



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

# **AUTOREFERAT**

**dr Tomasz Kowalczyk**  
(załącznik 2)

**Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki**  
**Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**  
**Uniwersytet Łódzki**

Łódź, 2022

## Spis treści

1. Dane personalne .....	3
2. Posiadane dyplomy oraz stopnie naukowe .....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) .....	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	3
4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe .....	4
4.3. Wstęp .....	5
4.4. Cel naukowy osiągnięcia .....	9
4.5. Omówienie wyników .....	11
4.6. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań .....	29
4.7. Wykaz cytowanej literatury .....	30
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej .....	33
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę .....	34
7. Inne osiągnięcia .....	36
7.1. Nagrody i wyróżnienia .....	36
7.2. Kursy i szkolenia .....	37
8. Inna aktywność .....	39
9. Podsumowanie danych bibliometrycznych .....	40

1. Dane personalne:  
Imię i nazwisko – **Tomasz Kowalczyk**
2. Posiadane dyplomy oraz stopnie naukowe:
  - 2013r. **Studia podyplomowe w zakresie zarządzania badaniami naukowymi i komercjalizacji wyników badań**  
Wydział Ekonomiczno-Socjologiczny, Uniwersytet Łódzki
  - 2012r. **Stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych w zakresie biologii**  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki  
Rozprawa doktorska pt. „Konstrukcja kaset ekspresyjnych genu kodującego białko fuzyjne ELP-AcGFP1 wyposażone w samowycinający się system intein podzielonych”
  - 2007r. **Magister biologii, specjalność: biotechnologia drobnoustrojów i roślin**  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki praca magisterska pt. „Ekspresja transgenu kodującego fuzyjne białko ELP-GUSplus w kulturach zawieszinowych *Nicotiana tabacum*”
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych  
**01.04.2012** – obecnie **adiunkt naukowo-dydaktyczny**  
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).
  - 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego  
**„Roślinne kultury *in vitro* jako źródło wybranych metabolitów wtórnych o potencjalnym znaczeniu medycznym”**  
Osiągnięcie naukowe stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji (P1-P6). Oświadczenia współautorów publikacji składających się na osiągnięcie naukowe oraz kopie tych publikacji zostały umieszczone w odrębnych załącznikach: oświadczenia współautorów (załącznik 5), kopie publikacji (załącznik 6).

## 4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

P1	<b>Kowalczyk, T.,</b> Merez-Sadowska, A., Picot, L.; Brčić Karačonji, I., Wieczfinska, J., Śliwiński, T., Sitarek, P. (2022). Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications. <i>Molecules</i> , 27, 795		
	Punkty MNiSW <sub>2021</sub>	IF <sub>2021</sub>	Liczba cytowań <sub>Scopus</sub>
	<b>140</b>	<b>4.927</b>	<b>3</b>
P2	<b>Kowalczyk, T.,</b> Sitarek, P., Skala, E., Toma, M., Wielanek, M., Pytel, D., Wieczfinska, J., Szemraj, J., Śliwiński, T. (2019). Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from <i>Menyanthes trifoliata</i> L. in human cancer cells. <i>Cytotechnology</i> 71, 165–180		
	Punkty MNiSW <sub>2019</sub>	IF <sub>2019</sub>	Liczba cytowań
	<b>40</b>	<b>1.777</b>	<b>28</b>
P3	<b>Kowalczyk, T.,</b> Sitarek, P., Skala, E., Rijo, P., Andrade, J. M., Synowiec, E., Szemraj, J., Krajewska, U., Śliwiński, T. (2019). An evaluation of the DNA-protective effects of extracts from <i>Menyanthes trifoliata</i> L. plants derived from in vitro culture associated with redox balance and other biological activities. <i>Oxidative medicine and cellular longevity</i> , 165784		
	Punkty MNiSW <sub>2019</sub>	IF <sub>2019</sub>	Liczba cytowań
	<b>100</b>	<b>5.076</b>	<b>6</b>
P4	<b>Kowalczyk, T.,</b> Sitarek, P., Toma, M., Picot, L., Wielanek, M., Skala, E., Śliwiński, T. (2020). An extract of transgenic <i>Senna obtusifolia</i> L. hairy roots with overexpression of <i>PgSS1</i> gene in combination with chemotherapeutic agent induces apoptosis in the leukemia cell line. <i>Biomolecules</i> , 10 (4):510		
	Punkty MNiSW <sub>2020</sub>	IF <sub>2020</sub>	Liczba cytowań
	<b>100</b>	<b>4.879</b>	<b>12</b>
P5	<b>Kowalczyk, T.,</b> Sitarek, P., Toma, M., Rijo, P., Domínguez-Martín, E., Falcó, I., Sánchez, G., Śliwiński, T. (2021). Enhanced accumulation of betulinic acid in transgenic hairy roots of <i>Senna obtusifolia</i> growing in the sprinkle bioreactor and evaluation of their biological properties in various biological models. <i>Chemistry &amp; biodiversity</i> , 18 (8), e2100455		
	Punkty MNiSW <sub>2020</sub>	IF <sub>2020</sub>	Liczba cytowań
	<b>70</b>	<b>2.745</b>	<b>6</b>
P6	<b>Kowalczyk, T.,</b> Sitarek, P., Merez-Sadowska, A., Szyposzyńska, M., Splawska, A., Gorniak, L., Bijak, M., Śliwiński, T. (2021). Methyl jasmonate effect on betulinic acid content and biological properties of extract from <i>Senna obtusifolia</i> transgenic hairy roots. <i>Molecules</i> , 26 (20):6208		
	Punkty MNiSW <sub>2021</sub>	IF <sub>2021</sub>	Liczba cytowań
	<b>140</b>	<b>4.927</b>	<b>2</b>
<b>Łącznie</b>	<b>590</b>	<b>24.331</b>	<b>57</b>

#### 4.3. Wstęp

Produkty pochodzenia naturalnego od zawsze stanowiły niezwykle ważny element w życiu człowieka. Związki biologicznie czynne produkowane przez bakterie, grzyby, zwierzęta czy rośliny były i są ważnym komponentem diety oraz podstawą wielu suplementów lub preparatów leczniczych (Devi i wsp. 2020; Pham i wsp. 2019; Santos i wsp. 2020; Sung i wsp. 2021; Thomford i wsp. 2018). Wśród tych licznych i różnorodnych źródeł cennych związków o szerokim zastosowaniu rośliny zajmują szczególnie ważne miejsce. Od niepamiętnych czasów przekazywana przez kolejne pokolenia wiedza o leczniczym działaniu roślin była podstawą terapii wielu chorób ludzi na całym świecie. Najstarsze znane dowody medycznego wykorzystania roślin pochodzą z sumeryjskiej płyty z Nagpur sprzed około 5000 lat, gdzie utrwalono przepisy wykorzystujące 250 różnych ziół leczniczych (Bhardwaj S. i wsp. 2018). Chińskie źródła takie jak księga „Pen T'Sao”, autorstwa cesarza Shen Nunga powstała około 2500 roku p.n.e., indyjskie święte księgi Wedy, czy Papirus Ebersa, napisany ok. 1550 r. p.n.e., to zbiory opisujące istotny udział roślin takich jak m.in. aloes, czosnek, jałowiec czy cebula w terapii szerokiego spektrum schorzeń (Kumar Srivastava, 2018). Obecnie, również wiele stosowanych powszechnie suplementów i leków bazuje na związkach pochodzenia roślinnego, są to m.in. paklitaksel (z *Taxus brevifolia*), winblastyna i winkrystyna (z *Catharanthus roseus*) czy atropina (z *Atropa belladonna*) wykorzystywane rutynowo w leczeniu chorób nowotworowych, premedykacji przed znieczuleniem ogólnym czy w okulistyce (Nobre i wsp. 2019; Wright i wsp. 2019; Zhang i wsp. 2014). Oczywiście jest, że używany w celach medycznych materiał roślinny pochodził pierwotnie z naturalnych stanowisk, a jego zbiór prowadzony był najczęściej w sposób niekontrolowany. Działanie takie doprowadziło w wielu przypadkach do niebezpiecznego zubożenia zasobów środowiskowych. Ogromny wzrost zapotrzebowania na produkty pochodzenia roślinnego w naturalny sposób wymusił prace związane z zapewnieniem alternatywnego do środowiska naturalnego źródła roślinnych związków biologicznie czynnych. Potężne możliwości dzisiejszej biotechnologii roślin bazujące na opracowaniu wydajnych technik ich rozmnażania w warunkach *in vitro*, optymalizacji hodowli nawet w bardzo dużej skali oraz wprowadzaniem określonych modyfikacji do ich genomu pozwoliły znacząco zwiększyć ilość materiału roślinnego, oraz w wielu przypadkach podwyższyć jego produktywność lub nadawać nowe pożądane właściwości bez ingerencji w środowisko naturalne. Dzisiejsze strategie utrzymywania cennych z medycznego punktu widzenia komórek i tkanek roślin w warunkach *in vitro* na sztucznych podłożach w sposób znaczący poszerzają wachlarz możliwych ich zastosowań

(Espinosa-Leal i wsp. 2018; Isah i wsp. 2018). Kultury takie, bazujące na totipotencji komórki roślinnej i prowadzone w określonych warunkach są dziś punktem wyjścia dla masowej produkcji m.in. roślinnych metabolitów wtórnych o pożądanych właściwościach. Dodatkowo możliwość stosowania tu szerokiego spektrum dostępnych narzędzi inżynierii genetycznej w połączeniu z wydajnymi metodami transgenezy otwiera dziś całkowicie nowe możliwości otrzymywania kultur roślinnych o zupełnie nowym potencjale. Skuteczna ingerencja w wybrane szlaki metaboliczne prowadzić może do otrzymywania nowych wysokowydajnych kultur roślinnych, które z powodzeniem wypierają tradycyjnie stosowany niemodyfikowany materiał roślinny jako źródło związków biologicznie czynnych stosowanych w różnych gałęziach przemysłu (Fuentes i wsp. 2018; Guerriero i wsp. 2018; Marchev i wsp. 2020). Wśród rutynowo wykorzystywanych dziś m.in. zawieszinowych kultur komórkowych, kultur kalusa, zregenerowanych transgenicznych roślin czy kultur korzeni włośnikowatych, te ostatnie wyróżniają się szczególnie interesującym potencjałem.

Korzenie te pojawiają się na tkance roślinnej w wyniku jej infekcji przez gram-ujemną bakterię glebową *Rhizobium rhizogenes*, która posiada naturalną zdolność przenoszenia informacji genetycznej zawartej w plazmidzie Ri do komórki roślinnej w złożonym wieloetapowym procesie (Guo i wsp. 2019). Finalnie dochodzi do intensywnego rozrostu korzeni włośnikowatych odznaczających się specyficznymi cechami takimi jak: szybki przyrost biomasy niezależny od regulatorów wzrostu, plagiotropizm, bogato rozgałęziona struktura korzeni bocznych czy brak geotropizmu. Nie bez znaczenia pozostaje tu również wysoka stabilność genetyczna w porównaniu np. do tkanki kalusowej (Gutierrez-Valdes i wsp. 2020). Te pożądane właściwości opisanych korzeni czynią je szczególnie często wykorzystywanym modelem dla produkcji rekombinowanych białek czy cennych z punktu widzenia człowieka metabolitów wtórnych. Transgeniczne korzenie włośnikowate posiadają interesujący potencjał, ponieważ możliwość wprowadzania do ich genomu dodatkowych genów może skutkować modyfikacjami istniejących w nich naturalnych szlaków metabolicznych i w konsekwencji prowadzić do wydajniejszego wytwarzania użytecznych związków o konkretnym zastosowaniu. To właśnie wykorzystanie tzw. inżynierii metabolicznej leży obecnie u podstaw tworzenia nowoczesnych wysokowydajnych roślinnych kultur *in vitro* wychodzących naprzeciw ogromnemu zapotrzebowaniu różnych gałęzi przemysłu na cenne fitozwiązki. W literaturze dostępnych jest wiele wyników badań potwierdzających możliwość znacznego zwiększania produktywności opisywanych kultur przy zastosowaniu różnych strategii biotechnologicznych. Przykładem może być praca Fu i wsp. w której autorzy, wprowadzając do genomu korzeni włośnikowatych *Salvia miltiorrhiza* dwa geny (kodujące

