouracyl (antymetabolit), paklitaksel (związek o działaniu antymitotycznym) i oksaliplatynę (związek alkilujący). Związki te, mimo licznych działań niepożądanych, stosowane są jako leki z wyboru w leczeniu wielu typów nowotworów.

Pomimo początkowej wrażliwości na wyżej wymienione leki, zwykle dochodzi do rozwinięcia oporności, gdy są one stosowane w monoterapii.

- **H1. Gach K**, Szymański J, Pomorska D, Długosz A, Modranka J, Michalak M, Janecki T, Janecka A. Anticancer properties of novel 4-methylene-1,2-diphenylpyrazolidin-3-ones. *Chem Biol Drug Des.* 2015, 86:961-968.

Celem tej pracy była ocena aktywności przeciwnowotworowej nowych syntetycznych 4-metylenopirazolidyn-3-onów, czyli α -metyleno- γ -laktamów zawierających dodatkowy atom azotu w pierścieniu γ -laktamu. α -Metyleno- γ -laktamy często uważane są za mniej toksyczne w stosunku do zdrowych komórek niż γ -laktony, ale przeważnie są też znacznie mniej od nich aktywne. Spośród dużej serii związków wybrałam dwa: 5-winylo-1,2-difenylo-4-metylenopirazolidyn-3-on (**2a**) i 5-fenylo-1,2-difenylo-4-metylenopirazolidyn-3-on (**2b**), które wykazywały wyjątkowo silną aktywność cytotoksyczną względem komórek MCF-7 (wartości IC_{50} poniżej $5\mu M$ po 24h inkubacji).

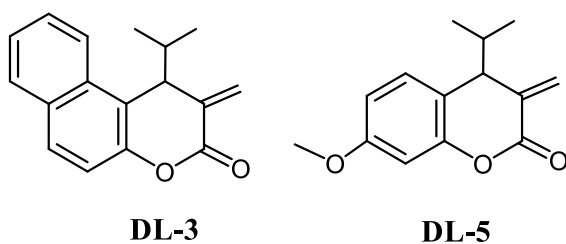


Związki te poddałam bardziej szczegółowym badaniom. Oba analogi hamowały proliferację, powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie subG0/G1, indukowały uszkodzenia DNA i apoptozę w komórkach MCF-7. Związek **2a**, który wykazywał znacznie silniejsze działanie, testowałam również w eksperymentach skojarzonych, w połączeniu ze znanymi chemioterapeutykami. Efekt synergistyczny obserwowałam, gdy związek **2a** stosowany był w kombinacji z 5-fluorouracylem lub oksaliplatyną. W pracy oceniałam również efekt terapii skojarzonej na wewnątrzkomórkową produkcję ROS. Zastosowanie związku **2a** i oksaliplatyny powodowało znaczny wzrost poziomu ROS w komórce, co w konsekwencji może prowadzić do indukcji wewnętrznej ścieżki apoptozy.

W pracy tej wykazałam, że α -metyleno- γ -laktamy stanowią ciekawą grupę związków o szerokim spektrum aktywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo związki te mogą być rozważane jako czynniki uwrażliwiające komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków.

- **H2. Gach K**, Szymański J, Pomorska D, Długosz A, Modranka J, Janecki T, Janecka A. Combined effects of anti-cancer drugs and new synthetic α -methylene- δ -lactones on MCF-7 cells. *Tumor Biology*, 2015, 36: 5971-5977.

Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnego synergistycznego działania przeciwnowotworowego w komórkach raka piersi MCF-7 nowych syntetycznych α -metyleno- δ -laktonów w połączeniu ze znanymi chemioterapeutykami. Do badań wybrałam dwa α -metyleno- δ -laktony: 1-*isopropyl*o-2-metylo-1,2-dihydrobenzochromen-3-on (DL-3) i jego analog, 4-*isopropyl*o-7-metoksy-3-metylenochroman-2-on, (DL-5), które we wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym Zespole charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwnowotworową. Związki te były silnie cytotoksyczne w stosunku do różnych nowotworowych linii komórkowych. Bardziej szczegółowe badania wykazały, że indukowały one wewnętrzną ścieżkę apoptozy, a także hamowały migrację i inwazyjność komórek nowotworowych raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 (21).



W pracy tej badałam, czy α -metyleno- δ -laktony mogą uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie wybranych chemioterapeutyków: 5-fluorouracylu, taksolu i oksaliplatin. Stosując wyznakowane fluorochromami przeciwciała oceniałam, przy użyciu cytometrii przepływowej, wpływ syntetycznych δ -laktonów oraz ich połączeń z lekami przeciwnowotworowymi na proliferację, generowanie uszkodzeń DNA i zdolności do indukcji apoptozy w komórkach MCF-7. Partenolid, naturalny α -metyleno- γ -lakton, używałam jako związek referencyjny. Oba syntetyczne analogi, jak i partenolid w stężeniu IC_{50} i $2xIC_{50}$ hamowały proliferację komórek oraz powodowały uszkodzenia DNA i indukowały apoptozę. Działanie DL-3 i DL-5 było podobne.

Testy skojarzone wykazały, że żaden z badanych syntetycznych analogów nie nasilał efektów wywoływanych przez taksol. Silny efekt synergistyczny obserwowałam natomiast w przypadku połączenia analogu DL-5 z oksaliplantyną oraz 5-fluorouracylem. Inkubacja komórek MCF-7 z DL-5 i 5-fluorouracylem powodowała bardzo silne hamowanie proliferacji, a także indukowanie uszkodzeń DNA. W przypadku uszkodzeń DNA obserwowany efekt był aż 8 razy silniejszy niż w przypadku samego 5-fluorouracylu.

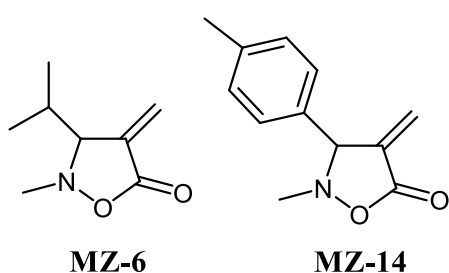
Inhibicja proliferacji komórek, a także indukcja apoptozy spowodowane przez oksaliplatinę były synergistycznie wzmocnione poprzez oba syntetyczne analogi, DL-3 oraz DL-5.

W pracy tej wykazałam, że stosunkowo łatwe do syntezy δ -laktony mogą nasilać przeciwnowotworowe działanie znanych chemioterapeutyków, jak 5-fluorouracyl i oksaliplantina.

