

Załącznik nr 2

Łukasz Kuźma

Autoreferat

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2016

1. Imię i nazwisko: **Łukasz Kuźma**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- a) **24.11.2006** – doktor nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, praca doktorska pt. „Wytwarzanie diterpenów w kulturach organów niezmienionych i zmienionych genetycznie *Salvia sclarea* L.”. Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Halina Wysokińska.
- b) **07.07.2002** – magister farmacji, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie Uniwersytet Medyczny w Łodzi), praca magisterska pt. „Diterpeny i sterole w kulturach korzeni transformowanych *Salvia sclarea* L.”. Pracę wykonano w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Łodzi. Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Halina Wysokińska.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.10.2006 – 01.05.2008 – asystent, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

02.05.2008 –obecnie – adiunkt, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

4. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

A) tytuł osiągnięcia naukowego:

“Korzenie transformowane *Salvia austriaca* Jacq. jako źródło biologicznie aktywnych diterpenów”

Zgłoszona do postępowania habilitacyjnego tematyka obejmuje cykl siedmiu publikacji.

B) wykaz publikacji:

| Lp. | Publikacja | Punktacja | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|
| | | IF | MNiSW |
| 1. | <p>Kuźma Ł., Kisiel W., Królicka A., Wysokińska H. "Genetic transformation of <i>Salvia austriaca</i> by <i>Agrobacterium rhizogenes</i> and diterpenoid isolation". Die Pharmazie 2011, 66, 904-907.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, transformacji genetycznej pędów Salvia austriaca, selekcji linii korzeniowych, hodowli korzeni transformowanych, optymalizacji warunków rozdziału chromatograficznego ekstraktu z korzeni, izolacji chromatograficznie czystych diterpenów. Brałem także aktywny udział przy tworzeniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 80 %.</i></p> | 1,006 | 15 |
| 2. | <p>Kuźma Ł., Wysokińska H., Różalski M., Krajewska U., Kisiel W. „An unusual taxodione derivative from hairy roots of <i>Salvia austriaca</i>”. Fitoterapia 2012, 83, 770-773.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał zoptymalizowaniu warunków eksperymentalnych pod kątem izolacji nowej pochodnej taksodionu, wyizolowaniu chromatograficznie czystej nowego związku - 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu, hodowli korzeni transformowanych. Współuczestniczyłem także w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 70 %.</i></p> | 2,231 | 25 |
| 3. | <p>Kuźma Ł., Wysokińska H., Różalski M., Budzyńska A., Więckowska-Szakiel M., Sadowska B., Paszkiewicz M., Kisiel W., Różalska B. „Antimicrobial and anti-biofilm properties of new taxodione derivative from hairy roots of <i>Salvia austriaca</i>”. Phytomedicine 2012, 19, 1285-1287.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na prowadzeniu kultur korzeni transformowanych i wyizolowaniu 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu i taksodionu oraz na współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 60 %.</i></p> | 2,972 | 35 |
| 4. | <p>Kuźma Ł., Wysokińska H. „UPLC-DAD Determination of taxodione content in hairy roots of <i>Salvia austriaca</i> Jacq.” Acta Chromatographica 2014, 26, 671-681.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wyizolowaniu chromatograficznie czystego taksodionu z ekstraktu korzeniowego, optymalizacji warunków ekstrakcji (dobór rozpuszczalnika) i analizy UHPLC (dobór właściwej długości fali DAD do detekcji taksodionu, dobór fazy ruchomej i programu gradientowego) pod kątem oznaczania zawartości taksodionu, walidacji metody UHPLC, przeprowadzeniu eksperymentalnej części biotechnologicznej</i></p> | 0,577 | 15 |

| | | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|
| | <i>(hodowla korzeni transformowanych podczas 50-dniowego cyklu wzrostu). Brałem także udział przy tworzeniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 80%.</i> | | |
| 5. | Kuźma Ł. , Wysokińska H., Sikora J., Olszewska P., Mikiciuk-Olasik E., Szymański P. "Taxodione and extracts from <i>Salvia austriaca</i> roots as human cholinesterase inhibitors". <i>Phytotherapy Research</i> 2016, 30, 234-242. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, hodowli korzeni transformowanych, wyizolowaniu czystego taksodionu z ekstraktu korzeniowego, przygotowaniu ekstraktów z korzeni transformowanych i nietransformowanych z roślin rosnących w gruncie, nadzór, koordynacja i współudział w realizacji badań biologicznych oraz aktywnym udziale w tworzeniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 70%.</i> | 2.519 | 25 |
| 6. | Sadowska B., Kuźma Ł. , Micota B., Budzyńska A., Wysokińska H., Kłys A., Więckowska-Szakiel M., Różalska B. "New biological potential of abietane diterpenoids isolated from <i>Salvia austriaca</i> against microbial virulence factors". <i>Microbial Pathogenesis</i> 2016, 98, 132-139. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na hodowli korzeni transformowanych, wyizolowaniu czystego taksodionu i 15-deoksy-fuerstionu z ekstraktu korzeniowego oraz na współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 40%.</i> | 1,888 | 20 |
| 7. | Kuźma Ł. , Kaiser M., Wysokińska H. „The production and anti-protozoal activity of abietane diterpenes in <i>Salvia austriaca</i> hairy roots grown in shake-flasks and bioreactor”. <i>Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> 2016, DOI 10.1080/10826068.2016.1168745. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na hodowli korzeni transformowanych w kolbach i aeroponicznym bioreaktorze, wykonaniu analiz ilościowych metodą UHPLC, wyizolowaniu i oczyszczeniu czterech diterpenów (taksodionu, taksodionu, 15-deoksy-fuerstionu i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu) na potrzeby badań biologicznych oraz na przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 80%.</i> | 1,114 | 15 |
| Łącznie: | | 12,307 | 150 |

Wyniki badań opublikowane w wymienionych pracach uzyskałem przy finansowym wsparciu z funduszu "dla młodych naukowców" (502-03/3-012-01/502-34-032) oraz funduszy statutowych UM w Łodzi (503/3-012-01/503-31-001).

Publikacje zgłoszone do postępowania habilitacyjnego powstały we współpracy z Prof. Wandą Kisiel (Zakład Fitochemii IF PAN Kraków), Prof. Aleksandrą Królicką (Pracownia

badania związków biologicznie czynnych UG i GUMed), dr Markiem Różalskim i mgr Urszulą Krajewską (Zakład Biochemii Farmaceutycznej UM w Łodzi), prof. Barbarą Różalską, Prof. Beatą Sadowską wraz z Zespołem (Katedra Mikrobiologii Infekcyjnej UŁ w Łodzi), Prof. Pawłem Szymańskim i Jego Współpracownikami (Zakład Chemii Farmaceutycznej UM w Łodzi), mgr Marcelem Kaiserem (Swiss Tropical and Public Health Institute, Parasite Chemotherapy, Basel, University of Basel, Switzerland) oraz dr Arkadiuszem Kłysem (Pracownia NMR UŁ).

Wprowadzenie w tematykę badawczą publikacji zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym

Każda roślina przeprowadza dwa rodzaje metabolizmu: podstawowy (pierwotny) i wtórny, których produkty pełnią odmienne funkcje. Do metabolitów podstawowych zaliczamy związki warunkujące podstawowe procesy życiowe rośliny takie, jak wzrost, podziały komórkowe, oddychanie, czy rozmnażanie. Do roślinnych metabolitów podstawowych możemy zaliczyć: białka, węglowodany, tłuszcze, czy kwasy nukleinowe. Metabolity wtórne, jakkolwiek zazwyczaj nie biorą udziału w podstawowych procesach życiowych rośliny, to mogą odgrywać w roślinie inne istotne role, np. ochrona przed atakiem roślinnych patogenów, w tym drobnoustrojów, czy udział w konkurencji międzygatunkowej, a także ochrona przed promieniowaniem UV, nadmiernym zasoleniem i metalami ciężkimi. Rośliny są źródłem bardzo zróżnicowanych pod względem struktury chemicznej i często wartościowych m.in. dla lecznictwa metabolitów wtórnych. Wśród nich można wyróżnić związki alifatyczne, aromatyczne oraz heterocykliczne. Przypuszcza się, że rocznie identyfikowanych jest około 4 tys. nowych fitozwiązków z grupy metabolitów wtórnych (Oksman-Caldentey i Inzé 2004). Występowanie danej grupy metabolitów wtórnych jest często charakterystyczne dla rodziny, jak również dla poszczególnych gatunków roślin, czy nawet ich organów. Rośliny wytwarzają je w małych ilościach i gromadzą w specjalnych strukturach, np. wakuolach, komórkach olejkowych, rurach mlecznych, włoskach wydzielniczych. Znane są przykłady roślin, w których miejscem akumulacji metabolitów wtórnych są na przykład korzenie (skopolamina, hioscyjamina w rodzinie Solanaceae, czy niektóre diterpeny w rodzinie Lamiaceae) lub liście (kardenolidy w rodzaju *Digitalis*). Metabolity wtórne mogą być pozyskiwane z roślin rosnących w warunkach glebowych (ze stanu naturalnego i/lub z upraw). Takie źródło pozyskiwania surowców leczniczych może napotykać szereg trudności związanych ze zmiennymi warunkami klimatycznymi, zanieczyszczeniami środowiska oraz obecnością patogenów (szkodniki roślinne,

mikroorganizmy chorobotwórcze dla roślin i człowieka). Problematyczny bywa też czas trwania tradycyjnej uprawy, np. korzenie żeń-szenia nadające się dla lecznictwa otrzymuje się po 5-7 latach prowadzenia plantacji.

Innym źródłem pozyskiwania metabolitów wtórnych mogą być roślinne kultury *in vitro*. Kultury *in vitro*, to hodowle protoplastów, komórek, tkanek lub organów roślinnych (pędów, korzeni) na sztucznych podłożach. Kultury organów, w porównaniu do kultur komórkowych, często są lepszym źródłem pozyskiwania metabolitów wtórnych, gdyż biosynteza wielu fitozwiązków może wymagać wyspecjalizowanych tkanek i/lub organów rośliny, np. korzeni. Roślinne kultury *in vitro* prowadzone są w sterylnych, ściśle kontrolowanych warunkach. Można je prowadzić niezależnie od pór roku, warunków klimatycznych i zanieczyszczeń środowiska. Rozwój kultur *in vitro* okazał się możliwy dzięki zdolności pojedynczej komórki somatycznej (lub protoplastu) do odtworzenia całej rośliny (totipotencja morfologiczna). Odizolowane od organizmu macierzystego komórki roślinne potrafią też wytwarzać i/lub akumulować metabolity wtórne takie same, jak roślina macierzysta (totipotencja chemiczna) (Skucińska 2001). Roślinne kultury *in vitro* mogą służyć do prostego i szybkiego mikrorozmnażania roślin, czy też uzyskiwania roślin genetycznie zmodyfikowanych w celu ich propagacji i pozyskiwania substancji biologicznie czynnych. Przykładem genetycznie zmodyfikowanych roślinnych kultur *in vitro* są kultury korzeni transformowanych. Można je uzyskać poprzez wektorową transformację genetyczną z wykorzystaniem bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes*, wywołującej u roślin tzw. „chorobę włóśnikowatości” (Petit i wsp., 1986). Przeniesienie genów między *Procaryota* a *Eucaryota* zachodzi wskutek obecności w komórkach bakteryjnych kolistego pozachromosowego DNA - plazmidu Ri (Wasilewska i Królicka, 2005). W tym plazmidzie znajduje się fragment transferowy DNA (T-DNA) (10-30 kbp). Prócz T-DNA, na plazmidzie Ri znajduje się region wirulencji (*vir* region) oraz geny odpowiedzialne za katabolizm opin (Sevón i Oksman-Caldentey 2002). Opiny, to połączenia aminokwasów z kwasami karboksylowymi. Są one wykorzystywane przez *A. rhizogenes* jako źródło węgla i azotu (Schell 1987). *A. rhizogenes* może biosyntetyzować różne opiny. W związku z tym szczepy tej bakterii dzieli się na agropinowe, mannopinowe i kukumopinowe (Petit i wsp. 1986; Schell 1987). W zależności od szczepu bakteryjnego T-DNA może być pojedynczy lub podzielony na dwa odcinki: prawy (TR-DNA, 19-20 kbp) i lewy (TL-DNA, 8-20 kbp). Przykładowo, u szczepów bakteryjnych typu kukumopiny i mannopiny występuje plazmid z pojedynczym fragmentem T-DNA, natomiast szczepy agropinowe mają T-DNA zbudowane z dwóch odcinków (TL-DNA i TR-DNA) (De Paolis i wsp. 1985). Każdy z nich, niezależnie od siebie,