syntazę kwasu rozmarynowego *RAS* oraz monoksygenazę zależną od cytochromu P450 (*CYP98A14*) i doprowadzając do ich nadekspresji, uzyskali produkcję nawet trzykrotnie większej ilości kwasów fenolowych w liniach transgenicznym korzeni w porównaniu z korzeniami nietransgenicznymi, co potwierdzono badaniem zdolności antyoksydacyjnej w teście DPPH. Ekstrakty pochodzące ze zmodyfikowanych korzeni włośnikowatych wykazywały silniejsze działanie przeciwutleniające i przeciwbakteryjne niż ekstrakty z korzeni nietransgenicznym oraz silniejsze działanie przeciwbakteryjne w porównaniu z liniami kontrolnymi (Fu i wsp. 2020). Także Luo i wsp. (Luo i wsp. 2020) udowodnili, że nadekspresja czynnika transkrypcyjnego TrMYB4 może wpływać na znaczne podwyższenie produkcji flawonoidów i rutyny w transgenicznym korzeniach włośnikowatych *Fagopyrum cymosum*. Oba przedstawione powyżej przykłady wraz z wieloma innymi potwierdzają możliwość wyprowadzenia wydajnych kultur roślinnych będących doskonałą, opłacalną oraz ekologiczną alternatywą w porównaniu z naturalnie występującymi w środowisku naturalnym roślinami. Dodatkowo możliwość jednoczesnego łączenia wielu strategii biotechnologicznych takich jak hodowla kultur korzeni włośnikowatych w dużej skali w specjalnie opracowanych w tym celu bioreaktorach wraz z zastosowaniem odpowiednich elicytorów dodatkowo może zwiększać możliwości opisywanych układów biologicznych w tak pożądanym sektorach, jak przemysł farmaceutyczny czy spożywczy (Eibl i wsp. 2018; Sabater-Jara i wsp. 2010).

Roślinne metabolity wtórne ze względu na wiele właściwości biologicznych od dłuższego już czasu koncentrują na sobie dużą uwagę badaczy. Ta grupa związków organicznych, chociaż nie jest bezpośrednio zaangażowana we wzrost i rozwój organizmu, pełni w nim niezwykle ważną rolę. Produkowane są one m.in. w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska, atak patogenów czy jako repelenty dla roślinożerców będąc również atraktantami dla owadów lub odgrywając ważną rolę w interakcjach między innymi symbiontami (Piasecka i wsp. 2015).

Ogromnym wyzwaniem dzisiejszej nauki oprócz próby uzyskania wysokowydajnych systemów roślinnych pozostaje poznanie właściwości biologicznych ponad 100 000 znanych obecnie roślinnych metabolitów wtórnych i w konsekwencji wskazanie oraz potwierdzenie ich potencjalnej przydatności m.in. w nowoczesnych formach terapii chorób człowieka. Opisywane związki dzieli się najczęściej na: fenole, alkaloidy, terpenoidy czy steroidy. Dla przedstawicieli każdej z tych klas istnieją potwierdzone właściwości biologiczne uzasadniające możliwość potencjalnego ich użycia w terapii lub prewencji wielu schorzeń



(Avato and Tava, 2021; Debnath i wsp. 2018; Działo i wsp. 2016; Koczurkiewicz i wsp. 2019; Sajadimajd i wsp. 2019).

Wśród licznych klas cennych dla człowieka roślinnych metabolitów wtórnych szerokie zastosowanie znalazły terpeny. Związki te nazywane również izoterpenoidami uważane są za najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę fitozwiązków (Singh and Sharma, 2015). W organizmach roślinnych odpowiedzialne są najczęściej za ich wybarwienie, zapach czy charakterystyczny smak. Rośliny zawierające terpeny wykorzystywane były przez człowieka już bardzo dawno temu w leczeniu różnych chorób. Przykładem może być zastosowanie żywicy pochodzącej z pistacji terpentynowej (*Pistachia terebinthus*), której bogata w terpeny żywica znalazła szerokie zastosowanie wśród mieszkańców Bliskiego Wschodu w terapii wielu schorzeń. Zresztą sama nazwa tej grupy związków pochodzi od greckiej nazwy wspomnianej rośliny. Wiele wyników badań potwierdza możliwość zastosowania związków należących do grupy terpenów jako czynników o aktywności m.in. antybakteryjnej, przeciwwirusowej, przeciwnowotworowej czy przeciwcukrzycowej (Petrovska, 2012; Pichersky and Raguso, 2018). Ogólnie klasyfikuje się je biorąc pod uwagę liczbę i organizację budujących jednostek izoprenowych o wzorze cząsteczkowym  $C_5H_8$ . Na podstawie wielkości cząsteczki klasyfikuje się terpeny jako: C5 (hemiterpeny), C10 (monoterpeny), C15 (seskwiterpeny), C20 (diterpeny), C25 (sesterpeny), C30 (triterpeny), C40 (tetraterpeny), >C40 (politerpeny) (Singh and Sharma, 2015). Pierwszy etap ich biosyntezy polega na wytworzeniu jednostki C5 (difosforan izopentenylu-IPP lub difosforan dimetyloallilu - DMAPP), której powstawanie może zachodzić w szlaku mewanonianu i fosforanu metyloerytrytolu (MEP). Pierwsza reakcja zachodzi w cytozolu, druga w plastydach roślin.

Triterpeny stanowią co najmniej 50% wszystkich zidentyfikowanych dotychczas terpenów, wśród nich natomiast znaczna część to triterpeny pentacykliczne. Jest to jeden z powodów opisanego w tej grupie dużej ilości związków o charakterze leczniczym (Hordyjewska i wsp. 2019). Przykładami mogą być: kwas oleanolowy, lukrecjowy czy korzozolowy, azjatykozyd, lupeol czy kwas betulinowy (Alqahtani i wsp. 2013). Ten ostatni będący pentacyklicznym triterpenem typu lupanu znany jest od 1788 roku, kiedy to Johann Tobias Lowitz wyizolował zredukowaną jego formę z roślin, określając również, że jest on znaczącym składnikiem zewnętrznej kory brzozy nadającym jej charakterystyczny kolor. Oprócz roślin z rodzaju *Betula* można go również znaleźć w wielu innych takich jak m.in.: głożyna omszona (*Zizyphus mauritiana*), eukaliptus kamadulski (*Eucalyptus camaldulensis*), zawilec (*Anemone raddeana*), bobrek trójlistkowy (*Menyanthes trifoliata*) czy *Senna obtusifolia* znany jako senes tępolistny



lub strączyńiec tępolistny. Wykazano, że wiele roślin produkujących kwas betulinowy posiada właściwości przeciwnowotworowe, ale ze względu na ograniczoną jego naturalną produkcję intensywnie poszukiwane są strategie pozwalające na uzyskanie wysokowydajnych systemów roślinnych produkujących ten cenny metabolit. W syntezie tego związku w układach biologicznych wyróżnia się dwa podstawowe etapy, w których pierwszy obejmuje kondensację difosforanu izopentenylu (IPP) i difosforanu dimetyloallilu (DMAPP) pod wpływem syntazy difosforanu farnezylu (FPS) do cząsteczki difosforanu farnezylu (FPP) którego dwie cząsteczki są kondensowane następnie do skwalenu w reakcji katalizowanej przez syntazę skwalenu (SQS). Następnie związek ten przekształcany jest do oksydoskwalenu w reakcji przeprowadzanej z udziałem eopksydazy skwalenu (SQE) dając 2,3-oksydoskwalen. Drugi etap syntezy polega na przekształceniu tego wyjściowego związku do lupeolu pod wpływem syntazy lupeolu a finalnie do kwasu betulinowego z udziałem enzymów cytochromu P450 (CYP) (An i wsp. 2020).



Ryc. 1. Ogólny i uproszczony schemat syntezy kwasu betulinowego u roślin

Obecnie, wielopoziomowa ingerencja w coraz lepiej poznawane szlaki metaboliczne w połączeniu z różnymi rozwiązaniami technicznymi pozwalającymi na hodowlę komórek i tkanek roślinnych w kontrolowanych warunkach *in vitro* staje się podstawą dla pozyskiwania szerokiej gamy związków biologicznie czynnych. Dodatkowo wiele czynników o charakterze elicytorów w znaczny sposób podwyższa wydajność takich układów. Te ekonomiczne i ekologiczne rozwiązania są już wykorzystywane na szeroką skalę a wiele zalet, które posiadają sprawia, że coraz częściej będą stawały się podstawowym źródłem atrakcyjnych i pożądaných komponentów leczniczych.

#### 4.4. Cel naukowy osiągnięcia

Głównym celem moich badań, będących podstawą przedstawionego osiągnięcia naukowego, była próba uzyskania roślinnych kultur *in vitro* oraz transformacja genetyczna wybranych z nich w celu zmiany zawartości wybranych metabolitów wtórnych ze szczególnym uwzględnieniem kwasu betulinowego poprzez uzyskanie nadekspresji genu dla wybranego

enzymu biorącego udział w szlaku jego biosyntezy. W prezentowanych pracach skupiłem się na określeniu właściwości biologicznych ekstraktów roślinnych pochodzących z *Menyanthes trifoliata* hodowanego w różnych warunkach oraz *Senna obtusifolia*, czyli roślin mających zdolność syntezy tego metabolitu. Dodatkowo w przypadku *S. obtusifolia* otrzymałem transgeniczne korzenie włośnikowate wykazujące nadekspresję genu syntazy skwalenu, które hodowałem następnie w specjalnie przez siebie zaprojektowanym i wykonanym 10-litrowym bioreaktorze zraszającym, finalnie z zastosowaniem elicytora w postaci jasmonianu metylu. W cyklu prac wykazałem antynowotworowe i ochronne właściwości ekstraktów roślinnych odpowiednio w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych. Przeprowadzone badania, wykorzystujące wiele różnych strategii, metod i technik pozwoliły na potwierdzenie, że transformacja genetyczna oraz zastosowanie hodowli transgenicznych tkanek roślinnych na większą skalę w bioreaktorze zraszającym przy odpowiedniej elicytacji może prowadzić do zwiększenia zawartości kwasu betulinowego.

- Część biotechnologiczna prowadzonych badań obejmowała wyprowadzenie kultur *in vitro* *M. trifoliata* oraz *S. obtusifolia* a także ich mikropropagację oraz hodowlę w celu uzyskania materiału roślinnego do badań biologicznych. W przypadku *S. obtusifolia* uzyskany materiał wykorzystano również do transformacji genetycznej w celu indukcji korzeni włośnikowatych drogą agroinfekcji bez/ oraz z konstruktem genetycznym będącym podstawą do uzyskania nadekspresji genu syntazy skwalenu - jednego z enzymów biorących udział w syntezie triterpenów pentacyklicznych.

Badania obejmowały również:

- Charakterystykę otrzymanego materiału roślinnego pod kątem wybranych metabolitów wtórnych m.in. polifenoli, antrachinonów oraz triterpenu pentacyklicznego w postaci kwasu betulinowego.
- W przypadku ekstraktów różnego pochodzenia otrzymanych z *M. trifoliata* zbadano ich cytotoksyczność w stosunku do prawidłowych astrocytów ludzkich oraz komórek glejaka. Określono również wpływ ekstraktów na indukcję zjawiska apoptozy w różnych liniach komórek nowotworowych. W tym zakresie zbadano różnice w poziomie ekspresji genów i białek zaangażowanych w to zjawisko, a także zmiany potencjału błony mitochondrialnej. Dodatkowo sprawdzono oddziaływanie ekstraktów na prawidłowe ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) poprzez badanie ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym i reakcją zapalną. Wykonano także analizę wpływu ekstraktów na uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego DNA, a także poziom ROS w cytoplazmie i mitochondriach

komórek, rozszczenie polimerazy poli(ADP-rybozy) i fosforylację histonu H2AX. Dodatkowo przetestowano wpływ tych ekstraktów na wybrane bakterie i grzyby (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Saccharomyces cerevisiae*).