- **H3. Gach K**, Grądzka I, Wasyk I, Męczyńska-Wielgosz S, Iwaneńko T, Szymański J, Koszuk J, Janecki T, Kruszewski M, Janecka A. Anticancer activity and radiosensitization effect of methyleneisoxazolidin-5-ones in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Chem Biol Interact.* 2016, 248: 68-73.

Celem tej pracy była ocena cytotoxyczności i potencjalnego przeciwnowotworowego działania nowych syntetycznych 4-metylenoizoksazolidyn-5-onów, czyli α -metyleno- γ -laktonów zawierających dodatkowy atom azotu w pierścieniu, w komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2. Badaliśmy również, czy związki te mogą uwrażliwiać komórki HepG2 na działanie promieniowania jonizującego.

Wcześniejsze badania prowadzone przez nasz Zespół wykazały, że 4-metylenoizoksazolidyn-5-ony charakteryzują się wysoką cytotoxycznością w komórkach raka piersi (MCF-7 i MDA-MB-231) i komórkach białaczkowych (HL-60 i NALM-6) (22,23). Do badań wybrałam dwa związki 3-*isopropyl*-2-metylo-4-metyleno*is*oksazolidyn-5-on (MZ-6) i jego analog 2-metylo-4-metyleno-3-(4-metylofenylo)*is*oksazolidyn-5-on (MZ-14). Jako związek referencyjny stosowaliśmy partenolid.



W teście MTT wykonanym na komórkach raka wątroby HepG2 związki MZ-6 i MZ-14 okazały się umiarkowanie cytotoxyczne. Wartości IC₅₀ po 24 godzinach inkubacji wynosiły 60 μ M i 33 μ M, odpowiednio dla związku MZ-6 i MZ-14. W dalszych badaniach wykazałam, że oba syntetyczne analogi generowały ROS, powodowały zaburzenia potencjału mitochondrium oraz indukowały apoptozę. Związki te w różny sposób działały na DNA komórek. Pozwalający na analizę poziomu uszkodzeń DNA test kometowy wykazał, że

związek MZ-14 powodował silne uszkodzenia DNA już po 2h inkubacji. Związek MZ-6 w tym teście był zupełnie nieaktywny nawet w wysokich stężeniach.

Kolejnym etapem pracy było zbadanie przy użyciu testu klonogenności, czy związki MZ-6 i MZ-14 mogą nasilać powodowany pod wpływem promieniowania jonizującego spadek przeżywalności komórek HepG2. Test klonogenności pozwala ocenić jaki procent komórek wystawionych na działanie badanych związków zachowuje zdolność do dalszej proliferacji oraz jest w stanie tworzyć kolonie.

Komórki traktowano przez 24 godziny badanymi związkami w wyznaczonych stężeniach, a następnie poddawano je działaniu promieniowania jonizującego w różnych dawkach (1, 2 lub 4Gy). Eksperymenty te wykazały, że komórki HepG2 preinkubowane z syntetycznymi analogami lub partenolidem były znacznie bardziej podatne na działanie promieniowania X niż komórki kontrolne. Najsilniejszy efekt synergistyczny obserwowany był w przypadku skojarzonego działania związku MZ-6 i promieniowania X użytego w dawce 4Gy. Przeżywalność spadła o ponad 60% w porównaniu z komórkami, które były tylko naświetlane.

Promieniowanie rentgenowskie wywołuje w komórkach efekty zarówno bezpośrednie jak i pośrednie. Efekty bezpośrednie związane są z indukowanymi promieniowaniem uszkodzeniami DNA, podczas gdy do skutków pośrednich można zaliczyć powstawanie w drodze radiolizy ROS. Uszkodzenia DNA i spowodowany nadmiarem ROS stres oksydacyjny mogą prowadzić do dysfunkcji organelli komórkowych, co powoduje kierowanie komórki na drogę apoptozy. Związki, które indukują stres oksydacyjny i zakłócają wewnątrzkomórkową równowagę redoks mogą obniżać próg promieniowania, które indukuje apoptozę.

W pracy tej wykazaliśmy, że proste związki zawierające układ α -metyleno- γ -laktonu, które same charakteryzują się tylko umiarkowaną cytotoksycznością w komórkach HepG2 mogą nasilać wrażliwość tych komórek na działanie promieniowania jonizującego.

- **H4.** Wyrębska A*, Pawłowska Z*, **Gach K***, Komorowski P, Protas A, Walkowiak B, Janecka A. Proteomic analysis of proteins engaged in α -methylene- δ -lactone cytotoxic effects in hormone-independent breast cancer MDA-MB-231 cells. Chem Biol Drug Des. 2014, 84: 300-306.

Celem niniejszej pracy była analiza proteomiczna białek zaangażowanych w ktywność cytotoksyczną syntetycznego α -metyleno- δ -laktonu (1-isopropylo-2-metylo-1,2-dihydrobenzochromen-3-onu, DL-3) w komórkach raka piersi MDA-MB-231. Wcześniejsze

badania prowadzone przez nasz Zespół wykazały, że aktywność przeciwnowotworowa DL-3 związana jest z indukcją apoptozy poprzez aktywację ścieżki mitochondrialnej oraz hamowaniem zdolności do przerzutowania komórek nowotworowych poprzez zmniejszenie wydzielania enzymów odpowiedzialnych za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (21). Jednak bardziej szczegółowe mechanizmy i ścieżki, poprzez które DL-3 wywiera te efekty są nadal słabo poznane.

W tej pracy, przy użyciu dwuwymiarowej różnicowej elektroforezy żelowej 2D-DIGE badaliśmy zmiany w ekspresji białek, jakie zachodzą w komórkach MDA-MB-231 traktowanych związkiem DL-3. Wyodrębniliśmy osiem białek, których ekspresja zmieniła się w porównaniu z kontrolą. Sześć z nich uległo nadekspresji, poziom dwóch białek obniżył się. Białka te zostały następnie zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas (MALDI-TOF-TOF/MS). Niektóre ze zidentyfikowanych białek zostały wcześniej opisane w komórkach nowotworowych i wiadomo, że zaangażowane są one w utrzymanie struktury i integralności komórkowej oraz regulację podstawowych procesów zachodzących w komórkach, takich jak: cykl komórkowy, cytokineza, modulacja transkrypcji, apoptoza i sygnalizacja komórkowa. Pozostałe są nadal słabo poznane, a ich funkcja nie jest do końca wyjaśniona.