integruje się z genomem komórki roślinnej. Na TL-DNA zidentyfikowano loci co najmniej czterech genów (tzw. rol geny): *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*, które działają synergistycznie, a ich ekspresja niezbędna jest do utworzenia korzeni włośnikowatych. Palazon i wsp. (1997) donoszą, że powstawanie korzeni włośnikowatych zależy od ekspresji genów *rolB*, zaś geny *rolC* warunkują ich wzrost. Na TR-DNA zlokalizowane są geny biosyntezy auksyn oraz opin (Wysokińska 2000 a). Na plazmidzie bakteryjnym występuje także rejon wirulencji (30-40 kpb). W rejonie tym znajdują się 24 geny, tzw. *vir* geny zgrupowane w operony (Rakoczy-Trojanowska 2001). Ekspresja genów *virD* prowadzi do syntezy enzymu wycinającego odcinek T-DNA z bakteryjnego plazmidu Ri. Białko *virD2* nacina T-DNA w miejscu sekwencji granicznych. Rolą genów *virB* jest kodowanie białek błonowych, przez które przechodzi odcinek T-DNA. Wraz z białkiem *virE2* powstaje kompleks z T-DNA zdolny do przejścia przez błonę jądrową. W procesie transformacji biorą również udział geny *chvA*, *chvB* i *chvE* mające loci w chromosomie bakteryjnym. Geny *chvA* i *chvB* kodują białka będące odpowiedzialne za połączenie bakterii z komórką roślinną, a gen *chvE* bierze udział w aktywacji genów *vir* (Petersen i wsp. 1989). W wyniku transformacji za pomocą *A. rhizogenes* pochodzący z plazmidu bakteryjnego Ri transferowy DNA (T-DNA) ulega trwałemu zintegrowaniu z genomem komórki roślinnej. Po zakażeniu eksplantatu bakterią *A. rhizogenes*, zazwyczaj z miejsca iniekcji zaczynają wyrastać korzenie włośnikowate. Po oddzieleniu od eksplantatu i eliminacji bakterii, korzenie transformowane mogą rosnąć na stałym lub w płynnym podłożu. W warunkach *in vitro* kultury korzeni transformowanych charakteryzują się brakiem geotropizmu, plagiotropizmem oraz wytwarzają liczne korzenie boczne ze zwiększoną strefą włośnikową (Sevón i Oksman-Caldentey 2002). W rezultacie zakażenia z jednego eksplantatu można otrzymać liczne korzenie włośnikowate, z których każdy daje początek jednej linii. Każda z nich może różnić się od pozostałych morfologią, intensywnością wzrostu oraz zawartością metabolitów wtórnych. Z tych powodów, selekcja odpowiednich linii jest istotna dla otrzymania kultur korzeni transformowanych, charakteryzujących wysokim przyrostem biomasy i wysokim poziomem metabolitów wtórnych. Korzenie włośnikowate posiadają szereg korzystnych właściwości. Mianowicie, charakteryzują się stabilnością genetyczną i biochemiczną, wysokim i na ogół szybkim przyrostem biomasy oraz możliwością prowadzenia hodowli na dużą skalę w bioreaktorach (Wysokińska, 2000 b). Dodatkowo, korzenie transformowane na ogół nie wymagają dodawania do podłoża hodowlanego zwykle drogich regulatorów wzrostu, co znacznie obniża koszty prowadzenia kultury. Nierzadko znamienny dla korzeni transformowanych jest wysoki potencjał w odniesieniu do biosyntezy metabolitów wtórnych w porównaniu do kultur

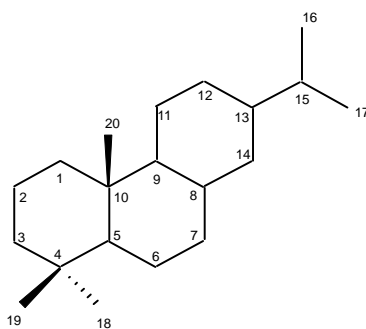
komórkowych, a także roślin macierzystych (Wasilewska i Królicka, 2005). Wśród biosyntetyzowanych w kulturach korzeni włośnikowatych fitozwiązków można znaleźć nie tylko te charakterystyczne dla danego gatunku, ale także nowe, dotychczas nie wykryte w roślinie (co znalazło potwierdzenie także w moich badaniach). Przykładem są siewki *Catharanthus roseus* poddane transformacji szczepem 15834 *A. rhizogenes*, które w korzeniach transformowanych wytwarzają związek: 3,7,11,19,23,27-heksametylo-15-hydroksymetyleno-*n*-octano-5,8,20-triene-10 β ,18 α -diol-10 β -D-glukopiranozyd, nie wykryty w niezmienionej genetycznie roślinie (Chung i wsp., 2007). Najczęściej kultury korzeni transformowanych wykorzystuje się do produkcji metabolitów wtórnych, których miejscem biosyntezy w roślinie są korzenie. Znane są jednak kultury genetycznie zmodyfikowanych korzeni, które wytwarzają metabolity wtórne syntetyzowane/akumulowane w innych częściach rośliny. Przykładem jest artemizyna, nie występująca w podziemnych częściach rośliny *Artemisia annua*, a wyizolowana z korzeni włośnikowatych tego gatunku (Kim i wsp., 2002).

Korzenie włośnikowate mogą być także wykorzystywane m.in. do przeprowadzania fitoremediacji. Są też przedmiotem badań nad funkcjonowaniem korzeni i ich bezpośredniego sąsiedztwa – ryzosfery (Suza i wsp., 2008). Korzenie włośnikowate stanowią również materiał do badań nad interakcjami pomiędzy roślinami a innymi organizmami, na przykład owadami, grzybami, czy nicieniami (Malepszy, 2001).

Jak wcześniej wspomniano, rośliny mogą być źródłem cennych, biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych. Jedną z grup takich związków, wokół której nie słabnie zainteresowanie wielu badaczy (np. Prof. A. Ulubelen z Wydziału Farmaceutycznego, Istambuł, Turcja), są diterpeny. Ogólnie, są to związki o wzorze sumarycznym C₂₀H₃₂ powstałe z połączenia czterech pięciowęglowych jednostek izoprenu. Cząsteczki diterpenów mogą być acykliczne, (np. geranylogeraniol, albo fitol) lub znacznie częściej cykliczne. Te ostatnie można podzielić na mono- (np. α -kamforen), di- (labdany, klerodany), tri- (pimarany, abietany), tetracykliczne (kaureny, bejereny, gibereliny) oraz diterpeny makrocykliczne (taksany) (Alvarenga i wsp. 2001). Prekursorem biosyntezy diterpenów jest pirofosforan 3-izopentenylu (IPP). Związek ten może powstawać w cytoplazmie komórkowej (powstaje wówczas z udziałem mewalonianu) lub w plastydach (bez udziału mewalonianu). Biosynteza diterpenów przebiega najczęściej w cytoplazmie. Powstały IPP izomeryzuje do dimetyloallilodifosforanu. W toku dalszych przemian dimetyloallilodifosforan, w obecności prenylotransferazy, zostaje połączony z trzema resztami pirofosforanu 3-izopentenylu, w wyniku czego powstaje geranylo-geranylodifosforan. Związek ten, w rezultacie dalszych

przemian przekształcany jest w diterpeny. Przykładowo, z geranylo-geranylodifosforanu, z udziałem cyklazy geranylo-geranylodifosforanu oraz syntazy abietadienu, powstaje kopalilodifosforan, z którego, w toku dalszej cyklizacji powstają diterpeny abietadienowe.

Biorąc pod uwagę właściwości biologiczne, na szczególną uwagę zasługują diterpeny typu abietanu. Jest to najliczniejsza grupa związków (ponad 270) (Hanson, 2004) wśród diterpenów występujących w rodzaju *Salvia*. Typowe abietanowe diterpeny są tricykliczne (Ryc. 1), przy atomie węgla C-13 obecna jest grupa izopropylowa, przy C-4 - dwie grupy metylowe, a przy C-10 jedna grupa metylowa.



Ryc. 1. Struktura abietanu

Wśród abietanów wyróżnić można także:

- 4,5-seko-20(10→5)*abeo*-abietany, charakteryzujące się brakiem wiązania między C4 i C5; ten typ abietanów występuje w głównie w rodzaju *Zhumeria* i *Salvia* (Alvarenga i wsp. 2001);
- 4,5-seko-20(10→5)*friedo*-abietany, charakteryzujące się obecnością podwójnego wiązania między atomami C-5 a C-10, które także wykryto w rodzaju *Salvia* (Alvarenga i wsp. 2001);
- 17(15→16)*abeo*abietany, w których strukturze przy C-13 nie ma grupy izopropylowej, tylko *n*-propylowa; znaleziono je w kilku rodzajach rodziny *Lamiaceae*, w tym w rodzaju *Salvia* (Ulubelen i wsp., 1994; Alvarenga i wsp., 2001).
- 19,20-dinorabietany oraz 20-norabietany, charakteryzujące się brakiem grupy metylowej, odpowiednio przy 4-tym (C19) i 10-tym atomie węgla (C20, p. Ryc. 1); te diterpeny zostały również wykryte u przedstawicieli rodzaju *Salvia*.

W diterpenach typu abietanu, występujących w rodzaju *Salvia*, każda pozycja może być utleniona z wyjątkiem atomu węgla C10. Do abietanowych diterpenów należą również tanszinony – związki po raz pierwszy wykryte w korzeniach szafwii czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*) (Kakisawa i wsp., 1968). W szkielecie tych związków zwykle występuje ugrupowanie *orto*- lub *para*- naftochinonu oraz pierścień furanu.

Do 2008 roku (początek moich badań nad gatunkiem *Salvia austriaca*) w korzeniach *Salvia austriaca* rosnącej w gruncie, wykryto dwa diterpeny z grupy abietanów: 7 α -acetoksyrojleanon i 7 α -hydroksyrojleanon (Nagy i wsp., 1999). Diterpeny te były poddane badaniom pod kątem aktywności biologicznej, z których wynika, że 7 α -acetoksyrojleanon działa cytotoksycznie wobec komórek białaczkowych (da Cruz Araujo i wsp., 2006; Slameňova i wsp., 2004), komórek raka trzustki (MIAPaCa-2) (Fronza i wsp., 2012; Fronza i wsp., 2011) i czerniaka z linii komórkowych MV-3 (Fronza i wsp., 2011). Dla 7 α -hydroksyrojleanonu wykazano działanie przeciwbakteryjne wobec niektórych bakterii gram-dodatnich. Potwierdzono również jego aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka szyjki macicy (HeLa) oraz krtani (Hep-2) (Moujir i wsp., 1996). Wyniki uzyskane przez tych autorów wskazujące na aktywność biologiczną diterpenów wykrytych w korzeniach *Salvia austriaca*, zachęciły mnie do podjęcia pracy z korzeniami transgenicznymi tej rośliny.