- W przypadku *S. obtusifolia* badano ekstrakty pochodzące z transgenicznych korzeni włośnikowatych tej rośliny pod względem cytotoxyczności w stosunku do komórek białaczkowych (NALM6) w połączeniu z chemoterapeutykami, glejakowych (U87MG) także raka płuca (A549) i prostaty (DU-145). W przeprowadzonych badaniach przetestowano ekstrakty pod kątem ich wpływu na indukcję apoptozy. Zbadano również wpływ ekstraktów na zmiany poziomu ekspresji białek związanych z apoptozą, zmianę potencjału błon mitochondrialnych, wykonano test klonalności komórek, analizę fragmentacji chromosomalnego DNA oraz możliwość inhibicji topoizomazy I. Ponadto uzyskane ekstrakty sprawdzono także pod kątem działania przeciwdrobnoustrojowego wobec *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Saccharomyces cerevisiae*, a także przeciwwirusowego wobec kaliciwirusa kotów będącego substytutem ludzkiego norowirusa.

#### 4.5. Omówienie wyników

Wstępem do cyklu prac składających się na niniejsze osiągnięcie naukowe jest artykuł przeglądowy przedstawiający możliwości dzisiejszej zielonej biotechnologii związanej z manipulacją genetyczną oraz hodowlą transgenicznych kultur roślinnych w różnego typu bioreaktorach w większej skali. W artykule tym przedstawiono krótką historię otrzymywania transgenicznych roślinnych kultur *in vitro*, możliwości prowadzenia takich kultur w różnego rodzaju bioreaktorach pozwalających na optymalizację i zwiększenie skali całej hodowli oraz zastosowania inżynierii metabolicznej jako jednej ze strategii pozyskiwania cennych związków biologicznie czynnych i rekombinowanych białek. Dodatkowo, przedstawiono tu przykłady patentów związanych z różnymi rodzajami bioreaktorów i rozwiązań technicznych mogących mieć zastosowanie w hodowli roślinnych kultur *in vitro* na większą skalę (**Publikacja P1**).

#### **Otrzymanie kultur *in vitro* oraz *ex vitro* *Menyanthes trifoliata***

Pierwszy etap moich badań polegał na uzyskaniu aksenicznych kultur *in vitro* roślin syntetyzujących wybrane cenne metabolity wtórne ze szczególnym uwzględnieniem kwasu betulinowego. Jako pierwszą z roślin wykorzystałem bobrek trójlistkowy (*Menyanthes trifoliata*). Kultury *in vitro* tej rośliny uzyskano z nasion, które poddano standardowej

procedurze sterylizacji powierzchniowej z zastosowaniem jako czynników sterylizujących 70% alkohol etylowy oraz komercyjnie dostępny wybielacz zawierający podchloryn sodu. Po przeprowadzonej procedurze sterylizacji nasiona bobrka trójlistkowego przeniesione zostały na podłoże SH (Schenk i Hildebrandt) zestalone 0.8% agarem i suplementowane kwasem giberelinowym w stężeniu 50 mg/L oraz kinetyną w stężeniu 0.02 mg/L. Młode siewki przenoszone były na zestalone agarem podłoże SH i utrzymywane w hodowli z intensywnym oświetleniem w temp. 26°C (fotoperiod 16/8 dzień/noc). Kolejnym etapem była mikropropagacja roślin z wykorzystaniem otrzymanych wierzchołków pędów umieszczonych w stałym podłożu (agar 0.8%) zawierającym 0.5 mg/L kwasu indoliloctowego oraz 1 mg/L 6-benzyloaminopuryny. Po 30-dniowej inkubacji materiał roślinny przeniesiono na podłoże SH zestalone agarem z dodatkiem 0.5 mg/L BAP, a następnie 1-2 cm wierzchołki umieszczano również w podłożu SH uzupełnionym o 0.5 mg/L IAA w celu ich ukorzenia. Ukorzone pędy przenoszono następnie do płynnego podłoża SH do dalszego wzrostu.

Równoległe do zakładania kultur *in vitro* bobrka trójlistkowego, zainicjowałem jego hodowlę *ex vitro* poprzez wysianie nasion do wysterylizowanej wcześniej mieszanki gleby, torfu i piasku w stosunku objętościowym odpowiednio 3:1:1 i hodowano w warunkach szklarniowych w 26°C z fotoperiodem 16/8 (dzień/noc) (**Publikacja P2**).

### **Identyfikacja oraz ilościowe oznaczanie wybranych metabolitów wtórnych obecnych w ekstraktach roślinnych**

W celu dokonania analizy jakościowej i ilościowej wybranych metabolitów wtórnych z grupy fenoli, oraz terpenów (kwasu betulinowego), ekstrakty pochodzące z *M. trifoliata* hodowanych w warunkach *in vitro* i *ex vitro* poddano badaniu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Do analiz fitochemicznych wykorzystano cztery różne ekstrakty pochodzące z roślin hodowanych w warunkach *in vitro* z podziałem na część nadziemną (MtAPV) oraz korzenie (MtRV) oraz analogicznym podziałem dla roślin pochodzących z hodowli w glebie (odpowiednio MtAPS i MtRS). **Uzyskane wyniki wykazały najwyższą zawartość kwasu betulinowego (5437.15 µg/g s.m.) w ekstraktach MtRV w porównaniu do MtAPV (395.31 µg/g s.m.), MtRS (3938.95 µg/g s.m.) oraz MtAPS (390.00 µg/g s.m.). Co więcej wśród zidentyfikowanych związków fenolowych we wszystkich ekstraktach wykazano najwyższe zawartości: kwasu synapinowego, elagowego, chlorogenowego oraz rutyny. Dodatkowo w ekstraktach MtRV i MtRS wykazano wyższą w stosunku do innych związków obecność kwasu syringowego**

**(Publikacja P2).****Badanie wpływu ekstraktów z *M. trifoliata* na przeżywalność ludzkich komórek nowotworowych i prawidłowych**

Przeprowadzone badanie przeżywalności (test MTT oparty na zdolności enzymu-dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) do nierozpuszczalnego ciemnoniebieskiego formazanu, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie) linii komórek nowotworowych glejaka (w IV stadium zaawansowania choroby) oraz prawidłowych astrocytów (NHA) pod wpływem zastosowanych ekstraktów wykazało, że mogą one wywoływać efekt cytotoksyczny w komórkach nowotworowych. **W przypadku linii glejaka silniejszy efekt cytotoksyczny wykazano dla ekstraktów przygotowanych z korzeni (MtRV i MtRS) niż z części nadziemnej rośliny (MtAPV i MtAPS). Badania wykazały, że najsilniejszy wpływ na żywotność komórek wykazywał ekstrakt MtRV. W przypadku badania żywotności ludzkich astrocytów, ekstrakty nie wykazywały znacznego wpływu cytotoksycznego (Publikacja P2).**

**Badanie wpływu ekstraktów *M. trifoliata* na cykl komórkowy komórek nowotworowych**

Ze względu na fakt, że badanie cytotoksyczności wykazało najsilniejszy wpływ ekstraktu MtRV na komórki nowotworowe, do dalszych badań biologicznych użyto właśnie tego ekstraktu.

**Wyniki badań cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej w komórkach poddanych działaniu ekstraktu przez 24-godziny w zakresie stężeń 0.25-1.5 mg/mL wykazały największy wzrost puli komórek w fazie G2/M po zastosowaniu 1.5 mg/mL ekstraktu z jednoczesnym wzrostem komórek apoptotycznych do 40% (Publikacja P2).**

**Analiza zmiany ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z apoptozą w komórkach glejaka**

W celu zbadania potencjalnego wpływu testowanego ekstraktu na ekspresję genów związanych z apoptozą w komórkach nowotworowych, analizowano poziomy mRNA dla genów *Bcl-2*, *Bax*, *Cas-3* oraz *TP53* po 24-godzinnej inkubacji komórek z tym ekstraktem w wybranym wcześniej stężeniu 1.5 mg/mL ekstraktu MtRV (**Publikacja P2**).

Uzyskane wyniki wykazały wzrost poziomu ekspresji genów *Bax*, *Cas-3* oraz *TP53* oraz spadek ekspresji genu *Bcl-2*. Dodatkowo ocena poziomu białek kodowanych przez te geny wykonana

została metodą Western-blot, a jej wyniki potwierdziły również wzrost poziomu białek Bax, Cas-3 oraz p53 (**Publikacja P2**).

### **Badanie zmian potencjału błon mitochondrialnych w komórkach nowotworowych**

Komórki nowotworowe poddane zostały także badaniu w kierunku zmian potencjału błony mitochondrialnej po 24-godzinnym działaniu testowanego ekstraktu (MtRV). Test ten wykonano z zastosowaniem jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazokarbocyaniny (JC-1), który w przypadku wysokiego potencjału elektrycznego błony ( $\Delta\Psi_m$ ) tworzy agregaty emitujące fluorescencję czerwoną. Gdy dochodzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej (spadku potencjału  $\Delta\Psi_m$ ) barwnik ten na skutek przemieszczenia do cytoplazmy przechodzi w formę monomeryczną emitując zieloną fluorescencję. **Otrzymane wyniki wykazały znaczący spadek tego potencjału w porównaniu do komórek kontrolnych co może potwierdzać indukcję wewnątrzpochodnej apoptozy w tych komórkach (Publikacja P2).**

**W celu bardziej kompleksowej oceny właściwości biologicznych ekstraktów *M. trifoliata* kolejnym etapem badań było określenie ich potencjalnych zdolności ochronnych w stosunku do ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC).**

Aby określić właściwości protekcyjne ekstraktów wytypowanych do dalszych badań na podstawie najwyższej zawartości kwasu betulinowego, wykorzystano je w celu sprawdzenia ich wpływu na przeżywalność komórek, ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym, uszkodzenia mitochondrialnego i jądrowego DNA, generowanie reaktywnych form tlenu, rozszczepienie polimerazy poli(ADP-rybozy), a także fosforylację histonu H2A.X w komórkach prawidłowych poddanych działaniu lipopolisacharydu (LPS) oraz nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Na tym etapie prac przeprowadzono dodatkowo również badanie wpływu tych ekstraktów na wybrane bakterie i grzyby (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Saccharomyces cerevisiae*).

**Ocena wpływu ekstraktów MtRV i MtAPV pochodzących z *M. trifoliata* na przeżywalność prawidłowych komórek linii HUVEC**

W celu oceny wpływu badanych ekstraktów na przeżywalność komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) przeprowadzono badanie ich cytotoksyczności w teście MTT. Wykonany test nie wykazał cytotoksycznego efektu w stosunku do badanych komórek po 24 godzinach inkubacji z ekstraktem.



W celu dalszego badania ochronnego potencjału ekstraktów komórki poddano działaniu 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS lub 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  celem wywołania odpowiednio stanu zapalnego lub stresu oksydacyjnego. W badaniach wykonano również test przeżywalności komórek poddanych działaniu samymi ekstraktami oraz ekstraktami w połączeniu z LPS lub  $\text{H}_2\text{O}_2$  a wyniki wykazały brak znaczącego wpływu na ich żywotność (**Publikacja P3**).

### **Ocena wpływu ekstraktów MtRV i MtAPV na poziom ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz stanem zapalnym**

Aby ocenić wpływ ekstraktów na poziom ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym wykonano badania metodą Real-time PCR (RT-PCR). Analizowano tu poziom mRNA dla genów *HO-1*, *NQO1*, *NRF2*, *kAEP1* oraz *GCLC* a uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie ekstraktów w stężeniu 1 mg/mL przez 24 godziny wpływa na poziom ekspresji analizowanych genów związanych ze stresem oksydacyjnym w komórkach HUVEC poddanych działaniu nadtlenu wodoru w porównaniu do komórek kontrolnych. Analogiczny efekt zaobserwowano w przypadku badania wpływu ekstraktów na poziom ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym (*IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  oraz *TNF- $\gamma$* ) po indukcji lipopolisacharydem.

**W obu badaniach wykazano, że silniejszy efekt wywierał ekstrakt MtRV w porównaniu do MtAPV (Publikacja P3).**

### **Ocena ochronnego wpływu ekstraktów na uszkodzenia DNA jądrowego oraz mitochondrialnego generowane nadtlaniem wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oraz wpływ na poziom cytoplazmatycznych i mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (ROS)**

W celu określenia efektu ochronnego ekstraktów polegającego na ograniczaniu uszkodzeń powstających w mitochondrialnym (mtDNA) oraz jądrowym (nDNA) materiale genetycznym, przeprowadzono analizę metodą SLR-qRT-PCR. Do badań wykorzystano materiał genetyczny wyizolowany z komórek inkubowanych z ekstraktem MtRV lub MTAPV przez 24 godziny, a następnie poddanych inkubacji z 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Wyniki wykazały znaczący spadek liczby uszkodzeń w obrębie analizowanych genów mitochondrialnych *ND1* i *ND5* (ok. 5 uszkodzeń na 10 kb DNA). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku analizy uszkodzeń rejonów genów jądrowych *HPRT1* oraz *TP53*. Wyniki te świadczą o właściwościach protekcyjnych zastosowanych ekstraktów (**Publikacja P3**).