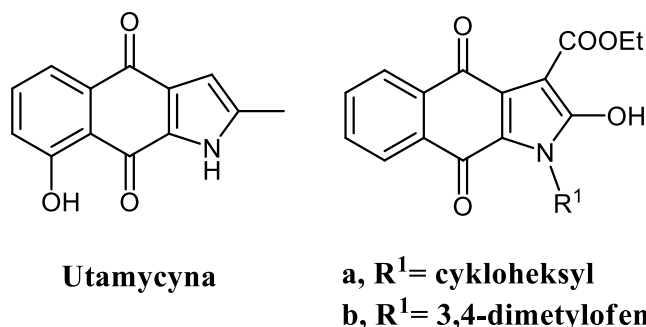
Według naszej najlepszej wiedzy w pracy tej po raz pierwszy przedstawiono analizę proteomiczną zmian zachodzących w komórkach raka piersi pod wpływem syntetycznych δ -laktonów. Mamy nadzieję, że rozwijający się poziom wiedzy na temat roli opisanych w pracy białek pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów działania związków cytotoksycznych.

- **H5. Gach K**, Modranka J, Szymański J, Pomorska D, Krajewska U, Mirowski M, Janecki T, Janecka A. Anticancer properties of new synthetic hybrid molecules combining naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione or benzo[*f*]indole-4,9-dione motif with phosphonate subunit. *Eur J Med Chem.* 2016, 120: 51-63.

Celem tej pracy była synteza oraz zbadanie aktywności przeciwnowotworowej serii podstawionych 3-dietoksyfosforylonafto[2,3-*b*]furano-4,9-dionów **13** oraz serii 3-dietoksyfosforylobenzo[*f*]indolo-4,9-dionów **18**, łączących ugrupowanie 1,4-naftalenodionu z grupą fosfonianową.

Związki zawierające w swej strukturze naftofurano-4,9-diony i benzoindolo-4,9-diony występują w naturze i mają ciekawe właściwości biologiczne. Przykładem może być wyizolowana ze *Streptomyces albus* utamycyna B (24). Syntetyczne analogi utamycyny

zawierające w pozycji 3 ugrupowanie estrowe były badane na wielu nowotworowych liniach komórkowych i niektóre z nich wykazywały silne właściwości cytotoksyczne (25) (Rys. 5).

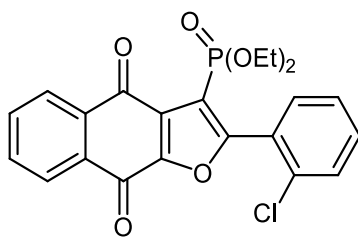


Rys. 5. Struktury utamycyny B i jej syntetycznych analogów (a,b), zawierających ugrupowanie estrowe w pozycji 3.

Kontynuując poszukiwanie nowych związków heterocyklicznych o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych współpracująca z nami grupa chemików Politechniki Łódzkiej otrzymała serię fosforylowanych oksa- i aza-heterocykli zawierających grupę fosfonianową zamiast grupy karboksylowej w pozycji 3. Grupa fosfonianowa może naśladować tetraedryczne związki przejściowe, które tworzą się w reakcjach enzymatycznych zaangażowanych w metabolizm grupy karboksylowej (26-28). Takie rozumowanie doprowadziło do otrzymania w przeszłości niektórych ważnych leków, jak na przykład kwas N-fosfonoacetylo-L-asparaginowy (PALA), który wykazuje dużą aktywność przeciwnowotworową (29).

Nasze nowe związki hybrydowe były testowane *in vitro* pod kątem ich cytotoksyczności na dwóch liniach białaczkowych HL-60 i NALM-6 oraz linii komórkowej raka piersi MCF-7. Eksperymenty przesiewowe wykazały, że naftofurano-4,9-diony **13a-f** charakteryzowały się silną aktywnością cytotoksyczną (IC₅₀ poniżej 10 μM) na wszystkich trzech badanych liniach komórkowych. Przy czym związki te były 2-3 razy bardziej aktywne w stosunku do komórek raka piersi MCF-7 niż w komórkach białaczkowych. Dalszą modyfikacją chemiczną była hydroliza diestru **13** do monoestru **14**, który okazał się być całkowicie pozbawiony aktywności cytotoksycznej, co wskazuje, że obie grupy estrowe są niezbędne do aktywności tych hybrydowych związków. Benzoindolo-4,9-diony **18a-e** charakteryzowały się słabą cytotoksycznością, z wartościami IC₅₀ rzędu 20-60 μM.

Najbardziej aktywny w teście MTT związek, 2-(2-chlorofenylo)-3-dietoksyfosforylonafto[2,3-*b*]furano-4,9-dion (**13c**), wybrałam do dalszych, bardziej szczegółowych badań.



13c

W celu określenia toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych, związek ten badałam również na dwóch liniach nie-nowotworowych: MCF-10A i HUVEC. Jego toksyczność w stosunku do komórek białaczkowych i komórek HUVEC była zbliżona, **13c** okazał się jednak 4 razy mniej toksyczny w stosunku do komórek MCF-10A niż do komórek MCF-7.

Nasze badania wykazały, że analog **13c** charakteryzował się szerokim spektrum aktywności przeciwnowotworowej. Związek ten hamował proliferację komórek, generował uszkodzenia DNA i indukował apoptozę w komórkach linii HL-60 i MCF-7. W komórkach traktowanych **13c** obserwowaliśmy ponad 10-krotny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu ROS w porównaniu z kontrolą, co może wskazywać, że mechanizm cytotoksycznego działania **13c** związany jest z indukcją stresu oksydacyjnego w komórce i zaburzeniem wewnątrzkomórkowej równowagi redoks. Nagromadzenie ROS, przekraczające zdolności detoksykacyjne komórki może powodować utlenianie lipidów i białek komórkowych, indukować uszkodzenia DNA i zmiany potencjału błonowego mitochondrium, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki nowotworowej.

Uzupełnieniem tematycznym opisanych przeze mnie badań są prace przeglądowe, w których omówiłam wybrane aspekty dotyczące aktywności przeciwbiałaczkowej, mechanizmów działania związanych ze stresem oksydacyjnym oraz synergistycznych efektów działania w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi, związków zawierających w swojej strukturze motyw α,β -nienasyconego wiązania karbonyłowego.

- **H6. Gach K, Janecka A.** α -Methylene- γ -lactones as a novel class of anti-leukemic agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014, 14: 688-694.

Celem tej pracy przeglądowej było podsumowanie najnowszej wiedzy na temat aktywności przeciwnowotworowej naturalnych α -metyleno- γ -laktonów w komórkach białaczkowych. W pracy omówiłam główne mechanizmy i ścieżki sygnałowe zaangażowane w przeciwbiałaczkowe działanie tych związków. Dokonałam również przeglądu

najważniejszych naturalnych laktonów seskwiterpenowych z uwzględnieniem ich działania na białaczkowe linie komórkowe, na których związki te były badane.