C) Cel naukowy ww. prac i osiągniętych wyników:

Podstawowym celem badań składających się na rozprawę habilitacyjną było otrzymanie kultury korzeni *Salvia austriaca* w wyniku transformacji szczepem A4 *Agrobacterium rhizogenes*, poznanie ich możliwości do wytwarzania diterpenów abietanowych oraz badania aktywności biologicznej ekstraktów i diterpenów wyizolowanych z hodowanych *in vitro* kultur.

Badania obejmowały:

1. Selekcję linii kultury korzeni transformowanych *S. austriaca*, charakteryzującej się wysokim przyrostem biomasy.
2. Izolację i identyfikację diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. austriaca*.
3. Określenie zawartości diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. austriaca* oraz porównanie z zawartością tych związków w korzeniach nietransformowanych rośliny rosnącej w gruncie.
4. Badania aktywności wyizolowanych z korzeni *S. austriaca* diterpenów pod kątem działania cytotoksycznego, przeciwbakteryjnego, przeciwpierwotniakowego i zdolności do inhibicji acetylo- i butyrylocholinoesterazy.

Otrzymywanie korzeni transformowanych *Salvia austriaca* i ich wzrost w kulturze *in vitro*.

Liście hodowanych *in vitro* pędów *S. austriaca* zakażano szczepem A4 *Agrobacterium*

rhizogenes (**publikacja nr 1**). Po 5 tygodniach ok. 50% zakażonych eksplantatów tworzyło korzenie, które przenoszono pojedynczo do płynnego podłoża ½ B5 (Gamborg i wsp., 1968) uzupełnionego ampicyliną. Po eliminacji bakterii otrzymano 7 sterylnych linii korzeniowych (C1-C7). Transformację tych korzeni potwierdzono metodą PCR (**publikacja nr 1**). Analiza wykazała obecność *rolB* (423 pz) i *rolC* (626 pz) genów we wszystkich wyizolowanych liniach korzeniowych. Na podstawie morfologii korzeni, przyrostu świeżej i suchej masy, do dalszych badań wybrano linię C7. Celem osiągnięcia jak najwyższej biomasy, korzenie linii C7 hodowano w kolbach Erlenmeyera w różnych płynnych podłożach: z pełną (B5) (Gamborg i wsp., 1968), WPM (woody plant medium) (Lloyd i McCown, 1980) i SH (Schenk i Hildebrandt, 1972)) i zredukowaną do połowy zawartością makro- i mikroelementów (½ B5, ½ WPM i ½ SH) (**publikacja nr 7**). Po 30 dniach hodowli najwyższą świeżą ($203,2 \text{ g L}^{-1}$) i suchą masę ($16,3 \text{ g L}^{-1}$) osiągały kultury w podłożu SH.

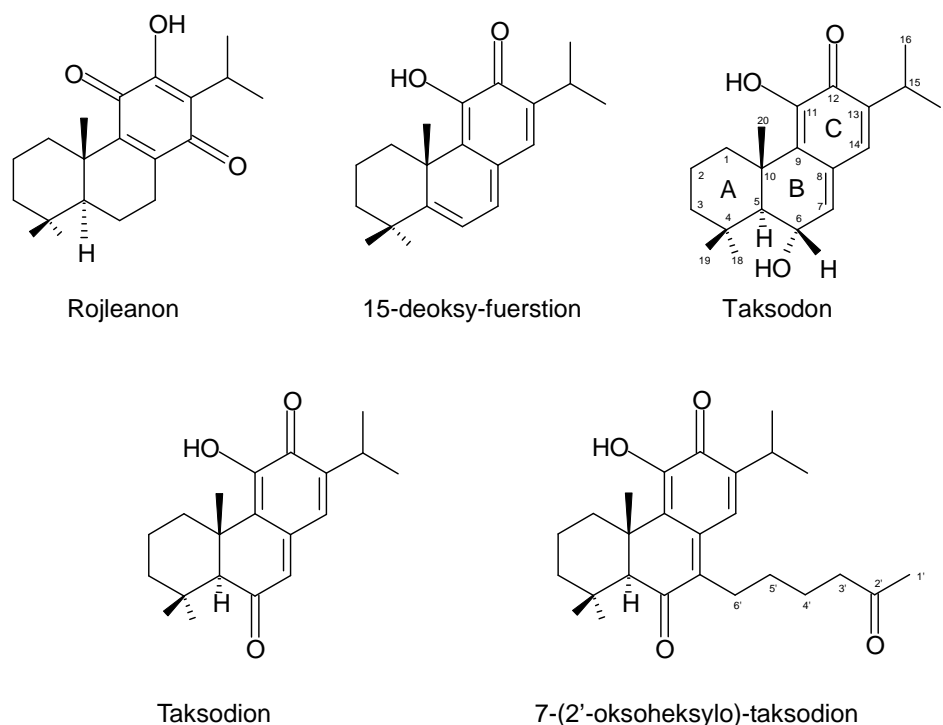
Aby określić optymalny czas trwania pasażu, dla linii C7 wykreślono krzywą wzrostu, określając w ciągu 50 dni hodowli w odstępach 5-dniowych zmiany w suchej masie korzeni (**publikacja nr 7**). Stwierdzono brak lag-fazy w tej kulturze – korzenie od razu podejmowały wzrost, a cykl wzrostu w podłożu SH trwał 35 dni. Podczas tego okresu sucha masa wrosła 7,4-krotnie i wynosiła $15,7 \text{ g L}^{-1}$ przy zastosowaniu inokulatu $2,1 \text{ g L}^{-1}$ (**publikacja nr 7**).

Kolejnym etapem badań było zwiększenie skali hodowli korzeni transformowanych *S. austriaca* z kolb Erlenmeyera do bioreaktora (**publikacja nr 7**). Zastosowano 5-litrowy aeroponiczny bioreaktor, w którym kultura korzeni była zraszana rozpylonym płynnym podłożem SH w czasie 35 sekund, po czym miała miejsce 3-minutowa przerwa w dostarczaniu podłoża. Cykl wzrostu wynosił 50 dni. Jednak osiągnięte przyrosty świeżej i suchej masy były, odpowiednio, 2-krotnie i 1,5-krotnie niższe niż dla kultury prowadzonej w kolbach Erlenmeyera (**publikacja nr 7**).

Izolacja i identyfikacja diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. austriaca*.

Uzyskane korzenie transformowane *S. austriaca* poddano 3-krotnej ekstrakcji *n*-heksanem poprzez sonikację z użyciem łaźni ultradźwiękowej. *N*-heksanowy ekstrakt zagęszczono, a następnie rozdzielano chromatograficznie z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej. Rozdział ekstraktu prowadzono na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym (faza normalna - NP) z użyciem dwuskładnikowej fazy ruchomej (*n*-heksan:octan etylu 9:1, v/v). W rezultacie uzyskano 6 pasm. Dwa pasma (odpowiednio o $R_f = 0,73$ i $R_f = 0,66$) rozdzielano dalej na płytkach (faza normalna) z użyciem dichlorometanu

jako fazy ruchomej, następnie na płytkach RP-18 (faza odwrócona - RP) w metanolu. Trzecie pasmo z pierwszego rozdziału chromatograficznego ($R_f = 0,56$) doczyszczane było przez preparatywną TLC (faza normalna) z użyciem fazy ruchomej: *n*-heksan:octan etylu 9:1 (v/v). Czwarte pasmo ($R_f = 0,22$) doczyszczano techniką preparatywnej TLC (faza ruchoma: dichlorometan:octan etylu 9,5:0,5 (v/v)) i RP-TLC (faza ruchoma: metanol). Piąte pasmo ($R_f = 0,19$) poddawano rechromatografii (preparatywna TLC) z użyciem fazy ruchomej: dichlorometan:octan etylu 9,5:0,5, v/v (NP-TLC) i acetonitryl:woda 9:1, v/v (RP-TLC). Wyekstrahowane z płytek chromatograficznie czyste związki poddawano analizie spektroskopowej NMR ($^1\text{H-NMR}$, 2D-NMR i $^{13}\text{C-NMR}$), EIMS oraz skręcalności optycznej (**publikacja nr 1, 2 i 7**). W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono, że korzenie transformowane *S. austriaca* są zdolne do biosyntezy abietanowych diterpenów, tj.: taksodionu, 15-deoksy-fuerstionu i rojleanonu (**publikacja nr 1**), taksodonu (**publikacja nr 7**) i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu (**publikacja nr 2**) (Ryc. 2). Wszystkie wymienione powyżej związki były po raz pierwszy wyizolowane z gatunku *S. austriaca*. 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion okazał się związkiem nowym, dotychczas nie wykrytym w królestwie roślin.



Ryc. 2. Struktury chemiczne wyizolowanych z korzeni transformowanych *S. austriaca* diterpenów.

Wyizolowane z korzeni transformowanych abietanowe diterpeny, z wyjątkiem rojleanonu

będącego abietanem z ugrupowaniem *para*-naftochinonu, posiadają w cząsteczce fragment *para*-metydo-chinonowy. Jak pokazano na ryc. 2, związki te charakteryzują się obecnością fragmentu cykloheksadienowego (pierścień C) (Ryc. 3) z grupą karbonylową (C-12, p. Ryc. 2) i egzocykliczną grupą metylenową (węgle z podwójnym wiązaniem, w tym przypadku C-7 i C-8 w pierścieniu B, p. Ryc. 2).

Oznaczanie zawartości diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. austriaca* oraz porównanie z zawartością tych związków w korzeniach nietransformowanych rośliny rosnącej w gruncie.

