



Narodowy Instytut Leków

**Badanie roli sulforafanu w chemoprewencji i terapii
skojarzonej trójnegatywnego raka piersi – potencjał niskich
dawek i liposomowych nośników leków**

mgr Anna Pogorzelska

Rozprawa doktorska oparta na jednotematycznym cyklu publikacji naukowych

Praca wykonana pod kierunkiem:

Promotor: **Dr hab. Katarzyny Wiktorskiej**

Promotor pomocniczej: **Dr Małgorzaty Milczarek**

Warszawa, 2025

*Przede wszystkim chciałabym podziękować **dr hab. Katarzynie Wiktorskiej** za nieocenione wsparcie, cenne wskazówki merytoryczne oraz zaangażowanie w przygotowanie niniejszej pracy. Szczególnie dziękuję za wiarę w moje umiejętności.*

*Dziękuję również **dr Małgorzacie Milczarek** za praktyczne wskazówki oraz pomoc w rozwiązywaniu problemów, które pojawiały się w trakcie realizacji badań oraz motywację, która była dla mnie niezwykle ważna na każdym etapie pracy.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim współautorom publikacji, którzy przyczynili się do realizacji badań i publikacji wyników związanych z moją rozprawą doktorską, a w szczególności **prof. Maciejowi Mazurowi, mgr Dominice Kuran, dr Marcie Świtalskiej** oraz **prof. Joannie Wietrzyk**.*

*Z całego serca dziękuję również **mojej rodzinie** oraz **przyjaciołom** za wiarę w moje możliwości i nieustające wsparcie.*



Badania prezentowane w pracy doktorskiej częściowo zrealizowano w ramach projektu PRELUDIUM 20 (nr projektu: 2021/41/N/NZ7/02530) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Spis treści

1. Wykaz użytych skrótów	5
2. Streszczenie.....	7
3. Abstract	8
4. Wprowadzenie	9
4.1. Charakterystyka, epidemiologia i etiologia trójnegatywnego raka piersi	9
4.2. Prewencja i leczenie trójnegatywnego raka piersi.....	9
4.2.1. Prewencja trójnegatywnego raka piersi	9
4.2.2. Leczenie trójnegatywnego raka piersi.....	10
4.2.3. Terapia skojarzona a trójnegatywny rak piersi	11
4.2.4. Doksorubicyna w leczeniu trójnegatywnego raka piersi.....	11
4.2.5. Zastosowanie i perspektywy nośników leków w terapii trójnegatywnego raka piersi.....	12
4.3. Perspektywy zastosowania sulforafanu	14
5. Cel rozprawy doktorskiej.....	16
6. Wyniki badań	17
Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?. <i>Nutrients</i> , 12(6), 1559.	17
Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. <i>Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie</i> , 161, 114490.	20
Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. <i>Scientific reports</i> , 14(1), 16016.	25
7. Wnioski	29
8. Szczegółowy opis udziału w tworzeniu publikacji wchodzących w skład rozprawy.....	30
9. Wykaz rycin i tabel	31
10. Literatura	31
11. Osiągnięcia	36
11.1. Publikacje wchodzące w skład rozprawy	36
11.2. Publikacje poza cyklem będące efektem udziału w projektach badawczych.....	36
11.4. Udział w projektach badawczych.....	37
11.5. Współautorstwo zgłoszeń patentowych.....	37
11.6. Udział w konferencjach krajowych	37
11.7. Udział w konferencjach międzynarodowych	38
11.8. Pozostałe osiągnięcia.....	39
12. Załączniki	39

1. Wykaz użytych skrótów

- ARE** (ang. *anti-oxidant response elements*) – regiony odpowiedzi przeciwoksydacyjnej
- BCL** (ang. *baicalein*) – baicaleina
- BL** (ang. *basal-like*) – podtyp podstawny
- CI** (ang. *combination index*) – indeks kombinacji
- CSCs** (ang. *cancer stem cells*) – komórki macierzyste nowotworowe
- CUR** (ang. *curcumin*) – kurkumina
- DLS** (ang. *dynamic light scattering*) – dynamiczne rozpraszanie światła
- DMPC** (ang. *dimyristoylphosphatidylcholine*) – dimirytoilofosfatydylocholina
- DOX** (ang. *doxorubicin*) – doksorubicyna
- DRI** (ang. *dose reduction index*) – indeks redukcji dawki
- EMT** (ang. *epithelial–mesenchymal transition*) – transformacja nabłonkowo-mezenchymalna
- EPR** (ang. *enhanced permeability and retention*) – mechanizm zwiększonej przepuszczalności i retencji
- ER** (ang. *estrogen receptor*) – receptor estrogenowy
- Fa** (ang. *fraction affected*) – frakcja poddana oddziaływaniu
- FDA** (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków
- HA** (ang. *hyaluronic acid*) – kwas hialuronowy
- HDAC** (ang. *histone deacetylases*) – Deacetylazy histonowe
- HER2** (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*) – receptor 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
- ICI** (ang. *immune cell infiltration*) – infiltracja komórek układu odpornościowego
- IM** (ang. *immunomodulatory*) – podtyp immunomodulacyjny
- ITC** (ang. *isothiocyanate*) – izotiocyjaniiny
- LAR** (ang. *luminal androgen receptor*) – podtyp luminalny z ekspresją receptora androgenowego
- M** (ang. *mesenchymal*) – podtyp mezenchymalny
- MSL** (ang. *mesenchymal stem-like*) – podtyp mezenchymalny macierzysty
- MTX** (ang. *methotrexate*) – metotreksat
- NLCs** (ang. *nanostuctured lipid carriers*) – nanostrukturalne nośniki lipidowe
- NPs** (ang. *nanoparticles*) – nanocząstki
- Nrf2** (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) – jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
- PARP** (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*) – polimeraza poli (ADP-rybozy)
- PR** (ang. *progesterone receptor*) – receptor progesteronowy
- ROS** (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

SAA (ang. *salvianolic acid A*) – kwas salwianolowy A

SFN (ang. *sulforaphane*) – sulforafan

TEM (ang. *transmission electron microscopy*) – transmisyjna mikroskopia elektronowa

TGI (ang. *tumor growth inhibition*) – zahamowanie wzrostu guza

TME (ang. *tumor microenvironment*) – mikrośrodowisko guza

TNBC (ang. *triple-negative breast cancer*) – trójnegatywny rak piersi

UNS (ang. *unstable*) – podtyp zmienny

2. Streszczenie

Rak piersi to najczęściej diagnozowana choroba onkologiczna na świecie i jedna z głównych przyczyn śmiertelności związanej z rakiem u kobiet. Odpowiada za około 12,5% nowych diagnoz raka, z ponad 2,3 miliona przypadków wykrywanych każdego roku. Pomimo poprawy metod diagnostycznych i strategii leczenia, rak piersi jest nadal odpowiedzialny za ponad pół miliona zgonów. Spośród wielu jego podtypów, potrójnie ujemny rak piersi (TNBC) jest jednym z bardziej agresywnych podtypów, stanowiącym 15-20% wszystkich diagnoz raka piersi. TNBC jest definiowany przez niedobór receptorów estrogenowych, progesteronowych i receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu, co czyni go opornym na leczenie hormonalne lub leki ukierunkowane na dany receptor. W związku z tym w leczeniu TNBC stosuje się głównie chemioterapię; chociaż początkowo leczenie jest skuteczne, często komórki nowotworowe nabywają oporność, co powoduje nawrót guza i ciężkie toksyczności ogólnoustrojowe. Pięcioletni wskaźnik przeżycia u pacjentek z TNBC z przerzutami jest szokująco niski i wynosi około 12%, co wskazuje na potrzebę lepszych metod leczenia.

Sulforafan (SFN), naturalny izotiocyjanian występujący w warzywach kapustnych, jest intensywnie badany pod kątem jego działania chemoprewencyjnego i przeciwnowotworowego. Wykazano iż działanie SFN może opierać się na drodze indukcji apoptozy, hamowania progresji cyklu komórkowego, modulowania stresu oksydacyjnego czy tłumienia komórek macierzystych raka. Pomimo tego, że wysokie dawki SFN mają wiele efektów przeciwnowotworowych, skuteczność niskich dawek, w szczególności w leczeniu TNBC, nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Ponadto, potencjał SFN do zwiększania skuteczności chemioterapii i łagodzenia skutków ubocznych w połączeniu z konwencjonalnymi lekami cytotoksycznymi nie został jeszcze szczegółowo zbadany.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena roli niskich dawek SFN w chemoprewencji i terapii TNBC. Badania przeprowadzono w trzech etapach. W pierwszym etapie przeprowadzono kompleksowy przegląd literatury w celu oceny potencjału profilaktycznego SFN i jego analogów w raku piersi. W kolejnym etapie, opracowano i scharakteryzowano innowacyjny liposomalny system dostarczania leków zawierający SFN i doksorubicynę (DOX). Działanie tego preparatu testowano w modelach TNBC, koncentrując się na skuteczności leczenia, hamowaniu wzrostu guza i redukcji toksyczności ogólnoustrojowej. W trzeciej fazie pracy zbadano wpływ niskich dawek SFN na progresję TNBC i przerzuty przy użyciu modeli TNBC. Badania przeprowadzono na modelach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano potencjał SFN jako nowego adjuwantu w terapii TNBC. Wyniki wykazały, że SFN, podawany razem z DOX w postaci liposomalnej, wzmocnił działanie cytotoksyczne leku na komórki TNBC, jednocześnie zmniejszając toksyczność wobec prawidłowych komórek nabłonka piersi. Badania *in vivo* potwierdziły, że liposomalny preparat skutecznie docierał do tkanek nowotworowych, prowadząc do znacznego zahamowania wzrostu guza. Analiza działania niskiej dawki SFN na TNBC wykazała skuteczność SFN w zmniejszeniu objętości guza, obniżeniu aktywności mitotycznej komórek, modulacji komórek układu odpornościowego oraz działanie antymetastatyczne w modelu *in vivo* TNBC.

Uzyskane wyniki badań rzucają nowe światło na mechanizm działania SFN, szczególnie jako potencjalnego adjuwantu w terapii TNBC. Otwiera to możliwości opracowania nowych strategii leczenia, zwłaszcza w kontekście terapii skojarzonych z DOX.

3. Abstract

Breast cancer is the most prevalent malignancy to be identified across the world and is one of the primary cancer-associated mortality causes in females. It is responsible for around 12.5% of new cancer diagnoses, with more than 2.3 million cases found each year. In spite of improvements in detection methods and treatment strategies, breast cancer is still responsible for more than half a million deaths every year. Of its many subtypes, triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the more aggressive subtypes, making up between 15-20% of total breast cancer diagnoses. TNBC is defined by a deficiency in estrogen receptors, progesterone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2, making it resistant to hormone-based treatment or HER2-targeted drugs. As such, chemotherapy is mainly used to treat TNBC; though initially effective, treatment using this often results in resistance, tumor reappearance, and heavy systemic toxicities. The five-year survival rate in metastatic TNBC patients is very low at approximately 12%, indicating a need for better treatment methods.

Sulforaphane (SFN), a natural isothiocyanate found in cruciferous vegetables, has been studied for its chemopreventive and anticancer effects. SFN is active in various ways, such as inducing apoptosis, inhibiting cell cycle progression and modulating oxidative stress. In spite of high doses of SFN having a great deal of anticancer effects, the efficacy of low doses, in particular in treatment of TNBC, is yet to be clarified in detail. Also, the potential of SFN to synergize chemotherapy efficacy and mitigate side effects when used in combination with conventional cytotoxic drugs is yet to be explored.

The aim of this doctoral dissertation was to evaluate the role of low-dose SFN in TNBC chemoprevention and therapy. The research was conducted in three phases. First, a comprehensive review of the literature was performed to assess the preventive potential of SFN and its analogs in breast cancer. Second, an innovative liposomal drug delivery system encapsulating SFN and doxorubicin (DOX) was developed and characterized. The effects of this formulation were tested in TNBC models focusing on treatment efficacy, tumor growth inhibition, and toxicity reduction. The third phase of the study examined the impact of low-dose SFN on TNBC progression and metastasis. The research was conducted on both *in vitro* and *in vivo* models.

This dissertation highlights the potential of SFN as a novel adjuvant in TNBC therapy. The results demonstrated that SFN, when co-administered with DOX in a liposomal formulation, enhanced the cytotoxic effects of drug on TNBC cells, while simultaneously reducing toxicity to normal breast epithelial cells. *In vivo* studies confirmed that the liposomal formulation effectively targeted tumor tissues, leading to significant tumor growth inhibition. Analysis of low-dose of SFN effects on TNBC demonstrated SFN's efficacy in reducing tumor volume, decreasing cell mitotic activity, modulating immune cells and tumor microenvironment, and antimetastatic effects in an *in vivo* model of TNBC.

The obtained research results provide new insights into the mechanism of action of SFN, particularly as a potential adjuvant in TNBC therapy. This opens up opportunities for developing new treatment strategies, especially in the context of combination therapies with DOX.

4. Wprowadzenie

4.1. Charakterystyka, epidemiologia i etiologia trójnegatywnego raka piersi

Rak piersi stanowi 12,5% wszystkich nowych przypadków nowotworów na świecie, co czyni go najczęściej diagnozowaną chorobą onkologiczną. Chociaż rak piersi charakteryzuje się stosunkowo niską śmiertelnością w porównaniu do jego częstości występowania, wciąż pozostaje główną przyczyną zgonów spośród wszystkich nowotworów u kobiet [1].

Rak piersi to złożona choroba, charakteryzująca się zróżnicowaniem molekularnym, patologicznym i epidemiologicznym. Najbardziej wyniszczającą postacią, cechującą się wysokim wskaźnikiem zachorowalności i śmiertelności, jest potrójnie ujemny rak piersi (TNBC, ang. *triple negative breast cancer*). U pacjentów z TNBC guzy rozwijają się szybciej i cechują się większą agresywnością. TNBC definiuje się przez brak ekspresji receptora estrogenowego (ER, ang. *estrogen receptor*), receptora progesteronowego (PR, ang. *progesterone receptor*) oraz brak nadekspresji receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2, ang. *human epidermal growth factor receptor 2*) [1]. Na podstawie profilowania molekularnego wyróżniono sześć podtypów molekularnych TNBC, w tym podtypy podstawne (BL1 i BL2, ang. *basal like*), mezenchymalne (M, ang. *mesenchymal*), mezenchymalne macierzyste (MSL, ang. *mesenchymal stem-like*), immunomodulacyjne (IM, ang. *immunomodulatory*), luminalne z ekspresją receptora androgenowego (LAR, ang. *luminal androgen receptor*) oraz podtyp zmienny (UNS, ang. *unstable*). Statystyki pokazują, że TNBC stanowi około 15-20% wszystkich przypadków raka piersi, podczas gdy ponad 70% przypadków raka piersi jest ER-pozytywnych, a PR-pozytywne stanowią około 50%. W porównaniu z nowotworami hormonozależnymi, TNBC wiąże się z gorszym rokowaniem, wyższymi wskaźnikami nawrotów i wyższą śmiertelnością. W przypadku zaawansowanego TNBC (stadium 4 lub nieoperacyjne stadium 3) średnie całkowite przeżycie wynosi jedynie 12-18 miesięcy. TNBC częściej diagnozuje się u młodszych pacjentów, a guzy te są zazwyczaj inwazyjnymi rakami przewodowymi o wysokim stopniu złośliwości [1].