Ważnym aspektem pracy było przedstawienie najnowszych badań i hipotez dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za selektywne działanie α -metyleno- γ -laktonów wobec nowotworowych komórek macierzystych. Skupiłam się przede wszystkim na wybiórczym działaniu partenolidu i micheliolidu, które mogą selektywnie eliminować białaczkowe komórki macierzyste bez uszkodzenia prawidłowych macierzystych komórek hemopoetycznych.

W pracy omówiłam problemy farmakokinetyczne i ograniczenia związane z możliwością zastosowania dwóch wyżej wymienionych związków jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Opisałam również syntetyczne analogi partenolidu i micheliolidu, które charakteryzują się lepszym profilem farmakokinetycznym, a zwłaszcza większą biodostępnością od związków macierzystych i są dobrymi kandydatami na terapeutki. Przykładem może być lepiej rozpuszczalna pochodna partenolidu, dimetyloaminopartenolid (DMAPT). Związek ten jest obecnie testowany w pierwszej fazie, prowadzonych w Wielkiej Brytanii, badań klinicznych jako lek przeciwbiałaczkowy.

Przypuszcza się, że otrzymanie leku zdolnego do zwalczania białaczkowych komórek macierzystych i progenitorowych będzie ogromnym krokiem naprzód w leczeniu białaczki.

- **H7. Gach K, Długosz A, Janecka A.** The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015, 388: 477-486.

W tej pracy przeglądowej skupiłam się na omówieniu jednego z aspektów przeciwnowotworowego działania laktonów seskwiterpenowych, jakim jest ich zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych.

W pracy przedstawiłam ogólne mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie równowagi redoks w komórce. Omówiłam również konsekwencje jej zaburzenia zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych.

Wiadomo, że równowaga pomiędzy wewnątrzkomórkową produkcją reaktywnych form tlenu (ROS), a antyoksydacyjnym systemem ochrony komórki ma zasadnicze znaczenie dla jej prawidłowego funkcjonowania i decyduje o jej dalszym losie. Według najnowszych badań ROS odgrywają ważną rolę w regulacji różnych procesów komórkowych, takich jak ekspresja genów, metabolizm, proliferacja, różnicowanie komórek i apoptoza. Zaburzenie

równowagi redoks i nagromadzenie ROS, przekraczające zdolności detoksykacyjne komórki może prowadzić do transformacji nowotworowej i promować rozwój raka.

W komórkach nowotworowych, które charakteryzują się zwiększonym metabolizmem, często występuje wyższy niż w zdrowych komórkach poziom ROS. Ten zwiększony poziom ROS może nasilać podatność komórek nowotworowych na indukowaną stresem oksydacyjnym apoptozę i może być wykorzystany w terapii nowotworów. Związki, które indukują produkcję ROS lub hamują ich eliminację przez system antyutleniaczy i powodują ich nadmierne nagromadzenie w komórkach nowotworowych, mogą okazać się skuteczne w zwalczaniu tych komórek.

W pracy omówiłam mechanizm cytotoksycznego działania laktonów seskwiterpenowych, który związany jest z generowaniem ROS oraz zmniejszeniem poziomu komórkowego zredukowanego glutationu (GSH), jednego z najważniejszych przeciwutleniaczy komórkowych. Prowadzi to do zaburzenia równowagi redoks, indukcji stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji uruchamia proces apoptozy na drodze mitochondrialnej.

Ważnym aspektem pracy jest dyskusja na temat różnic w działaniu laktonów seskwiterpenowych w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych, które spowodowane są różnicami w stanie redoks tych komórek.

- **H8.** Wyrębska A*, Gach K*, Janecka A. Combined effect of parthenolide and various anti-cancer drugs or anti-cancer candidate substances on malignant cells in vitro and in vivo. *Mini Rev Med Chem.* 2014, 14: 222-228.

Lekooporność jest jedną z głównych przyczyn niepowodzenia w leczeniu chorób nowotworowych. Stale podejmowane są próby łączenia znanych chemioterapeutyków z nowymi związkami w nadziei na jej pokonanie.

Celem tej publikacji było podsumowanie najnowszej wiedzy na temat synergistycznego działania partenolidu w połączeniu ze znanymi chemioterapeutykami i substancjami o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. W pracy zostały krótko opisane mechanizmy działania oraz główne przyczyny rozwoju lekooporności na znane chemioterapeutyki, takie jak: paklitaksel, 5-fluorouracyl, oksaliplatyn i geldanamycyna.

Przedstawiłyśmy również związki, inhibitory cyklooksygenazy - sulindak i celekoksyb, które nie są klasycznymi chemioterapeutykami, ale od wielu lat przyciągają uwagę badaczy w związku z chemoprewencyjnym działaniem w stosunku do niektórych typów nowotworów.

Lekooporność wiąże się w dużej mierze z konstytutywną aktywnością czynnika transkrypcyjnego NF- κ B charakterystyczną dla wielu typów nowotworów, bądź jego aktywacją w wyniku stosowanej terapii. Partenolid, nie tylko hamuje aktywność czynnika NF- κ B, ale wpływa również na różne ścieżki sygnałowe w komórce i dzięki temu może kierować komórki nowotworowe na drogę apoptozy, bądź uwrażliwiać je na działanie innych leków przeciwnowotworowych.

Niniejsza praca zawiera przegląd najnowszych wyników badań, w których wyżej wymienione chemioterapeutyki stosowane były w kombinacji z partenolidem oraz opisuje mechanizmy i ścieżki sygnałowe zaangażowane w synergistyczne efekty takiej terapii skojarzonej. W opisanych w pracy badaniach, prowadzonych *in vitro* na liniach komórkowych oraz w niektórych przypadkach na modelach zwierzęcych, partenolid wykazywał synergistyczne działanie z różnymi związkami o działaniu przeciwnowotworowym, poprawiając ich profil terapeutyczny.

Wyniki tych badań wskazują na potencjalne nowe zastosowanie partenolidu, jako czynnika uwrażliwiającego komórki nowotworowe na chemioterapię. Powstaje pytanie, czy jeśli próby kliniczne zostaną podjęte, podobne rezultaty uda się uzyskać u ludzi.