Oznaczanie zawartości diterpenów w kulturze korzeni transformowanych i w korzeniach rośliny rosnącej w gruncie przeprowadzono w oparciu o opracowaną przeze mnie i zwalidowaną metodę UHPLC dla oznaczania zawartości taksodionu (**publikacja nr 4**). Pomimo faktu, że taksodion był już wcześniej izolowany, np. z nadziemnych części *Taxodium distichum*, czy z korzeni *Salvia phlomoides* (Kupchan i wsp., 1969; Hueso-Rodríguez i wsp. 1983), w piśmiennictwie nie było dotychczas znanej metody dla ilościowego oznaczania tego diterpenu. W **publikacji nr 4** oceniono wydajność ekstrakcji taksodionu z materiału roślinnego przy użyciu różnych rozpuszczalników i stwierdzono, że najbardziej odpowiednim jest *n*-heksan. *N*-heksanowy ekstrakt rozdzielano na UHPLC z użyciem dwuskładniokowej fazy ruchomej (acetonitryl i woda, zakwaszone kwasem mrówkowym w stęż. 0,1%). W oparciu o uzyskane parametry walidacji ustalono, że zaproponowana metoda charakteryzuje się wysoką precyzją, odzyskiem i powtarzalnością (**publikacja nr 4**). Z użyciem tej metody określono zawartość taksodionu w siedmiu liniach korzeni transformowanych (C1-C7) rosnących w podłożu ½ B5 przez 30 dni. Najwyższą zawartość tego metabolitu odnotowano w linii C7 (0,7 mg g⁻¹ s.m.). Biorąc pod uwagę biomasę oraz zawartość taksodionu, linia C7, jako najbardziej produktywna, została wybrana do dalszych badań. Zaproponowana w **publikacji nr 4** metoda UHPLC umożliwiła także rozdział i oznaczanie zawartości w korzeniach pozostałych diterpenów, tj. taksodonu, 15-deoksy-fuerstionu oraz 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu. Z racji braku dostępności preparatów handlowych, wszystkie substancje wzorcowe (taksodon, taksodion, 15-deoksy-fuerstion i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion) użyte do kalibracji na potrzeby oznaczeń metodą UHPLC zostały wyizolowane z korzeni transformowanych *S. austriaca* metodą preparatywnej TLC, co opisano w **publikacjach nr 1, 2 i 7**. Badania przeprowadzone z linią C7 korzeni transformowanych hodowanych w kolbach Erlenmeyera w różnych podłożach z pełną (Schenk'a i Hildebrandt'a

(SH), Gamborga (B5) i woody plant medium (WPM)) i zredukowaną do połowy zawartością makro- i mikroelementów (1/2 SH, 1/2 B5, 1/2 WPM) wykazały, że kultury rosnące we wszystkich badanych podłożach były zdolne do biosyntezy analizowanych diterpenów (**publikacja nr 7**). Jednak poziom tych metabolitów był różny w zależności od użytego podłoża hodowlanego. Po 30 dniach wzrostu najwięcej diterpenów (liczonych jako suma taksodonu, taksodionu, 15-deoksy-fuerstionu i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu) wytwarzały korzenie rosnące w płynnym podłożu SH (7,3 mg g⁻¹ s.m.). Niezależnie od rodzaju zastosowanego podłoża dominował taksodon. Stanowił on od 42 do 57% oznaczanych diterpenów, a jego zawartość w korzeniach wahała się od 2,1 (hodowla w podłożu 1/2 B5) do 3,9 mg g⁻¹ s.m. (hodowla w podłożu SH). Hodowla korzeni w podłożu SH skutkowała także najwyższą zawartością taksodionu, którego poziom wynosił 1,15 mg g⁻¹ s.m. Dla biosyntezy 15-deoksy-fuerstionu, najkorzystniejszymi podłożami były SH i WPM – w 1 gramie s.m. korzeni hodowanych w tych warunkach odnotowano, odpowiednio, 2,15 i 2,25 mg tego związku (**publikacja nr 7**). Spośród wszystkich badanych diterpenów, w najmniejszych ilościach biosyntetyzowany był 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion. Z racji wysokiego przyrostu biomasy korzenie transformowane *S. austriaca* rosnące w płynnym podłożu SH charakteryzowały się także najwyższą produkcją (liczoną jako zawartość w mg diterpenów w suchej masie w odniesieniu do 1 litra podłoża). Hodowane w tych warunkach korzenie produkowały po 30 dniach wzrostu ponad 114 mg diterpenów w 1 litrze kultury.

Badano również zmiany zawartości diterpenów (taksodonu, taksodionu, 15-deoksyfuerstionu i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu) podczas 50-dniowego cyklu wzrostu w korzeniach transformowanych *S. austriaca* hodowanych w płynnym podłożu SH (**publikacja nr 7**). Z przebiegu krzywej wzrostu korzeni rosnących w kolbach Erlenmeyera w płynnym podłożu SH wynika, że biosynteza diterpenów rozpoczynała się w 20-25 dniu cyklu wzrostu, tj. w czasie, w którym obserwowano spowolnienie wzrostu kultury. Poziom diterpenów zwiększał się w kolejnych dniach i osiągał maksimum: dla taksodonu – w 40 dniu hodowli (4,8 mg g⁻¹ s.m.), dla taksodionu – w 45 dniu cyklu wzrostu (1,4 mg g⁻¹ s.m.). Najwyższy poziom 15-deoksy-fuerstionu stwierdzono po zakończeniu wzrostu, tj. w 50 dniu hodowli i wynosił on 4,0 mg g⁻¹ s.m. Z porównania krzywej wzrostu i krzywej przebiegu akumulacji diterpenów w korzeniach wynika, że istnieje odwrotna korelacja między wzrostem korzeni, a biosyntezą diterpenów, ponieważ najwyższy poziom metabolitów występował po zakończeniu przyrostu biomasy. To jest często spotykane w odniesieniu do metabolitów wtórnych produkowanych w innych roślinnych kulturach *in vitro*, np. w kulturach korzeni transformowanych *Datura stramonium*, czy *Catharanthus roseus* (Maldonado-Mendoza i wsp., 1993; Parr i wsp., 1988).

Putalun i wsp. (2006) sugerują, że wzrost biosyntezy metabolitów wtórnych podczas fazy stacjonarnej może być spowodowany stresem wynikającym m. in. z wyczerpania składników odżywczych w podłożu hodowlanym.

Korzenie włośnikowate *S. austriaca* wykazywały stabilność pod względem biosyntezy abietanowych diterpenów w ciągu ponad 6 lat hodowli w warunkach *in vitro*. W tym okresie odnotowano tylko nieznaczne wahania w zawartości tych związków (**publikacja nr 7**).

Kolejnym etapem badawczym była hodowla korzeni transformowanych *S. austriaca* w aeroponicznym bioreaktorze. Jak opisano na str. 11, do hodowli użyto 5-litrowy aeroponiczny bioreaktor (objętość robocza: 4 litry) uzupełniony 1 l płynnego podłoża SH (**publikacja nr 7**). Stwierdzono, że po 50 dniach wzrostu w bioreaktorze korzenie transformowane *S. austriaca* wytwarzały diterpeny w mniejszych ilościach niż korzenie rosnące w kolbach. Zawartość diterpenów w korzeniach rosnących w bioreaktorze wynosiła 5,56 mg diterpenów w 1 g suchej masy, co stanowiło 77% zawartości tych metabolitów w korzeniach rosnących w kolbach. Jeszcze większe różnice zaobserwowano w produkcji diterpenów (61 mg L⁻¹ w bioreaktorze vs 114 mg L⁻¹ w kolbach). Obniżenie poziomu diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. austriaca* rosnących w bioreaktorze w porównaniu z kulturą prowadzoną w kolbach można tłumaczyć różnymi warunkami hodowli, w tym także różnicami w składzie fazy gazowej (stężenie tlenu, dwutlenku węgla, etylenu), co obserwowano w badaniach innych autorów (ten Hoopen i wsp. 1994; Zheng i wsp. 1998).

Poziom abietanowych diterpenów w korzeniach transformowanych *Salvia austriaca* porównywano z zawartością tych związków w korzeniach pochodzących z 2-letniej rośliny rosnącej w warunkach glebowych. Stwierdzono, że nietransformowane korzenie wytwarzały zaledwie 3,6 mg w g s.m. abietanowych diterpenów, co stanowiło około 50% zawartości tych metabolitów w korzeniach transformowanych rosnących w kolbach i 64% zawartości osiągniętej przez korzenie włośnikowate hodowane w bioreaktorze (**publikacja nr 7**). Największe różnice obserwowano w odniesieniu do 15-deoksy-fuerstionu, który transformowane korzenie w kolbach biosyntetyzowały w ilościach powyżej 2 mg g⁻¹ s.m. podczas gdy ten metabolit występował w korzeniach roślin rosnących w gruncie w ilościach śladowych. W korzeniach z rośliny *S. austriaca* rosnącej w gruncie w ogóle nie stwierdzono obecności 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu (**publikacja nr 7**).

Badania biologiczne.

Badania przeprowadzono z ekstraktami z korzeni transformowanych i nietransformowanych (z 2-letnich roślin rosnących w gruncie) *Salvia austriaca* oraz z czterema abietanowymi diterpenami: taksodionem, taksodionem, 15-deoksy-fuerstionem i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionem, wyizolowanymi z korzeni transformowanych *S. austriaca*.

Aktywność cytotoksyczna heksanowego ekstraktu i diterpenów wyizolowanych z korzeni transformowanych *S. austriaca*

Abietanowym diterpenom często przypisywana jest aktywność wobec komórek nowotworowych. Przykładowo, rojleanon i taksodion wykazują wysoką cytotoksyczną (Moujir i Gutiérrez-Navarro, 1996). Dlatego, w **publikacji nr 2** taksodion oraz jego nową pochodną - 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion poddano badaniom pod kątem aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych: białaczki szpikowej (HL-60), białaczki limfoblastycznej (NALM-6), czerniaka (WM-115) oraz komórek normalnych śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC). Stwierdzono, że nowa pochodna taksodionu, wobec wszystkich testowanych linii komórek nowotworowych, wykazuje aktywność cytotoksyczną ($IC_{50} = 0,6 - 0,7 \mu M$) 10-krotnie wyższą niż taksodion ($IC_{50} = 6,6 - 7,8 \mu M$). Wykazano także, że taksodion i jego nowa pochodna odznaczały się 7-8-krotnie niższą cytotoksycznością wobec komórek normalnych (HUVEC) niż wobec komórek nowotworowych. Wyniki uzyskane w tej pracy upoważniają do dalszych badań nad działaniem przeciwnowotworowym 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu.

Taksodion i ekstrakty *n*-heksanowe z korzeni włóśnikowatych oraz z korzeni 2-letniej rośliny *S. austriaca* rosnącej w gruncie poddano także badaniom na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych płuc A549 (**publikacja nr 5**). Aktywność ekstraktów z korzeni transformowanych i nietransformowanych była porównywalna, ale była ona 8-9,5-krotnie niższa niż czystego taksodionu ($IC_{50} = 9,1 \mu g mL^{-1}$). Cytotoksyczność taksodionu była już wcześniej badana (Kupchan i wsp., 1969), ale wobec innych linii komórek (komórki raka nosogardzieli KB) i stwierdzono jego silną aktywność cytotoksyczną ($ED_{50} = 3 \mu g mL^{-1}$). Kupchan i wsp. (1969) stwierdził również, że po potraktowaniu taksodionem zwierząt doświadczalnych (szczury) biomasa tkanki nowotworowej mięsaka (Walker 256) obniżała się nawet 13-krotnie względem kontroli.

Aktywność przeciwbakteryjna

Nie od dziś wiadomo, że mikroorganizmy, w tym gatunki chorobotwórcze, są zdolne do tworzenia biofilmów. Żyjące w takiej formie drobnoustroje wykazują lekooporność nawet 100-1000 razy wyższą niż te same mikroorganizmy rosnące w zawieszynie. Stąd też zwalczanie infekcji, zwłaszcza przebiegających z udziałem biofilmu drobnoustrojów, przy użyciu klasycznej antybiotykoterapii bywa często nieskuteczne (Høiby i wsp. 2010). Poszukuje się zatem nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, w tym związków pochodzenia roślinnego, aktywnych również wobec struktur biofilmu (Gibbons 2008; Dürig i wsp. 2010). Abietanowe diterpeny znane są z wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Przykładowo, rojleanon i taksodion wykazują wysoką aktywność przeciwbakteryjną (Gaspar-Marques i wsp., 2006; Yang i wsp., 2001). W **publikacji nr 3**, badaniom biologicznym poddano *n*-heksanowy ekstrakt, taksodion i jego nową pochodną – 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion otrzymane z korzeni transformowanych *Salvia austriaca*, wobec szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* NCTC 8196, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, *Candida albicans* ATCC 10231 oraz szczepów klinicznych *S. aureus* (A3, A7, D5) i *Enterococcus spp.* (138/09, 988/09, 203/06). *N*-heksanowy ekstrakt wykazywał aktywność przeciwbakteryjną w zakresie stężeń 20 – 40 µg mL⁻¹. 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion szczególnie silnie działał wobec bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza wobec metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA) (MIC = 1,25 µg mL⁻¹). Związek ten działał 4-krotnie silniej niż taksodion. Wzrost bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów *C. albicans* nie był znacząco hamowany przez testowane związki (MIC > 160,0 µg mL⁻¹).

