

Załącznik 2

Dr n.med. Przemysław Sitarek

Autoreferat

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2018

1. Imię i nazwisko: **Przemysław Sitarek**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

a) **24.02.2012** – doktor nauk medycznych, w zakresie biologia medyczna , specjalność genetyka, Wydział Wojskowo-Lekarski Uniwersytetu

Medycznego w Łodzi, praca doktorska pt. „, Znaczenie ekspresji i polimorfizmów genów *COX-2*, *LF*, *OSF-2* oraz *MET* dla patogenezы przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa .”- Promotor: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

b) **20.06.2008** – magister biologii; specjalność - biochemia, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, praca magisterska pt. „Polimorfizm genów biorących udział w metabolizmie estrogenów w raku i rozrostach endometrium”. Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotor: Prof. dr hab. Janusz Błasiak.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

02.04.2013 –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:

“Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Leonurus sibiricus* L. oraz określenie ich właściwości biologicznych”

Zgłoszona do postępowania habilitacyjnego tematyka obejmuje cykl siedmiu publikacji.

Lp.	Publikacja	Punktacja	
		IF	MNiSW
1	Sitarek P, Skała E, Wysokińska H, Wielanek M, Szemraj J, Toma M, Śliwiński T. The Effect of <i>Leonurus sibiricus</i> Plant Extracts on Stimulating Repair and Protective Activity against Oxidative DNA Damage in CHO Cells and Content of Phenolic Compounds. <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i> . doi: 10.1155/2016/5738193, 2016 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie większości części eksperymentalnej tj. wyprowadzenie kultur in vitro Leonurus sibiricus, przygotowanie ekstraktów roślinnych do badań fitochemicznych i badań biologicznych, przeprowadzenie testu kometowego, zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	4.49	30
2	Sitarek P, Skała E, Toma M, Wielanek M, Szemraj J, Nieborowska-Skorska M, Kolasa M, Skorski T, Wysokińska H, Śliwiński T. A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of <i>Leonurus sibiricus</i> L. <i>Tumour Biology</i>, 2016 Jan 7 pp 1-12 doi. 10.1007/s13277-015-4714-2 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie większości części eksperymentalnej tj. wyprowadzenie kultur korzeni transformowanych in vitro Leonurus sibiricus, przygotowanie ekstraktów roślinnych do badań fitochemicznych i badań biologicznych, izolacja DNA materiału roślinnego i ludzkiego, zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	3.65	25
3	Sitarek P, Rijo P, Garcia C, Skała E, Kalembe D, Białas AJ, Szemraj J, Pytel D, Toma M, Wysokińska H, Śliwiński T. Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of <i>Leonurus sibiricus</i> L. and their chemical composition. <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i>, 2017 doi.org/10.1155/2017/7384061 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie części eksperymentalnej tj. uzyskanie olejków eterycznych, izolacja materiału ludzkiego, współudział przy przygotowaniu komórek do badań biologicznych, zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	4.936	30

4	Sitarek P, Kowalczyk T, Rijo P, Białas AJ, Wielanek M, Wysokińska H, Garcia C, Toma M, Śliwiński T, Skała E. Over-Expression of AtPAP1 Transcriptional Factor Enhances Phenolic Acid Production in Transgenic Roots of <i>Leonurus sibiricus</i> L. and Their Biological Activities, 2017 <i>Molecular Biotechnology</i> doi. 10.1007/s12033-017-0048-1 Volume 60, Issue 1, pp 74–82 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie części eksperymentalnej tj. uzyskanie kultur in vitro oraz kultur z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1, przygotowaniu ekstraktów do badań fitochemicznych oraz przeciwbakteryjnych, współudział przy przygotowaniu komórek do badań biologicznych, zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	1.81	20
5	Sitarek P, Kowalczyk T, Santangelo S, Białas AJ, Toma M, Wiczfńska J, Śliwiński T, Skała E. The Extract of <i>Leonurus sibiricus</i> Transgenic Roots with AtPAP1 Transcriptional Factor Induces Apoptosis via DNA Damage and Down Regulation of Selected Epigenetic Factors in Human Cancer Cells. <i>Neurochemical Research</i>,. July 2018, Volume 43, Issue 7, pp1363–1370 doi.org/10.1007/s11064-018-2551-6 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie części eksperymentalnej tj. przygotowaniu ekstraktów do badań, izolacji RNA z komórek, przeprowadzenie testu kometowego, współudział w wykonaniu większości badań biologicznych (PARP1 oraz H2A.X) , zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	2.77	20
6	Sitarek P, Kowalczyk T, Picot L, Michalska-Hejduk D, Bijak M, Białas AJ, Wielanek M, Śliwiński T, Skała E. Growth of <i>Leonurus sibiricus</i> L. roots with over-expression of AtPAP1 transcriptional factor in closed bioreactor, production of bioactive phenolic compounds and evaluation of their biological activity. <i>Industrial Crops & Products</i>. 2018, 732-739. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.059 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie części eksperymentalnej tj. hodowla korzeni w 5 litrowym rozpyłowym bioreaktorze o kolbach o różnych rozmiarach, przygotowanie ekstraktów do badań , współudział przy przygotowaniu komórek do badań biologicznych, izolacji RNA roślinnego, zebranie wyników i ich</i>	3.84	40