Dodatkowo zbadano tu poziomu ROS w cytoplazmie z wykorzystaniem 2',7'-diodoctanu dichlorofluoresceiny (DCFDA), będącego barwnikiem fluorogennym, pozwalającym wykazać



aktywność ROS w komórce. Barwnik ten jest deacetylowany przez esterazy komórkowe i przekształcany do związku niewykazującego fluorescencji. Związek ten utleniany jest następnie przez ROS do 2', 7'-dichlorofluoresceiny (DCF), który wykazuje silną fluorescencję możliwą do wykrycia za pomocą spektrofluorymetrii. Poziom mitochondrialnych ROS badano natomiast z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej MitoSOX. W badanych komórkach wykazano ich spadek po inkubacji z ekstraktami roślinnymi w porównaniu do komórek kontrolnych, co dodatkowo potwierdza efekt ochronny MtRV oraz MtAPV (**Publikacja P3**).

#### **Analiza poziomu rozszczepionej polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) oraz fosforylacji histonu H2A.X z wykorzystaniem cytometrii przepływowej**

Aby dodatkowo potwierdzić ochronne właściwości ekstraktów roślinnych wykonano analizę poziomu rozszczepionych PARP-1 oraz ufosforylowanych histonów H2A.X. Wykazano, że komórki HUVEC inkubowane z 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  po 24-godzinnym działaniu badanymi ekstraktami wykazywały niższy poziom rozszczepionych PARP-1 oraz fosforylowanych histonów w porównaniu do komórek niepoddanych działaniu ekstraktów. Przeprowadzone analizy wykazały, że silniejszy efekt ochronny wykazywał ekstrakt MtRV (**Publikacja P3**).

#### **Badanie przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego działania ekstraktów *M. trifoliata***

W celu sprawdzenia aktywności badanych ekstraktów w stosunku do bakterii i grzybów, dodatkowo wykonano badanie dla wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego – MIC oraz minimalnego stężenia bakterioobójczego/grzybobójczego – MBC/MFC w stosunku do mikroorganizmów takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, oraz *Candida albicans*. Badania te wykazały umiarkowaną aktywność obu ekstraktów w stosunku do badanych szczepów bakterii i grzybów (MIC 150-925  $\mu\text{g/mL}$  oraz MBC/MFC 500-2500  $\mu\text{g/mL}$ ). Pomimo umiarkowanej aktywności, ekstrakt MtRV wykazywał silniejszą aktywność w porównaniu z ekstraktem MtAPV w stosunku do *P. aeruginosa* oraz *E. faecalis* (MIC 150  $\mu\text{g/mL}$ ), a także silniejsze działanie na *C. albicans* oraz *S. cerevisiae* (odpowiednio MIC 625  $\mu\text{g/mL}$  i 725  $\mu\text{g/mL}$  oraz MFC 625  $\mu\text{g/mL}$  i 1500  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Publikacja P3**).

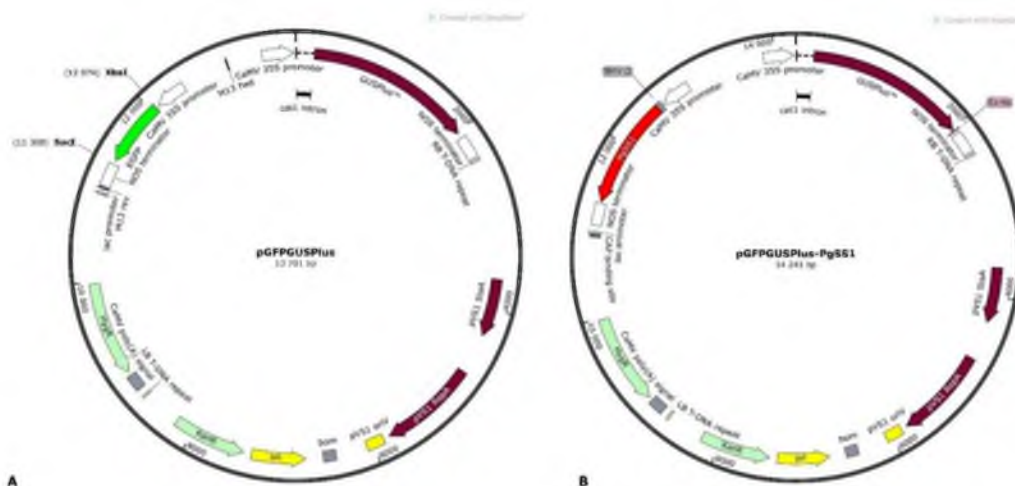
#### **Kolejnym etapem prowadzonych badań było wyprowadzenie kultur *in vitro* strączyńca tępolistnego (*Senna obtusifolia*)**

Kultury *in vitro* *S. obtusifolia* otrzymano z nasion poddanych powierzchniowej sterylizacji 70%

etanołem oraz 3% podchlorynem sodu. Po procedurze sterylizacji nasiona kiełkowano na stałym podłożu MS (Murashige i Skoog) zawierającym 15 g/L glukozy zestalonym 0,8% agarem. Nasiona kiełkowano w 26°C w warunkach fotoperiodu 16/8 (dzień/noc) (**Publikacja P4**).

### Konstrukcja roślinnych wektorów wykorzystanych do transformacji genetycznej

W toku prac nad próbą uzyskania transgenicznych korzeni włośnikowatych skonstruowano kasetę ekspresyjną dla genu kodującego syntazę skwalenu pochodzącą z żeńszenia koreańskiego (*Panax ginseng*), w której znajdował się pod kontrolą konstytutywnego promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S) oraz zawierającą 5'-liderową sekwencję (nazywaną Omega) wirusa mozaiki tytoniu (TMV) mającą za zadanie wzmacnianie procesu translacji. Finalna wersja wektora roślinnego została przygotowana na drodze klonowania molekularnego z wykorzystaniem endonukleaz *SacI* oraz *XbaI* pozwalających na jednoetapową rekombinację pomiędzy wektorem pUC57 zawierającym sekwencję kodującą syntazę skwalenu oraz wektorem docelowym pGFPGUSPlus. Skonstruowany wektor oprócz opisanej kasy ekspresyjnej zawierał również kasety dla genów *hpt* i *gusA* kodujące odpowiednio fosfotransferazę higromycyny oraz  $\beta$ -glukuronidazę będącą białkiem reporterowym. Poprawność konstrukcji wektora roślinnego sprawdzono za pomocą ponownej hydrolizy endonukleazami użytymi do jego konstrukcji oraz z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji wprowadzanego genu (**Publikacja P4**).



Ryc. 2. Schematy wektorów wykorzystanych do transformacji genetycznej *S. obtusifolia*. **A**- oryginalny wektor pGFPGUSPlus, **B**- rekombinowany wektor zawierający kasetę ekspresyjną dla genu *PgSSI*

### **Transformacja genetyczna roślin**

Transformacji genetycznej *S. obtusifolia* dokonano w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem metody agroinfekcji. Proces ten poprzedzony był wprowadzeniem rekombinowanego wektora pGFPGUSPlus-PgSS1 do kompetentnych komórek bakteryjnych *Rhizobium rhizogenes* A4 przygotowanych metodą przepłukiwania buforem TE. Komórki bakteryjne transformowano genetycznie wektorami wykorzystując metodę szoku termicznego a następnie dokonano selekcji transformantów z wykorzystaniem czynnika selekcyjnego w postaci antybiotyku kanamycyny na którą gen oporności jest obecny w wektorze pGFPGUSPlus (**Publikacja P4**).

W toku transformacji genetycznej siewek *S. obtusifolia* wykorzystano dwa różne wektory, wśród których był oryginalny niemodyfikowany wektor pGFPGUSPlus oraz rekombinowany wektor pGFPGUSPlus-PgSS1. Do transformacji użyto również niemodyfikowanych szczepów *R. rhizogenes* A4 w celu indukcji korzeni transformowanych bez dodatkowego transgenu (**Publikacja P4**).

Na tym etapie prac każdy wariant bakterii (z wektorami i bez nich) hodowany był na podłożu YMB w 28°C z intensywnym wytrząsaniem z tą różnicą, że transgeniczne komórki niosące plazmid hodowano z dodatkiem 50 mg/L kanamycyny w celu ciągłej selekcji transgenicznych komórek. Hodowle bakteryjne o odpowiedniej gęstości optycznej ( $OD_{600}=0.7$ ) wirowano, a powstały osad zawieszano w identycznej objętości płynnego podłoża MS. Na tym etapie pochodzące z hodowli *in vitro* 14-dniowe siewki przecinano w miejscu hipokotyli a powstałe powierzchnie zranienia inokulowano otrzymaną wcześniej zawiesiną bakterii, której nadmiaru pozbywano się sterylnym papierem a następnie tak zainokulowane siewki układano na podłożu ½ MS zranioną częścią do góry i kokultywowano przez okres 3 dni w ciemności w temperaturze 26°C. Po tym czasie siewki przenoszono na zestalone 0.8% agarem podłoże MS uzupełnione cefotaksymem w stężeniu 250 mg/L i hodowano w 25°C z zastosowaniem fotoperiodu 16/8 (dzień/noc). Pasażowania dokonywano co 7 dni na świeże podłoże.

**Opisana procedura transformacji skutkowała pojawieniem się pierwszych korzeni włóśnikowatych na materiale roślinnym po 10 dniach od rozpoczęcia kokultywacji (Publikacja P4).**

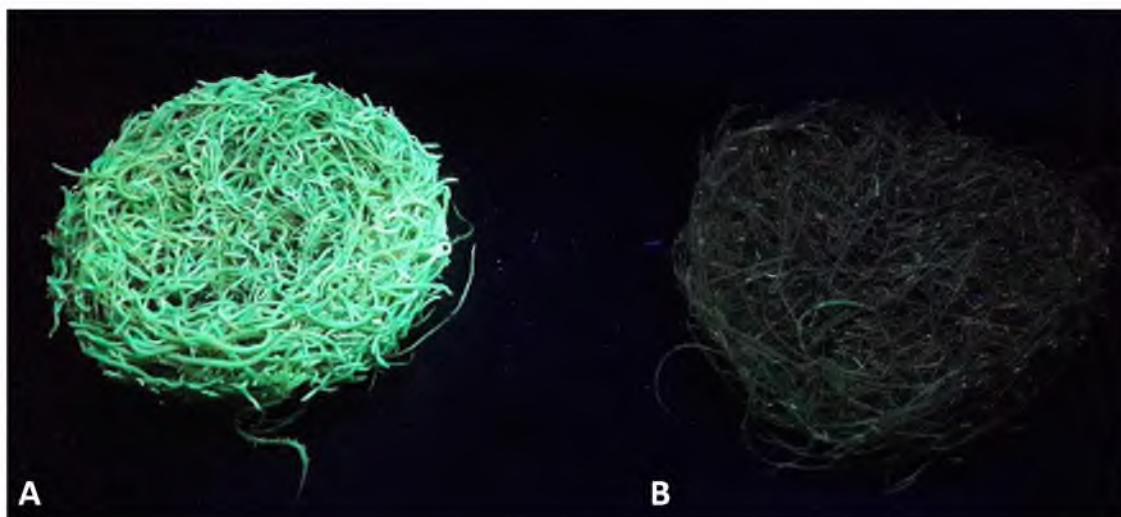
**Uzyskane wyniki wydajności indukcji korzeni włóśnikowatych wykazały najefektywniejsze zachodzenie tego procesu w przypadku inokulacji bakteriami nieniosącymi wektora (92%) a nieznacznie niższy w przypadku transformacji bakteriami posiadającymi oryginalny niemodyfikowany wektor oraz rekombinowany wektor pGFPGUSPlus-PgSS1 (odpowiednio 87% i 80%) (Publikacja P4).**

Odpowiednio wyselekcjonowane korzenie transgeniczne z zastosowaniem jako czynnika selekcyjnego higromycyny B były finalnie hodowane w podłożu płynnym MS w 25°C z intensywnym wytrząsaniem.