Oceniano również kinetykę przeciwgronkowcowego działania 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu i taksodionu. Już po 4 godzinach ekspozycji *S. aureus* na związki w stężeniach MIC i ½ MIC obserwowano znaczące hamowanie wzrostu tych bakterii. Po 8 godzinach ekspozycji wzrost gronkowców hamowany był przez oba fitozwiązki w 90%. Aktywność tych metabolitów była porównywalna do działania antybiotyku beta-laktamowego – oksacyliny. Bardzo znamieną była zdolność 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu do hamowania powstawania biofilmu bakteryjnego. 24-godzinna ko-inkubacja tego diterpenu (w stężeniach: ¼ MIC, ½ MIC i MIC) z bakteriami redukowała formowanie biofilmu gronkowców o 25-30% w porównaniu do biofilmu kontrolnego tworzącego się w podłożu bez dodatku tego związku. Istotny był też fakt, że traktowanie już utworzonego biofilmu gronkowców 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionem dodawanym w stężeniach 50-200 µg mL⁻¹, zmniejszało przeżywalność drobnoustrojów aż o

47 – 66%, w zależności od użytego stężenia diterpenu (**publikacja nr 3**). Z danych literaturowych wiadomo, że kompletna eradykacja biofilmu drobnoustrojów, nawet przy zastosowaniu klasycznych antybiotyków/chemioterapeutyków, jest trudna do osiągnięcia (Høiby i wsp. 2010). Zaprezentowane w **publikacji nr 3** wyniki dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej, w tym przeciwbiofilmowej, wskazują, że 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion może być interesującym i obiecującym związkiem pochodzenia naturalnego zdolnym do zwalczania wybranych antybiotykoopornych patogenów bakteryjnych.

Pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej badany był także taksodon oraz 15-deoksy-fuerstion (**publikacja nr 6**). Opisano biostatyczny efekt tych dwóch diterpenów wobec *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) i *Candida albicans* (ATCC 10213) oraz ich wpływ na istotne w przebiegu zakażeń *in vivo* czynniki wirulencji tych drobnoustrojów, takie jak adhezja, formowanie biofilmu, aglutynacja w ludzkim osoczu, przeżywalność we krwi oraz (w przypadku *C. albicans*) tworzenie *germ tube* i mycelium. Minimalne stężenie hamujące (MIC) taksodonu wobec *S. aureus* i *C. albicans* wynosiło, odpowiednio, 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Stężenie, w którym taksodon działał bakteriobójczo wobec *S. aureus* było takie samo, jak wartość MIC dla tego drobnoustroju, podczas gdy działanie grzybobójcze było znacznie słabsze (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). 15-deoksy-fuerstion wykazywał znacznie niższą aktywność. Minimalne stężenie hamujące wzrost *S. aureus* i *C. albicans* dla tego związku wynosiło, odpowiednio, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ponadto wykazano, że taksodon ma zdolność hamowania adhezji i tworzenia biofilmu drobnoustrojów. Ko-inkubacja *S. aureus* z tym diterpenem już w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC powodowała hamowanie adhezji gronkowców o 31,7 % oraz formowania biofilmu tych drobnoustrojów o 85,5 % w porównaniu z kontrolą drobnoustrojów nietraktowanych tym fitozwiązkiem. Podobne obserwacje poczyniono dla *C. albicans*, które traktowane taksodonom w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC ulegały słabszej adhezji (niespełna 59% w stosunku do komórek kontrolnych), a także słabiej tworzyły biofilm (zaledwie ok. 24 % w porównaniu do kontroli). Przeciwadhezyjne i przeciwbiofilmowe działanie 15-deoksy-fuerstionu było słabsze niż taksodonu (zwłaszcza wobec grzybów *Candida*), choć nadal istotnie statystyczne w porównaniu do drobnoustrojów nietraktowanych tym fitozwiązkiem. W piśmiennictwie jest niewiele danych o zdolności diterpenów do hamowania bakteryjnego biofilmu. Przykładowo, w obecności frutikuliny A i demetylofrutikuliny A (stęż. $\frac{1}{2}$ MIC) - diterpenów wyizolowanych z liści *Salvia corrugata*, hodowla szczepów gronkowcowych formowała biofilm bakteryjny w 30-80% (Schito i wsp., 2011). W przypadku taksodonu obiecująca jest zdolność tego związku do inhibicji formowania nie tylko bakteryjnego, ale również grzybowego biofilmu. W **publikacji nr 6** oceniano także wpływ taksodonu na

przeżywalność *S. aureus* ATCC 29213 w ludzkiej krwi. Wykazano, że zastosowany w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC taksodon, po 1-, 2- i 3-godzinnej inkubacji, hamował przeżywalność gronkowców we krwi, odpowiednio, o 21,3%, 81,7% i 64,6% w odniesieniu do kontroli. W stężeniu równym MIC i $\frac{1}{2}$ MIC, taksodon silnie hamował również proces kiełkowania i rozwój strzępek *C. albicans*.

Uzyskane wyniki dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków roślinnych, zwłaszcza 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu, taksodionu i taksodonu, są obiecujące i mogą stanowić podstawę dalszych, bardziej szczegółowych badań, obejmujących między innymi ocenę synergistycznego działania związków naturalnych i antybiotyków wobec określonych drobnoustrojów patogennych.

Aktywność przeciwpierwotniakowa diterpenów wyizolowanych z korzeni transformowanych *S. austriaca*

Diterpeny wyizolowane z korzeni transformowanych *Salvia austriaca* (taksodon, taksodion, 15-deoxy-fuerstion i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion) poddano badaniom *in vitro* na aktywność przeciwpierwotniakową wobec *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* i *Plasmodium falciparum* (**publikacja nr 7**). Dla *T. brucei rhodesiense* związkiem kontrolnym był melarsoprol, dla *T. cruzi* - benznidazol, a dla *P. falciparum* - chlorochina. Dla każdego z diterpenów zbadano także cytotoksyczność wobec szczurzych komórek mięśniowych L6 celem wyznaczenia indeksu selektywności ($SI = IC_{50}$ dla komórek L6/ IC_{50} dla badanych pasożytów). Jest to ważny parametr wskazujący na ile działanie badanego związku jest selektywne wobec testowanych komórek, w tym przypadku, komórek pasożytniczych. Im wyższa wartość SI, tym działanie badanego związku jest bardziej ukierunkowane na pierwotniaki pasożytnicze niż na komórki organizmów wyższych. Badania wykazały, że, wśród testowanych diterpenów, najwyższą aktywność wobec użytych do badań pierwotniaków wykazywał taksodion. Związek ten szczególnie silnie działał wobec *T. b. rhodesiense* ($IC_{50} = 0,05 \mu M$). Wobec tego gatunku pasożyta, taksodion odznaczał się także bardzo wysoką wartością indeksu selektywności ($SI = 38$), najwyższą wśród badanych diterpenów (**publikacja nr 7**). Z wyizolowanymi z korzeni transformowanych *S. austriaca* diterpenami takie badania zrobiono po raz pierwszy, chociaż, niektóre abietanowe diterpeny, np. sahandol i sahandon wyizolowane z korzeni *Salvia sahendica* były badane wobec *P. falciparum* i *T. b. rhodesiense* (Ebrahimi i wsp., 2013). Jednak związki te działały słabiej niż taksodion (IC_{50} w zakresie 0,8 - 32,3 μM vs 0,05 μM dla taksodionu). Po uwzględnieniu

cytotoksyczności wobec komórek L6, wykazywały one także znacznie niższy indeks selektywności (SI w zakresie 0,1 do 15,5 vs 38 dla taksodionu). Wobec pierwotniaków chorobotwórczych inne abietanowe diterpeny testował wcześniej także Ślusarczyk i wsp. (2011). Wśród wyizolowanych z korzeni *Salvia miltiorrhiza* diterpenów najwyższą aktywność wobec *T. b. rhodesiense* wykazywał metylenotanszichinon ($IC_{50} = 0,5 \mu M$). Była ona jednak 10-krotnie niższa niż aktywność taksodionu wobec tego pierwotniaka. Metylenotanszichinon odznaczał się także niższą niż taksodion wartością indeksu selektywności ($SI = 24$). Wysoka selektywność taksodionu pozwala przypuszczać, że związek ten jest bezpieczny dla komórek organizmów wyższych, czego potwierdzenie będzie wymagało dalszych badań przeprowadzonych *in vivo*.

Ocena zdolności taksodionu i *n*-heksanowych ekstraktów z korzeni *S. austriaca* do inhibicji acetylo- i butyrylocholinoesterazy, wraz z symulacją parametrów biologicznych taksodionu pod kątem genotoksyczności, kardiotoxyczności, przenikalności bariery krew-mózg i biodystrybucji.

Choroba Alzheimera (ang. Alzheimer's disease, w skrócie AD), jest to najczęstsza postać otępienia. Jest to choroba neurodegeneracyjna, nieuleczalna i postępująca w swoim przebiegu, prowadząca nieuchronnie do śmierci pacjenta. Podstawową terapią w tym schorzeniu jest leczenie objawowe. Mechanizm tego rodzaju terapii polega na hamowaniu aktywności enzymów (acetylo- i butyrylocholinesterazy (AChE i BChE)) przyczyniających się do obniżenia stężenia ważnych neuroprzekaźników w przestrzeni międzysynaptycznej - acetylocholiny i butyrylocholiny. Podstawowe leki z grupy inhibitorów acetylocholinoesterazy (leki I rzutu w AD) należą do syntetycznych leków, np. takryna, rywastygmina, czy donepezil. Pierwszy znany jest z wysokiej toksyczności w stosunku do komórek wątroby. Jest to częsty powód ograniczania stosowania takryny w leczeniu choroby Alzheimera (Watkins et al., 1994; Meng i wsp., 2007). Toksyczność syntetycznych leków, a także doniesienia o zdolności niektórych związków naturalnych do inhibicji AChE i BChE (Perry i wsp., 2000 i 2001), były powodem badań przeprowadzonych i opublikowanych w **pracy nr 5**. Badaniom pod kątem zdolności do inhibicji AChE i BChE poddano wyizolowany z korzeni transformowanych *S. austriaca* taksodion oraz *n*-heksanowe ekstrakty z korzeni transformowanych i nietransformowanych z 2-letniej rośliny rosnącej w gruncie. Badania przeprowadzono na enzymach wyizolowanych z ludzkiej krwi pozyskanej w Łódzkiego Centrum Krwiodawstwa. Jako substancję referencyjną użyto takrynę, jeden z pierwszych