	<i>interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>		
7	Sitarek P , Synowiec E , Kowalczyk T, Sliwinski T, Skała E. An In Vitro Estimation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Extract from <i>Leonurus sibiricus</i> L. Overexpressing AtPAP1 against Different Cancer Cell Lines. <i>Molecules</i>, 2018 doi:10.3390/molecules23082049 <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań eksperymentalnych, wykonanie części eksperymentalnej tj izolacji DNA z komórek, współudział w wykonaniu badań dotyczących zmiany liczby kopii mitochondrialnych oraz uszkodzeń mitochondrialnego i jądrowego DNA, przygotowaniu ekstraktów roślinnych do badań biologicznych, współudział przy przygotowaniu komórek do badań biologicznych, zebranie wyników i ich interpretacja oraz redakcja manuskryptu.</i>	3.09	30
	Łącznie	24.713	195

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. Tomaszem Skórskim i współpracownikami (a Temple University Lewis Katz School of Medicine , Department of Microbiology and Immunology and Fels Institute for Cancer Research & Molecular Biology, Philadelphia , PA , USA.), Prof. Laurentem Picotem (UMRi CNRS 7266 LIENSs, University of La Rochelle, 17042 La Rochelle, France), Prof Patricia Rijo i współpracownikami (Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies (CBIOS), Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal., Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon (ULisboa), Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisbon, Portugal), Dr Simona Santangelo (Department of Respiratory Pathophysiology, Campus Bio-Medico University and Teaching Hospital, Rome, Italy), Dr Dariuszem Pytlem (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hollings Cancer Center, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, United States of America), Prof Tomaszem Śliwińskim i współpracownikami (Laboratorium Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki), Prof Januszem Szemrajem (

Zakład Biochemii Uniwersytetu Medycznego), Prof Danutą Kalembą (Institute of General Food Chemistry, Lodz University of Technology), Dr Marzeną Wielanek (Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin), Dr Tomaszem Kowalczykiem (Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin) z Dr Michałem Bijakiem (Katedra Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego), Dr Adamem Białasem (Klinika Pneumonologii i Alergologii I Katedra Chorób Wewnętrznych Uniwersytet Medyczny w Łodzi), Dr Joanną Wieczfińską (Zakład Immunopatologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi).

Wprowadzenie w tematykę badawczą publikacji zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym

Rośliny lecznicze są ważnym źródłem metabolitów wtórnych wykorzystywanych do produkcji leków w przemyśle farmaceutycznym oraz w innych gałęziach medycyny od wielu lat [Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002, Karuppusamy, 2012]. Jedną z takich roślin o wielokierunkowym działaniu jest *Leonurus sibiricus* L. należący do rodziny *Lamiaceae* (jasnotowate). Roślina ta pochodzi z kilku regionów Azji w tym: Chin, Korei, Japonii oraz Kambodży gdzie używana była od tysięcy lat w tradycyjnej medycynie ludowej do leczenia różnych schorzeń. Ponadto roślina ta jest cennym źródłem metabolitów wtórnych należących do takich grup jak związki fenolowe czy diterpeny. Przygotowywane z niej ekstrakty wykazywały działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz kardioprotekcyjne. Aktualne badania pokazują również działanie przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne czy przeciwbakteryjne [Abu Sayed i wsp. 2016]. Ze względu na szereg właściwości leczniczych gatunek ten stał się obiektem badań w powyższej pracy.