Badania pokazują, że kobiety pochodzenia afroamerykańskiego i hiszpańskiego są szczególnie narażone na ryzyko wystąpienia TNBC, przy czym prognozy dla kobiet afroamerykańskich są gorsze niż dla innych grup etnicznych. W badaniu z 2009 roku przeanalizowano przypadki 187 pacjentek z TNBC i wykazano, że kobiety stosujące doustne środki antykoncepcyjne przez ponad rok miały o 2,5% wyższe ryzyko zachorowania na TNBC. W grupie kobiet poniżej 40. roku życia ryzyko to wzrastało do 4,2% [2].

Badania wskazują, że również czynniki dietetyczne i tryb życia odgrywają istotną rolę w etiologii raka piersi [3]. Do czynników zwiększających ryzyko zachorowania zalicza się przede wszystkim brak aktywności fizycznej, wysoki wskaźnik masy ciała, zwłaszcza w okresie pomenopauzalnym, oraz dietę ubogą w tłuszcze nienasycone, warzywa i owoce. Badania epidemiologiczne, jak również dodatkowe dowody z badań nad związkami modulującymi receptory estrogenowe i progesteronowe, wykazały, że długość ekspozycji na hormony endogenne - związana z wczesną menarche lub późną menopauzą - stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju raka piersi [3].

4.2. Prewencja i leczenie trójnegatywnego raka piersi

4.2.1. Prewencja trójnegatywnego raka piersi

Obiecujące podejście do profilaktyki raka koncentruje się na zdrowym stylu życia, który obejmuje dietę bogatą w związki o charakterze przeciwzapalnym i redukcję stresu. Badania epidemiologiczne wykazały, iż kompleksowa dieta bogata w owoce i warzywa może zmniejszyć ryzyko zachorowania na raka piersi nawet o 30% [4, 5]. W związku z tym związki naturalne są szczególnie interesujące

w zapobieganiu chorobom i ewentualnie wspomaganie leczenia [6, 7]. Związki te wyróżniają się podwójnymi właściwościami: działają jako środki zapobiegające rozwojowi raka oraz jako związki przeciwnowotworowe, które można stosować w leczeniu nowotworów złośliwych. Od 1981 do 2010 roku około 50% leków przeciwnowotworowych zatwierdzonych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) stanowiły związki pochodzenia naturalnego, a setki kolejnych są badane w próbach klinicznych lub wykorzystywane w zastosowaniach klinicznych [8].

Uważa się, że warzywa z rodziny *Brassicaceae* są bogatym źródłem substancji chemoprewencyjnych. Obejmują one 350 gatunków roślin, takich jak kapusta, brokuły, kalafior i brukselka [9]. Wykazano, że związki fitochemiczne i ich prekursory zawarte w tych warzywach zmniejszają ryzyko rozwoju nowotworów, w tym raka piersi [10, 11]. Właściwości przeciwnowotworowe tych roślin wynikają z zawartych w nich glukozynolanów, które dzięki aktywności enzymu mirozynazy ulegają enzymatycznej degradacji do izotiocyanianów (ITC, ang. *isothiocyanate*). Najczęściej badanym ITC jest sulforafan (SFN, ang. *sulforaphane*) [9].

SFN w niskich stężeniach jest opisywany jako związek wykazujący zdolność do chemoprewencji w raku piersi (0,5-10 μ M). Mechanizm działania SFN jest wielokierunkowy i obejmuje zwiększenie poziomu enzymów detoksykacyjnych, zmniejszenie aktywności enzymatycznej cytochromu P450, zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych poprzez hamowanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy a także eliminację nowotworowych komórek macierzystych [12]. SFN jest również jednym z najbardziej znanych agonistów szlaku sygnalizacyjnego Nrf2-ARE (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 - anti-oxidant response elements*), regulatorem enzymów detoksykacyjnych fazy II i środkiem przeciwzapalnym [13].

4.2.2. Leczenie trójnegatywnego raka piersi

Istnieje kilka wyzwań związanych z leczeniem TNBC, w tym heterogeniczność guza, działania niepożądane chemioterapii i możliwość przerzutów. TNBC jest niezwykle trudny do leczenia ze względu na brak receptorów ER, PR i HER2. Jednak cechy biologiczne i patologiczne TNBC wskazują na kilka potencjalnych celów molekularnych dla obecnych i przyszłych terapii [14]. Chemioterapia antracyklinami/taksanami jest standardem leczenia w ogólnoustrojowej terapii neoadjuwantowej i adjuwantowej we wszystkich nowo wykrytych przypadkach. Celem terapii neoadjuwantowej jest zmniejszenie objętości guza przed leczeniem głównym, podczas gdy terapia adjuwantowa jest stosowana po leczeniu głównym. W zależności od rozpoznania i stadium niektóre przypadki kwalifikują się do usunięcia operacyjnego wraz z kontrolą węzłów chłonnych i dalszego leczenia, aby zapobiec nawrotom.

Chemioterapia jest główną opcją leczenia systemowego. Powszechnie stosowane leki chemioterapeutyczne obejmują antracykliny, taksany, kapecytabinę, gemcytabinę, eribulinę i wiele innych. Leki chemioterapeutyczne mogą być stosowane samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami. Terapia skojarzona obejmuje stosowanie więcej niż jednego leku o różnych mechanizmach działania. Chociaż TNBC początkowo dobrze reaguje na chemioterapię, ma również tendencję do nawrotów częściej niż inne nowotwory piersi. Dodatkowo radioterapia wykorzystywana jest jako terapia adjuwantowa. Niemniej jednak, istniejące podejścia terapeutyczne dla TNBC pozostają ograniczone. Zatwierdzone terapie celowane dotyczą pacjentów o ściśle określonym profilu molekularnym i dostępne są jedynie dla około 35% pacjentów, co jest dalekie od zaspokojenia zapotrzebowania na leczenie TNBC [14]. W szczególnych przypadkach dla TNBC dostępne są terapie celowane. Wykorzystanie inhibitorów PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*) takich jak

Olaparyb lub Talazoparyb stosują się przy obecności mutacji BRCA [14, 15]. Obecność białka PD-L1 wskazuje na zastosowanie immunoterapii (Pembrolizumab) w połączeniu z chemioterapią [14, 15]. Dostępne są również koniugaty przeciwciało-lek Sakituzumab Govitecan lub intensywnie rozwijana terapia oparta na nanotechnologii [15, 16]. Dlatego zwiększenie skuteczności leczenia pacjentów z TNBC stanowi pilny problem i ogromne wyzwanie.

4.2.3. Terapia skojarzona a trójnegatywny rak piersi

W ciągu ostatnich kilku dekad zaobserwowano wzrost popularności terapii skojarzonych opracowywanych w celu przewyciężenia wyzwań związanych z podawaniem tradycyjnych chemioterapeutyków w monoterapii. Terapia skojarzona odnosi się do jednoczesnego podawania dwóch lub więcej środków cytotoksycznych lub połączenia chemioterapii, immunoterapii, radioterapii i hormonoterapii. Podejście polegające na jednoczesnym podawaniu dwóch lub wielu środków cytotoksycznych jest uważane za najbardziej powszechną i skuteczną metodę leczenia klinicznego względu na raka piersi [17].

Łączenie leków przeciwnowotworowych zwiększa skuteczność w porównaniu z monoterapią, ponieważ celuje w kluczowe szlaki w sposób synergistyczny lub addytywny. Takie podejście pozwala na ograniczenie nabywania oporności na leki i zwiększenie efektywności terapii przeciwnowotworowych poprzez redukcję wzrostu guza, ograniczenie przerzutów, zatrzymanie podziałów komórkowych, zmniejszenie populacji komórek macierzystych raka oraz indukcję apoptozy. Wskaźniki 5-letniego przeżycia dla większości nowotworów z przerzutami są nadal niskie, a opracowywanie nowych leków jest kosztowne i czasochłonne. Dlatego poszukuje się nowych strategii ukierunkowanych na szlaki sygnałacyjne związane z przeżyciem, które są efektywne i przystępne cenowo. Jednym z takich podejść jest wykorzystanie leków pierwotnie stosowanych w innych chorobach, które są skuteczne w terapii nowotworowej. Gdy jeden z leków w terapii skojarzonej jest już zatwierdzony przez FDA, koszty badań są niższe. Połączenie takich leków z innymi środkami terapeutycznymi daje obiecujące wyniki [18]. Chemioterapia skojarzona jest również uważana za najbardziej powszechne podejście w leczeniu zaawansowanego raka piersi [17]. Na przykład, lek Myocet[®] w skojarzeniu z cyklofosfamidem jest wskazany jako terapia pierwszego rzutu w leczeniu raka sutka w stadium przerzutów. W badaniach klinicznych wykazano, że zastosowanie samej liposomalnej doksorubicyny (Myocet[®]) wiąże się ze zmniejszeniem kardiotoxyczności, ale bez różnic pod względem aktywności terapeutycznej w leczeniu choroby rozianej. W niektórych przypadkach klinicznych wykazano celowość i bezpieczeństwo włączenia Myocet[®] z cyklofosfamidem mimo uprzedniego leczenia antracyklinami i stanowi opcję terapeutyczną w pierwszym rzucie leczenia przerzutowego raka piersi [19].

4.2.4. Doksorubicyna w leczeniu trójnegatywnego raka piersi

Doksorubicyna (DOX, ang. *doxorubicin*) należy do leków przeciwnowotworowych z grupy antracyklin i jest jednym z najskuteczniejszych środków z tej rodziny. Została odkryta w 1969 roku jako metabolit *Streptomyces peucetius*. DOX w monoterapii lub w połączeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi jest często stosowana w leczeniu różnych rodzajów raka, w tym piersi, płuc, jajnika i pęcherza moczowego. Pomimo licznych badań jej dokładny mechanizm działania nie został w pełni poznany i podlega nadal analizom. Wiadomo, że DOX wywiera działanie na komórki poprzez interkalację do DNA i późniejsze hamowanie naprawy DNA za pośrednictwem topoizomerazy II. Co więcej, dodatkowo generowane uszkodzenia wywoływane przez reaktywne formy tlenu (ang. ROS, *reactive oxygen species*) są kluczowym składnikiem aktywności przeciwnowotworowej antracyklin a zarazem główną przyczyną działań niepożądanych limitujących terapię [20].

Pomimo swojej skuteczności, stosowanie DOX jest ograniczone ze względu na jej działania niepożądane, takie jak kardiotoxycywność i mielosupresja. Kardiotoxycywność jest głównym działaniem niepożądanym DOX, którego nasilenie zależy od kumulacji leku. Klinicznie skumulowana dawka DOX jest ograniczona do 400-450 mg/m². Subkliniczna kardiomiopatia może jednak wystąpić przy niższych dawkach skumulowanych ($\approx 300 \text{ mg/m}^2$) [20]. Ostra kardiotoxycywność wywołana DOX występuje zwykle 2-3 dni po podaniu DOX u około 11% pacjentów [21]. Częstość występowania przewlekłej kardiotoxycywności DOX jest znacznie niższa i szacuje się ją na około 1,7% i jest przede wszystkim związana z jej dawką. W zależności od niej częstość występowania wynosi około 4%, gdy dawka DOX wynosi 500-550 mg/m², 18%, gdy dawka wynosi 551-600 mg/m² i 36%, gdy dawka przekracza 600 mg/m². Rokowanie u pacjentów, u których rozwinie się niewydolność serca, jest niepomyślne ($\sim 50\%$ śmiertelności w ciągu 1 roku) [22]. Liczne badania wykazały, że do czynników przyczyniających się do kardiomiopatii indukowanej przez DOX należą poza powstawaniem ROS, apoptoza, zahamowanie ekspresji genów specyficznych dla kardiomiocytów oraz zmienione szlaki sygnalizacyjne [23]. Metodami zmniejszenia kardiotoxycywności indukowanej DOX są wcześniejsze podanie Dekstrazoksanu lub enkapsulacja DOX w liposomach w postaci leku Doxil[®]/Caelyx[®] czy Myocet[®], lecz te rozwiązania nie są wolne od dodatkowych działań niepożądanych [21].

4.2.5. Zastosowanie i perspektywy nośników leków w terapii trójnegatywnego raka piersi

Rozwój nanomedycyny wynika z pilnej potrzeby opracowania skutecznych i niskotoksycznych metod leczenia nowotworów. Systemy dostarczania nanoleków nie tylko umożliwiają efektywną enkapsulację i kontrolowane uwalnianie leków, ale także poprawiają skuteczność ich dostarczania i działania w miejscu występowania nowotworu. Dodatkowo, kontrolowane uwalnianie leku zwiększa profil bezpieczeństwa terapii oraz pozwala uniknąć jego dyspersji i nagłego uwolnienia. Co więcej, systemy nanodostarczania charakteryzują się dłuższym okresem półtrwania w krążeniu oraz możliwością modyfikacji powierzchni i ukierunkowania (zarówno aktywnego, jak i pasywnego) [24]. Dodatkowo, ogromne zalety nanocząstek wynikają nie tylko z możliwości ich tworzenia w małych rozmiarach, ale także z ich zdolności do tworzenia ich z różnorodnych materiałów, np.: stałych nanocząstek lipidowych i liposomów z lipidów, nanocząstek polimerowych z polimerów czy nanocząstek złota z materiałów nieorganicznych [17]. Wyżej wymienione nanocząsteczki są szeroko badane pod kątem możliwości wykorzystania w terapii raka piersi.

Liposomy powstają w wyniku samoorganizacji fosfolipidów w środowisku wodnym, w wyniku czego powstają zamknięte dwuwarstwowe struktury z wodnym rdzeniem i jedną lub więcej dwuwarstwowymi błonami fosfolipidowymi [25]. Liposomy mają wielkość od 20 nm do 2,5 μm . Rozmiar pęcherzyka i liczba dwuwarstw są ważnymi czynnikami, które wpływają na skuteczność kapsułkowania leku, klirens i okres półtrwania w krążeniu [26]. Ze względu na ich podobieństwo strukturalne do błon komórkowych mają wysoki stopień biokompatybilności i biodegradowalności. Liposomy zapewniają szereg korzyści, w tym lepsze właściwości farmakokinetyczne kapsułkowanego leku, dłuższy czas krążenia oraz bierne ukierunkowanie i rozmieszczenie w guzach i ogniskach przerzutowych dzięki mechanizmowi zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR, ang. *enhanced permeability and retention*). Mechanizm ten opiera się na tym, że proces neowaskularyzacji zachodzący podczas szybkiego wzrostu guza charakteryzuje się szerokimi fenestracjami i ograniczonym drenażem limfatycznym, co umożliwia nośnikom przenikanie przez stosunkowo nieszczelne naczynia krwionośne guza i ich kumulację w miejscu docelowym [26]. Podanie leku zamkniętego w liposomie może również zmniejszać toksycywność ogólnoustrojową w porównaniu z wolnym lekiem. Ponadto liposomy mogą poprawiać rozpuszczalność leków i zapewniać powolne i długotrwałe uwalnianie kapsułkowanych leków [25, 26].