leków rekomendowanych w leczeniu choroby Alzheimera. Wśród użytych do badań substancji pochodzenia naturalnego, taksodion najsilniej hamował aktywność AChE ($IC_{50} = 54.84 \mu\text{g mL}^{-1}$). Znacznie niższą aktywność związek ten wykazywał wobec BChE ($IC_{50} = 195.9 \mu\text{g mL}^{-1}$). Aktywność ekstraktów wobec AChE wahała się w granicach $139,5 - 142,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, natomiast wobec BChE - $23,6 - 41,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Testowane ekstrakty oraz taksodion demonstrowały znacznie niższą zdolność inhibicji AChE i BChE niż takryna, jednakże lek ten, co warto podkreślić, znany jest z wysokiej hepatotoksyczności (Lagadic-Gossmann i wsp., 1998; Meng i wsp., 2007). Taksodion został również po raz pierwszy poddany symulacjom komputerowym z użyciem programu Percepta (**publikacja nr 5**). Wykorzystując parametry testu Ames'a taksodion poddano symulacjom na możliwą genotoksyczność. Stwierdzono, że związek ten nie wykazywał cech toksyczności. Stwierdzono także niską kardiotoxyczność taksodionu, a także jego zdolność do szybkiego transportu w całym organizmie. Z uwagi na potencjalne miejsce działania taksodionu (centralny układ nerwowy), przeprowadzono także symulację dla tego związku pod kątem zdolności przenikania bariery krew-mózg (BBB) (**publikacja nr 5**). Stwierdzono, że taksodion wykazuje wysoką zdolność przenikania bariery krew-mózg, co jest istotne dla substancji stosowanych w leczeniu choroby Alzheimera. Wykazywał także wysoką wartość objętości biodystrybucji ($V_d=1,9 \text{ l kg}^{-1}$), co oznacza, że taksodion w znacznym stopniu może wiązać się ze strukturami wewnątrzkomórkowymi tkanek. W oparciu o uzyskane w **publikacji nr 5** rezultaty można stwierdzić, że taksodion wykazywał umiarkowaną aktywność hamującą wobec AChE i BChE. Chociaż ten abietanowy diterpen wykazywał niższą aktywność niż abietanowe diterpeny z grupy tanszinonów (dihydrotanszinon i kryptotanszinon) wyizolowane z korzeni *Salvia miltiorrhiza* (Ren i wsp. 2004), to np. inne diterpeny wyizolowane z nadziemnych części *Calceolaria talcana* i *C. integrifolia* (1,10-cyclopropylo-9-epi-ent-izopimarol, czy 1,19- α -hydroksy-abietatrien) w ogóle nie hamowały cholinesterazy (Cespedes i wsp. 2013). Taksodion odznaczał się niską genotoksycznością i kardiotoxycznością, a także wysoką biodystrybucją i przenikalnością bariery krew-mózg. Były to pierwsze wyniki dotyczące aktywności taksodionu wobec enzymów (AChE i BChE). Sugerują one, że badany związek może być interesującym modelem do dalszych badań i poszukiwań nowych ścieżek terapeutycznych w odniesieniu do choroby Alzheimera (leczenie skojarzone?).

Podsumowanie:

1. Po raz pierwszy po transformacji *Agrobacterium rhizogenes* (szczep A4) uzyskano kulturę korzeni transformowanych *Salvia austriaca*. Korzenie te intensywnie rosły w kolbach Erlenmeyera w płynnym podłożu Schenk'a i Hildebrandt'a (SH).
2. Z korzeni transformowanych *S. austriaca* po raz pierwszy wyizolowano pięć abietanowych diterpenów, które metodami spektroskopowymi zidentyfikowano jako: rojleanon, taksodon, taksodion, 15-deoksy-fuerstion i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion.
3. Wyizolowany z korzeni transformowanych *S. austriaca* 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion jest związkiem nowym dotychczas nie wykrytym w królestwie roślin.
4. Opracowano i zwalidowano metodę UHPLC do rozdzielania i oznaczania zawartości taksodionu w korzeniach transformowanych *S. austriaca*. Metoda ta była z powodzeniem zastosowana także do oznaczeń ilościowych innych wyizolowanych z kultur korzeni włóśnikowatych *S. austriaca* diterpenów, tj. taksodonu, 15-deoksy-fuerstionu i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu.
5. Zawartość diterpenów w korzeniach transformowanych *S. austriaca* zmienia się w zależności od wyselekcjonowanej linii, zastosowanego podłoża i typu hodowli. Najlepsze wyniki uzyskano dla linii C7 hodowanej w płynnym podłożu SH w kolbach Erlenmeyera po zakończeniu przyrostu biomasy, tj. w 35 dniu hodowli.
6. Uzyskane kultury korzeni transformowanych *S. austriaca* charakteryzowały się wysoką stabilnością (przyrosty biomasy i zawartość diterpenów pozostały na stałym poziomie nawet po 6 latach prowadzenia hodowli) i 2-krotnie wyższą zawartością diterpenów niż w korzeniach tych roślin rosnących w gruncie (7,2 mg g⁻¹ s.m. vs 3,6 mg g⁻¹ s.m.).
7. Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec testowanych linii komórek nowotworowych wykazywał 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion. Była ona 10-krotnie wyższa niż taksodonu, który również charakteryzował się aktywnością cytotoksyczną. 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion i taksodion 7-8-krotnie słabiej działały na komórki normalne niż nowotworowe.
8. Wśród badanych diterpenów (taksodon, taksodion, 15-deoksy-fuerstion i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion), najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywał 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion, szczególnie wobec antybiotykoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA) (MIC = 1,25 µg mL⁻¹). W zakresie stężeń 50-200 µg mL⁻¹, związek ten zmniejszał przeżywalność bakteryjnego biofilmu aż o 47 – 66%. Silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe wykazywał także taksodon (MIC= 31.25 µg mL⁻¹ i 62.5 µg mL⁻¹). W jego obecności w stężeniu ½ MIC gronkowcowy biofilm formował się tylko w 14,5 % w porównaniu z kontrolą.

9. Najwyższą aktywnością przeciwpierwotniakową charakteryzował się taksodion, zwłaszcza wobec *T. brucei rhodesiense* ($IC_{50} = 0,05 \mu M$). Związek ten posiadał także bardzo wysoki indeks selektywności ($SI = 38$).

10. Taksodion hamował aktywność acetylocholinoesterazy ($IC_{50} = 54.84 \mu g mL^{-1}$) w znacznie wyższym stopniu niż ekstrakty z korzeni transformowanych i nietransformowanych (z rośliny rosnącej w gruncie) *S. austriaca*. Na podstawie przeprowadzonych symulacji, taksodion wykazywał także niską geno- i kardiotoksyczność oraz bardzo dobrą przenikalność bariery krew-mózg i wysoką objętość biodystrybucji.

Najważniejsze osiągnięcia i perspektywy dalszych badań:

Badania biotechnologiczne i fitochemiczne doprowadziły do otrzymania kultur korzeni transformowanych *Salvia austriaca* oraz izolacji i identyfikacji pięciu abietanowych diterpenów, tj. rojleanonu, taksodonu, taksodionu, 15-deoksy-fuerstionu i 7-(2'-oksoheksylo)-taksodionu. Cztery pierwsze z wymienionych związków zostały wykryte po raz pierwszy w gatunku *S. austriaca*, a 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion jest nowym związkiem nie znanym dotychczas w świecie roślinnym. Badania biologiczne wykazały, że związek ten odznaczał się silną aktywnością wobec komórek nowotworowych (p. str. 16) oraz wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową (p. str. 17). Wykazano, że związek ten jest zdolny do zwalczania wybranych antybiotykoopornych patogenów bakteryjnych. Stwierdzono także, że 7-(2'-oksoheksylo)-taksodion jest zdolny do hamowania formowania bakteryjnego biofilmu.

Związkiem o znacznej aktywności biologicznej okazał się również taksodion. Odznaczał się on aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych oraz przeciwbakteryjną wobec chrobotwórczych gronkowców. Na szczególną uwagę zasługuje także silne działanie przeciwpierwotniakowe taksodionu, szczególnie wobec *T. b. rhodesiense*, co w połączeniu ze znaczą selektywnością działania daje dobre perspektywy do zakwalifikowania tego związku do dalszych badań. Istotne są również rezultaty przeprowadzonej symulacji komputerowej, z których wynika, że taksodion nie wykazuje geno- i kardiotoksyczności. Związek ten odznaczał się także wysoką przenikalnością bariery krew-mózg i wysoką biodystrybucją.

Znacznie wyższa zawartość taksodionu i innych diterpenów (taksodonu i 15-deoksy-fuerstionu) w otrzymanych korzeniach włósnikowatych niż w nietransformowanych korzeniach 2-letniej rośliny *S. austriaca* świadczy o tym, że kultury korzeni transformowanych tego gatunku mogą stanowić alternatywne źródło biologicznie aktywnych diterpenów. Tym niemniej potrzebne będą dalsze badania nad zwiększeniem skali produkcji i przeniesieniem tej kultury z kolb do bioreaktora. Zastosowany w moich badaniach

aeroponiczny bioreaktor nie dał zadowalających wyników, zarówno w odniesieniu do produkcji biomasy, jak i zawartości analizowanych związków.

Piśmiennictwo cytowane:

1. Alvarenga S.A.V., Gastmans J.P., Rodrigues G.V., Moreno P.R.H., Emerenciano V.P.: „A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies-diterpenes in Lamiaceae”. *Phytochemistry* 2001, 56, 583-95.
2. Cespedes C.L., Muñoz E., Salazar J.R., Yamaguchi L., Werner E., Alarcon J., Kubo I.: „Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae)”. *Food Chem Toxicol* 2013, 62, 919–926.
3. Chung Ill-M., Park H-Y., Ali M., San K.Y., Peebles C.A, M., Hong S-B., Ahmad A.: „A new chemical constituent from the hairy root cultures of *Catharanthus roseus*”. *Bull Korean Chem Soc* 2007, 28, 229-234.
4. De Paolis A., Mauro M.L., Pompom M., Cardarelli M., Spanò L., Costantino P.: „Localization of agropine-synthesizing functions in the T R region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855”. *Plasmid* 1985, 13, 1 – 7.
5. Dürig A., Kouskoumvekaki I., Vejborg R.M., Klemm P.: „Chemoinformatics assisted development of new anti-biofilm compounds”. *Appl Microb Biotechnol* 2010, 87, 309–317.
6. Ebrahimi S.N., Zimmermann S., Zaugg J., Smiesko M., Brun R., Hamburger M.: „Abietane diterpenoids from *Salvia sahendica*--antiprotozoal activity and determination of their absolute configurations”. *Planta Med* 2013, 79, 150-156.
7. Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, Lima M.A.S.: „Cytotoxic Abietane Diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth”. *Z Naturforsch C* 2006, 61, 177-183.
8. Fronza M., Lamy E., Günther S., Heinzmann B., Laufer S., Merfort I.: „Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action”. *Phytochemistry* 2012, 78, 107-119.
9. Fronza M., Murillo R., Ślusarczyk S., Adams M., Hamburger M., Heinzmann B., Laufer S., Merfort I.: „*In vitro* cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*”. *Bioorg Med Chem* 2011, 19, 4876-4881.
10. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.: „Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”. *Exp Cell Res* 1968, 50, 151–158.
11. Gaspar-Marques C., Rijo P., Simões M.F., Duarte M.A., Rodriguez B.: „Abietanes

- from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vankomycin-resistant bacteria". *Phytomedicine* 2006, 13, 267-271.
12. Gibbons S.: „Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities". *Planta Med* 2008, 74, 594–602.
 13. Hannedouche, S., Souchard, J.P., Jacquemond-Collet, I., Moulis, C.: „Molluscicidal and radical scavenging activity of quinones from the root bark of *Caryopteris x clandonensis*". *Fitoterapia* 2002, 73, 520–522.
 14. Hanson J.R.: „Diterpenoids". *Nat Prod Rep* 2004, 21, 785 – 93.
 15. Høiby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T. „The clinical impact of bacterial biofilms". *Int J Oral Sci* 2011, 3, 55-65.
 16. Hueso-Rodríguez J.A., Jimeno M.L., Rodríguez B., Savona G., Bruno M.: „Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*". *Phytochemistry* 1983, 22, 2005-2009.
 17. Kakisawa H., Hayashi T., Okazaki I., Ohashi M.: „Isolation and structures of new tanshinones". *Tetrahedron Lett* 1968, 28, 3231 – 3234.
 18. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J.: "Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors". *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 2002, 38, 1–10.
 19. Kupchan S.M., Karim A., Marcks C.: „Tumor inhibitors. XLVIII.^{1a} Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*^{1b}". *J Org Chem* 1969, 34, 3912-3918.
 20. Lagadic-Gossmann D., Rissel M., Le Bot M.A., Guillouzo A.: „Toxic effects of tacrine on primary hepatocytes and liver epithelial cells in culture". *Cell Biol Toxicol* 1998, 14, 361–373.
 21. Lloyd G., McCown B. „Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture". *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 1980, 30, 421-427.
 22. Luis J.G., Grillo T.A.: „New diterpenes from *Salvia munzii*: chemical and biogenetic aspects". *Tetrahedron* 1993, 49, 6277-6284.
 23. Maldonado-Mendoza I.E., Ayora-Talavera T., Loyola-Vargas V.M.: „Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing". *Plant Cell Tiss Org Cult* 1993, 33, 321-329.
 24. Malepszy S. (red.): „Biotechnologia roślin". PWN. Warszawa 2001.