IV. WNIOSKI

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe w mojej pracy uważam:

1. Wykazanie, że syntetyczne związki oparte na budowie substancji występujących w przyrodzie, zawierające w swej strukturze motyw wiązania *egzo*-metylenowego sprzężonego z grupą karbonylową często wykazują silniejsze działanie cytotoksyczne od związków pochodzenia naturalnego.
2. Wykazanie, że syntetyczne α -metylenolaktony i laktamy uwrażliwiają komórki raka piersi MCF-7 na działanie chemioterapeutyków, takich jak 5-fluorouracyl i oksaliplatyna.
3. Wykazanie, że syntetyczne α -metyleno- γ -laktony, które same charakteryzują się tylko umiarkowaną cytotoksycznością w komórkach raka wątroby HepG2 mogą nasilać wrażliwość tych komórek na działanie promieniowania jonizującego.
4. Określenie zmian ekspresji białek zachodzących w komórkach raka piersi MDA-MB-231 pod wpływem syntetycznych α -metyleno- δ -laktonów, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów działania związków cytotoksycznych.

5. Wykazanie, że syntetyczne fosforylonaftofurano-4,9-diony, hybrydy łączące ugrupowanie 1,4-naftalenodionu z grupą fosfonianową, charakteryzują się silną aktywnością cytotoksyczną w komórkowych białaczkowych (HL-60, NALM-6) oraz komórkach raka piersi MCF-7. Obie grupy estrowe są niezbędne do aktywności tych hybrydowych związków.
6. Wykazanie, że fosforylonaftofurano-4,9-diony są 2-3 razy bardziej aktywne w stosunku do komórek raka piersi MCF-7 niż w komórkach białaczkowych. Dodatkowo związki te są mniej toksyczne w stosunku do komórek prawidłowych MCF-10A niż do komórek nowotworowych MCF-7.
7. Wykazanie, że fosforylonaftofurano-4,9-diony wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej, a mechanizm ich cytotoksycznego działania związany jest wytwarzaniem ROS, indukcją stresu oksydacyjnego w komórce i zaburzeniami potencjału błonowego mitochondrium, co prowadzi do śmierci komórki nowotworowej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych nie zawartych w osiągnięciu naukowym stanowiącym podstawę habilitacji:

Pracę naukową rozpoczęłam w 2005 roku w Zespole kierowanym przez Panią Prof. Annę Janecką (Zakład Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

Tematyka mojej dotychczasowej działalności naukowej obejmuje kilka kierunków:

- **Synteza i badanie właściwości biologicznych nowych analogów peptydów opioidowych:**

W czasie studiów doktoranckich zajmowałam się projektowaniem, syntezą i badaniem aktywności biologicznej nowych analogów endomorfina i morfineptyny modyfikowanych poprzez wstawianie aminokwasów nienaturalnych oraz/lub cyklizację liniowych sekwencji.

W ramach tej tematyki nasz Zespół otrzymał kilka analogów o znacznie lepszych właściwościach farmakologicznych niż macierzyste peptydy. Związki te charakteryzowały się wysokim powinowactwem do receptora μ -opioიდowego, były odporne na działanie enzymów proteolitycznych, wykazywały silne działanie przeciwbólowe (**P1-P7**).

Brałam również udział w badaniach inhibitorów enzymów proteolitycznych, które odpowiedzialne są za degradację endomorfina oraz możliwości zastosowania tych inhibitorów w celu poprawy farmakologicznego profilu działania endomorfina (**P8-P10**).

W latach 2005-2007 odbyłam trzy (jeden miesięczny i dwa dwumiesięczne) staże naukowe na Katolickim Uniwersytecie w Leuven w Belgii (Laboratory for Developmental Physiology, Genomics and Proteomics), w czasie których uczestniczyłam w opracowaniu testu funkcjonalnego („calcium assay”) służącego do badania aktywności nowych analogów peptydów opioidowych (**P11, P12**), a także zajmowałam się ustaleniem miejsc wiążących dla endomorfina na receptorze μ -opioidowym przy zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów (**P13**).

Jeden z aspektów moich badań dotyczył wpływu peptydów opioidowych na skurcze mięśniówki jelit (**P4, P14**). Część badań z tej tematyki przeprowadziłam w czasie pobytu na stażach naukowych na Uniwersytecie w Goteborgu w Szwecji (Institute of Clinical Sciences), które odbyłam w 2009 i 2010 roku jako uczestnik programu ERASMUS dla pracowników.

Uczestniczyłam również w projekcie, którego celem było badanie powinowactwa do receptorów opioidowych oraz właściwości biologicznych nowych syntetycznych pochodnych morfiny i leworfanolu (**P15, P16**).

Poza badaniami eksperymentalnymi jestem również współautorką czterech artykułów przeglądowych dotyczących tematyki opioidowej (**P17-P20**).

• **Badanie wpływu opioidów na procesy nowotworowe:**

Interesującym faktem dotyczącym peptydów opioidowych jest zaobserwowany przez kilku autorów ich wpływ na procesy nowotworowe. Obserwacja ta ma istotne znaczenie, ponieważ chorzy na nowotwory często otrzymują opioidy (np. morfinę) do uśmierzania silnego bólu. Najnowsze doniesienia na temat roli morfiny w procesach nowotworowych zebrałam w pracy przeglądowej (**P21**).

Włączając się w badania dotyczące wpływu opioidów na komórki nowotworowe, określiłam poziom ekspresji oraz lokalizację komórkową receptorów opioidowych w kilku ludzkich nowotworowych liniach komórkowych (**P22**). Badałam również wpływ wybranych ligandów opioidowych zarówno agonistycznych, jak i antagonistycznych na poziom ekspresji genu receptora μ -opioidowego w komórkach raka piersi (**P23, P24**).

Ważnym aspektem mojej pracy były badania wpływu peptydów opioidowych na proces apoptozy (**P25**). Na realizację tego projektu uzyskałam grant: „Juventus Plus” finansowany przez MNiSW. Zajmowałam się również wpływem opioidów na procesy migracji i przerzutowania komórek nowotworowych (**P26-P28**).

Z opublikowanych z powyższej tematyki prac (**P1-P28**) do rozprawy doktorskiej wykorzystałam pięć prac, w których jestem pierwszym autorem (**P4, P23, P24, P26, P27**).

W maju 2010 roku obroniłam pracę doktorską, której celem było badanie właściwości farmakologicznych nowych syntetycznych analogów morficeptyny oraz ich wpływu na procesy zachodzące w komórkach nowotworowych. Praca ta została wyróżniona w 2011 roku Nagrodą Prezesa Rady Ministrów za rozprawę doktorską.