W ostatnich latach, medycyna naturalna przeżywa swój renesans przez co stała się tematem o znaczeniu globalnym. Pomimo, że nowoczesna medycyna jest ogólnie dostępna we wszystkich krajach rozwiniętych, leki ziołowe (fitofarmaceutyki) od zawsze były obecne w życiu człowieka zarówno z powodów historycznych jak i kulturowych [Hussain i wsp., 2012, Canter i wsp., 2005, Rodney i wsp., 2000]. Działanie wielu metabolitów wtórnych produkowanych przez rośliny zostało naukowo potwierdzone pod kątem ich skuteczności w terapii wielu chorób cywilizacyjnych [Weaver, 2014, Bernabeu i wsp., 2016, Velde i wsp., 2017, Douer, 2017]. Niestety wiele dostępnych dzisiaj na rynku leków to syntetyczne modyfikacje lub analogi związków naturalnie występujących w roślinach. Jedną z przyczyn takiej sytuacji jest niestabilność środowiska oraz zmiany antropogeniczne które przyczyniają się do niszczenia naturalnych siedlisk przez co coraz trudniej pozyskać naturalny materiał

roślinny. W tym właśnie celu alternatywą dla pozyskiwania metabolitów wtórnych są roślinne kultury *in vitro*, zapoczątkowane w sterylnych warunkach z takiego materiału wyjściowego jak: liście, łodygi, korzenie czy merystemy. Liczne badania potwierdzają większą akumulację metabolitów wtórnych w różnych kulturach *in vitro* [Skała i wsp., 2015], a ostatnim kluczowym etapem komercyjnej produkcji metabolitów wtórnych na skalę przemysłową są bioreaktory [Sajc i wsp. 2000]. Wśród roślinnych kultur *in vitro* zdolnych do szybkiego przyrostu biomasy a co za tym idzie również metabolitów wtórnych są kultury genetycznie zmodyfikowanych korzeni włośnikowatych [Srivastava S i Srivastava AK, 2007, Guillon S i wsp. 2006, Sykłowska-Baranek K i wsp, 2012]. Transformacje wektorową przeprowadzić można za pomocą bakterii glebowej *Agrobacterium rhizogenes* która wywołuje u roślin tzw. „chorobę włośnikowatości”. Korzenie te mogą mieć szereg zastosowań wśród których wymienia się manipulacje nad szlakami biosyntezy i procesami fizjologicznymi, produkcję związków biologicznie czynnych pochodzenia roślinnego, metabolitów wtórnych (m.in. fenoli, alkaloidów czy terpenów), wykorzystanie ich w procesach fitoremediacji (np. substancji toksycznych) oraz do tworzenia w nich rekombinowanych białek (np. interferonu, interleukin) [Georgiev i wsp., 2012, Łucka i wsp., 2015]. W procesie agroinfekcji istotną rolę odgrywają sekwencje obecne w trzech regionach. Są to: T-DNA, w którym umieszczane są interesujące nas geny mające docelowo trafić do komórek roślinnych, oraz geny odpowiedzialne za wywoływanie symptomów choroby, metabolizm auksyn, cytokin a także syntezę opin. Innym regionem jest region wirulencji z zespołem genów *vir*, który podobnie jak poprzedni zlokalizowany jest w obrębie plazmidu. Trzeci region istotny dla procesu agroinfekcji to *chv*, obecny w chromosomie bakteryjnym, odpowiedzialny za adsorpcję bakterii do powierzchni komórki roślinnej [Łucka i wsp., 2015]. Podstawą klasyfikacji szczepów *A. rhizogenes* jest rodzaj kodowanych w nich opin. Ta klasyfikacja obejmuje szczepy: agropinowe (przedstawiciele to m.in.: A4, 15834, 1855, LBA 9402), indukujące wytwarzanie agropiny, mannopiny i kwasu atropinowego - ponadto szczepy mannopinowe oraz kukumopinowe [Bensaddek i wsp. 2008]. Opiny są to metabolity które pojawiają się w komórkach roślinnych w wyniku ekspresji genów przeniesionych w wyniku infekcji *Agrobacterium*. Ponadto nie są wykorzystywane przez roślinę, jednak stanowią źródło azotu i węgla dla bakterii [Wang i wsp. 2008]. Do tej pory brakuje jednoznacznych danych które pozwoliłyby wyjaśnić związek zachodzący pomiędzy rodzajem wytwarzanej opiny a cechami poszczególnych szczepów bakteryjnych. Wydaje się jednak, że może to mieć związek z poziomem ich zjadliwości [Lewko i Oldham, 2009]. W plazmidach szczepów oktopinowych potwierdzono np. obecność genu wirulencji *virF*, którego są pozbawione szczepy nopalinowe