25. Meng Q., Ru J., Zhang G., Shen C., Schmitmeier S., Bader A.: „Re-evaluation of tacrine hepatotoxicity using gel entrapped hepatocytes”. *Toxicol Lett* 2007, 168, 140–147.
26. Moujir L., Gutierrez-Navarro A.M.: „Bioactive diterpenoids isolated from *Salvia mellifera*”. *Phytother Res* 1996, 10, 172-174.
27. Nagy G., Günther G., Máthé I., Blunden G., Yang M., Crabb T. A.: „Diterpenoids from *Salvia glutinosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots”. *Phytochemistry* 1999, 52, 1105-1109.
28. Oksman-Caldentey K., Inzé D.: „Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites”. *Trends Plant Sci* 2004, 9, 433-440.
29. Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Pinol M.T.: „Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures”. *Plant Physiol* 1997, 35, 155 – 162.
30. Parr A.J., Peerless A.C.J., Hamill J.D., Walton N.J., Robins R.J., Rhodes M.J.: „Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*”. *Plant Cell Rep* 1988, 7, 309-312.
31. Perry N.S.L., Houghton P.G., Sampson J., Theobald A.E., Hart S., Lis-Balchin M., Hoult J.R., Evans P., Jenner P., Milligan S., Perry E.K.: „*In vitro* activities of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) relevant to treatment of Alzheimer’s disease”. *J Pharm Pharmacol* 2001, 53, 1347–1356.
32. Perry N.S.L., Houghton P.G., Theobald A.E., Jenner P., Perry E.K.: „*In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes”. *J Pharm Pharmacol* 2000, 52, 895–902.
33. Petersen S.G., Stummann B.M., Olsen P., Henning K.W.: „Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids”. *Physiol Plant* 1989, 77, 427-35.
34. Petit A., Beralalof A., Tempe J.: „Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* by responsible for complex organization of T-DNA in crown gall on hairy root”. *Mol Gen Genet* 1986, 202, 388 – 393.
35. Putalun, W., Pimmeuangkao, S., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., Shoyama, Y.: „Sennosides A and B production by hairy roots of *Senna alata* (L.) Roxb.”. *Z Naturforsch C* 2006, 61, 367-371.
36. Rakoczy-Trojanowska M.: „Wprowadzenie genów do roślin”. W: Malepszy S. (red.): *Biotechnologia roślin*. PWN. Warszawa. 2001, 233 - 246.

37. Ren Y., Houghton P.J., Hider R.C., Howes M.J.R.: „Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*”. *Planta Med* 2004, 70, 201–204.
38. Schell J. S.: „Transgenic plants as tools to study the nuclear organization of plant genus”. *Science* 1987, 237, 1176 – 1182.
39. Schenk R.U., Hildebrandt A.C.: „Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures”. *Can J Bot* 1972, 50, 199–204.
40. Schito A.M., Piatti G., Stauder M., Bisio A., Giacomelli E., Romussi G., Pruzzo C.: „Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production *in vitro* by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*”. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 37, 129–134.
41. Sevón N., Oksman-Caldentey K.: „*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids”. *Planta Med* 2002, 68, 859 – 68.
42. Skucińska B.: „Kultura komórek i tkanek”. W: *Biotechnologia roślin* (red.: Malepszy S.), 19-31, Warszawa 2001.
43. Slameňova D., Mašterowa I., Lábaj J., Horvátova E., Kubala P., Jakubíková J., Wsóllová L.: „Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. Colonic and hepatic human cells cultured *in vitro*”. *Basic Clinic Pharmacol Toxicol* 2004, 94, 282-290.
44. Suza W., Harris R.S., Lorence A.: „Hairy roots: from high-value metabolite production to phytoremediation”. *Electr J Integr Biosci* 2008, 3, 57-65.
45. Ślusarczyk S., Zimmermann S., Kaiser M., Matkowski A., Hamburger M., Adams, M.: „Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of tanshinone-type diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*”. *Planta Med.* 2011, 77, 1594–1596.
46. Ulubelen A., Topcu G., Olçal S.: „Rearranged abietane diterpenes from *Teucrium divaricatum* subsp. *Villosum*”. *Phytochemistry* 1994, 37, 1371 - 1375.
47. Wasilewska A., Królicka A.: „Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych”. *Biotechnologia* 2005, 4, 173-188.
48. Watkins P.B., Zimmerman H.J., Knapp M.J., Gracon S.I., Lewis K.W.: „Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer’s disease”. *J Am Med Assoc* 1994, 271, 992–998.

49. ^aWysokińska H.: „Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych”. *Biotechnologia* 2000, 4, 32-9.
50. ^bWysokińska H.: „Wykorzystywanie inżynierii genetycznej do modyfikacji dróg biosyntezy roślinnych związków czynnych biologicznie” W: Wierzbicki R. (red.). „Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej”. 2000, 216-225, tom 242, Dział Wydawnictw i Poligrafii Akademii Medycznej, Łódź.
51. Yang Z., Kitano Y., Chiba K., Shibata N., Kurokawa H., Doi Y., Arakawa Y., Tada M.: „Synthesis of variously oxidized abietane diterpenes and their antibacterial activities against MRSA and VRE”. *Bioorg Med Chem* 2001, 9, 347-356.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5a. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja naukowa ścieżka zawodowa od początku związana była z biotechnologią roślin leczniczych. W wyhodowanych *in vitro* kulturach komórkowych, kulturach pędów i korzeni transformowanych zajmowałem się izolacją i identyfikacją różnego typu biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, głównie z grupy diterpenów. Z zastosowaniem różnych technik biotechnologicznych dążyłem do zwiększenia poziomu metabolitów wtórnych: w kulturach korzeni transformowanych i kulturach zawiesinowych *S. sclarea* oraz kulturach pędów *S. nemorosa*. Stwierdziłem, że kultury pędów *S. nemorosa* biosyntetyzują kwas rozmarynowy (*cis* i *trans*), sterole (kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol i stigmastanol) oraz triterpeny (kwas ursolowy i oleanolowy).

W komórkach *S. sclarea* rosnących w zawieszynie metodą GC-MS stwierdziłem obecność steroli (stigmasterol i β -sitosterol) oraz kwasu ursolowego i oleanolowego. Ponadto, metodą chromatografii kolumnowej oraz preparatywnej TLC, z badanego materiału roślinnego wyizolowałem dwa diterpeny abietanowe: salwipison i ferruginol oraz stwierdziłem w tej kulturze także obecność flawonoidów: apigeniny, luteoliny i 7-O-glukozydu apigeniny.

Po transformacji szczepem LBA 9402 *A. rhizogenes* otrzymałem kultury korzeni transformowanych *S. sclarea*. Z tych korzeni wyizolowałem cztery abietanowe diterpeny: salwipison, ferruginol, etiopinon i 1-keto-etiofinon oraz kwas $2\alpha,3\alpha$ -dihydroksy-urs-12-en-28-oikowy i $2\alpha,3\alpha,24$ -trihydroksy-urs-12-en-28-oikowy. Metodą GC-MS stwierdziłem, że korzenie transformowane zawierały kwas ursolowy i oleanolowy oraz sterole: β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol.

Zawartość diterpenów (salwipisonu, ferruginolu, etiopinonu i 1-keto-etiofinonu) w kulturze korzeni transformowanych *S. sclarea* oznaczałem metodą HPLC. W celu zwiększenia

przyrostów biomasy korzeni i wytwarzania diterpenów zmieniałem warunki hodowli (światło/ciemność) oraz stężenie sacharozy w podłożu ½ B5. Najwyższą biomasę oraz poziom diterpenów stwierdziłem w korzeniach transformowanych *S. sclarea* podczas hodowli na świetle w płynnym podłożu ½ B5 uzupełnionym 3% sacharozą.

Wyizolowane z korzeni transformowanych diterpeny (salwipison, ferruginol, etiopinon i 1-keto-etioopinon) oraz frakcje diterpenowe (wyelutowane dichlorometanem z kolumny wypełnionej żelazem krzemionkowym) badane były pod kątem aktywności cytotoksycznej *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych (HL-60 i NALM-6). Badana była także zdolność tych związków do indukcji apoptozy. Stwierdziłem, że salwipison i etiopinon odznaczają się najwyższą cytotoksycznością wobec testowanych linii. Związki te intensywnie indukowały apoptozę.

Tematyka związana z kulturami korzeni transformowanych *S. sclarea* była przedmiotem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłem z wyróżnieniem w 2006 roku. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w czasopiśmie: *Herba Polonica* (2004), *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (2006) oraz *Zwitschrift Für Naturforschung C* (2006).

5b. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałem badania biotechnologiczne i biologiczne z kulturą korzeni transformowanych *S. sclarea*. Badałem zmiany w zawartości diterpenów podczas cyklu wzrostu korzeni. Poziom diterpenów oznaczałem metodą HPLC i stwierdziłem, że 30-dniowe korzenie włóśnikowate biosyntetyzują diterpeny w największych ilościach, w znacznie wyższych niż niezmienione genetycznie korzenie hodowane *in vitro* oraz pochodzące z roślin *S. sclarea* rosnących w gruncie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Zwitschrift Für Naturforschung C* (2008). Poziom diterpenów w kulturze korzeni transformowanych *S. sclarea* rosnących w kolbach oraz w aeroponicznym bioreaktorze udało się istotnie zwiększyć poprzez elicytację jasmonianem metylu. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Enzyme and Microbial Technology* (2009).

Przedmiotem moich badań były także kultury pędów *S. sclarea*. Wyizolowany z tego materiału olejek eteryczny był analizowany jakościowo i ilościowo i porównywany z olejkiem eterycznym otrzymanym z części nadziemnych 2-letnich roślin *S. sclarea*. Jakkolwiek, profil chemiczny tych olejków był podobny, to wydajność olejku z 2-letnich roślin była wyższa niż wydajność olejku ze zregenerowanych *in vitro* pędów. Olejek eteryczny z roślin otrzymanych *in vitro* i z roślin pochodzących z nasion poddawany był

badaniom biologicznym pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych. Olejek eteryczny pochodzący ze zregenerowanych *in vitro* roślin odznaczał się wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową niż olejek z 2-letnich roślin *S. sclarea*, szczególnie wobec *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Candida albicans*. Olejek ten odznaczał się także wyższą aktywnością cytotoksyczną wobec nowotworowych komórek NALM-6. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w *Molecules* (2009).