Badania rozpoczęte podczas pracy doktorskiej kontynuuję obecnie w ramach projektu pt.: „Badanie właściwości farmakologicznych analogów peptydów opioidowych jako nowych potencjalnych leków o działaniu przeciwbólowym i przeciwbiegunkowym” (2015-2017), finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy.

• **Molekularna charakterystyka receptora dla endopezyn:**

W latach 2011-2013 odbywałam dwuletni staż podoktorancki w Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication na Uniwersytecie w Rouen (Francja), który realizowałam w ramach projektu Mobilność Plus, finansowanego przez MNiSW. Celem tego projektu była molekularna charakterystyka receptora metabotropowego, z którym wiążą się endopezyny, neuropeptydy odgrywające ważną rolę w patogenezie (ale również terapii) chorób neurodegeneracyjnych i otyłości. Prowadziłam również badania mające na celu identyfikację macierzystych form endopezyn produkowanych przez komórki astrocytów (**P29**).

• **Badanie aktywności przeciwnowotworowej syntetycznych związków heterocyklicznych:**

W 2011 roku po obronie doktoratu, poszukując nowych kierunków działalności naukowej zainteresowałam się badaniem aktywności przeciwnowotworowej nowych syntetycznych związków heterocyklicznych otrzymywanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. W ramach tej tematyki zajmowałam się oceną cytotoksyczności nowych analogów na liniach komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231 (**P30, P31**). Badałam także ich wpływ na proces proliferacji i apoptozy (**P30, P31**) oraz przerzutowanie komórek nowotworowych (**P30, P33**).

Jestem również współautorem pracy przeglądowej podsumowującej najnowszą wiedzę na temat aktywności przeciwnowotworowej naturalnych i syntetycznych związków zawierających motyw α,β -nienasyconego ugrupowania karbonylowego (**P34**).

Prace dotyczące powyższych tematów (z wyłączeniem prac stanowiących podstawę habilitacji):

- P1.** Staniszevska R, Fichna J, **Gach K**, Toth G, Poels J, Vanden Broeck J, Janecka A. Synthesis and biological activity of endomorphin-2 analogs incorporating piperidine-2-, 3- or 4-carboxylic acids instead of proline in position 2. *Chem Biol Drug Des* 2008, 72: 91–94. (IF₂₀₀₈=2.375)
- P2.** Janecka A, Perlikowska R, **Gach K**, Fichna J, Mazur A, Kruszyński R, Janecki T, Jankowski S. Structural studies of position 2 modified endomorphin-2 analogs by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Polish J. Chem.* 2009, 83: 1293–1307. (IF=0.523)
- P3.** Perlikowska R, **Gach K**, Fichna J, Toth G, Walkowiak B, do-Rego JC, Janecka A. Biological activity of endomorphin and [Dmt1]endomorphin analogs with six-membered proline surrogates in position 2. *Bioorg Med Chem.* 2009, 17: 3789-3794. (IF₂₀₀₉=2.822)
- P4.** **Gach K**, do-Rego JC, Fichna J, Storr M, Debroy D, Toto G, Janecka, A. Synthesis and biological evaluation of novel peripherally active morphiceptin analogs. *Peptides* 2010, 31: 1617-1624. (IF₂₀₁₀=2.654)
- P5.** Fichna J, Perlikowska R, Wyrębska A, **Gach K**, Piekielna J, do-Rego JC, Toth G, Kluczyk A, Janecki T, Janecka A. Effect of 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) on pharmacological activity of cyclic endomorphin-2 and morphiceptin analogs. *Bioorg Med Chem.* 2011, 19: 6977-6981. (IF₂₀₁₁ = 2.921)
- P6.** Borics A, **Gach K**, Fichna F, Sobolewski D, Toth G, Janecka A. Structural comparison of endomorphin-2 and its conformationally restricted analog Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂. *Cent. Eur. J. Chem.* 2012, 10: 172-179. (IF₂₀₁₂ = 1.167)
- P7.** Fichna J., Socala K., Nieoczym D., **Gach K.**, Perlikowska R., Janecka A., Wlaż P. The mu-opioid receptor-selective peptide antagonists, antanal-1 and antanal-2, produce anticonvulsant effects in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013, 40: 126-31. (IF₂₀₁₃ = 4.025)
- P8.** Fichna J, Perlikowska R, **Gach K**, do-Rego JC, Cravezic A, Janecka A, Storr MA. The novel endomorphin degradation blockers Tyr-Pro-DCIPhe-Phe-NH₂ (EMDB-1) and Tyr-Pro-Ala-NH₂ (EMDB-2) prolong endomorphin-2 action in rat ileum in vitro. *Chem Biol Drug Des.* 2010, 76: 77-81. (IF₂₀₁₀ = 2.527)
- P9.** Cravezic A, Fichna J, **Gach K**, Wyrebska A, Perlikowska R, Costentin J, Bonnet JJ, Janecka A, do Rego JC. Effect of potent endomorphin degradation blockers on analgesic and antidepressant-like responses in mice *Neuropharmacology* 2011, 61: 1229-1238. (IF₂₀₁₁= 4.814)
- P10.** Perlikowska R, Fichna J, do-Rego JC, **Gach K**, Janecka A. Kinetic studies of novel inhibitors of endomorphin degrading enzyme, *Med Chem Res* 2012, 21 :1445-50. (IF₂₀₁₂ = 1.612)
- P11.** Fichna J, **Gach K**, Piestrzeniewicz M, Burgeon E, Poels J, Broeck JV, Janecka A. Functional characterization of opioid receptor ligands by aequorin luminescence-based calcium assay. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317:1150-1154. (IF₂₀₀₆ = 3.956)
- P12.** Fichna J, Piestrzeniewicz M, **Gach K**, Poels J, Burgeon E, Vanden Broeck J, Janecka A. [D-1-Nal⁴]endomorphin-2 is a potent micro-opioid receptor antagonist in the aequorin luminescence-based calcium assay. *Life Sci.* 2006, 79: 1094-1099. (IF₂₀₀₆ = 2.389)
- P13.** Fichna J, **Gach K**, Perlikowska R, Poels J, Vanden Broeck J, Szemraj J, Janecka A. Identification of endomorphin-1 and endomorphin-2 binding sites in human mu-opioid receptor by antisense oligonucleotide strategy. *Chem Biol Drug Des* 2008, 72: 507–512. (IF₂₀₀₈=2.375)