Istnieje wiele różnych metod stosowanych do przygotowania liposomów, w tym nawilżanie cienkowarstwowe, odparowywanie w odwróconej fazie, wstrzykiwanie etanolu, sonikacja, wytlaczanie, homogenizacja wysokociśnieniowa, zamrażanie-rozmrażanie, z których sonikacja, wytlaczanie, homogenizacja wysokociśnieniowa i zamrażanie-rozmrażanie mogą być wykorzystywane w połączeniu z innymi metodami [26].

Ważnym aspektem jest fizyczna charakterystyka liposomów i nanocząstek do dokładnego skorelowania określonej właściwości nanocząstki z efektami biologicznymi. Rozmiar cząstek (lub średnica) i właściwości ich powierzchni są kluczowymi parametrami do ich charakteryzacji. Najczęściej wykorzystywanymi technikami są transmisyjna mikroskopia elektronowej (TEM, ang. *transmission electron microscopy*) oraz pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*) wraz z wyznaczeniem potencjału zeta, czyli potencjału elektrostatycznego w podwójnej warstwie elektrycznej otaczającej nanocząstkę w roztworze [27, 28]. Aby wykazywać skuteczność, liposomy muszą być przygotowane w określonym rozmiarze, by umożliwić wchłanianie z krwiobiegu. Kluczowym parametrem jest też efektywność enkapsulacji leku oceniana przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej lub pomiarów spektrometrycznych oraz fluorescencyjnych [25].

Biorąc pod uwagę zalety liposomów, kilka liposomalnych produktów leczniczych zostało z powodzeniem zatwierdzonych i stosowanych w medycynie w ciągu ostatnich dziesięcioleci. Spośród preparatów liposomowych zgłoszonych do FDA 63% zostało opracowanych do leczenia nowotworów [29]. Wśród nich Doxil[®]/Caelyx[®] był pierwszym produktem liposomalnym zatwierdzonym przez FDA w 1995 roku. Doxil, modyfikowana glikolem polietylenowym liposomalna DOX, jest jednym z wiodących produktów nanocząsteczkowych stosowanych w terapii nowotworów [28]. Doxil wykazuje wyższą skuteczność przeciwnowotworową w wybranych typach nowotworów, ale nie TNBC, dzięki unikalnej farmakokinetyce i mechanizmowi EPR, które zwiększają akumulację leku w tkankach nowotworowych. Jego liposomalna formuła znacząco zmniejsza kardiotoksyczność i inne działania niepożądane, co poprawia jakość życia pacjentów w porównaniu z wolną doksorubicyną [24, 30]. Jednak pomimo ogólnej przewagi tolerancji Doxilu nad DOX, w przypadku Doxilu zaobserwowano dwa działania niepożądane, które nie są typowe dla standardowego leczenia DOX. Są to złuszczone zapalenie skóry oraz reakcja immunologiczna związana z infuzją objawiająca się dusznościami [30].

Co więcej, nanoinżynieria umożliwia jednoczesne i bezpieczne dostarczanie wielu leków, chroniąc je przed czynnikami zewnętrznymi. Wspólne dostarczanie leków za pomocą nanocząstek pomaga w realizacji strategii 3R", które zostało ujęte w języku angielskim jako podejście 3R: the right place at the right time and with the right dose (właściwe miejsce, we właściwym czasie, z właściwą dawką), do dostarczania leków, które kładzie nacisk na dostarczanie leków we właściwym miejscu, we właściwej dawce i we właściwym czasie, co wynika z efektywnej akumulacji nanocząstek w komórkach nowotworowych. To pozwala na optymalne połączenie leków i zwiększa ich skuteczność terapeutyczną [18, 31].

Przykładem może być kwas salwianolowy A (SAA, ang. *salvianolic acid A*), silny naturalny przeciwutleniacz pochodzący z szałwii łąkowej, który przynosi znaczące korzyści w walce z różnymi uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym, takimi jak kardiotoksyczność indukowana przez DOX. Li et. al. wykazali, że zastosowanie biokompatybilnego nośnika zawierającego jednocześnie DOX oraz kwas SAA, zmniejsza zależną od dawki kardiotoksyczność związaną z terapią DOX, zarówno w badaniach *in vitro* na linii komórek raka piersi MCF-7, jak i w badaniach *in vivo* na mysim modelu BALB/c z guzem piersi MCF-7 [32].

Vakilinezhad i in. z powodzeniem stworzyli nanocząstki (NPs, ang. *nanoparticles*) zawierające metotreksat (MTX, ang. *methotrexate*) i kurkuminę (CUR, ang. *curcumin*) przy użyciu metody kopcypitacji. Badania *in vitro* wykazały, że CUR pomogła w podtrzymywaniu uwalniania MTX, a nanocząstki MTX-CUR (MTX-CUR-NPs) wykazały najwyższą cytotoksyczność wobec linii komórkowych SK-Br3 – raka jajnika. Badania *in vivo* na modelu szczurzym z chemicznie indukowanymi guzami wykazały, że MTX-CUR-NPs znacznie skuteczniej zmniejszały rozmiar guza niż monoterapie [33].

Liu i in. opracowali nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLCs, ang. *nanostuctured lipid carriers*) funkcjonalizowane kwasem hialuronowym (HA, ang. *hyaluronic acid*) zawierające DOX z baicaleiną (BCL, ang. *baicalein*) - bioaktywnym flawonoidem naturalnego pochodzenia. HA-BCL/DOX-NLCs były efektywne w komórkach raka piersi z nadekspresją receptorów HA, i wykazywały cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych *in vitro* oraz znaczącą zdolność do hamowania wzrostu guza *in vivo*. Synergię w działaniu przeciwnowotworowym oceniono w komórkach opornych na DOX MCF-7 i modelach mysich z rakiem piersi MCF-7 opornych na DOX. System ten umożliwił ukierunkowane dostarczanie BCL i DOX, przewyższanie oporności wielolekowej DOX oraz zmniejszenie toksyczności systemowej. Te nośniki lipidowe wykazały potencjał, aby zostać obiecującym nanolekiem do aktywnego dostarczania dwóch leków w leczeniu nowotworów [34].

Rahmani i in. opracowali pH-wrażliwe i biodegradowalne micelle z nowego kopolimeru do współdostarczania DOX i konferonu. Konferon to naturalna kumaryna pochodząca z owoców i korzeni samorosnącego gatunku *Ferula*. Współdostarczone związki w micelach wykazywały zwiększony wychwyt komórkowy i wysoki synergizm działania. DOX i konferonu, indukowały apoptozę oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, co skutkowało zwiększoną skutecznością przeciwnowotworową. Micele te poprawiły funkcję terapeutyczną DOX, minimalizując jej dawkę. Dzięki doskonałej zdolności do indukowania apoptozy, micelle DOX i konferon są kandydatem do przyszłych badań *in vivo* [35].

4.3. Perspektywy zastosowania sulforafanu

Liczne badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że SFN w wyższych stężeniach wykazuje aktywność przeciwnowotworową [36]. SFN w zakresie stężeń 10 - 50 μM działa jako czynnik proapoptotyczny i proautofagiczny w różnych nowotworach złośliwych [37]. Wykazano, że SFN może również promować zatrzymanie cyklu komórkowego [38]. SFN działa także jako modulator mikrośrodowiska guza [39]. Ma również potencjał oddziaływania na komórki macierzyste raka (CSCs, ang. *cancer stem cells*), populację komórek nowotworowych, oporną na terapię i odpowiedzialną za nawrót raka [40, 41]. Co ważniejsze, SFN jest testowany jako koadjuwant w chemioterapii, proponując perspektywiczny kierunek rozwoju, w którym SFN wzmacnia działanie leku, jednocześnie minimalizując działania niepożądane na normalne komórki. W związku z tym SFN jest obiecującym środkiem koadjuwantowym w zapobieganiu oporności na leki, przerzutom i nawrotom nowotworu [42].

W odniesieniu do DOX – w literaturze ostatnich lat wykazano, że SFN wykazuje właściwości redukujące toksyczne działanie ROS w kardiomiocytach indukowane przez samą DOX [43]. W 2019 roku rozpoczęto badania kliniczne (numer NCT03934905) oceniające potencjał SFN w zmniejszaniu kardiotoxyczności DOX w warunkach klinicznych, co czyni SFN obiecującym kandydatem do wykorzystania w terapiach skojarzonych. Obecnie, równoległe z moimi badaniami, pojawiły się publikacje – w tym jedna stanowiąca część niniejszej rozprawy – które podejmują analizę perspektywiczności tego podejścia. Omawiają one również molekularne i komórkowe mechanizmy

synergistycznego działania tych dwóch związków, wskazując na pilność oraz zasadność realizacji obranego kierunku badawczego.

Z drugiej strony, SFN w zależności od dawki wykazuje dwojaki wpływ na wzrost komórek nowotworowych, migrację komórek nowotworowych i angiogenezę. Działanie SFN w niższych dawkach może być różne w komórkach prawidłowych i nowotworowych [44]. W niskich stężeniach SFN promuje autofagię lub pozostaje nieaktywny, co biorąc pod uwagę jego niską biodostępność w ludzkim osoczu po spożyciu może mieć poważne konsekwencje dla rozwoju guza lub skuteczności terapii [45, 46]. Postawiono hipotezę, że podczas gdy w zdrowym organizmie ten efekt SFN jest korzystny, to w rozwijającym się guzie nowotworowym działanie SFN, zwłaszcza w niskich stężeniach, może wywoływać odwrotny efekt: może promować tworzenie się guza [41, 47]. Jednocześnie warto zauważyć, że SFN jest dostępny na rynku i jest często stosowany jako środek wspierający terapię onkologiczną lub w profilaktyce nowotworowej. Z tego powodu niewielkie dawki SFN mogą być obecne w krwiobiegu zarówno u osób z grupy ryzyka, jak i u pacjentów z TNBC. Wykazano już, że stosowanie suplementów przeciwutleniających podczas chemioterapii, a także żelaza i witaminy B12, może zwiększać ryzyko nawrotu raka piersi i śmiertelności [48]. W przypadku SFN, jego stężenie w surowicy po spożyciu brokułów wynosiło 0,94 - 2,27 μM [49]. Dlatego istnieje pilna potrzeba zweryfikowania właściwości SFN w kontekście TNBC, ponieważ jest to podtyp raka piersi, dla którego brakuje specyficznych celów terapeutycznych. Związki o wielokierunkowym działaniu, takie jak SFN, mogłyby okazać się obiecującą opcją terapeutyczną.

Analiza wpływu SFN na TNBC może dostarczyć ważnych danych dotyczących potencjalnego zastosowania tej substancji jako nowej, wielokierunkowej strategii terapeutycznej, co ma szczególne znaczenie w przypadku raka o tak ograniczonych opcjach leczenia. W związku z powyższym, badanie działania niskich dawek SFN ma istotne znaczenie, zwłaszcza w sytuacji, gdy suplementy diety są powszechnie stosowane bez konsultacji specjalistycznej.

5. Cel rozprawy doktorskiej

SFN jest powszechnie uznawany za związek o właściwościach chemoprewencyjnych, szczególnie w wyższych dawkach. Brakuje jednak wystarczających danych literaturowych dotyczących wpływu niskich dawek SFN na rozwój i terapię TNBC. Choć uznaje się go za substancję zapobiegającą rozwojowi raka, jego działanie w przypadku rozwijającego się nowotworu lub terapii onkologicznej pozostaje niejasne. Ponadto, możliwości jego zastosowania w terapii skojarzonej, zwłaszcza w połączeniu z DOX, wymagają dalszych badań. Brakuje również danych na temat opracowania innowacyjnych systemów dostarczania SFN w celu zwiększenia jego biodostępności i skuteczności terapeutycznej.

Celem pracy doktorskiej było określenie roli niskich dawek SFN w chemoprewencji i terapii TNBC oraz opracowanie i określenie działania nośnika pozwalającego na łączne podanie SFN i DOX.

Realizacja celu pracy została rozpoczęta poprzez weryfikację roli SFN i jego analogów w prewencji raka piersi w pracy przeglądowej.

Kolejnym etapem było opracowanie i charakteryzacja innowacyjnych nośników leków zawierających SFN z DOX oraz określenie wpływu dodatku SFN na skuteczność i wybrane aspekty mechanizmu działania liposomalnej DOX na modelu TNBC *in vitro* i *in vivo*.

Trzecim etapem pracy doktorskiej było zbadanie roli niskiego stężenia SFN w TNBC - zarówno na wzrost guza jak i przerzutowanie z wykorzystaniem modelu *in vitro* i *in vivo*.

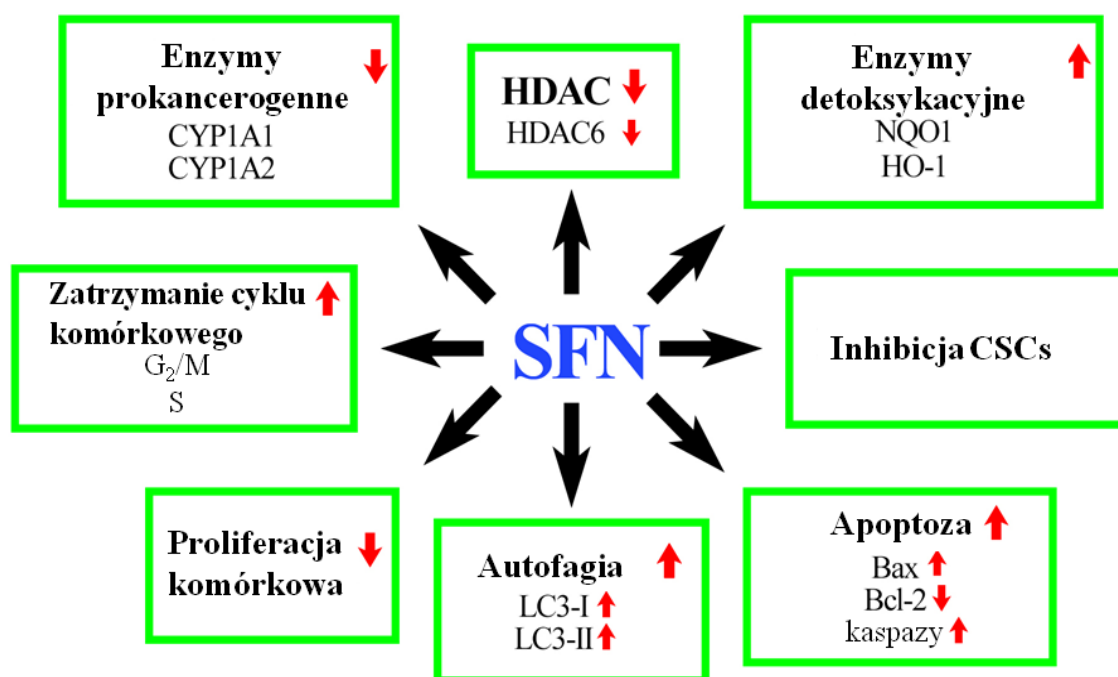
6. Wyniki badań

Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?. *Nutrients*, 12(6), 1559.