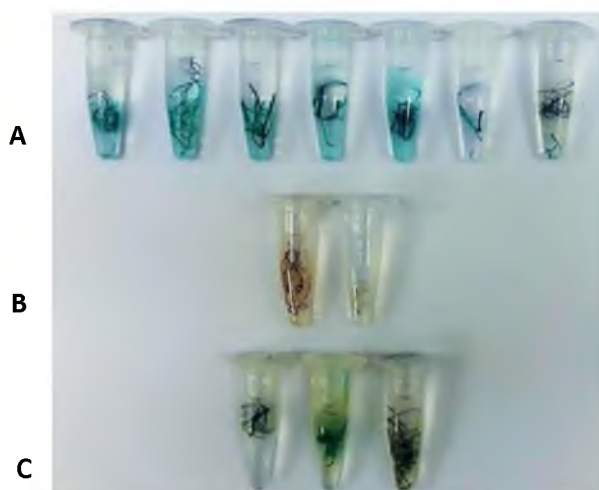
**Na tym etapie wyselekcjonowano 7 linii korzeni włośnikowatych z przeniesionym transgenem zawierającym gen kodujący syntazę skwalenu (SOPSS1-7), 3 linie korzeni indukowanych *R. rhizogenes* nosącymi oryginalny niemodyfikowany wektor (SOGFP 1-3) oraz 2 linie indukowane nietransgenicznymi bakteriami *R. rhizogenes* A4 (SOA4 1-2) (Publikacja P4).**

#### **Potwierdzenie transformacji korzeni włośnikowatych**

W celu potwierdzenia integracji transgeny z genomem wygenerowanych linii korzeni włośnikowatych przeprowadzono izolację genomowego DNA z każdej linii korzeni oraz przeprowadzono reakcję PCR z użyciem starterów komplementarnych do sekwencji kodującej *PgSS1* (wariant SOPSS1) oraz sekwencji komplementarnej do genów *rolB* i *rolC* (wariant SOA41). Uzyskane wyniki potwierdziły obecność w badanych genomach poszukiwanych genów co potwierdza występowanie ampikonów o wielkości 557pz, 386pz oraz 582pz odpowiednio dla genów *PgSS1*, *rolB* i *rolC* rozdzielonych i wizualizowanych w żelu agarozowym. Transgeniczny charakter linii korzeni SOGFP potwierdzono wykazując ich fluorescencję w świetle ultrafioletowym pochodzącą od produkowanego białka GFP. Dodatkowo, transgeniczny charakter korzeni linii SOPSS oraz SOGFP potwierdzono testem histochemicznym pozwalającym wykazać aktywność enzymu  $\beta$ -glukuronidazy (GUS) z wykorzystaniem specyficznego substratu 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- $\beta$ -d-glukuronidu przekształcanego pod wpływem GUS do nierozpuszczalnego ciemnoniebieskiego produktu (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indygo). Uzyskane w tym etapie badań wyniki potwierdziły zarówno indukcję transgenicznych korzeni włośnikowatych jak i korzeni transformowanych nietransgenicznymi bakteriami **(Publikacja P4 i P5)**.



Ryc.3. A - Korzenie włośnikowate *S. obtusifolia* linii SOGFP, B - Korzenie włośnikowate *S. obtusifolia* linii SOPSS w świetle ultrafioletowym.



Ryc.4. Wynik testu histochemicznego wykrywającego aktywność  $\beta$ -glukuronidazy przeprowadzony na korzeniach włośnikowatych linii: A – SOPSS, B – SOA4, C – SOGFP.

#### **Ocena zawartości kwasu betulinowego w uzyskanych liniach korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia***

Ponieważ jednym z głównych celów całości prac nad roślinnymi kulturami *in vitro* była próba wzmocnienia produkcji kwasu betuliniowego w materiale roślinnym, ekstrakty pochodzące z zaindukowanych i wyselekcjonowanych linii różnych wariantów korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia* poddano analizie HPLC w celu określenia zawartości tego metabolitu.

**Wyniki analizy wykazały 2.78 mg/g s.m. oraz 1.94 mg/g s.m. kwasu betulinowego w liniach korzeni pochodzących z transformacji nietransgenicznymi bakteriami (odpowiednio linia SOA41 i SOA42), natomiast trzy linie pochodzące z transformacji genetycznej bakteriami**



niosącymi niemodyfikowany wektor pGFPGUSPlus zawierały: linia SOGFP1- 4.08 mg/g s.m.; SOPGF2- 4.73 mg/g s.m oraz SOGFP3 -3.98 mg/g s.m. Wyniki analiz wykazały, że najwyższe zawartości kwasu betulinowego wśród analizowanych linii korzeni włośnikowatych zanotowano dla wariantów transformowanych konstruktem genetycznym zawierającym kasetę ekspresyjną dla genu syntazy skwalenu. Zawartość ta w badanych ekstraktach pochodzących z siedmiu linii korzeni wynosiła od 5.99 mg/g s.m do 22.71 mg/g s.m z najwyższą zawartością oznaczoną dla linii SOPSS1 (15.75 mg/g s.m) oraz SOPSS2 (22.7 mg/g s.m); (Publikacja P4).

Ze względu na najwyższą zawartość kwasu betulinowego w dwóch transgenicznym liniach korzeni włośnikowatych ekstrakty z nich pozyskane wykorzystane zostały do dalszych badań biologicznych związanych z określaniem ich potencjału antynowotworowego oraz w połączeniu z chemoterapeutyką (doksorubicyną) w stosunku do linii komórek białaczkowych (NALM6).

**Pierwszym etapem przeprowadzonych badań biologicznych była ocena cytotoksycznego wpływu ekstraktów z transgenicznym lini korzeni włośnikowatych (SOPSS1 i SOPSS2) na komórki NALM6**

Cytotoksyczność badana w teście MTT z zastosowaniem obu ekstraktów w zakresie stężeń 0.015-2 mg/mL wykazała ich zdolność do obniżania żywotności badanych komórek białaczkowych z silniejszym efektem obserwowanym dla ekstraktu SOPSS2. Wartości  $IC_{50}$  dla ekstraktu SOPSS1 oraz SOPSS2 wynosiła odpowiednio 0.23 mg/mL oraz 0.08 mg/mL dla SOPSS1, oraz SOPSS2 (Publikacja P4).

Na tej podstawie określono stężenia ekstraktów użyte do dalszych badań biologicznych (0.08 i 0.23 mg/mL).

**Analiza wpływu badanych ekstraktów oraz kombinacji ekstrakt-doksorubicyna na ekspresję genów związanych z apoptozą w linii komórek białaczkowych (NALM6)**

W celu sprawdzenia wpływu wytypowanych wcześniej ekstraktów *S. obtusifolia* na komórki białaczkowe, komórki poddawano inkubacji przez 24 godziny ze stężeniami wyznaczonymi jako  $IC_{50}$ . Dodatkowo dokonano analogicznej analizy z wykorzystaniem połączenia ekstrakt-chemoterapeutyk (250nM doksorubicyna). Analizy RT-PCR pod kątem zmiany poziomu ekspresji genów *TP53*, *PUMA*, *NOXA* oraz *BAX* wykazała wzrost we wszystkich badanych układach w porównaniu do komórek kontrolnych. **Najsilniejszy efekt zanotowano w komórkach traktowanych wariantami zawierającymi sam ekstrakt SOPSS2 lub jego**

**połączenie z chemoterapeutykami (Publikacja P4).****Analiza wpływu ekstraktów SOPSS1 i SOPSS2 oraz połączenia ich z doksorubicyną na indukcję apoptozy w linii komórek białaczkowych (NALM6)**

Wpływ badanych ekstraktów oraz ich połączenia z doksorubicyną na indukcję apoptozy badano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zwiększony odsetek komórek apoptotycznych obserwowano po zastosowaniu badanych ekstraktów w stężeniach  $IC_{50}$  w porównaniu do komórek kontrolnych po 24-godzinnej inkubacji. Dodatkowo, zastosowanie połączenia ekstraktów z chemoterapeutykami zwiększyło ilość komórek apoptotycznych. Wykazano, że silniejszy efekt wywierał ekstrakt SOPSS2 sam lub w połączeniu z doksorubicyną (**Publikacja P4**).

Dodatkowo przeprowadzona analiza zmian w cyklu komórkowym linii NALM6 po zastosowaniu badanych ekstraktów wykazały zwiększenie frakcji komórek w fazie cyklu sub-G0/G1 w porównaniu do komórek nietraktowanych (27% wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie sub-G0/G1 cyklu po zastosowaniu wyznaczonego wcześniej stężenia  $IC_{50}$  ekstraktu SOPSS1 oraz 39% wzrost komórek w przypadku ekstraktu SOPSS2 vs. 12% wzrost komórek kontrolnych). Podobną tendencję zauważono w przypadku połączenia ekstraktów

z doksorubicyną, dla których otrzymano wyniki: 53% wzrost dla ekstraktu SOPSS1 oraz 70% wzrost dla ekstraktu SOPSS2 (**Publikacja P4**).

Ostatnim etapem badań ekstraktów wykazujących najwyższy poziom produkcji kwasu betulinowego była ocena ich wpływu na potencjał błony mitochondrialnej badanych komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki pokazały, że traktowanie komórek NALM6 ekstraktami SOPSS1 lub SOPSS2 oraz połączeniem ekstraktu z doksorubicyną powoduje spadek potencjału błon mitochondrialnych co może świadczyć o indukcji apoptozy komórek nowotworowych (**Publikacja P4**). Na podstawie uzyskanych przeze mnie w toku badań wyników wykazałem, że ekstrakt SOPSS2 zawierający wyższą zawartość kwasu betulinowego posiada silniejszy efekt cytotoksyczny sam i w połączeniu z chemoterapeutykami i sugeruję, że może indukować apoptozę w komórkach białaczkowych poprzez zmianę poziomu genów związanych z apoptozą, zmianę potencjału błon mitochondrialnych oraz zahamowanie cyklu komórkowego w fazie sub-G0/G1.

Kolejnym etapem prac nad próbą poszukiwania wysokowydajnych roślinnych kultur



*in vitro* dla produkcji kwasu betulinowego była hodowla wyselekcjonowanych wcześniej korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia* w większej skali. **W tym celu zaprojektowałem i wykonałem autorski bioreaktor zraszany pozwalający na zamkniętą hodowlę aksenicznych kultur korzeni włośnikowatych w celu optymalizacji warunków wzrostu i w konsekwencji sprawdzenie wpływu takiej hodowli na zawartość kwasu betulinowego.** Opisywany bioreaktor składał się z 10 litrowej okrągłodennej kolby reakcyjnej z dopasowaną pokrywą posiadającą otwory ze szlifem. Wszystkie elementy bioreaktora wykonane były ze szkła borokrzemowego, silikonu oraz odpowiedniej stali co pozwalało na autoklawowanie całego układu przed inicjacją hodowli. Obieg medium wymuszony był to pompą perystaltyczną sterowaną elektronicznie.



Ryc. 5. 10- litrowy bioreaktor zraszany do hodowli korzeni włośnikowatych

### **Hodowla korzeni włośnikowatych w bioreaktorze zraszonym**

W celu przetestowania możliwości hodowli uzyskanych korzeni włośnikowatych w większej skali oraz zbadania wpływu warunków prowadzonej kultury na poziom syntezy wybranych metabolitów wtórnych podjąłem próbę hodowli korzeni w 10-litrowym bioreaktorze. W wysterylizowanym w autoklawie bioreaktor wypełniony podłożem płynnym MS (2 litry) inokulowano korzeniami włośnikowatymi pochodzącymi z 2-tygodniowej hodowli w kolbach Erlenmeyera poprzez umieszczenie ich w specjalnym koszu ze stali nierdzewnej wyposażonym w platformę do hodowli. Cykl zraszania korzeni medium hodowlanym napędzanym przez pompę perystaltyczną polegał na 30-sekundowym podawaniu pożywki oraz 180-sekundowej przerwie. Podczas jednego cyklu do korzeni dostarczano ok 60 mL medium. W toku prac

potwierdziłem po raz pierwszy, że taki zamknięty system hodowli *in vitro* może z powodzeniem być wykorzystany do optymalizacji warunków wzrostu korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia*. Tom 18, numer 8 (sierpień 2021r.) Chemistry & Biodiversity, w którym został opublikowany powyższy artykuł dodatkowo posiada zaprojektowaną i wykonaną przeze mnie okładkę.