- P14.** Fichna J, **Gach K**, Perlikowska R, Cravezic A, Bonet JJ, do-Rego JC, Janecka A, Storr MA. Novel endomorphin analogues with antagonist activity at the mu-opioid receptor in the gastrointestinal tract. *Regul Pept.* 2010, 162: 109-114. (IF₂₀₁₀ = 2.473)
- P15.** Gyulai Z, Udvardy A, Cs Bényei A, Fichna J, **Gach K**, Storr M, Tóth G, Antus S, Berényi S, Janecka A, Sipos A. Synthesis and opioid activity of novel 6-ketolevorphanol derivatives. *Med Chem.* 2013, 9: 1-10. (IF₂₀₁₃ = 1.387)
- P16.** Czakó B, Marton J, Berényi S, **Gach K**, Fichna J, Storr M, Tóth G, Sipos A, Janecka A. Synthesis and opioid activity of novel 6-substituted-6-demethoxy-ethenomorphinans. *Bioorg Med Chem.* 2010, 18: 3535-3542. (IF₂₀₁₀ = 2.978)
- P17.** Janecka A, Perlikowska R, **Gach K**, Wyrebska A, Fichna J. Development of opioid peptide analogs for pain relief. *Curr Pharm Des.* 2010, 16: 1126-1135. (IF₂₀₁₀ = 4.774)
- P18.** Janecka A, Staniszewska R, **Gach K**, Fichna J. Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides.* 2008, 29: 2066-2073. (IF₂₀₀₈ = 2.565)
- P19.** Piekielna J, Perlikowska R, **Gach K**, Janecka A. Cyclization in opioid peptides. *Curr Drug Targets.* 2013, 14: 798-816. (IF₂₀₁₃ = 3.597)
- P20.** Pomorska DK, **Gach K**, Janecka A. Immunomodulatory Effects of Endogenous and Synthetic Peptides Activating Opioid Receptors. *Mini Rev Med Chem.* 2014, 14: 1148-1155. (IF₂₀₁₄ = 2.903)
- P21.** **Gach K**, Wyrębska A, Fichna J, Janecka A. The role of morphine in regulation of cancer cell growth, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2011, 384: 221-230. (IF₂₀₁₁=2.647)
- P22.** **Gach K**, Szemraj J, Stasikowska-Kanicka O, Danilewicz M, Janecka A. Opioid-receptor gene expression and localization in cancer cells. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011, 6: 10-15. (IF₂₀₁₁ = 1.000)
- P23.** **Gach K**, Piestrzeniewicz M, Fichna J, Stefanska B, Szemraj J, Janecka A. Opioid-induced regulation of micro-opioid receptor gene expression in the MCF-7 breast cancer cell line. *Biochem Cell Biol* 2008, 86: 217-226. (IF₂₀₀₈ = 2.473)
- P24.** **Gach K**, Piestrzeniewicz M, Fichna J, Szemraj J, Janecka A. Opioid antagonist-induced regulation of the μ -opioid receptor expression in MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Regul.* 2009, 43: 23-28.
- P25.** **Gach K**, Wyrębska A, Szemraj J, Janecka A. Opioid-regulated pro- and anti-apoptotic gene expression in cancer cells. *Cent. Eur. J. Biol.* 2012, 7: 411-418. (IF₂₀₁₂=0.818)
- P26.** **Gach K**, Szemraj J, Fichna J, Piestrzeniewicz M, Debrow D, Janecka A. The influence of opioids on urokinase plasminogen activator on protein and mRNA level in MCF-7 breast cancer cell line. *Chem Biol Drug Des.* 2009, 74: 390-396. (IF₂₀₀₉=2.473)
- P27.** **Gach K**, Szemraj J, Wyrębska A, Janecka, A. The influence of opioids on matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion and mRNA levels in MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2011, 38: 1231-6. (IF₂₀₁₁=2.929)
- P28.** **Gach K**, Wyrebska A, Szemraj J, Janecka A. The influence of opioid peptides on matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator expression in three cancer cell lines. *Mol Biol (Mosk).* 2012, 46: 894-899. (IF₂₀₁₂ = 0.637)
- P29.** **Gach K**, Belkacemi O, Lefranc B, Perlikowski P, Masson J, Walet-Balieu ML, Do-Rego JC, Galas L, Schapman D, Lamtahri R, Tonon MC, Vaudry D, Chuquet J, Leprince J. Detection, characterization and biological activities of [bisphospho-thr3,9]ODN, an endogenous molecular form of ODN released by astrocytes. *Neuroscience.* 2015, 290: 472-484. (IF₂₀₁₅ = 3.231)
- P30.** 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 Clin Pharmacol Toxicol.* 2013, 113: 391-400. (IF₂₀₁₃ = 2.294)

- P31.** Modranka J, Jakubowski R, Różalski M, Krajewska U, Janecka A, **Gach K**, Pomorska D, Janecki T. Design, synthesis and cytotoxic evaluation of 4-methylidenepyrazolidin-3-ones. *Eur J Med Chem.* 2015, 14; 92C: 565-574. (IF₂₀₁₅ = 3.902)
- P32.** Wyrębska A, Szymański J, **Gach K**, Piekielna J, Koszuc J, Janecki T, Janecka A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Mol Biol Rep.* 2013, 40: 1655-1663. (IF₂₀₁₃ = 1.958)
- P33.** Wyrębska A, **Gach K**, Szemraj J, Szewczyk K, Hrabec E, Koszuc J, Janecki T, Janecka A. Comparison of anti-invasive activity of parthenolide and 3-isopropyl-2-methyl-4-methyleneisoxazolidin-5-one (MZ-6)-a new compound with α -methylene- γ -lactone motif--on two breast cancer cell lines. *Chem Biol Drug Des.* 2012, 79: 112-120. (IF₂₀₁₂ = 2.469)
- P34.** Janecka A, Wyrębska A, **Gach K**, Fichna J, Janecki T. Natural and synthetic α -methylene lactones and α -methylene lactams with anticancer potential. *Drug Discov Today.* 2012, 17: 561-572. (IF₂₀₁₂= 6.551)

6. Działalność dydaktyczna:

Zajęcia ze studentami prowadzę od 2006 roku, kiedy zostałam przyjęta na Stacjonarne Studium Doktoranckie. Od 13 listopada 2008 roku, od momentu zatrudnienia w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pracuję jako nauczyciel akademicki (najpierw jako asystent, a od 1 sierpnia 2010 roku jako adiunkt). Moja działalność dydaktyczna obejmuje prowadzenie zajęć z chemii i biochemii dla studentów kilku wydziałów i kierunków studiów.