Pomimo spadku śmiertelności obserwowanego w ostatnich latach, rak piersi jest główną przyczyną zgonów związanych z rakiem wśród kobiet, a zatem pozostaje krytycznym problemem nie tylko zdrowotnym, ale także społeczno-ekonomicznym. Z tego względu też chemoprewencja, w tym chemoprewencja farmakologiczna, jest ważnym aspektem, który powinien być uwzględniany w szerszym zakresie. Chemoprewencja nowotworów jest definiowana jako stosowanie naturalnych, syntetycznych lub biochemicznych czynników w celu odwrócenia, opóźnienia lub zapobiegania procesowi rakotwórczemu prowadzącemu do choroby nowotworowej.

Trzeciorzędowa chemoprewencja ma na celu zapobieganie nawrotom choroby i powstawaniu kolejnego pierwotnego guza/choroby. Obecnie na rynku dostępne są dwa leki stosowane w trzeciorzędowej chemoprewencji raka piersi – Tamoxifen i Raloxifen, a kilka kolejnych znajduje się w fazie badań klinicznych. Są to głównie leki już zarejestrowane, dla których poszukiwane są nowe wskazania.

Naturalne produkty pochodzące z różnych źródeł mogą być bardzo przydatne w zapobieganiu inicjacji i rozwojowi raka, w tym raka piersi. Na etapie przedklinicznym sugerowano, że różne związki naturalne mają obiecującą skuteczność. SFN coraz częściej pojawia się w różnych badaniach (w tym klinicznych) dotyczących jego zastosowania w prewencji raka piersi. Jeśli chodzi o chemoprewencję raka piersi, mechanizm działania SFN jest wielokierunkowy i obejmuje np. zwiększony poziom enzymów detoksykacyjnych, zmniejszoną aktywność enzymatyczną cytochromu P450 (CYP1A1, CYP1A2), zmniejszoną żywotność/proliferaację komórek nowotworowych poprzez hamowanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy i autofagicznej śmierci komórek, a także eliminację CSCs. Wpływ SFN na te cele molekularne, przedstawiono na rysunku 1. Działanie chemoprewencyjne SFN potwierdzają badania *in vitro* (Tabela 1), *in vivo* jak również badania kliniczne.



Rycina 1 Mechanizmy działania SFN w tkance raka piersi.

Dane literaturowe wskazują na selektywne działanie SFN – w stężeniach hamujących wzrost komórek nowotworowych SFN w ograniczonym stopniu zaburza funkcjonowanie komórek nienowotworowych (Tabela 1). Ta selektywność działania na komórki TNBC w porównaniu z nienowotworowymi komórkami jest pożądana dla nowo opracowanego leku przeciwnowotworowego. Co więcej analiza literatury pozwala wnioskować iż SFN działa w sposób niezależny od statusu receptorów w komórkach raka piersi (Tabela 1). Oznacza to, że jego mechanizm hamowania przeżywalności i wzrostu komórek nie jest związany z różnicami w ekspresji receptorów (ER, PR, HER2). Dzięki temu SFN może mieć szerokie zastosowanie terapeutyczne w leczeniu różnych podtypów raka piersi, niezależnie od ich charakterystyki molekularnej.

Tabela 1 Wartości IC₅₀ dla różnych linii komórkowych raka piersi i nienowotworowych linii komórkowych po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z SFN. W tabeli uwzględniono również charakterystykę podtypów histologicznych i molekularnych poszczególnych linii komórkowych.

Cell Line	24 godz. [μM]	48 godz. [μM]	72 godz. [μM]	Podtyp	
				Histologiczny	Molekularny
MCF-7		7.5		inwazyjny rak przewodowy	Luminalny A
	12.5	9.2			
	14.05	12.38			
	19	13	6.73		
	25	16	9		
	26	20	10.15		
	38.92	20.06	33.8		
	54	27.9			
	MCF-7/ADR				
		13.7			
T47D	-	9.5	-	naciekający rak przewodowy	Luminalny A
KPL-1	-	19.1	17.8	inwazyjny rak przewodowy	Luminalny A
SK-BR-3	16.64	-	-	gruczolakorak	HER2 pozytywny
	25				
MDA-MB-231	19.35			gruczolakorak	TNBC B
	21	8.3	7.26		
	21.76	9.6	11.55		
	27.40	16.04	31.5		
	115.7				
MDA-MB-468	20	8.1	-	gruczolakorak	TNBC A
	21.93				
SUM159	-	10	7.8	inwazyjny rak przewodowy	TNBC B
SUM149	-	-	7.5	zapalny rak przewodowy	TNBC B
BT549	20.47	-	-	inwazyjny rak przewodowy	TNBC B
MCF-12A	-	40.5	-	nie-nowotworowy włóknisto-torbielowaty	podstawny
				nabłonek piersi	
MCF-10A	-	-	12.4	nie-nowotworowy włóknisto-torbielowaty	podstawny
				nabłonek piersi	

Ze względu na krótki okres półtrwania i biodostępność, skuteczność SFN może być niska. W związku z tym podejmowane są wysiłki w celu poprawy stabilności SFN w płynach ustrojowych. Jednym z podejść jest zastosowanie nanonośników opartych na polimerach naturalnych lub syntetycznych. Wyniki zebrane w pracy przeglądowej są zachęcające i wskazują, że enkapsulacja SFN do odpowiedniego nanonośnika jest obiecującą metodą poprawy skuteczności SFN ze względu na jego lepszą stabilność, dłuższy czas krążenia i ostatecznie zwiększoną biodostępność. Istnieją również doniesienia wskazujące na potencjał zastosowania SFN w połączeniu z konwencjonalną chemioterapią. Bardzo interesujące wyniki uzyskano w przypadku komórek TNBC poddanych

działaniu SFN w połączeniu z innym związkiem przeciwnowotworowym, np. 5-fluoracylem czy Witaferyną A na komórki linii MDA-MB-231. W przypadku obu związków, gdy podane łącznie wykazywały większą skuteczność przeciwnowotworową niż każdy ze związków osobno. Wyniki te wskazują na potencjał stosowania SFN jako adjuwantu w terapii przeciwnowotworowej w celu zmniejszenia stężenia cytostatyków przy zachowaniu zwiększonej efektywności, a także złagodzenia działań niepożądanych [50, 51]. W 2019 r. rozpoczęto badanie kliniczne II fazy dotyczące bezpieczeństwa stosowania SFN i DOX u kobiet cierpiących na raka piersi. SFN jest tam testowany jako adjuwant w celu złagodzenia kardiomiopatii wywołanej DOX i prawdopodobnie wzmocnienia efektu leczenia raka piersi.

Doniesienia literaturowe sugerują, że rodzaj aktywności SFN może być zależy od jego stężenia. Mechanizm takiego działania jest zgodny z koncepcją hormezy, która zakłada różne efekty biologiczne zależnie od dawki substancji. W badaniach nad TNBC opublikowanych przez Lewińska i in. SFN w wyższych stężeniach wykazał aktywność cytotoksyczną, jednak niższych dawkach indukował starzenie się komórkowe oraz cytostatyczną autofagię w liniach MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3[38].

Ponadto SFN jest dostępny na rynku jako suplement diety w różnych formach jak również dawkach, nierzadko wątpliwej jakości, więc społeczność naukowa, medyczna i farmaceutyczna powinna zintensyfikować wysiłki w celu określenia jego właściwości terapeutycznych. Obecnie dostępnych jest wiele suplementów diety, cieszących się dużą popularnością wśród osób poszukujących ochrony przed rakiem, ale także - wywołujących ambiwalentne skutki - u osób w okresie remisji choroby lub po wyzdrowieniu, zamierzających zapobiegać nawrotom, przerzutom lub wtórnym nowotworom.

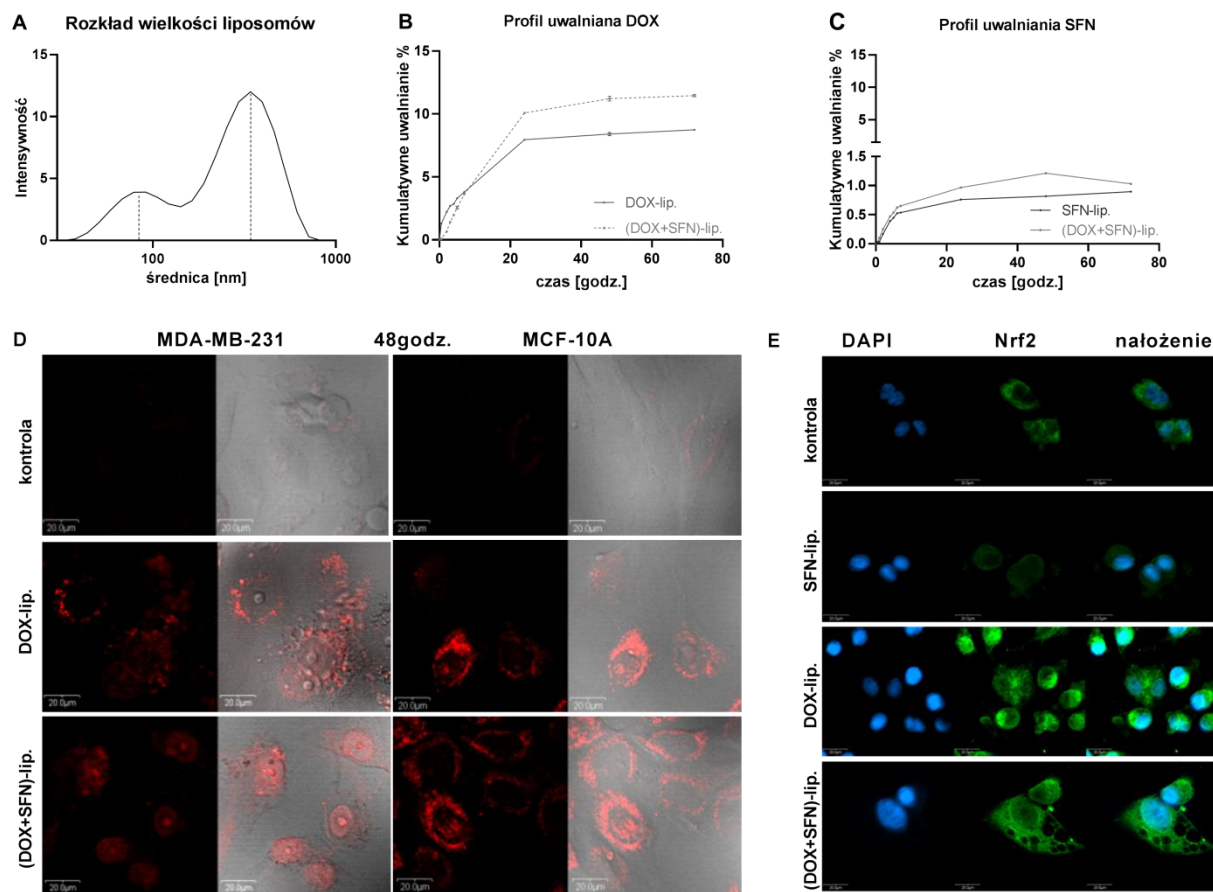
Wiele ośrodków prowadzi również badania w celu zidentyfikowania aktywnych, syntetycznych analogów SFN. Wykazano, że nawet niewielka zmiana w strukturze SFN może powodować znaczące różnice w jego aktywności biologicznej. Najbardziej korzystne zmiany strukturalne obejmują: wydłużenie łańcucha węglowego oraz wprowadzenie atomów selenu i fluoru do cząsteczki przebadane przez grupę Skupińskiej oraz Cierpiąła i in. na liniach MCF-7 oraz MDA-MB-231 [52, 53].

Materiał zebrany w omawianej pracy pozwala stwierdzić, że właściwości SFN są obiecujące i pożądane w kontekście jego zastosowania jako potencjalnego leku w chemoprewencji raka piersi na każdym etapie, również ze względu na jego niską toksyczność w tkance prawidłowej, a dodatkowo jego zdolność do utrzymania funkcji homeostatycznych w organizmie. Trwające obecnie badania kliniczne, po ich zakończeniu, dostarczą nowych informacji pozwalających wyjaśnić, czy możliwe będzie wprowadzenie SFN na rynek farmaceutyczny. Przegląd piśmiennictwa pozwala na wyciągnięcie wniosku, że dodatkowo zastosowanie nanotechnologii do opracowania skutecznego nośnika SFN byłoby korzystne, ponieważ mogłoby zwiększyć stabilność SFN, a tym samym jego skuteczność. Taka formuła może otworzyć nowe możliwości w chemoprewencji TNBC. Na zakończenie warto wspomnieć, że korzystne byłoby zintensyfikowanie wysiłków w celu określenia przydatności wybranych analogów SFN (w szczególności tych z wprowadzonymi atomami selenu i fluoru) do stosowania w chemoprewencji TNBC, co zwiększyłoby zakres farmaceutyków, które można stosować samodzielnie lub w połączeniu z istniejącymi lekami.

Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 161, 114490.

W pierwszej oryginalnej publikacji zbadano zaproponowane w publikacji przeglądowej zastosowanie SFN w połączeniu ze znanym chemioterapeutykiem – doksorubicyną (DOX) w terapii TNBC. Założeniem tego połączenia było zmniejszenie działań niepożądanych terapii DOX jak również zwiększenie jej efektywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo aby zwiększyć stabilność podawanego SFN oraz umożliwić bierne ukierunkowanie kombinacji związków zamknięto je w nowo opracowanych liposomach.

W niniejszej publikacji przedstawiono liposomy wytworzone z dimirystoilofosfatydylocholine (DMPC, ang. *dimyristoylphosphatidylcholine*), w których enkapsulowano DOX i SFN ((DOX+SFN)-lip.). Charakterystyka tych nanocząstek wykazała, że tworzą one polidispersyjną mieszaninę cząsteczek o dwóch rozmiarach około 86 i 342 nm (Rys. 2A). Rozmiar ten jest korzystny, gdyż liposomy o średnicy do 400nm, dzięki zwiększonej fenestracji naczyń włosowatych guza, biernie celują w zmianę nowotworową [54]. Określono również, że potencjał elektrokinetyczny opracowanych liposomów jest dodatni, co cechuje nośnik jako stabilny, o długim okresie półtrwania we krwi oraz z małą skłonnością tworzenia agregatów [55]. Przedstawione liposomy charakteryzuje również wysoka skuteczność enkapsulacji DOX. Średnia oznaczona wartość enkapsulacji DOX wynosi 98% i nie zależy od obecności SFN. Dodatkowo oznaczone profile uwalniania wykazały, że DOX i SFN nie są uwalniane w środowisku wodnym z liposomów. Uwalnianie leku w kwaśnym pH odpowiadającym środowisku nowotworu wynosiło 10 % i 1% odpowiednio dla liposomów zawierających DOX i SFN ((DOX+SFN)-lip.) (Rys. 2A,B). Przedstawiona charakterystyka proponowanego nośnika potwierdziła spełnienie kluczowych kryteriów wymaganych przy projektowaniu leków przeciwnowotworowych przeznaczonych do podawania dożylnego [56].