**Uzyskane wyniki wykazały, że hodowla korzeni w tak zaprojektowanym układzie prowadziła do zwiększonego przyrostu biomasy korzeni (25-krotnie większa ilości świeżej masy dla SOA41 i SOPSS2 w odniesieniu do materiału wyjściowego) w porównaniu z hodowlą prowadzoną w 50 mL podłoża w kolbach Erlenmeyera (19- i 17-krotny przyrost świeżej masy w odniesieniu do materiału wyjściowego odpowiednio dla klonu SOA41 oraz SOPSS2) (Publikacja P5).**

W toku dalszych badań analizowano hodowane w bioreaktorze zraszonym korzenie włośnikowate SOPSS2 pod kątem ekspresji genu *PgSSI* wobec przyjętych tu jako korzeni kontrolnych linii SOA41 (niezawierającej konstruktów genetycznych). Wyniki analiz wykazały wysoki poziom ekspresji analizowanego genu syntazy skwalenu w porównaniu do kontroli negatywnej (**Publikacja 5**).



Ryc. 6. Korzenie włośnikowate *S. obtusifolia* linii SOPSS hodowane w: A-kolbie Erlenmeyera, B- 10- litrowym bioreaktorze zraszonym.

#### **Analiza zawartości kwasu betulinowego w korzeniach włośnikowatych *S. obtusifolia* rosnących w bioreaktorze zraszonym**

Analiza ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazała różnice w zawartości kwasu betulinowego w korzeniach hodowanych w bioreaktorze zraszonym. **Kultury hodowane w bioreaktorze były zdolne do produkcji 38.12 mg/g s.m.**

**kwasy betulinowego w porównaniu z kulturami hodowanymi na mniejszą skalę w kolbach (22.71 mg/g s.m. w przypadku korzeni linii SOPSS2 oraz 4.21 mg/g s.m. dla linii SOA41). Dodatkowo w pracy oznaczono również zawartość wybranych antrachinonów, które występowały w mniejszej ilości w porównaniu z kwasem betulinowym (Publikacja P5).**

**Ocena cytotoksycznego efektu ekstraktów z korzeni hodowanych w bioreaktorze w stosunku do komórek glejaka linii U-87MG**

Wpływ badanych ekstraktów na przeżywalność komórek glejaka linii U-87MG przeprowadzono testem MTT z zastosowaniem zakresu stężeń 0.125-2 mg/mL. Wyniki pozwoliły wyznaczyć wartość  $IC_{50}$  dla obu ekstraktów, która wynosiła 0.36 mg/mL oraz 0.7 mg/mL odpowiednio dla SOPSS2 oraz SOA41, co po raz kolejny konsekwentnie wykazało silniejsze działanie ekstraktu pochodzącego z korzeni transformowanych konstruktem z genem syntazy skwalenu w porównaniu do komórek bez takiego transgeny.

**Test klonogenności (efekt antyproliferacyjny) komórek nowotworowych linii glejaka (U-87MG)**

W celu dalszego przetestowania aktywności przeciwnowotworowej badanych ekstraktów wykonano test klonogenności, pozwalający na ocenę ewentualnej inhibicji tworzenia kolonii przez komórki nowotworowe traktowane ekstraktami. Wyniki badania wykazały hamujący wpływ na tworzenie kolonii komórek nowotworowych w zależności od stężenia. Ekstrakty badane z zastosowaniem stężeń  $IC_{30}$  wykazały inhibicję proliferacji komórek do około 70% oraz około 40% odpowiednio w przypadku testowania ekstraktów SOA41, oraz SOPSS2. W przypadku badania ekstraktów w tym teście z zastosowaniem stężenia  $IC_{50}$  wykazały proliferację na poziomie 20% (SOA41) oraz 5% (SOPSS2) w porównaniu do komórek kontrolnych, co potwierdziło silniejszy hamujący wpływ na komórki glejaka wywoływany ekstraktem SOPSS2 (Publikacja P5).

**Badanie poziomu ekspresji genów związanych z apoptozą w komórkach nowotworowych poddanych działaniu ekstraktów SOA4 oraz SOPSS2**

W celu zbadania mechanizmu indukcji apoptozy w komórkach glejaka przez badane ekstrakty zbadano w nich zmiany poziomu białek związanych z procesem apoptozy (BAX, PUMA, NOXA oraz p53). Wykazano, że inkubacja komórek nowotworowych z badanymi ekstraktami zastosowanymi w wyznaczonym stężeniu  $IC_{50}$  przez 24 godziny spowodowała wzrost poziomu badanych białek po zastosowaniu obu ekstraktów z wyraźniejszym silniejszym efektem

obserwowanym dla ekstraktu SOPSS2 (z wyjątkiem białka PUMA); **(Publikacja P5)**.

### **Analiza przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego i antywirusowego działania badanych ekstraktów**

W celu zbadania przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego oraz przeciwwirusowego działania badanych ekstraktów wykonano testy z użyciem gram-dodatnich (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) oraz gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakterii, a także grzybów *Candida albicans* oraz *Saccharomyces cerevisiae*. Dodatkowo wykonano test na aktywność antywirusową na kalciwirusie kotów (FCV) będącym często stosowanym jako surogat ludzkiego norowirusa.

**Wyniki wykazały, że w przypadku badań mikrobiologicznych oba ekstrakty wykazywały umiarkowane działanie od 62.5 do 625 µg/mL (wartości MIC) oraz 500-5000 µg/mL (wartości MBC/MFC). Najsilniejsze działanie zanotowano dla ekstraktu SOPSS2 w stosunku do *E. faecalis*. W przypadku badania antywirusowego ekstraktów wykazano, że oba ekstrakty obniżały miano wirusa FCV w sposób zależny od stężenia w porównaniu do kontroli. Wykazano, że po zastosowaniu obu ekstraktów w stężeniu 5 mg/mL silniejszą redukcję miana wirusa uzyskano dla ekstraktu SOPSS2 (publikacja P5).**

Ostatnim etapem na drodze uzyskiwania bardziej produktywnych roślinnych kultur *in vitro* *Senna obtusifolia* było połączenie strategii opartej na hodowli korzeni włośnikowatych w bioreaktorze z zastosowaniem elicytora w postaci jasmonianu metylu.

W tym celu wyprowadzone w toku wcześniejszych prac korzenie włośnikowate testowano dodatkowo pod kątem dalszej optymalizacji warunków ich wzrostu. Prowadzono ich hodowlę w bioreaktorze zraszającym z zastosowaniem różnych czasów zraszania oraz przerwy pomiędzy podawaniem pożywki. Przetestowano następujące układy: 15-, 30- oraz 45-sekundowe zraszanie z zastosowaniem różnych przerw w postaci 30, 90 oraz 180 sekund. Dodatkowo sprawdzono również sposób dostarczania medium do rosnących korzeni poprzez zastosowanie dyszy spryskującej ponad oraz pod rosnącymi w stalowym koszu korzeniami.

**Wyniki wykazały, że najbardziej efektywne okazało się zastosowanie dyszy spryskującej nad hodowanymi korzeniami, co zapewniało najlepszą penetrację dostarczanego medium do gęstej masy korzeni oraz spryskiwanie ich przez 45 sekund z 90-sekundową przerwą (Publikacja P5).**

Jako elicytor został w hodowli zastosowany jasmonian metylu (MeJA) w stężeniu 100 µM.

W tym celu hodowlę korzeni prowadzono w bioreaktorze zraszonym przez 25 dni a następnie podłoże hodowlane uzupełniano elicytorem. Hodowlę z elicytorem prowadzono przez 10 dni.

**Na tym etapie prac wykazano obniżenie przyrostu biomasy korzeni w porównaniu do hodowli bez zastosowania elicytora. Średnia masa korzeni po 35-dniowej hodowli z elicytorem wynosiła 221 gramów i była niższa w porównaniu z masą korzeni hodowanych w bioreaktorze bez elicytacji (247g); (Publikacja P5). Uzyskane na tej drodze kultury korzeni włósnikowatych wykorzystano do przygotowania ekstraktów, a następnie do badań biologicznych.**

W toku przeprowadzonych badań dodatkowo wstępnie oceniono profil białkowy korzeni włósnikowatych rosnących w obecności elicytora oraz bez jego zastosowania.

Analiza ta wykazała różnice w ilości białek, które wymagają dalszej identyfikacji (**Publikacja P6**).

**Analiza zawartości kwasu betulinowego po zastosowaniu elicytora oraz hodowli korzeni w bioreaktorze**

W celu sprawdzenia zmian w zawartości kwasu betulinowego w korzeniach włósnikowatych hodowanych z zastosowaniem elicytora, ekstrakty poddano analizie HPLC.

**Wyniki wykazały zawartość analizowanego związku na poziomie 48 mg/g s.m., co jest wartością wyższą w porównaniu z korzeniami hodowanymi bez elicytacji (38.12 mg/g s.m.) (Publikacja P6).**

Ze względu na najwyższą zawartość kwasu betulinowego w analizowanych dotychczas korzeniach uzyskano dla linii transgenicznej SOPSS2 hodowanej z zastosowaniem elicytora, ekstrakty z tych korzeni użyto do dalszych badań biologicznych.

**Ocena efektu cytotoksycznego ekstraktów pochodzących z hodowli korzeni w bioreaktorze z zastosowaniem elicytacji na liniach nowotworowych**

Oceny cytotoksycznego działania uzyskanego ekstraktu dokonano na trzech liniach komórek nowotworowych: U-87MG (glejak), DU-145 (rak prostaty) oraz A549 (rak płuca).

**Otrzymane w teście MTT wyniki wykazały cytotoksyczne działanie na badane komórki z wyznaczeniem wartości  $IC_{50}$  równej odpowiednio: 250  $\mu\text{g/mL}$ , 550  $\mu\text{g/mL}$  oraz 920  $\mu\text{g/mL}$ . Wyniki te potwierdziły, że linia komórek glejaka jest najbardziej wrażliwa na działanie badanego ekstraktu.**

**Ze względu na najsilniejsze działanie badanego ekstraktu w stosunku do linii komórek**

**glejaka, ta linia została wybrana do dalszych analiz.**

#### **Analiza indukcji apoptozy w liniach komórek nowotworowych**

Analiza indukcji apoptozy przez ekstrakty korzeni włośnikowatych uzyskanych z hodowli w bioreaktorze z zastosowaniem elicytacji przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej wykazała, że badany ekstrakt stosowany w stężeniu  $IC_{50}$  znacząco redukował liczbę żywych komórek oraz zwiększał liczbę komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek kontrolnych. **Ekstrakt ten najsilniej działał na komórki linii U87-MG doprowadzając do wzrostu liczby komórek apoptotycznych do poziomu 68% (Publikacja P6).**

#### **Zmiana potencjału błony mitochondrialnej komórek nowotworowych w wyniku działania ekstraktu korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia* hodowanych w bioreaktorze z zastosowaniem elicytora**

Zastosowanie badanego ekstraktu w stężeniu  $IC_{50}$  w komórkach U-87MG powodowało silne obniżenie potencjału błonowego mitochondriów w porównaniu do komórek nietraktowanych ekstraktem.

**Uzyskane wyniki wykazały znaczące obniżenie potencjału błon mitochondrialnych w testowanych komórkach w porównaniu do komórek nietraktowanych ekstraktem. (Publikacja P6).**

#### **Analiza fragmentacji chromosomalnego DNA komórek nowotworowych pod wpływem badanego ekstraktu**

W celu zbadania zachodzenia zjawiska fragmentacji jądrowego DNA komórek nowotworowych pod wpływem ekstraktu wykonany został „test drabinkowy”. Analiza obrazu po rozdiale elektroforetycznym izolowanego z komórek nowotworowych DNA wykazała fragmentację jądrowego materiału genetycznego. Działanie ekstraktu w stężeniu  $IC_{50}$  przez 24 godziny doprowadziło do dezintegracji DNA w porównaniu z integralnym DNA komórek kontrolnych.