Prowadzone zajęcia:

2006-2010:

- Chemia ogólna - dla studentów I roku Stomatologii Wydziału Lekarsko-Dentystycznego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- Chemia organiczna z elementami biochemii statycznej – dla studentów I roku Biotechnologii Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- Chemia ogólna – dla studentów Ratownictwa Medycznego Wydziału Nauk o Zdrowiu: ćwiczenia laboratoryjne

2011:

- Chemia ogólna - dla studentów I roku Stomatologii Wydziału Lekarsko-Dentystycznego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- Biochemia - dla studentów II roku Medycyny Wydziału Lekarskiego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne

Od października 2011 roku do września 2013 roku przebywałam na stażu podoktoranckim, w czasie którego nie prowadziłam zajęć ze studentami.

2013-nadal:

- Chemia organiczna z elementami biochemii statycznej – dla studentów I roku Biotechnologii Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- Biochemia - dla studentów II roku Stomatologii Wydziału Lekarsko-Dentystycznego: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne, wybrane wykłady

Zajęcia w języku angielskim:

- Wprowadzenie do chemii medycznej – dla studentów I roku kierunku 6-letniego Lekarskiego Oddziału Studiów w Języku Angielskim: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne
- Przełomowe odkrycia w historii rozwoju leków (Fakultet) - dla studentów II roku kierunku 6-letniego Lekarskiego Oddziału Studiów w Języku Angielskim: seminaria i ćwiczenia laboratoryjne

W latach 2014-2016 byłam koordynatorem systemu Uczelnia.XP (UXP) w Zakładzie Chemii Biomolekularnej.

7. Podsumowanie dorobku naukowego:

Mój dorobek naukowy obejmuje **43** publikacje pełnotekstowe, w tym **34** prace oryginalne i **9** artykułów poglądowych. W **18** z tych **43** publikacji jestem pierwszym autorem.

- Sumaryczny Impact Factor: **111.887**, w tym jako pierwszy autor **41.343**.
- Ilość cytowań wg ISI Web of Science Core Collection (bez autocytowań): **401 (353)**, indeks Hirscha: **13**.
- Ilość cytowań wg Scopus: **450**, indeks Hirscha: **14**.

8. Piśmiennictwo:

1. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005, 100: 72-79.
2. Kitson R., Millemaggi A., Taylor R. The renaissance of α -methylene- γ -butyrolactones; new synthetic approach. *Angew. Chem. Int Ed Engl.* 2009, 48: 9426-51.
3. Janecka A, Wyrębska A, Gach K, Fichna J, Janecki T. Natural and synthetic α -methylenelactones and α -methylenelactams with anticancer potential. *Drug Discov Today.* 2012, 17: 561-72.
4. Zhang S, Won YK, Ong CN, Shen HM. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005, 5: 239-49.
5. Kevin P. New agents for the treatment of leukemia: discovery of DMAPT (LC-1). *Drug Disc Today*, 2010,15: 322.
6. Lee KH, Hall IH, Mar EC, Starnes CO, ElGebaly SA, Waddell TG, HADGRAFT RI, Ruffner CG, Weidner I. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. *Science.* 1977, 196: 533-6.
7. Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl HL, Merfort I, Schmidt TJ., Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 1999, 7: 2343-52.
8. Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W. Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60: 4426-32.
9. Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C, Suarez M, Fabregat X, Campo E, Gascon P, Serrano S, Fernandez PL, Rovira A, Albanell J. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer.* 2006, 13: 607-16.
10. Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.* 1997, 402: 85-90.
11. Wyrębska A, Gach K, Janecka A. Combined effect of parthenolide and various anti-cancer drugs or anticancer candidate substances on malignant cells in vitro and in vivo. *Mini Rev Med Chem.* 2014, 14: 222-28.
12. Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell S.H., Goulet R.J. Jr, Sledge G.W. Jr, Nakshatri H., Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene.* 2000, 19: 4159-69.
13. Sun Y, St Clair DK, Fang F, Warren GW, Rangnekar VM, Crooks PA, St Clair WH. The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-kappaB inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol Cancer Ther.* 2007, 6: 2477-86.
14. Grech-Baran M, Pietrosiuk A. Arglabina –laktos seskwiterpenowy o właściwościach przeciwnowotworowych. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2010, 3: 22-26.
15. de Paiva SR, Figueiredo MR, Aragão TV, Kaplan MA. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003, 98: 959-61.
16. Bonifazi EL, Ríos-Luci C, León LG, Burton G, Padrón JM, Misico RI, Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. *Bioorg Med Chem.* 2010, 18: 2621-30.
17. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999, 57: 727-41.

18. da Cruz EH, Hussene CM, Dias GG, Diogo EB, de Melo IM, Rodrigues BL, da Silva MG, Valença WO, Camara CA, de Oliveira RN, de Paiva YG, Goulart MO, Cavalcanti BC, Pessoa C, da Silva Júnior EN. 1,2,3-triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. *Bioorg Med Chem.* 2014, 22: 1608-19.
19. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2000, 13: 135-60.
20. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 2006, 10: 175-6.
21. 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 Clin Pharmacol Toxicol.* 2013, 113: 391-400.
22. Wyrębska A, Gach K, Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Modranka J, Jakubowski T, Janecki T, Wasek M, R_ozalski U, Krajewska K, Studzian A, Janecka A. 4-Methylideneisoxazolidin-5-one a new class of alpha-methylidene-gammalactones with high cytostatic activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006,16: 1430-33.
23. Wyrębska A, Szymański J, Gach K, Piekielna J, Koszuc J, Janecki T, Janecka A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Mol Biol Rep.* 2013, 40: 1655-63.
24. Bauer JD, King RW, Brady SF. Utahmycins a and B, azaquinones produced by an environmental DNA clone. *J Nat Prod.* 2010, 73: 976-9.
25. Park HJ, Lee HJ, Lee EJ, Hwang HJ, Shin SH, Suh ME, Kim C, Kim HJ, Seo EK, Lee SK.. Cytotoxicity and DNA topoisomerase inhibitory activity of benz[*f*]indole-4,9-dione analogs. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003, 67: 1944-9.
26. Kafarski P, Lejczak B. Biological activity of aminophosphonic acids. *Phosphorus Sulfur* 1991, 63: 193-215.
27. Engel R. The use of carbon-phosphorus analogue compounds in the regulation of biological processes, in: R. Engel, Ed.; M. Dekker, *Handbook of organophosphorus chemistry*, New York, 1992, pp 559-600.
28. Van der Jeught S, Stevens CV. Direct Phosphonylation of Aromatic Azaheterocycles, *Chem. Rev.* 2009, 109: 2672-2702.
29. Quin LD, *Organophosphorus compounds in medicine.* in: John Wiley & Sons, *A guide to organophosphorus chemistry*, New York, 2000, pp 362-367.

Katarzyna Gach-Janczak