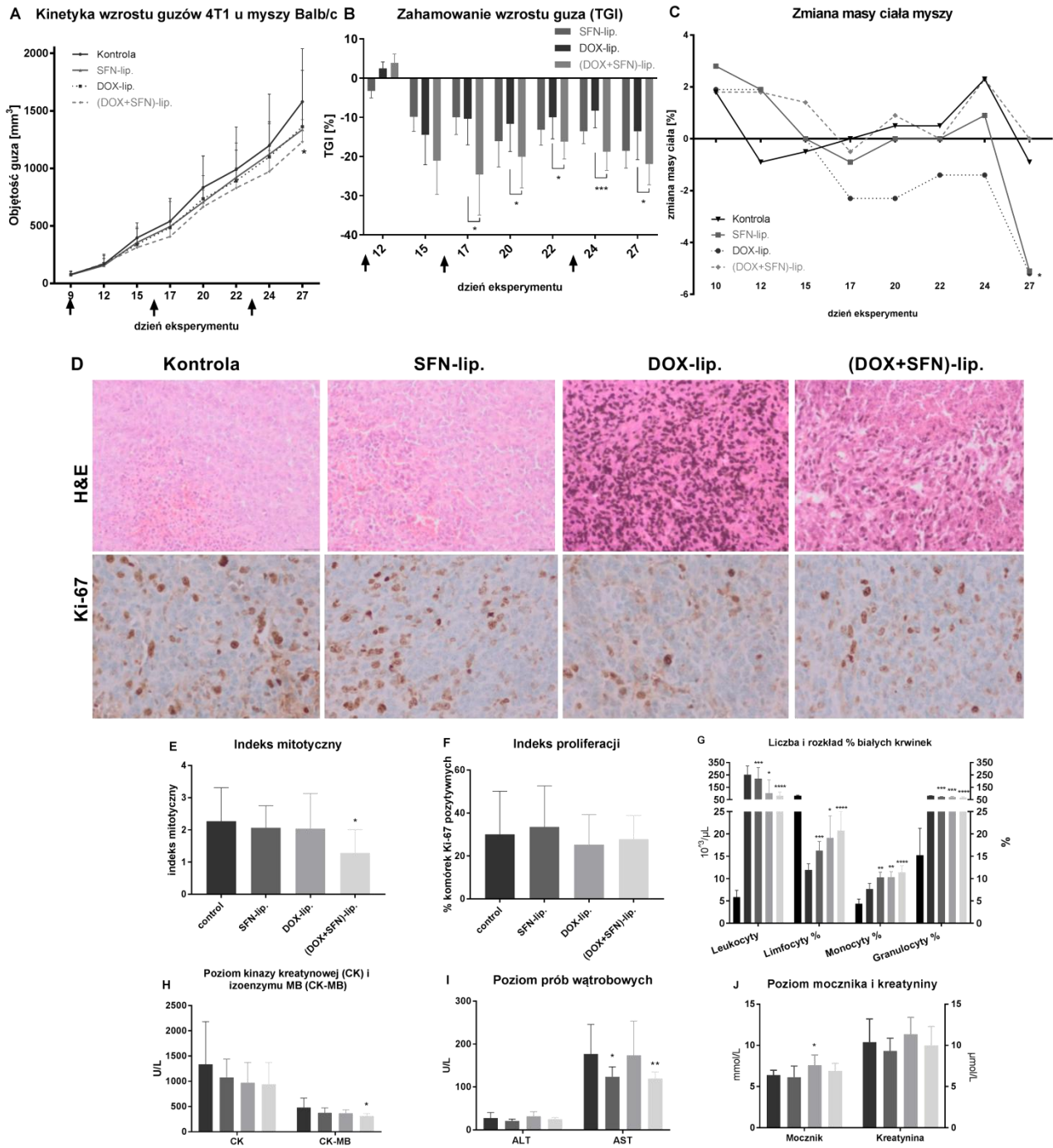
Rycina 2 Charakterystyka wytworzonych liposomów oraz wpływ inkorporacji SFN do liposomów zawierających DOX na wewnątrzkomórkową lokalizację DOX oraz status Nrf2 w TNBC i normalnych komórkach. A - rozkład wielkości liposomów; Profil uwalniania B – DOX z DOX-lip. i (DOX+SFN)-lip.; C – SFN z SFN-lip. i (DOX+SFN)-lip. w PBS (pH 7,4). Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (n = 3); D - Wewnątrzkomórkowa dystrybucja DOX po 48 godz. traktowania DOX-lip. i (DOX + SFN)-lip. w komórkach MDA-MB-231 i MCF-10A; E - Barwienie immunofluorescencyjne Nrf2 po 1 godz. traktowania liposomami komórek linii MDA-MB-231. Kolor niebieski - jądra wybarwione DAPI, zielony - Nrf2 wybarwiony przeciwciałami sprzężonymi z FITC, wizualizowane za pomocą mikroskopii konfokalnej, pasek skali 20 μ m.

W kolejnym etapie badań oznaczono skuteczność przeciwnowotworową opracowanych nośników w modelach TNBC *in vitro*, w ludzkiej linii komórkowej MDA-MB-231, w prawidłowej linii komórek sutka MCF-10A oraz *in vivo*, w mysim modelu guza gruczołu sutkowego 4T1. Przeprowadzone testy MTT wykazały iż DOX i SFN podane w (DOX+SFN)-lip. *in vitro* zadziałały synergistycznie w komórkach TNBC natomiast w prawidłowych komórkach wykazały działanie antagonistyczne (Tabela 2). Świadczy to o zwiększonej toksyczności wobec komórek TNBC przy równoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych na prawidłowe komórki. W celu wyjaśnienia mechanizmu synergii działania DOX i SFN przeprowadzono badania mikroskopowe i oznaczenie poziomów ROS. Przeprowadzone badania potwierdziły, że opracowane liposomy, dzięki obecności SFN skutecznie dostarczają DOX do jądra komórek nowotworowych, zwiększając efektywność terapii w miejscu działania DOX (Rys. 2D). Natomiast wyniki uzyskane z mikroskopowej obserwacji lokalizacji Nrf2 wskazują, że (DOX+SFN)-lip. indukuje szybszą translokację Nrf2 do jądra w porównaniu do liposomów z samym DOX (DOX-lip.) (Rys 2E), co sugeruje ich potencjał w modulacji odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny poprzez regulację genów związanych z eliminacją ROS.

Tabela 2 Rodzaje interakcji między SFN i DOX *in vitro*. Wartości współczynników: indeks kombinacji (CI, ang. *combination index*) i indeks redukcji dawki (DRI, ang. *dose reduction index*) dla różnych stężeń DOX i SFN zamkniętych w liposomach w oparciu o frakcję poddaną oddziaływaniami (Fa, ang. *fraction affected*) ocenianą testem MTT przeprowadzonym na liniach komórkowych MDA-MB-231 i MCF-10A.

Stężenie [nM]		MDA-MB-231			MCF-10A		
SFN	DOX	Fa	CI	DRI	Fa	CI	DRI
31.25	15.6	0.15	1.18	0.84	0.31	1.02	0.98
125	62.5	0.49	0.26	3.83	0.34	1.88	0.53
500	250	0.67	0.30	3.38	0.42	1.06	0.94
2000	1000	0.76	0.56	1.80	0.41	4.88	0.20

Jako model *in vivo* wybrano złośliwy nowotwór 4T1 wyindukowany u myszy Balb/c ze względu na wspólne cechy molekularne z ludzkim TNBC. Podanie (DOX+SFN)-lip. niemal podwoiło zahamowanie wzrostu guza w porównaniu do DOX-lip. (Rys 3A,B), wykazując efekt synergistyczny po drugim i trzecim podaniu oraz addytywny działania SFN i DOX w pozostałe dni. Oba zaobserwowane typy interakcji są korzystne farmakologicznie, ponieważ pozwalają na obniżenie dawki cytostatyku przy jednoczesnym zwiększeniu jego toksyczności wobec komórek nowotworowych [57]. Badania *in vivo* potwierdziły zależność synergii działania SFN i DOX oznaczoną *in vitro* i wykazały, że (DOX+SFN)-lip. stanowią efektywny nośnik umożliwiający jednoczesne dostarczanie DOX i SFN do miejsca guza również *in vivo*.



Rycina 3 Wpływ opracowanych liposomów *in vivo*. A - Krzywe wzrostu guza - kinetyka wzrostu guza 4T1 u myszy Balb/c w dniach 9, 12, 15, 17, 20, 22 i 27 eksperymentu (objętość guza (TV) [mm³]). Dane przedstawione z grupy kontrolnej i po podaniu SFN-lip., DOX-lip. i (DOX+SFN)-lip. jako średnia \pm SD (n = 9); B - zahamowanie wzrostu guza obliczone w porównaniu z kontrolą, strzałki wskazują czas podania leku; C - Ocena masy ciała myszy podczas eksperymentu [%]; D - Analiza histologiczna wycinków guza myszy, barwienia histochemiczne H&E i anty-Ki-67 oraz obliczony E - indeks mitotyczny i F - indeks proliferacji. Dane przedstawiają średnie \pm SD (n = 3; 5; 5; 5). * p < 0,05, *** p < 0,0002 wobec kontroli; G - liczby białych krwinek [10³ komórek/ μ L] i procentowy rozkład białych krwinek [%]; H - poziom kinazy kreatynowej (CK) i izoenzymu MB (CK-MB) [U/L]; I - poziom aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST) [U/L]; J - poziom mocznika [mmol/L] i kreatyniny [μ mol/L] we krwi myszy pod koniec eksperymentu u zdrowych myszy, w grupie kontrolnej i po leczeniu SFN-lip. DOX-lip. i (DOX+SFN)-lip. Dane przedstawiają średnie wartości dla każdej grupy \pm SD (n = 9), * test Manna-Whitneya wobec kontroli p < 0,05, *p < 0,0332 **p < 0,0021 ***p < 0,0002; ****p < 0,0001.

Następnie w celu dalszego zbadania mechanizmu synergii działania (DOX+SFN)-lip. na tkankę nowotworową przeprowadzono analizę histopatologiczną guzów myszy (Rys. 3D). Oznaczenie poziomu indeksu Ki-67 oraz indeksu mitotycznego wykazało, że pomimo iż komórki utrzymywały wysoką aktywność proliferacyjną (Rys. 3E), aktywność mitotyczna została obniżona dwukrotnie po podaniu (DOX+SFN)-lip. (Rys. 3F). Wcześniej wykazano SFN, poprzez inaktywację polimeryzacji tubuliny, działa jako inhibitor mitozy w komórkach nowotworowych [58], co potwierdza nasze wyniki. Dodatkowo w skrawkach barwionych H&E po podaniu (DOX+SFN)-lip. wykryto nagromadzenie brązowego pigmentu w jądrach komórkowych i figurach podziału mitotycznego (Rys. 3D), co świadczy o stabilnym włączeniu DOX do DNA promowanym przez działanie SFN. Dane literaturowe potwierdzają, iż DOX można wykryć w jądrach komórkowych w skrawkach H&E ze względu na jego stabilne włączenie do DNA, w przeciwieństwie do wolnej DOX, która może zostać wypłukana podczas przetwarzania tkanki [59]. Biorąc pod uwagę wyniki badań *in vitro*, jak również *in vivo* wyniki te pozwalają na określenie mechanizmu działania opracowanych liposomów. SFN działa synergistycznie z DOX, zwiększając jego akumulację w jądrze komórkowym oraz hamując mitozę, co prowadzi do uszkodzeń DNA i chromatyny, skutecznie hamując wzrost guza. Natomiast nośnik liposomalny zwiększa akumulację podanych związków w miejscu guza i poprawia stabilność i czas cyrkulacji związków w krwioobiegu.

Histopatologiczne analizy guzów wykazały również zmniejszenie obszarów martwicy i nacieku komórek immunologicznych (ICI, ang. *immune cell infiltration*), z wyjątkiem wzrostu granulocytów w strefach martwiczych po zastosowaniu (DOX+SFN)-lip. (Rys. 3D). Spadek ICI może sugerować ograniczenie skuteczności liposomów. Dodatkowo wzrost liczby przerzutów do płuc po włączeniu SFN do DOX-lip., przywracający ich poziom zbliżony do grupy kontrolnej, wskazuje na możliwy efekt antagonistyczny SFN wobec DOX w zapobieganiu przerzutom. Konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tej zależności, gdyż przerzuty są ważnym problemem TNBC wpływającym na śmiertelność pacjentów.

Końcowym etapem pracy była analiza bezpieczeństwa (DOX+SFN)-lip. (Rys. 3C). Opracowane liposomy wykazały wysokie bezpieczeństwo na podstawie analizy parametrów krwi (Rys. 3G-J) oraz obserwacji zmiany masy myszy (Rys. 3C). Co więcej, (DOX+SFN)-lip. obniżyły typową dla myszy z guzem leukocytozę i niemal dwukrotnie zwiększyły stosunek procentowy limfocytów do monocytów (Rys. 3G), wskazując na przeciwnowotworowy efekt immunologiczny podanych liposomów [60]. Istotnym aspektem była również ocena wpływu liposomów na działania niepożądane DOX. Wyniki wykazały obniżenie poziomów markerów uszkodzenia serca, wątroby i nerek po podaniu (DOX+SFN)-lip. w porównaniu do ich podwyższonych wartości przy stosowaniu DOX-lip. (Rys. 3H-J). Chociaż kardioprotekcyjne właściwości SFN były wcześniej opisane, ochrona przed hepato- i nefrotoksycznością indukowaną DOX została zidentyfikowana jako jego potencjalna nowa rola.