Abietanowe diterpeny (salwipison, ferruginol, etiopinon i 1-keto-etiopinon) oraz frakcje diterpenowe wyizolowane z korzeni transformowanych *S. sclarea* były badane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wobec *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *C. albicans*. Najwyższą aktywnością charakteryzował się salwipison, zwłaszcza wobec *S. aureus* i *S. epidermidis*. Związek ten hamował także formowanie biofilmu tych drobnoustrojów. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Phytomedicine* (2007).

Abietanowe diterpeny (salwipison i etiopinon) wyizolowane z korzeni włóśnikowatych *S. sclarea* oceniano również pod kątem ich synergistycznego działania z antybiotykami wobec chorobotwórczych antybiotykoopornych szczepów gronkowcowych (*S. aureus* i *S. epidermidis*). Oba związki wykazywały wyraźny synergizm w działaniu z antybiotykami β -laktamowymi wobec użytych szczepów gronkowcowych. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w *Planta Medica* (2007). Diterpeny wyizolowane z korzeni transformowanych *Salvia sclarea* (salwipison, ferruginol, etiopinon i 1-keto-etiopinon) były także badane pod kątem aktywności przeciwpierwotniakowej wobec *Acanthamoeba ssp.* Wśród testowanych diterpenów najwyższą aktywnością charakteryzował się ferruginol. Efektem tych badań była publikacja w *Parasitology Research* (2015).

W ramach grantu (Nr 3499/B/P01/2007/33 - wykonawca) prowadziłem hodowle kultur korzeni transformowanych *Rindera graeca*. Korzenie te rosły w kolbach wstrząsanych, a po zoptymalizowaniu warunków hodowli, także w aeroponicznym bioreaktorze. Stwierdziłem, że korzenie włóśnikowate tej rośliny są zdolne do regeneracji transgenicznych pędów. Kultury niezmienionych i zmienionych genetycznie pędów *R. graeca*, po ustaleniu optymalnych warunków hodowli, prowadziłem w aeroponicznym bioreaktorze. Z uzyskanych wyników przygotowana jest publikacja.

W ramach grantu (Nr N405 362537 - wykonawca) hodowałem kultury korzeni transformowanych *Taxus x media var. Hicksii* w kolbach. Podjąłem też próby zoptymalizowania warunków hodowli tych korzeni w aeroponicznym bioreaktorze. Jednak

uzyskanie zadowalających przyrostów biomasy w tych warunkach, będzie wymagało dalszych badań.

Dużo uwagi poświęciłem wykorzystaniu metody UHPLC do rozdziału i oznaczania ilościowego różnego typu metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. Badania dotyczyły:

- oznaczania zawartości bajkaliny, wogonozydu i werbaskozydu w kulturze kalusowej *Scutellaria altissima* (publikacja w Journal of Medicinal Plant Research 2013). W kolejnej publikacji (Acta Physiologiae Plantarum 2015) w kulturze pędów *S. altissima* oraz w pędach roślin zregenerowanych *in vitro* i pochodzących z nasion, oprócz bajkaliny, wogonozydu i werbaskozydu, stwierdziłem również obecność 7-O-glukozydu luteoliny i luteoliny. W kulturze pędów *S. alpina* sprawdziłem wpływ różnych cytokinin na zawartość flawonów i werbaskozydu (praca w Plant Cell Tissue and Organ Culture 2015);
- oznaczania zawartości 20-hydroksy-ekdyzonu i kwasu chlorogenowego w pędach *Rhaponticum carthamoides* otrzymanych metodą bezpośredniej i pośredniej organogenezy; zawartość tych związków w kulturze *in vitro* była porównywana z ich zawartością w nadziemnych częściach zregenerowanych *in vitro* roślin rosnących w gruncie. Efektem była publikacja w Plant Cell Tissue and Organ Culture (2015);
- oznaczania zawartości irydoidów (aukubiny, katalpolu, katalpozydu, loganiny, harpagidu i harpagozydu) i glikozydów fenyloetanolowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) w organogennych kalusach regenerujących pędy i w roślinach otrzymanych *in vitro* (liście, korzenie) oraz w roślinach pochodzących z nasion (liście, korzenie) *Rehmannia glutinosa*. Wyniki zostały opublikowane w Plant Cell Tissue and Organ Culture (2015^a);
- oznaczanie zawartości w/w związków w liściach i korzeniach 12-miesięcznych roślin *Rehmannia glutinosa* otrzymanych z nasion. Efektem była praca opublikowana w Acta Poloniae Pharmaceutica (2015);
- oznaczania zawartości irydoidów (aukubiny, katalpolu, katalpozydu, loganiny, harpagidu i harpagozydu) i glikozydów fenyloetanolowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) w liściach i korzeniach zmienionych genetycznie roślin *Rehmannia glutinosa*, zregenerowanych z korzeni transformowanych. Wyniki zostały opublikowane w Plant Cell Tissue and Organ Culture (2015^b);
- oznaczania zawartości irydoidów (katalpolu i harpagidu) i glikozydów fenyloetanolowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) w pędach i korzeniach zregenerowanych *in vitro* i otrzymanych z nasion roślin *Rehmannia elata* N.E. Brown ex Prain oraz w kulturze pędów bocznych tej rośliny. Efektem była praca opublikowana w Acta Physiologiae Plantarum (2015);

- oznaczanie zawartości irydoidów (katalpolu i harpagidu) i glikozydów fenyloetanoidowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) w kulturze korzeni transformowanych *Rehmannia glutinosa* po elicytacji jasmonianem metylu i kwasem salicylowym. Efektem była praca opublikowana w *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* (2016);
 - oznaczanie ginsenozydów w kulturze korzeni transformowanych *Panax quinquefolium*. Efektem była praca opublikowana w *Acta Physiologiae Plantarum* (2016);
 - oznaczanie zawartości kwasu ursolowego i oleanolowego w liściach *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis idaea* i *Gaultheria procumbens*. Efektem była praca opublikowana w *Applied Sciences* (2016);
 - w ramach obecnie prowadzonej współpracy z Prof. Wojciechem Litwińczukiem (Uniwersytet Rzeszowski), zoptymalizowałem metodę UHPLC dla oznaczania zawartości werbaskozydu i izowerbaskozydu w liściach triploidalnych i tetraploidalnych roślin *Paulownia tomentosa*.
- Ostatnio, w rezultacie transformacji genetycznej szczepem A4 *A. rhizogenes*, uzyskałem kultury korzeni *Salvia verticillata*. Po potwierdzeniu ich transgenicznego charakteru zamierzam zająć się izolacją diterpenów abietanowych z tych korzeni. Dane literaturowe wskazują, że korzenie tej rośliny wytwarzają 7 α -hydroksy-rojleanon i 7 α -acetoksy-rojleanon;
- jestem w trakcie opracowania metody rozdziału i oznaczania fenolokwasów techniką UHPLC w kulturze korzeni transformowanych: *Salvia austriaca* i *S. sclarea*.

5c. Projekty badawcze

- Praca własna młodego naukowca (Nr 502-03/3-012-01/502-34-032, Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Tytuł projektu: „Izolacja i analiza ilościowa związków biologicznie czynnych w kulturach korzeni transformowanych roślin z rodzaju *Salvia*” (2012-2014).
Udział: **kierownik projektu**;
- Projekt badawczy finansowany z funduszy statutowych UM w Łodzi (Nr 503/3-012-01/503-31-001) pt. „Hodowla *in vitro* roślin leczniczych; wytwarzanie metabolitów wtórnych” (2008-2012, 2015-2016). Udział: **wykonawca**;
- Grant MNiSW/NCN Nr N405 362537. Tytuł projektu: ”Wytwarzanie taksanów i innych związków w organach transformowanych *Taxus x media* var. *Hicksii* z hodowli *in vitro*” (2009-2014). Udział: **wykonawca**;
- Grant MNiSW/NCN Nr 3499/B/P01/2007/77. Tytuł projektu: ”Wybrane rośliny lecznicze z rodziny Boraginaceae jako źródło naftochinonów – badania biotechnologiczne, fitochemiczne i biologiczne” (2007-2013). Udział: **wykonawca**;

-Grant MNiSW/KBN Nr PBZ-KBN-092/P05/2003. Tytuł projektu: „Poszukiwanie nowych źródeł produktów naturalnych o aktywności biologicznej: przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, przeciwutleniającej i cytostaticznej – pozyskiwanych z wybranych gatunków roślin z hodowli *in vivo* i *in vitro*, z wykorzystaniem metod biotechnologicznych” (2003-2006). Udział: **wykonawca**.

5d. Szkolenia.

Kurs chromatografii cieczowej, Akademia Medyczna w Lublinie 2009

Kurs chromatografii cieczowej HPLC, Akademia Medyczna w Lublinie 2010

5e. Staże zagraniczne

5f. Członkostwo towarzystw naukowych:

Polskie Towarzystwo Botaniczne

5g. Recenzje

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - 1

Molecules – 3

Journal of Pharmacy and Pharmacology – 2

African Journal of Pharmacy and Pharmacology -1

African Journal of Microbiology Research – 1

African Journal of Biotechnology - 1

Process Biochemistry – 1

Annals of Agricultural and Environmental Medicine – 1

5h. Otrzymane nagrody

a) Dyplom Dziekana Wydziału Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego za wyróżniający się poster na V Sesji Posterowej Prac Dyplomowych Łódzkiego Środowiska Chemicznego. Łódź, dn. 14. 06. 2002 r.

b) Dyplom uznania za pracę magisterską pt. „Diterpeny i sterole w kulturach korzeni transformowanych *Salvia sclarea* L.” zgłoszoną do konkursu w ramach Przeglądu Prac Dyplomowych Wydziału Farmaceutycznego 2002 r. Łódź, dn. 21.02.2003 r.

c) Nagroda im. Profesora W.J.H. Kunickiego-Goldfingera przyznana zespołowi za pracę pt. „Biofilm phytotherapy: diterpenoids of *Salvia sclarea* as potential anti-biofilm agents active against antibiotic resistant staphylococci”. Konferencja Naukowa Komitetu Mikrobiologii PAN, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, dn. 22.10.2005 r.

d) Nagroda Naukowa indywidualna Stopnia Drugiego J.M. Rektora za pracę doktorską, Łódź, dn. 27.12.2007 r.

e) Nagroda Naukowa Zespołowa Stopnia Pierwszego J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za cykl publikacji (IF 6,122): „Biologicznie aktywne diterpeny w kulturze korzeni transformowanych *Salvia austriaca* Jacq.”. Łódź, grudzień 2013 r.

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

a) oryginalne pełnotekstowe prace naukowe: 28 publikacji (IF **42,299**; MNiSW 566) i 1 publikacja poglądowa (MNiSW 3),

h-index 9 (wg ISI Web of Science oraz Scopus).

b) konferencje: krajowe - 14 i międzynarodowe 8.

c) recenzje publikacji: 7 w czasopismach z IF i 3 w czasopismach bez IF.

d) udział w realizacji trzech grantów badawczych, jednego projektu badawczego finansowanego z funduszu dla młodych naukowców oraz jednego projektu badawczego finansowanego z funduszy statutowych UM (p. pkt. 5c)

e) Łączna liczba punktów MNiSW, jaką uzyskały prace z moim udziałem wynosi 569, łączny IF = 42,299, liczba cytowań = 222 (wg ISI Web od science bez autocytowań) i 267 (wg Scopus bez autocytowań), **indeks Hirscha h = 9**.