Uzyskany wynik potwierdza zachodzenie apoptozy w analizowanych komórkach **(Publikacja P6).**

Dodatkowo, przeprowadzenie testu kometowego na materiale genetycznym wykazało uszkodzenia ze średnią zawartością DNA w ogonie komety na poziomie 45% **(Publikacja P6).**

#### **Określenie aktywności kaspaz 3/7 w badanych komórkach nowotworowych w odpowiedzi na działanie badanego ekstraktu**



W celu sprawdzenia aktywacji kaspaz 3 i 7 w komórkach nowotworowych wykorzystano zestaw Caspase-Glo 3/7. Te wykonawcze kaspazy wytwarzane są jako prokaspazy nieposiadające aktywności, a ich aktywacja odbywa się drogą proteolizy za pośrednictwem kaspaz inicjatorowych. Aktywacja kaspaz 3 i 7 uwidacznia zachodzenie procesu apoptozy.

**Zastosowanie w badanych komórkach ekstraktu w stężeniu IC<sub>50</sub> wykazało znaczący wzrost aktywacji kaspazy 3/7 w porównaniu do komórek kontrolnych (Publikacja P6).**

### **Test inhibicji topoizomerazy I**

Ze względu na fakt, że lekooporność komórek nowotworowych jest jednym z głównych problemów w chemioterapii, uzasadnione jest poszukiwanie nowych alternatywnych form terapii. W wielu badanych komórkach nowotworowych udokumentowano oporność na różne inhibitory topoizomerazy I i II. Przeprowadzony test inhibicji aktywności topoizomerazy I na superhelikalnej formie plazmidowego DNA potwierdził zdolność badanego ekstraktu do takiej aktywności (**Publikacja P6**).

#### 4.6. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Podsumowując wyniki niniejszego osiągnięcia naukowego, w toku realizacji przedstawionych prac:

- Po raz pierwszy poddano ocenie fitochemicznej materiał roślinny *M. trifoliata* pochodzący z hodowli *in vitro* i *ex vitro* z uwzględnieniem pochodzenia z części nadziemnej oraz podziemnej roślin.
- Po raz pierwszy wykazano szerokie właściwości biologiczne uzyskanych ekstraktów *M. trifoliata* z uwzględnieniem działania antynowotworowego, ochronnego, przeciwzapalnego, antyoksydacyjnego oraz przeciwdrobnoustrojowego.
- Po raz pierwszy otrzymano transgeniczne korzenie włośnikowate *Senna obtusifolia* z nadekspresją genu syntazy skwalenu.
- Po raz pierwszy wykazano, że możliwe jest opracowanie wydajnych pod względem produktywności kwasu betulinowego roślinnych kultur *in vitro* *Senna obtusifolia* przy zastosowaniu różnych strategii biotechnologicznych.
- Skonstruowano 10-litrowy bioreaktor zraszany do hodowli transgenicznych korzeni włośnikowatych *S. obtusifolia* i po raz pierwszy prowadzono hodowlę tych korzeni w większej skali.
- Po raz pierwszy wykazano, że strategia oparta o transgenezę w liniach korzeni



włośnikowatych z potwierdzoną nadekspresją genu syntazy skwalenu oraz hodowlę korzeni włośnikowatych w optymalnych warunkach w większej skali może prowadzić do zwiększenia produktywności roślinnych kultur *in vitro*.

- Po raz pierwszy zbadano potencjał ekstraktów otrzymanych z wyprowadzonych transgenicznych kultur *S. obtusifolia* pod kątem właściwości antynowotworowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych czy antywirusowych.
- Po raz pierwszy potwierdzono, że nadekspresja genu syntazy skwalenu w korzeniach włośnikowatych *S. obtusifolia* wpływająca na biosyntezę kwasu betulinowego we wszystkich prowadzonych badaniach konsekwentnie wpływała na silniejsze właściwości biologiczne badanych ekstraktów w porównaniu z ekstraktami pochodzącymi z korzeni włośnikowatych niewykazujących takiej nadekspresji.

Perspektywa dalszych badań obejmuje próbę uzyskania kolejnych linii transgenicznych korzeni włośnikowatych wykazujących nadekspresję innych wybranych enzymów biorących udział w biosyntezie cennych metabolitów wtórnych, a także innych czynników zaangażowanych w kluczowe etapy szlaków metabolicznych. Planowane jest również podjęcie innych działań prowadzących do zwiększania produktywności różnych roślinnych kultur *in vitro*. Dodatkowo, planowany jest rozszerzenie badań związanych z właściwościami uzyskanych kultur roślinnych, a także próba przetestowania różnych systemów ekspresyjnych do produkcji szerokiej gamy rekombinowanych białek.

#### 4.7. Wykaz cytowanej literatury

Alqahtani, A., Hamid, K., Kam, A., Wong, K.H., Abdelhak, Z., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K., Li, K.M., Groundwater, P.W., Li, G.Q., (2013). The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications, *Current Medicinal Chemistry*, 20 (7):908-931

An, T., Zha, W., Zi, J., (2020). Biotechnological production of betulinic acid and derivatives and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (8):3339-3348

Avato, P., Tava, A., (2021). Rare fatty acids and lipids in plant oilseeds: occurrence and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09770-4>

Bhardwaj S., Verma R., Gupta J., (2018). Challenges and future prospects of herbal medicine *International Research in Medical and Health Sciences*, 1(1) :12-15

Debnath, B., Singh, W.S., Das, M., Goswami, S., Singh, M.K., Maiti, D., Manna, K., (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>

Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K.L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A.N., Saxena, A.K., (2020). Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health,

- in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, (pp. 147–161)
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A., (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2): 160
- Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T., Eibl, D., (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(20): 8661-8675
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248(1): 1-18
- Fuentes, P., Armarego-Marriott, T., Bock, R., (2018). Plastid transformation and its application in metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 49:10-15
- Fu, R., Shi, M., Deng, C., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, Y., Kai, G., (2020). Improved phenolic acid content and bioactivities of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by genetic manipulation of RAS and CYP98A14. *Food Chemistry*, 331: 127365
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J.A., Apone, F., Abdel-Salam, E.M., Qahtan, A.A., Alatar, A.A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J.F., Siddiqui, K.S., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Faisal, M., (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. 9(6): 309
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., Yang, J., (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances*. 37(1): 259-270
- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S.T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K.M., Ritala, A., Cardon, F., (2020). Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications. *Frontiers in Plant Science*. 11:33
- Hordyjewska, A., Ostapiuk, A., Horecka, A., Kurzepa, J., (2019). Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews*. 18: 929-951
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M.P., Rajasekharan, P.E., Zafar, N., Fruk, A., (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 132: 239-265
- Koczurkiewicz, P., Kłás, K., Grabowska, K., Piska, K., Rogowska, K., Wójcik-Pszczółka, K., Podolak, I., Galanty, A., Michalik, M., Pękala, E., (2019). Saponins as chemosensitizing substances that improve effectiveness and selectivity of anticancer drug—Minireview of in vitro studies. *Phytotherapy Research*. 33(9): 2141-2151
- Kumar Srivastava, A., (2018). Significance of medicinal plants in human life, in: *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*. Elsevier (pp. 1–24)
- Luo, Q., Li, J., Wang, C., Cheng, C., Shao, J., Hui, J., Zeng, Y., Wang, J., Zhu, X., Xu, Y., (2020). TrMYB4 transcription factor regulates the rutin biosynthesis in hairy roots of *F. cymosum*. *Plant Science* 294, 110440

- Marchev, A.S., Yordanova, Z.P., Georgiev, M.I., (2020). Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 40(4): 443-458
- Nobre, L., Pauck, D., Golbourn, B., Maue, M., Bouffet, E., Remke, M., Ramaswamy, V., (2019). Effective and safe tumor inhibition using vinblastine in medulloblastoma. *Pediatric Blood and Cancer* 66(6):e27694
- Petrovska, B.B., (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. 6(11): 1-5
- Pham, J. V., Yilma, M.A., Feliz, A., Majid, M.T., Maffetone, N., Walker, J.R., Kim, E., Cho, H.J., Reynolds, J.M., Song, M.C., Park, S.R., Yoon, Y.J., (2019). A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology* 10:1404
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., Bednarek, P., (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*. 206(3): 948-964
- Pichersky, E., Raguso, R.A., (2018). Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*. 220(3):692-702
- Sabater-Jara, A.B., Tudela, L.R., López-Pérez, A.J., (2010). In vitro culture of *Taxus* sp.: Strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochemistry Reviews*. 9:343-356
- Sajadimajd, S., Bahrami, G., Daglia, M., Nabavi, S.M., Naseri, R., Farzaei, M.H., (2019). Plant-Derived Supplementary Carbohydrates, Polysaccharides and Oligosaccharides in Management of Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review. *Food Reviews International*. 35:6, 563-586
- Santos, J.D., Vitorino, I., Reyes, F., Vicente, F., Lage, O.M., (2020). From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*. 9(8): 455
- Singh, B., Sharma, R.A., 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* 5(2): 129–151.
- Sung, S.-H., Kim, J.-W., Han, J.-E., Shin, B.-C., Park, J.-K., Lee, G., (2021). toxins Animal Venom for Medical Usage in Pharmacopuncture in Korean Medicine: Current Status and Clinical Implication. *Toxins*. 13,105
- Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., Dzobo, K., (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6):1578
- Wright, G.E.B., Amstutz, U., Drögemöller, B.I., Shih, J., Rassekh, S.R., Hayden, M.R., Carleton, B.C., Ross, C.J.D., Visscher, H., Aminkeng, F., Higginson, M., Massah, N., Miao, F., Bhavsar, A., Lee, J., Bendyshe-Walton, T., Tanoshima, R., Johnson, D., Zhuwaki, C., Honcharik, N., Jong, G., Israels, S., Staub, M., Rieder, M., Faught, L., Ito, S., Nathan, P., Karande, S., Vaillancourt, R., Johnston, D., Nguyen, K., Bussi eres, J.F., Lebel, D., Jean-Louis, J., (2019). Pharmacogenomics of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy Implicates Pharmacokinetic and Inherited Neuropathy Genes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 105(2): 402–410
- Zhang, D., Yang, R., Wang, S., Dong, Z., 2014. Paclitaxel: New uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy* 8: 279–284

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Bardzo istotnym elementem mojej działalności zawodowej jest współpraca z wieloma ośrodkami naukowymi, czego efektem są liczne publikacje w czasopiśmie z listy JCR.

Współpraca naukowa dotycząca roślinnych kultur *in vitro*, ich transformacji genetycznej oraz badania właściwości biologicznych ekstraktów z nich pozyskanych, a także określanie aktywności rekombinowanych białek prowadzona była w międzynarodowych zespołach badawczych w wielu jednostkach krajowych i zagranicznych, co zawsze stwarzało optymalne warunki dla realizacji wszystkich zaplanowanych zadań.

Prowadzone badania realizowane były we współpracy z:

- Jednostki krajowe:

**Prof. dr hab. Haliną Wysokińską, dr hab. Przemysławem Sitarkiem oraz dr hab. Ewą Skalą** z Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, **Prof. dr hab. Januszem Szemrajem** z Zakładu Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, **dr hab. Maciejem Radkiem** z Kliniki Neurochirurgii, Chirurgii Kręgosłupa i Nerwów Obwodowych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi,

**Prof. dr hab. Janiną Grzegorzyczką** i pracownikami Zakładu Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, **dr Moniką Szyposzyńską** i **dr Aleksandrą Splawską** z Wojskowego Instytut Chemii i Radiometrii w Warszawie, **dr hab. Michałem Bijakiem** i pracownikami Centrum Zapobiegania Zagrożeniom Biologicznym Uniwersytetu Łódzkiego, dr hab. Joanną Wieczfińską z Zakładu Immunopatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

- Jednostki zagraniczne:

**Prof. Patricią Rijo** i jej współpracownikami z CBIOS - Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal; Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon (ULisboa), Rome, Italy, **Prof. Laurentem Picot** z UMRi CNRS 7266 LIENSs, University of La Rochelle, France, **Prof. dr hab. Tomaszem Skórskim** i jego współpracownikami z Department of Microbiology and Immunology, Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Temple University, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA, **dr. Dariuszem Pytlem** z Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, Hollings Cancer Center, USA, **Prof. Glorią Sanchez** i jej współpracownikami z Departament

of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Valencia, Spain oraz **dr hab. Ireną Brčić Karačonji** z Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Funkcja promotora pomocniczego w przewodach doktorskich

10.2015 – obecnie      Opieka naukowa nad doktorantką mgr Ewelina Łojewską, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wykorzystanie różnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek o charakterze przeciwbakteryjnym”

6.2. Funkcja promotora prac magisterskich oraz licencjackich

W okresie od 2012 do 2022 roku pełniłem funkcję promotora 7 prac magisterskich oraz 15 prac licencjackich.