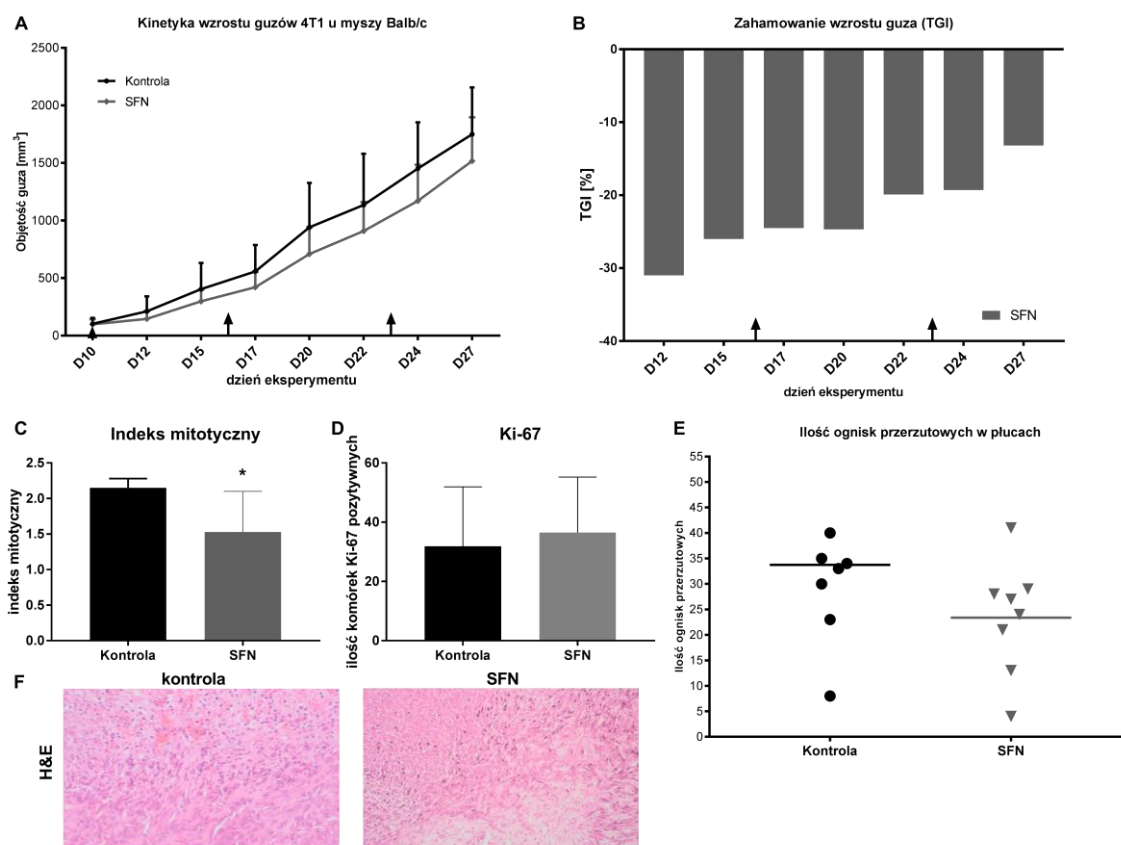
Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać odpowiedzi na postawione cele. Opracowano i scharakteryzowano liposomalne nośniki leków zawierające DOX i SFN, wykazując ich synergistyczne działanie zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Efektem działania (DOX+SFN)-lip. było niemal dwukrotne zahamowanie wzrostu TNBC w porównaniu do samej DOX-lip. Mechanizm działania opracowanych liposomów obejmuje zahamowanie mitozy oraz zwiększoną akumulację DOX w jądrze komórkowym dzięki obecności SFN. Formułacja ta wykazała bezpieczeństwo w obu modelach badawczych wobec komórek i tkanek nienowotworowych. Po raz pierwszy wykazano, że SFN, poza znanymi właściwościami kardioprotekcyjnymi, może również ograniczać nefro- i hepatotoksyczność w terapii z zastosowaniem DOX.

Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Scientific reports*, 14(1), 16016.

Wiele fitochemikaliów wykazuje niemonotoniczną, dwufazową odpowiedź na dawkę, która klasyfikuje je jako związki hormetyczne, czyli wywołujące biologicznie przeciwstawne efekty w zależności od dawki. Zazwyczaj działają one stymulująco w niskich stężeniach, natomiast w wysokich wykazują działanie hamujące. Jednym z takich związków jest SFN, który w wysokich stężeniach znany jest ze swoich właściwości przeciwnowotworowych, natomiast rola niskich stężeń w terapii przeciwnowotworowej nie została jeszcze zbadana.

Większość badaczy koncentruje się na dawkach SFN, o wysokich stężeniach, wykazujących działanie przeciwnowotworowe. Jednak niewiele badań dotyczy działania niskich stężeń SFN, uzyskiwanych w organizmie po spożyciu warzyw kapustnych, kiełków brokułu lub odpowiednich suplementów diety. Dlatego w niniejszej pracy zbadano różne dawki SFN w modelu TNBC *in vitro* 2D i 3D, w ludzkiej linii komórkowej MDA-MB-231 oraz dawkę 0,026 mg/kg odpowiadającą stężeniu 1,5 μ M SFN w osoczu podawaną dootrzewnowo myszom z rozwiniętym TNBC.

Dawka 0,026 mg/kg SFN podawana raz w tygodniu zahamowała wzrost guza (TGI, ang. *tumor growth inhibition*) do 31% w modelu *in vivo* TNBC (Rys. 4A,B). W literaturze dostępne są dane o przeciwnowotworowym działaniu dawek dziennych 50 mg/kg SFN [61, 62], Tym samym, nasz model zakładający najniższą dawkę z badanych podawaną co tydzień okazał się skuteczny w ograniczaniu wzrostu guza.

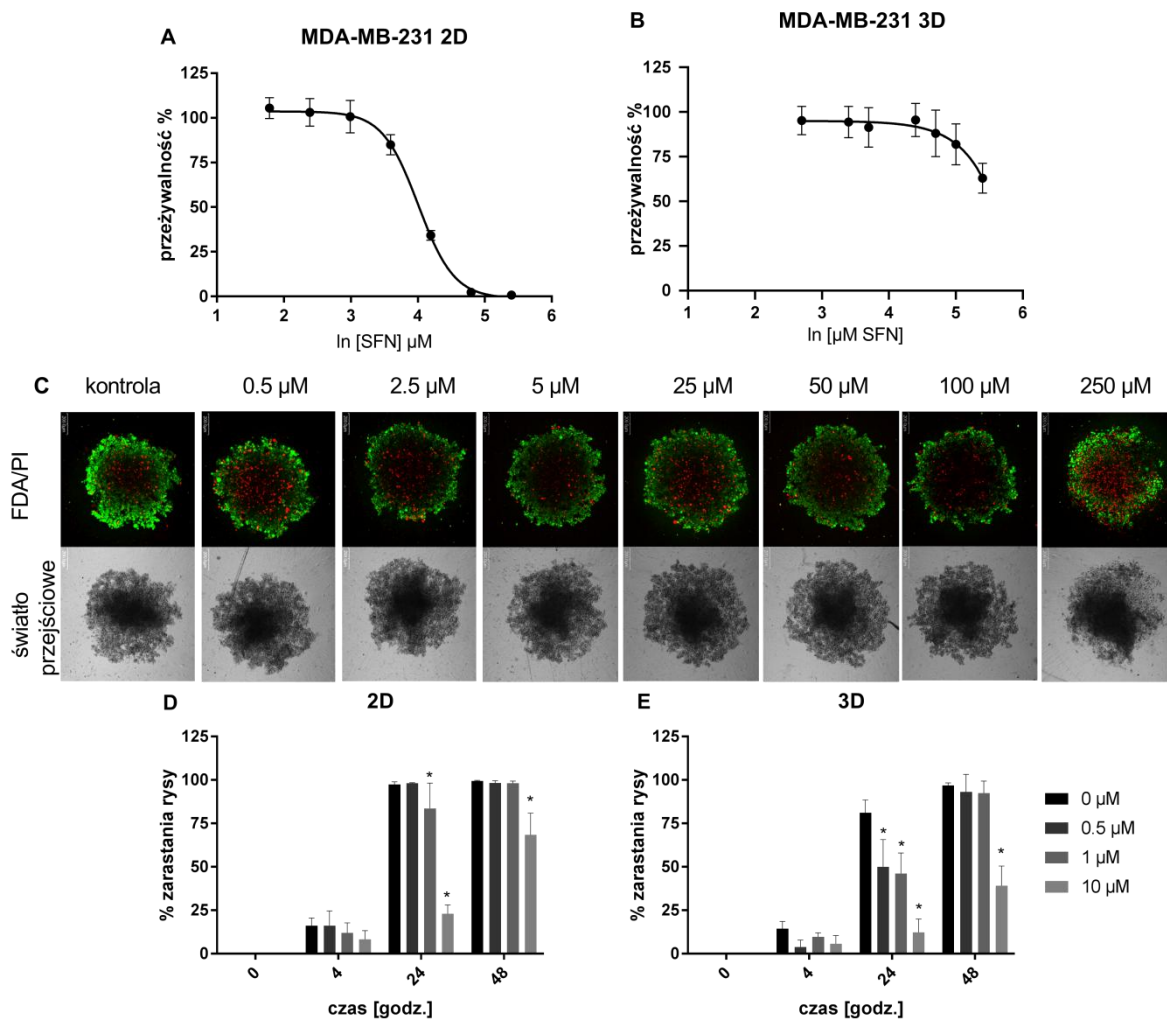


Rycina 4 Wpływ SFN na wzrost guza pierwotnego, histologię i przerzuty. A - Krzywe wzrostu guza - kinetyka wzrostu guza 4T1 u myszy BALB/c - objętość guza (mm³); B - zahamowanie wzrostu guza (TGI) po podaniu SFN obliczone w porównaniu z grupą kontrolną. Strzałki wskazują podanie SFN lub wody do iniekcji w dniach 10, 16 i 23; C - indeks mitotyczny i D - liczba komórek Ki-67 dodatnich obliczone na podstawie analizy histologicznej wycinków guza myszy; E - liczba przerzutów w płucach, linia odpowiada średniej liczbie przerzutów w płucach. Wszystkie dane przedstawiono dla grupy kontrolnej i po podaniu SFN w dniach 10, 16 i 23 eksperymentu jako średnie ± SD (n = 8). * p < 0,05 wobec kontroli; F - barwienie histochemiczne hematoksyliną i eozyną wycinków guza. Pasek skali 100 μm.

W celu zrozumienia mechanizmu działania SFN przeprowadzono badania *in vitro* na ludzkim modelu TNBC w formie hodowli 2D i 3D. Wprowadzono do badań model sferoidów 3D, aby badania rzetelniej odzwierciedlały interakcje komórka-komórka oraz trójwymiarową architekturę obecną w nowotworach złośliwych. Model ten charakteryzuje się zmniejszoną proliferacją komórek, ale jednocześnie zwiększoną transformacją nabłonkowo-mezenchymalną (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*) oraz zwiększoną opornością na działanie toksyczne [63].

Zaobserwowano różnice w cytotoksyczności SFN wobec komórek TNBC w modelu 2D i 3D. Otrzymane wyniki badań MTT i barwienia FDA/PI wskazują, że niskie stężenia SFN mogą stymulować proliferację komórek w hodowli 2D, lecz brak tego efektu w modelu 3D podkreśla znaczenie pozakomórkowego środowiska obecnego w strukturach trójwymiarowych dla badań nad guzami *in vivo* (Rys. 5 A-C). Jednocześnie, sferoidy 3D wykazują znaczną odporność na cytotoksyczność SFN (Rys. 5B,C), co sugeruje, że model 3D lepiej odzwierciedla rzeczywistą oporność TNBC na leczenie niż model 2D. Co więcej, w modelu mysim *in vivo* SFN w niskiej dawce wykazał hamujący wpływ na wzrost guza. Wyniki te sugerują, że działanie SFN może wykraczać poza bezpośredni wpływ na komórki nowotworowe. W modelu *in vivo* obecne są elementy nowotworu złośliwego, których nie zawiera nasz model 3D, takie jak mikrośrodowisko guza (TME, ang. *tumor microenvironment*), które obejmuje nie tylko komórki nowotworowe, ale również naciekające komórki odpornościowe (np. makrofagi i limfocyty), macierz zewnątrzkomórkową oraz liczne

cząsteczki sygnalizacyjne. Wpływ SFN na zahamowanie EMT, poprzez modulację ekspresji kadheryny i wimentyny oraz modulację układu odpornościowego został wcześniej opisany [6, 64]. W związku z tym, wpływ SFN na proliferację komórek oraz wielkość guza *in vivo* sugeruje, że jego działanie obejmuje także modulację procesów w mikrośrodkowisku guza, co wykracza poza bezpośrednie oddziaływanie na komórki nowotworowe.



Rycina 5 Aktywność cytotoksyczna SFN *in vitro*. Krzywe przeżywalności komórek linii MDA-MB-231 z A - hodowli 2D i B - hodowli sferoidalnej 3D po traktowaniu SFN w stężeniach A - 0,06-250 μM i B - 0,5-250 μM ; C - obrazy mikroskopowe barwienia żywe/martwe komórek hodowli sferoidalnej 3D MDA-MB-231 po traktowaniu SFN (0,5-250 μM), gdzie zielone - żywe komórki (dwooctan fluoresceiny), czerwone - martwe komórki (jodek propidyny). Skala 200 μm ; Wykresy przedstawiające % zarastania rysy z D - hodowli 2D i E - komórek pochodzących ze sferoidów po traktowaniu 0,5 μM ; 1 μM i 10 μM SFN w porównaniu z komórkami kontrolnymi obliczone na podstawie obrazów mikroskopowych testu zarastania rysy. Dane przedstawiono jako średnia \pm SD (n = 5). * < 0,01 wobec kontroli.

Aby potwierdzić tę hipotezę przeprowadzono analizę histopatologiczną guzów (Rys. 4F), która wykazała, że niska dawka SFN działa antymitotycznie, jak również zmniejsza nacieki zapalne komórek immunologicznych, powodując spadek liczby limfocytów i wzrost odsetka granulocytów obojętnochłonnych - neutrofilii. Napływ tych komórek spowodował ograniczenie wzrostu guza poprzez wywołane uszkodzenia oksydacyjne. Uszkodzenia te spowodowane były cytotoksycznym działaniem aktywowanych neutrofilii, wydzielających ROS [65]. Jednocześnie we krwi obwodowej ich populacja zmniejszyła się w porównaniu do grupy kontrolnej, co przekłada się na zmniejszenie promocji nowotworu w organizmie [65]. Co ważne, działanie to znalazło potwierdzenie również

w zmniejszonej liczbie przerzutów do płuc po podaniu niskiej dawki SFN w porównaniu do kontroli w modelu *in vivo* TNBC (Rys. 4E). Badania te świadczą o podwójnym wpływie niskich dawek SFN zarówno na komórki nowotworowe, jak i na komórki odpornościowe tworzące razem mikrośrodowisko guza. SFN, jako aktywator szlaku Nrf2, reguluje wydzielanie ROS przez neutrofile, mobilizując je do guza pierwotnego i zmniejszając liczbę granulocytów we krwi, co prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych jak i przerzutowych. Efekt ten jednak nie był widoczny w badaniach *in vitro* z powodu braku komórek odpornościowych uwzględnionych w modelu badawczym *in vivo*. W wynikach z przeprowadzonego testu zarastania rysy SFN wykazał działanie antymigracyjne wobec komórek z hodowli 3D, jednak nie z hodowli 2D *in vitro* (Rys. 5D,E). Aktywność antymigracyjna i antymetastatyczna jest niezmiernie pożądana dla związku przeciwnowotworowego, gdyż przerzuty są główną przyczyną zgonów w przypadku TNBC.

Analiza działania niskiej dawki SFN na TNBC przedstawiona w opisanym wyżej artykule dostarczyła nowych danych na temat zależności pomiędzy niską dawką SFN a jego efektem biologicznym. Niskie stężenie SFN spowodowało zmniejszenie objętości guza, obniżenie aktywności mitotycznej komórek TNBC oraz wykazało działanie antymetastatyczne w modelu *in vivo* TNBC. Wyniki te są zgodne z obniżoną aktywnością migracyjną komórek pochodzących ze sferoidów pod wpływem SFN. Dodatkowo, mobilizacja neutrofilów do guza pierwotnego, wraz ze spadkiem liczby granulocytów krążących we krwi, wspólnie przyczyniły się do zmniejszenia objętości guza i obniżenia liczby przerzutów do płuc.

Wyniki te podkreślają, że niskie dawki SFN mają wyraźny efekt przeciwnowotworowy, nie tylko bezpośrednio hamując proliferację TNBC, ale także wpływając na złożone mechanizmy pośrednie, takie jak modulacja mikrośrodowiska guza i transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej. Ostatecznie prowadzi to do supresji wzrostu guza i ograniczenia liczby przerzutów TNBC do płuc.

7. Wnioski

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie związkami pochodzenia naturalnego jako potencjalnymi adjuwantami terapii przeciwnowotworowych. Jednym z kandydatów jest SFN, który wykazuje wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe, obejmujące indukcję apoptozy, hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz modulację stresu oksydacyjnego. Pomimo licznych badań wskazujących na skuteczność SFN w wysokich stężeniach, jego rola w niskich dawkach oraz w połączeniu z chemioterapią nie była dotychczas dostatecznie zbadana. Niniejsza rozprawa miała na celu ocenę potencjału niskich dawek SFN w chemoprewencji i terapii TNBC, ze szczególnym uwzględnieniem jego synergii z DOX oraz możliwości zastosowania w innowacyjnych nośnikach leków. Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. SFN wykazuje potencjalną użyteczność w prewencji trzeciorzędowej TNBC oraz jako koadjuwant w terapii skojarzonej z cytostatykami.
2. Opracowano stabilny nośnik dla SFN i DOX i wykazano, że oba związki działają synergistycznie wobec TNBC, hamując proliferację i wzrost guza, a zarazem wykazując aktywność protekcyjną w stosunku do komórek prawidłowych.
3. SFN zwiększa aktywność przeciwnowotworową DOX poprzez kierowanie DOX do jądra komórkowego oraz hamowanie mitozy. Efekt ten jest synergistyczny i wykazuje duży potencjał w terapii TNBC.
4. Po raz pierwszy wykazano, że SFN może zmniejszać nie tylko kardiotoksyczność, ale także nefro- i hepatotoksyczność DOX, co wskazuje na jego potencjalną rolę w ochronie narządów przed skutkami chemioterapii.
5. Przeprowadzone badania wykazały, że niskie stężenia SFN mogą prowadzić do istotnych efektów w zakresie hamowania wzrostu guza, a w szczególności do redukcji liczby przerzutów czyniąc z niego obiecujący środek do chemoprewencji i terapii TNBC.
6. Uzyskane wyniki wskazują że efekt niskich dawek SFN na wzrost TNBC jest związany nie tylko z bezpośrednim wpływem na komórki nowotworowe, ale jest także powiązany z modulacją funkcjonowania układu odpornościowego, modulacją mikrośrodowiska guza oraz procesu transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej.

Otrzymane w toku badań wyniki dostarczają nowej charakterystyki działania SFN, w szczególności jako potencjalnego adjuwanta w terapii TNBC, co otwiera perspektywy dla nowych strategii leczenia, zwłaszcza w kontekście terapii skojarzonych z DOX.

8. Szczegółowy opis udziału w tworzeniu publikacji wchodzących w skład rozprawy

Kuran, D., **Pogorzelska, A.**, & Wiktorska, K. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?. *Nutrients*, 12(6), 1559. <https://doi.org/10.3390/nu12061559> (IF **5.719**; pkt MNiSW **140**)

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na:

- Wykonaniu przeglądu literatury dotyczącej TNBC.
- Wykonaniu przeglądu literatury dotyczącej badań klinicznych.
- Wykonaniu części rycin i tabel.
- Udziale w tworzeniu i redagowaniu manuskryptu.

Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 161, 114490. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114490> (IF **7.5**; pkt. MNiSW **100**)

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na:

- Uczestnictwie w planowaniu koncepcji i metodologii badań.
- Wykonaniu i optymalizacji nośnika liposomalnego oraz wykonaniu częściowej charakterystyki fizykochemicznej – profile uwalniania.
- Wykonaniu wszystkich badań *in vitro*.
- Udziale w końcowym etapie badań *in vivo* – zebranie próbek i udział w analizie.
- Analizie i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu rycin, analizie statystycznej.
- Udziale w tworzeniu i redagowaniu manuskryptu.
- Pozyskaniu finansowania części badań.

Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Scientific reports*, 14(1), 16016. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65455-w> (IF **3.8**; pkt. MNiSW **140**)

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na:

- Udziale w planowaniu koncepcji i metodologii badań.
- Wykonaniu wszystkich badań *in vitro*.
- Udziale w końcowym etapie badań *in vivo* – zebranie próbek i udział w analizie.
- Analizie i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu rycin, analizie statystycznej.
- Udziale w tworzeniu i redagowaniu manuskryptu.
- Pozyskaniu finansowania części badań.

9. Wykaz rycin i tabel

Rycina 1. Mechanizmy działania SFN w tkance raka piersi	17
Tabela 1. Wartości IC ₅₀ dla różnych linii komórkowych raka piersi i nienowotworowych linii komórkowych po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z SFN.....	18
Rycina 2. Charakterystyka wytworzonych liposomów oraz wpływ inkorporacji SFN do liposomów zawierających DOX na wewnątrzkomórkową lokalizację DOX oraz status Nrf2 w TNBC i normalnych komórkach.....	21
Tabela 2. Rodzaje interakcji między SFN i DOX <i>in vitro</i>	22
Rycina 3. Wpływ opracowanych liposomów <i>in vivo</i>	23
Rycina 4. Wpływ SFN na wzrost guza pierwotnego, histologię i przerzuty.....	25
Rycina 5. Aktywność cytotoksyczna SFN <i>in vitro</i>	27

10. Literatura

1. Patel G, Prince A, Harries M (2024) Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Semin Oncol Nurs* 40:151548. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2023.151548>
2. Almansour NM (2022) Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front Mol Biosci* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.836417>
3. Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB (2007) Diet and breast cancer: A review of the prospective observational studies. *Cancer* 109:2712–2749. <https://doi.org/10.1002/cncr.22654>
4. Ullah MF, Bhat SH, Husain E, Abu-Duhier F, Hadi SM, Sarkar FH, Ahmad A (2014) Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. *Phytochem Rev* 13:811–833. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9341-9>
5. Abuajah CI, Ogbonna AC, Osuji CM (2015) Functional components and medicinal properties of food: a review. *J Food Sci Technol* 52:2522–2529. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5>
6. Na G, He C, Zhang S, Tian S, Bao Y, Shan Y (2023) Dietary Isothiocyanates: Novel Insights into the Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci* 24:1962. <https://doi.org/10.3390/ijms24031962>
7. Lee J (2023) Current Treatment Landscape for Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *J Clin Med* 12:. <https://doi.org/10.3390/JCM12041524>
8. Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75:311–335. https://doi.org/10.1021/NP200906S/SUPPL_FILE/NP200906S_SI_001.XLS
9. Tomczyk J, Olejnik A (2010) Sulforafan - Potencjalny czynnik w prewencji i terapii chorób nowotworowych. *Postepy Hig Med Dosw* 64:590–603
10. Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Zhang Y, Shields PG (2004)

Breast Cancer Risk in Premenopausal Women Is Inversely Associated with Consumption of Broccoli, a Source of Isothiocyanates, but Is Not Modified by GST Genotype. *J Nutr* 134:1134–1138. <https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1134>

11. Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, Cheng JR, Shu XO, Gao YT, Zheng W (2003) Urinary isothiocyanate levels, Brassica, and human breast cancer. *Cancer Res* 63:3980–3986
12. Kuran D, Pogorzelska A, Wiktorska K (2020) Breast cancer prevention-is there a future for sulforaphane and its analogs? *Nutrients* 12:2020–2021. <https://doi.org/10.3390/nu12061559>
13. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM (2018) Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1391–1405. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1259983>
14. Sarno F, Dell’aversana C, Cappetta D, Megchelenbrink WL, Obidiro O, Battogtokh G, Akala EO (2023) Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796>
15. Zhu S, Wu Y, Song B, Yi M, Yan Y, Mei Q, Wu K (2023) Recent advances in targeted strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* 16:100. <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01497-3>
16. Wessel M, Wyant T, Peña C, Caberra M, Alteri R, Zhang Q, Lubejko B, Petri D, Merrick L, Eidsmoe K, Lovely B, Thomas C, Henkle T, Grenne B, Daflin-Davis R (2019) Common treatment approaches
17. Gupta P, Raj Neupane Y, Aqil M, Kohli K, Sultana Y (2023) Lipid-based nanoparticle-mediated combination therapy for breast cancer management: a comprehensive review. *Drug Deliv Transl Res* 13:2739–2766. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01366-z>
18. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H (2017) Combination therapy in combating cancer. *Impact Journals, LLC*
19. Kustra M, Nowara E (2010) Liposomalna doksorubicyna (Myocet®) z cyklofosfamidem jako terapia pierwszego rzutu w rozsiałym raku piersi u chorej po uprzednim stosowaniu doksorubicyny w leczeniu uzupełniającym. *Onkol w Prakt Klin supl. A:A25–A27*
20. Aloss K, Hamar P (2023) Recent Preclinical and Clinical Progress in Liposomal Doxorubicin. *Pharmaceutics* 15:. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030893>
21. Kong C-Y, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan Y-P, Teng T, Yan L, Tang Q-Z (2022) Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci* 2022:760–770. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65258>
22. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS (2010) Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* 115:155. <https://doi.org/10.1159/000265166>
23. Takemura G, Fujiwara H (2007) Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog Cardiovasc Dis* 49:330–352. <https://doi.org/10.1016/J.PCAD.2006.10.002>
24. Zeng W, Luo Y, Gan D, Zhang Y, Deng H, Liu G (2023) Advances in Doxorubicin-based nano-drug delivery system in triple negative breast cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11
25. Fulton MD, Najahi-Missaoui W (2023) Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now. *Int J Mol Sci* 24:6615. <https://doi.org/10.3390/IJMS24076615>

26. Wang S, Chen Y, Guo J, Huang Q (2023) Molecular Sciences Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review. <https://doi.org/10.3390/ijms24032643>
27. Clogston JD, Patri AK (2011) Zeta Potential Measurement. *Methods Mol Biol* 697:63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
28. Fan Y, Marioli M, Zhang K (2021) Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal* 192:113642. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113642>
29. Kapoor M, Lee SL, Tyner KM (2017) Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective. *AAPS J* 19:632–641. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0049-9>
30. Barenholz Y (2012) Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release* 160:117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
31. Wang H, Huang Y (2020) Combination therapy based on nano codelivery for overcoming cancer drug resistance. *Med Drug Discov* 6:100024. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100024>
32. Li Z, Liu J, Sun Z, Li Y, Yu B, Zhao F, Wang H, Xu H (2022) Nanomicelles co-loaded with doxorubicin and salvianolic acid A for breast cancer chemotherapy. *Cancer Nanotechnol* 13:1–22. <https://doi.org/10.1186/S12645-022-00127-W/FIGURES/9>
33. Vakilinezhad MA, Amini A, Dara T, Alipour S (2019) Methotrexate and Curcumin co-encapsulated PLGA nanoparticles as a potential breast cancer therapeutic system: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 184:110515. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.110515>
34. Liu Q, Li J, Pu G, Zhang F, Liu H, Zhang Y (2016) Co-delivery of baicalein and doxorubicin by hyaluronic acid decorated nanostructured lipid carriers for breast cancer therapy. *Drug Deliv* 23:1364–1368. https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1031295/ASSET/9E853D35-72BB-484B-B628-D16B10FE9070/ASSETS/IMAGES/IDRD_A_1031295_F0002_B.JPG
35. Rahmani A, Rahimi F, Iranshahi M, Kahroba H, Zarebkohan A, Talebi M, Salehi R, Mousavi HZ (2021) Co-delivery of doxorubicin and conferone by novel pH-responsive β -cyclodextrin grafted micelles triggers apoptosis of metastatic human breast cancer cells. *Sci Rep* 11:. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-00954-8>
36. Kamal MM, Akter S, Lin CN, Nazzal S (2020) Sulforaphane as an anticancer molecule: mechanisms of action, synergistic effects, enhancement of drug safety, and delivery systems. *Arch Pharm Res* 43:371–384. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01225-2>
37. Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, Tsubura A (2010) Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 30:3381–3390
38. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Deregowska A, Wnuk M (2017) Sulforaphane-induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells. *Theranostics* 7:3461–3477. <https://doi.org/10.7150/thno.20657>
39. Rong Y, Huang L, Yi K, Chen H, Liu S, Zhang W, Yuan C, Song X, Wang F (2020) Co-administration of sulforaphane and doxorubicin attenuates breast cancer growth by preventing the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett* 493:189–196. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.041>

40. Coutinho L de L, Junior TCT, Rangel MC (2023) Sulforaphane: An emergent anti-cancer stem cell agent. *Front Oncol* 13:. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1089115>
41. Zanichelli F, Capasso S, Cipollaro M, Pagnotta E, Carteni M, Casale F, Iori R, Galderisi U (2012) Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age (Omaha)* 34:281–293. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9231-7>
42. Saavedra-Leos MZ, Jordan-Alejandro E, Puente-Rivera J, Silva-Cázares MB (2022) Molecular Pathways Related to Sulforaphane as Adjuvant Treatment: A Nanomedicine Perspective in Breast Cancer. *Med.* 58
43. Bose C, Awasthi S, Sharma R, Beneš H, Hauer-Jensen M, Boerma M, Singh SP (2018) Sulforaphane potentiates anticancer effects of doxorubicin and attenuates its cardiotoxicity in a breast cancer model. *PLoS One* 13:1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193918>
44. Bao Y, Wang W, Zhou Z, Sun C (2014) Benefits and Risks of the Hormetic Effects of Dietary Isothiocyanates on Cancer Prevention. *PLoS One* 9:114764. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114764>
45. Hanlon N, Coldham N, Gielbert A, Kuhnert N, Sauer MJ, King LJ, Ioannides C (2008) Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat. *Br J Nutr* 99:559–564. <https://doi.org/10.1017/S0007114507824093>
46. Pal S, Badireenath Konkimalla V (2016) Hormetic Potential of Sulforaphane (SFN) in Switching Cells' Fate Towards Survival or Death. *Mini-Reviews Med Chem* 16:980–995. <https://doi.org/10.2174/1389557516666151120115027>
47. Liang J, Hänsch GM, Hübner K, Samstag Y (2019) Sulforaphane as anticancer agent: A double-edged sword? Tricky balance between effects on tumor cells and immune cells. *Adv Biol Regul* 71:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.11.006>
48. Ambrosone CB, Zirpoli GR, Hutson AD, Mccann WE, Mccann SE, Barlow WE, Kara ;, Kelly M, Cannioto R, Lara ;, Sucheston-Campbell E, Hershman DL, Unger JM, Halle ;, Moore CF, Stewart JA, Isaacs C, Hobday TJ, Salim ; Muhammad, Gabriel ;, Hortobagyi N, Gralow JR, George ;, Budd T, Albain KS (2019) Dietary Supplement Use During Chemotherapy and Survival Outcomes of Patients With Breast Cancer Enrolled in a Cooperative Group Clinical Trial (SWOG S0221). *J Clin Oncol* 38:804–814. <https://doi.org/10.1200/JCO.19>
49. Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P (2002) Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: Pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 316:43–53. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00727-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00727-6)
50. Royston KJ, Udayakumar N, Lewis K, Tollefsbol TO (2017) A novel combination of withaferin A and sulforaphane inhibits epigenetic machinery, cellular viability and induces apoptosis of breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18051092>
51. Milczarek M, Wiktorska K, Mielczarek L, Koronkiewicz M, Dąbrowska A, Lubelska K, Matosiuk D, Chilmonczyk Z (2018) Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. *Food Chem Toxicol* 111:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.056>
52. Skupinska K, Misiewicz-Krzeminska I, Lubelska K, Kasprzycka-Guttman T (2009) The effect