6.3. Prowadzone zajęcia dydaktyczne

W okresie od 2012 do 2022 roku prowadziłem następujące zajęcia dydaktyczne na studiach I i II stopnia: Biotechnologia roślin, Inżynieria genetyczna, Inżynieria genetyczna roślin, Pracownia magisterska, Pracownia specjalistyczna, Pracownia metodyczna, Seminarium licencjackie, Seminarium magisterskie, Biologia molekularna roślin, Roślinne bioreaktory, Biotechnologia, Podstawy biotechnologii, Inżynieria genetyczna roślin oraz Metody rekultywacji w obszarach rolniczych na studiach I i II stopnia.

**Wielokrotnie otrzymywałem najwyższą możliwą ocenę (5.0) w wynikach ankiet studenckich oceniających moją działalność dydaktyczną, m.in.:**

**2016/2017 - Inżynieria genetyczna roślin – ocena 5.0**

**2017/2018 – Roślinne bioreaktory – 5.0**

6.4. Organizacja oraz udział w przedsięwzięciach popularyzujących naukę

- 2013/2014 – współorganizator i współprowadzący warsztatów „Izolacja i elektroforeza DNA” organizowanych dla uczniów liceów
- 2014- Udział w audycji radiowej „Szkielko i oko” (Radio Łódź) na temat genetycznie modyfikowanych roślin
- 2014 - współorganizator i współprowadzący warsztatów „Izolacja i elektroforeza DNA” organizowanych dla uczniów liceów
- 2014 – Prelekcja na temat terapeutycznego działania roślin w Filii nr 32 Biblioteki Miejskiej

- 2015- Wykład o organizmach modyfikowanych genetycznie w ramach akcji Uniwersytet Zawsze Otwarty
- 2015 - Wykład o organizmach modyfikowanych genetycznie w ramach Uniwersytetu Trzeciego Wieku w Aleksandrowie Łódzkim
- 2015- Wykład „Roślinne fabryki leków” w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
- 2015- współorganizator i współprowadzący warsztatów „Izolacja i elektroforeza DNA” organizowanych dla uczniów liceów
- 2016- współorganizator spotkania warsztatowego na Wydziale BiOŚ UŁ z uczniami klas II profilu biologiczno-chemicznego (I LO im. Bolesława Chrobrego z Piotrkowa Trybunalskiego, w ramach którego wygłoszono wykład „Sekrety współczesnej biotechnologii roślin, w ramach promocji kierunku Biotechnologia (spec. Biotechnologia roślinna)
- 2016- wykład „Nowoczesne rośliny – wyzwania i możliwości” oraz pokaz „Roślinny kawior”
- 2016- wykład „Przez chorobę do zdrowia, czyli tajemnice biotechnologii roślin” w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
- 2016- Wykład „Rośliny jakich nie znaleźliśmy - współczesne wyzwania i możliwości” w ramach Uniwersytet Trzeciego Wieku, Zgierz
- 2016- Wywiad dla telewizji Centrum dot. genetycznych modyfikacji roślin
- 2016- Wykład „Nieznany potencjał roślin – szansa czy zagrożenia?” zorganizowany dla uczniów XVIII L.O. w Łodzi
- 2017 – Wykład „Nowoczesna ochrona przyrody” - w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
- 2017/2018 – Współprowadzenie warsztatów „Jak ujarzmić DNA- izolacja DNA z roślin” w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii UŁ
- 2018- Wykład „Ochrona przyrody – połączenie tradycji z nowoczesnością” w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
- 2018/2019 oraz 2020/2021- Udział w programie UŁ „Dobry Uczeń Świetny Student” jako opiekun trojga uczestników
- 2017 – sprawowanie funkcji opiekuna podczas realizacji badań w ramach Studenckich Grantów Badawczych Uniwersytetu Łódzkiego – realizacja projektu



„Roślinne systemy ekspresyjne jako źródło peptydów przeciwbakteryjnych”.

- 2018 – wykład „Ochrona przyrody – połączenie tradycji z nowoczesnością” w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ
- 2022 – Laboratorium zielonej biotechnologii, warsztaty w ramach ogólnoswiatowej akcji fascynującego dnia roślin
- 2022 - Bakteryjne DNA i molekularne nożycy, czyli podstawowe narzędzia inżyniera genetycznego, warsztaty w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii organizowanego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

## 7. Inne osiągnięcia

### 7.1. Nagrody i wyróżnienia

- **Nagroda Dydaktyczna III stopnia Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego** za osiągnięcia dydaktyczne istotne dla zapewnienia wysokiego poziomu procesu dydaktycznego i jakości kształcenia w roku 2021/2022
- **Nagroda Naukowa Zespołowa za wyróżniające się osiągnięcia w międzynarodowej współpracy naukowej J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Medicinal plants as a source of bioactive compounds in biological research” 2022
- **Nagroda Naukowa Zespołowa III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za publikację naukową pt.: „The Anti-inflammatory Potential of Selected Plant-derived Compounds in Respiratory Diseases” 2020
- **Nagroda Naukowa Zespołowa III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za publikację pt.: "Caffeoylquinic acids with potential biological activity from plant in vitro cultures as alternative sources of valuable natural products" 2020
- **Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Medicinal plants - The potential mechanism of action in various diseases" 2020
- **Nagroda Naukowa Zespołowa III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „ Właściwości biologiczne ekstraktów z *Leonurus sibiricus* L.” 2019



- **Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Estimation of biological properties of plant extracts in various cell models” 2019
- **Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Biological properties of root extract from *Leonurus sibiricus* L. with overexpression of AtPAP1 transcriptional factor” 2018
- **Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. "*Rhaponticum carthamoides* transformed root extract has potent anticancer activity in human leukemia and lung adenocarcinoma cell lines" 2018
- **Nagroda Naukowa Zespołowa III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Analysis of Short-Term Smoking Effects in PBMC of Healthy Subjects—Preliminary Study” 2018
- **Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za cykl publikacji pt. „Właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwutleniające olejku eterycznego z korzeni transformowanych *Rhaponticum carthamoides* oraz właściwości przeciwnowotworowe wobec komórek glejaka ludzkiego ekstraktu z tych korzeni" 2017
- **Nagroda dla pracowników naukowo-dydaktycznych** posiadających największe osiągnięcia w roku 2014 w zakresie dorobku publikacyjnego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ (najwyżej punktowany pracownicy pomocniczy z Instytutu Biologii Eksperymentalnej)
- **Nagroda Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego** za wkład publikacyjny w ocenę parametryczną działalności Wydziału w latach 2013-2016 dotyczący 600 najwyżej punktowanych publikacji Wydziału z lat 2013-2016

## 7.2. Kursy i szkolenia

- 2022 – Szkolenie „ABC pomagania dla specjalistów i nauczycieli w pracy z dziećmi i młodzieżą ukraińską w obliczu wojny”
- 2022 – Szkolenie „Jak podnieść jakość i skuteczność swojej pracy dzięki metodom coachingowym?”
- 2022 – Szkolenie „Świadomość niepełnosprawności" realizowane w ramach

projektu (Nie)Pełnosprawny Student UŁ

- 2022 – Szkolenie z „kompetencji emocjonalnych z empatią” organizowane przez Uniwersytet Łódzki w ramach projektu „(Nie) Pełnosprawny Student UŁ”
- 2022 – Szkolenie „Jak uczyć, żeby nauczyć? Nauczyciel przyszłości – mentor”
- 2022 – Szkolenie „Kształtowanie optymizmu poznawczego”
- 2022 – Szkolenie „Być spełnionym nauczycielem”
- 2022 – Szkolenie „Praca z uczniem ze spektrum autyzmu – jak się do niej dobrze przygotować?”
- 2022 – Szkolenie „Jak odkrywać i pielęgnować talenty uczniów”
- 2022 – Szkolenie „Uczeń z niezgodnością płciową w systemie szkolnym”
- 2022 – Szkolenie „Indywidualizacja pracy z uczniem z afazją”
- 2022 – Szkolenie „Jak efektywnie pracować z klasą będącą zbiorem indywidualności o różnych możliwościach i preferencjach?”
- 2022 – Szkolenie „Jak kształtować swój profesjonalny wizerunek i budować markę osobistą nauczyciela w środowisku lokalnym i internecie?”
- 2020 - Kurs doskonalący „Wybrane zagadnienia z molekularnych podstaw onkogenezy” organizowany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
- 2020 – Kurs „Efektywne prezentowanie treści dydaktycznych” realizowane w ramach projektu „Jak projektować zajęcia mieszane” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków EFS w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój
- 2020 - Kurs „Profesjonalne bazy danych- zarządzanie informacją” realizowane w ramach projektu „Doskonałość naukowa kluczem do doskonałości kształcenia” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków EFS w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój
- 2020 – Kurs „Efektywne prezentowanie treści dydaktycznych” realizowane w ramach projektu „Doskonałość naukowa kluczem do doskonałości kształcenia” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków EFS w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój
- 2019 -Kurs doskonalący „Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE metoda i zastosowanie” organizowany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej

- 2019 - Kurs doskonalący „Podstawy techniki immunoenzymatycznej ELISA” organizowany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
- 2019 – Szkolenie „Przygotowywanie materiałów dydaktycznych i metodyka kształcenia w języku obcym” realizowane w ramach projektu „Budowanie kompetencji kadry akademickiej i administracyjnej oraz podnoszenie zdolności instytucjonalnej w zakresie umiędzynarodowienia Uniwersytetu Łódzkiego”
- 2019 – Szkolenie „Zarządzanie wielokulturowością” realizowane w ramach projektu „Budowanie kompetencji kadry akademickiej i administracyjnej oraz podnoszenie zdolności instytucjonalnej w zakresie umiędzynarodowienia Uniwersytetu Łódzkiego”
- 2018 - Kurs doskonalący „Klonowanie molekularne” organizowany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego
- 2018 - Kurs doskonalący „Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia” organizowany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
- 2018 – Szkolenie medyczne z zakresu BLS- Basic Life Support przeprowadzone na podstawie wytycznych Polskiej Rady Resuscytacji, rozszerzone o pierwszą pomoc przedmedyczną
- 2015 - Uczestnictwo w Regionalnym Forum Tutoringu w Łodzi zorganizowanym przez Collegium Wratislaviense
- 2012 - Szkolenie z metodyki zarządzania projektem PRINCE2 zakończone egzaminem i uzyskaniem międzynarodowego certyfikatu PRINCE2 Foundation Examination (nr rejestracyjny:P2R/899548, nr certyfikatu:02612794-01-PNYG)
- 2010 - Kurs „Manager Projektów Badawczych” organizowany przez Uniwersytet Łódzki oraz Centrum Transferu Technologii

#### 8. Inna aktywność

- Członek Kolegium Elektorów Uniwersytetu Łódzkiego na kadencję 2016-2020 oraz 2020-2024

## 9. Podsumowanie danych bibliometrycznych (dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora)

### Prace stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego (P1-P6)

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **24.331**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **590**

### Pozostałe prace

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **166.544**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **3010**

### Całość dorobku publikacyjnego łącznie:

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **190.875**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **3600**

### *1. Web of Science Core Collection:*

Liczba cytowań: 585

Liczba cytowań bez autocytowań: 479

Indeks Hirsha: 13

### *2. Scopus:*

Liczba cytowań: 644

Indeks Hirsha: 14

Liczba cytowań bez autocytowań wszystkich autorów: 499

Indeks Hirsha bez autocytowań wszystkich autorów 11


Liczba cytowań bez autocytowań autora: 535

Indeks Hirsha bez autocytowań autora: 12

### *3. Publish or Perish (Google Scholar):*

Liczba cytowań: 968

Indeks Hirsha: 16

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)