- of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells. *Toxicol Vitro* 23:763–771. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.001>
53. Cierpiął T, Łuczak J, Kwiatkowska M Organofluorine Isoselenocyanate Analogues of Sulforaphane: Synthesis and Anticancer Activity Tomasz
 54. Feng J, Iyer A, Seo Y, Broaddus C, Liu B, VanBrocklin H, He J (2013) Effects of size and targeting ligand on biodistribution of liposome nanoparticles in tumor mice. *J Nucl Med* 54:1339 LP – 1339
 55. Samimi S, Maghsoudnia N, Eftekhari RB, Dorkoosh F (2019) Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. *Charact Biol Nanomater Drug Deliv Nanosci Nanotechnol Drug Deliv* 47–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9>
 56. Gkionis L, Aojula H, Harris LK, Tirella A (2021) Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics. *Int J Pharm* 604:.. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120711>
 57. Duarte D, Vale N (2022) Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Curr Res Pharmacol Drug Discov* 3:100110. <https://doi.org/10.1016/J.CRPCHAR.2022.100110>
 58. Jackson SJTT, Singletary KW (2004) Sulforaphane: A naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis* 25:219–227. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg192>
 59. Böckelmann L, Starzonek C, Niehoff AC, Karst U, Thomale J, Schlüter H, Bokemeyer C, Aigner A, Schumacher U (2020) Detection of doxorubicin, cisplatin and therapeutic antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded human cancer cells. *Histochem Cell Biol* 153:367–377. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01857-x>
 60. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW (2007) The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol* 88:351–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>
 61. Zhou T, Zhou M, Tong C, Zhuo M (2022) Cauliflower bioactive compound sulforaphane inhibits breast cancer development by suppressing NF-κB /MMP-9 signaling pathway expression. *Cell Mol Biol* 2022:134–143. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.4.17>
 62. Castro NP, Rangel MC, Merchant AS, MacKinnon G, Cuttitta F, Salomon DS, Kim YS (2019) Sulforaphane suppresses the growth of tripleneegative breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Cancer Prev Res* 12:147–158. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0241>
 63. Huang Z, Yu P, Tang J (2020) Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Onco Targets Ther* 13:5395. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>
 64. Naujokat C, McKee DL (2020) The “Big Five” Phytochemicals Targeting Cancer Stem Cells: Curcumin, EGCG, Sulforaphane, Resveratrol and Genistein. *Curr Med Chem* 28:4321–4342. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200228110738>
 65. Que H, Fu Q, Lan T, Tian X, Wei X (2022) Tumor-associated neutrophils and neutrophil-targeted cancer therapies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1877:188762. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188762>

11. Osiągnięcia

11.1. Publikacje wchodzące w skład rozprawy

- Kuran, D., **Pogorzelska, A.**, & Wiktorska, K. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?. *Nutrients*, *12*(6), 1559. <https://doi.org/10.3390/nu12061559> (IF **5,719**; **140** pkt. MNiSW, **28** cytacji)
- **Pogorzelska, A.**, Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *161*, 114490. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114490> (IF **6,9**; **100** pkt. MNiSW, **25** cytacji)
- **Pogorzelska, A.**, Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Scientific reports*, *14*(1), 16016. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65455-w> (IF **3,8**; **140** pkt. MNiSW, **1** cytacja)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) opublikowanych publikacji wchodzących w skład cyklu wynosi **16,419**, a punktacja MNiSW **380**.

11.2. Publikacje poza cyklem będące efektem udziału w projektach badawczych

- Milczarek, M., **Pogorzelska, A.**, & Wiktorska, K. (2021). Synergistic Interaction between 5-FU and an Analog of Sulforaphane-2-Oxoethyl Isothiocyanate-In an In Vitro Colon Cancer Model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(10), 3019. <https://doi.org/10.3390/molecules26103019> (IF = **4,927**; **140** pkt. MNiSW, **15** cytacji)
- Bocian, W., Naumczuk, B., Urbanowicz, M., Sitkowski, J., Bednarek, E., Wiktorska, K., **Pogorzelska, A.**, Wielgus, E., & Kozerski, L. (2022). Insight on the Interaction between the Camptothecin Derivative and DNA Oligomer Mimicking the Target of Topo I Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(20), 6946. <https://doi.org/10.3390/molecules27206946> (IF = **4,6**; **140** pkt. MNiSW, **5** cytacji)
- Łyczko, K., Pogorzelska, A., Częścik, U., Koronkiewicz, M., Rode, J. E., Bednarek, E., Kawęcki, R., Węgrzyńska, K., Baraniak, A., Milczarek, M., & Dobrowolski, J. C. (2024). Tricarbonyl rhenium(i) complexes with 8-hydroxyquinolines: structural, chemical, antibacterial, and anticancer characteristics. *RSC advances*, *14*(25), 18080–18092. <https://doi.org/10.1039/d4ra03141e> (IF = **3,9**; **100** pkt. MNiSW, **5** cytacje)

11.3. Projekty pozyskane ze źródeł zewnętrznych

- Kierownik projektu NCN PRELUDIUM 20 pt. „Poszukiwanie molekularnych celów dla przełamania oporności na doksorubicynę potrójnie ujemnego raka piersi z zastosowaniem innowacyjnych nośników leków i terapii kombinowanej” (2021/41/N/NZ7/02530)

11.4. Udział w projektach badawczych

- Wykonawca w projekcie NCN OPUS 24 pt. „Chiralne kompleksy renu i rodu o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwbakteryjnym: synteza, aktywność, właściwości fizykochemiczne” (2021/41/N/NZ7/02530)
- Wykonawca w projekcie NCN OPUS 14 pt. „Badania mechanizmu alkilowania oligomerów DNA z użyciem nowych inhibitorów Top I z rodziny kamptotecyny metodami fizykochemii organicznej i testami biologicznymi w aspekcie zastosowania w celowanej chemioterapii onkologicznej” (2017/27/B/ST4/00190)
- Wykonawca w projekcie Inkubator Innowacyjności 4.0 „Drobnocząsteczkowe inhibitory wybranych czynników transkrypcyjnych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe”. pod kierownictwem dr hab. Tomasza Wilanowskiego (Uniwersytet Warszawski)
- Współpraca naukowa jako specjalista mikroskopii konfokalnej w projekcie „Rozwój i wizualizacja hodowli komórkowej sferoidów 3D” pod kierownictwem dr hab. Beaty Gruber-Bzura, (Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków)
- Wykonawca w projekcie Inkubator Innowacyjności 2.0 „Formulacje farmaceutyczne sulforafanu do zastosowań w terapiach przeciwnowotworowych” pod kierownictwem prof. Macieja Mazura (Uniwersytet Warszawski)
- Wykonawca w projekcie „Opracowanie innowacyjnego suplementu diety dla osób cierpiących na cukrzycę, hipercholesterolemię oraz osób odchudzających się” w ramach projektu bony na innowacje: (POIR.02.03.02-14-0064/18)2019), w efekcie którego opracowano suplement diety Reducan[®].
- Współpraca naukowa w ramach testów *in vitro* aktywności przeciwnowotworowej nowo zsyntetyzowanych cząstek z prof. Piotrem Kielbasińskim (Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź)

11.5. Współautorstwo zgłoszeń patentowych

- Formułacja farmaceutyczna o kontrolowanym uwalnianiu doksorubicyny, zastosowanie formułacji w farmacji oraz do wytwarzania leku przeciwnowotworowego, P.449059 (28.06.2024)
- Drobnocząsteczkowe inhibitory czynników transkrypcyjnych GRHL do zastosowania w leczeniu nowotworów, zwłaszcza raka jelita grubego, P.442297 (15.09.2022)
- Nośnik lipidowy leku, formułacja farmaceutyczna, ich zastosowania oraz sposób wytwarzania nośnika lipidowego leku, nośnik otrzymany takim sposobem oraz jego zastosowania, P.439632 (23.11.2021)

11.6. Udział w konferencjach krajowych

- „Modyfikacja liposomalnej doksorubicyny poprzez inkorporację związków pochodzenia roślinnego w terapii potrójnie ujemnego raka piersi”, IV edycja Konferencji Ogólnopolskiej „Medyczne Targi Wiedzy”, prezentacja ustna, 1.12.2023, Kraków
- „Działanie przeciwnowotworowe i bezpieczeństwo preparatu liposomalnego doksorubicyny i nutraceutyku sulforafanu w modelu zwierzęcym potrójnie ujemnego raka piersi”, prezentacja ustna, XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 29-30.06.2023, Toruń

- „Poszukiwanie molekularnych celów dla przełamania oporności na doksorubicynę potrójnie ujemnego raka piersi z zastosowaniem innowacyjnych nośników leków i terapii kombinowanej”, prezentacja ustna, seminarium wewnętrzne, Narodowy Instytut Leków, 18.10.2022, Warszawa
- 9. Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne „Symbioza”, Warszawskie Stowarzyszenie Biotechnologiczne (WSB) „Symbioza”, udział bierny, 21-23.05.2021, Warszawa

11.7. Udział w konferencjach międzynarodowych

- „Exploring Hormetic Effects: Sulforaphane's Role in Triple-Negative Breast Cancer via In Vitro and In Vivo Models”, prezentacja posterowa, XIIth Intercollegiate Biotechnology Symposium “Symbioza”, 16-18.05.2024, Warszawa, Polska
- „Enhancing Triple-negative breast cancer Treatment: Sulforaphane-Doxorubicin Liposomal Formulation for Targeted Therapy and Chemoprotection”, prezentacja posterowa, The 48th FEBS Congress, 29.06-03.07.2024, Mediolan, Włochy
- „Investigating the Impact of Sulforaphane on Triple-Negative Breast Cancer Using *In Vitro* and *In Vivo* Models: Insights into Hormetic Effects”, prezentacja posterowa, Interdisciplinary conference on drug sciences, ACCORD, 23-25.05.2024, Warszawa, Polska
- „Anticancer effect of 5-fluorouracil and sulforaphane combined treatment in *in vivo* model of triple-negative breast cancer”, prezentacja posterowa, Interdisciplinary conference on drug sciences, ACCORD, 23-25.05.2024, Warszawa, Polska
- „The impact of plant compounds with anti-cancer properties on liposomal doxorubicin in triple negative breast cancer oncological therapy”, prezentacja ustna, Interdisciplinary conference on drug sciences, ACCORD, 23-25.05.2024, Warszawa, Polska
- „Sulforaphane Hormetic Effects in Triple Negative Breast Cancer: Insights from *In Vitro* and *In Vivo* Models”, prezentacja ustna, The Natural Science Baltic Conference, 20-21.04.2024, online
- „The impact of plant compounds with anti-cancer properties on liposomal doxorubicin in triple negative breast cancer oncological therapy”, prezentacja ustna, The Natural Science Baltic Conference, 20-21.04.2024, online
- „Antitumour and antimetastatic activity of dietary dose of sulforaphane in the model of triple-negative breast cancer”, prezentacja posterowa, XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, 24.11.2023, Łódź, Polska
- „Anticancer effect of 5-fluorouracyl and 4-isoselenocyanato-1-butyl 4'-fluorobenzyl sulfoxide combined treatment in *in vivo* model of triple negative breast cancer”, prezentacja posterowa, XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, 24.11.2023, Łódź, Polska
- „Study of the cytotoxic and antimicrobial activity of new rhenium complexes”, prezentacja posterowa, XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, 24.11.2023, Łódź, Polska
- „Antitumor effect and safety of liposomal preparation of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane in an animal model of triple-negative breast cancer”, prezentacja ustna, 1st International Conference for doctoral students and young scientists, OncoPhD, 20-22.10.2023, Lublin, Polska
- „Nutraceutical Sulforaphane impact on mitochondrial morphology and ROS level in an *in vitro* model of normal tissue”, prezentacja posterowa, LW 10th Mitochondrion Meeting 2023, 20-21.06.2023, online
- „4-Isoselenocyanato-1-butyl 4'-fluorobenzyl sulfoxide potentiates anticancer drugs activity”, prezentacja posterowa, XXIII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, 28.10.2022, Łódź, Polska

- „The enhanced activity of doxorubicin in breast cancer therapy due to sulforaphane properties”, prezentacja posterowa, Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, ACCORD, 26-28.05.2022, Warszawa, Polska
- „The augmented activity of doxorubicin and reduced cardiotoxicity in breast cancer therapy due to sulforaphane properties”, prezentacja posterowa, Webinar on Breast Cancer, Endeavor Research, 19.07.2021, online

11.8. Pozostałe osiągnięcia

- Wykonywanie ekspertyz badawczych leków techniką mikroskopii konfokalnej i cytometrii przepływowej
- Faktyczna opieka nad studentami wykonującymi badania do prac inżynierskich i magisterskich w zakładzie Badań Biomedycznych w Narodowym Instytucie Leków

12. Załączniki

Wykaz załączników:

Załącznik 1

Kuran, D., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2020). Breast Cancer Prevention-Is there a Future for Sulforaphane and Its Analogs?. *Nutrients*, 12(6), 1559. <https://doi.org/10.3390/nu12061559>

Załącznik 2

Pogorzelska, A., Mazur, M., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Sigorski, D., Fronczyk, K., & Wiktorska, K. (2023). Anticancer effect and safety of doxorubicin and nutraceutical sulforaphane liposomal formulation in triple-negative breast cancer (TNBC) animal model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 161, 114490. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023>

Załącznik 3

Pogorzelska, A., Świtalska, M., Wietrzyk, J., Mazur, M., Milczarek, M., Medyńska, K., & Wiktorska, K. (2024). Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Scientific reports*, 14(1), 16016. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65455-w>

Załącznik 4

Oświadczenia współautorów publikacji.