i co może mieć wpływ na zjadliwość bakterii wobec testowanych gatunków roślin (wyższa u oktopinowych) [Petit i wsp., 1986]. Podczas transformacji za pomocą *A. rhizogenes* pochodzący z plazmidu bakteryjnego Ri transferowy DNA (T-DNA) ulega trwałemu zintegrowaniu z genomem komórki roślinnej [Wasilewska i Królicka, 2005]. W warunkach *in vitro* kultury korzeni transformowanych charakteryzują się brakiem geotropizmu, plagiotropizmem, czyli rodzajem ukierunkowanej reakcji na bodźce oraz rozrostem korzeni bocznych [Sevón i Oksman-Caldentey 2002]. Plagiotropizm podczas prowadzenia tych kultur wynika z większego napowietrzenia w pożywce płynnej oraz związaną z tym szybką akumulację biomasy. Ponadto istotną przewagą korzeni włóśnikowatych nad innymi kulturami jest ich wysoka stabilność genetyczna, szczególnie istotna w warunkach prowadzenia kultur przez dłuższy czas [Wysokińska, 2000 a]. Zaletą jest też brak konieczności dodawania do podłoża hormonów wzrostu w trakcie prowadzonej hodowli i możliwość jej utrzymywania w ściśle określonych warunkach [Wysokińska, 2000 b]. Jednym z wielu przykładów wzrostu poziomu produkcji metabolitów w kulturach korzeni transformowanych mogą być m.in. kultury *Ajuga reptans*, w których uzyskano 4 razy wyższe stężenie 20-hydroksyekdysteronu który zwiększa retencję azotu w organizmie i przyspiesza tempo syntezy białek w porównaniu do roślin gruntowych. Podobne wyniki zostały zaobserwowane w kulturach korzeni dzwonkowca (*Codonopsis lanceolata*), gdzie wykazano zwiększoną produkcję saponin triterpenoidowych, związków o działaniu przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym [Matvieieva i wsp. 2012, Tanaka i wsp. 1993, Sun i wsp 2012, Kim i wsp. 2011]. Innym przykładem zwiększenia produkcji metabolitów może być dodatek do podłoża różnych elicytorów [Zhao i wsp. 2001]. Mogą to być związki zarówno o charakterze biotycznym, jak i abiotycznym, które indukują wytwarzanie metabolitów wtórnych jako przejaw reakcji obronnej roślin, w wyniku ekspresji genów związanych ze szlakami syntezy produktu [Goel i wsp. 2011].

Obecnie stosuje się wiele strategii prowadzących do ingerencji we wtórny metabolizm roślinny w celu uzyskania większych ilości cennych metabolitów o szerokim zastosowaniu medycznym. Jednym ze sposobów zwiększania produkcji wybranych grup tych biologicznie czynnych związków jest szeroko rozumiana inżynieria metaboliczna. Zdobyta na przestrzeni lat wiedza na temat przemian prowadzących do syntezy cennych metabolitów, enzymów biorących udział w poszczególnych etapach ich powstawania, a także wielu mechanizmów regulacyjnych w komórce roślinnej stała się punktem wyjścia dla dostępnych obecnie możliwości manipulowania nimi na poziomie molekularnym. Dostępne obecnie narzędzia pozwalające na ingerencję w materiał genetyczny żywych organizmów otwierają

całkiem nowe możliwości modyfikacji skomplikowanych szlaków metabolicznych w celu uzyskania nadprodukcji lub akumulacji cennych związków biologicznie czynnych. W ostatnich latach pojawiło się wiele prac wykazujących zdolności ingerencji w szlaki metaboliczne roślin poprzez transformację genetyczną z wykorzystaniem wcześniej poznanych i dobrze scharakteryzowanych genów kodujących enzymy katalizujące kluczowe etapy w wielu szlakach [Xiang i wsp., 2012, Vasilev i wsp., 2014, Vaccaro i wsp., 2014]. Innymi stosowanymi w tym celu genami są te kodujące wybrane czynniki transkrypcyjne wpływające na ilość syntetyzowanego metabolitu [Zuluaga i wsp., 2008, Yang i wsp., 2017]. Te ostatnie reprezentują liczną i zróżnicowaną grupę białek wiążących DNA, które oddziałują z regionami promotorowymi docelowych genów regulując inicjację transkrypcji przez polimerazę RNA. W literaturze wyróżnia się kilka rodzin czynników transkrypcyjnych mogących wpływać na wtórny metabolizm roślin [Yang CQ i wsp., 2012]. Jedną z nich jest rodzina czynników MYB a jej reprezentantem czynnik AtPAP1. Wykazano że białko to może wpływać na szlaki metabolizmu wtórnego, zwiększając zawartość m.in kwasów fenolowych czy flawonoidów u transgenicznych roślin *Salvia miltiorrhiza* [Zhang i wsp., 2014] , *Brassica napus* [Li i wsp., 2010] oraz *Taraxacum brevicorniculatum* [Qiu i wsp., 2014] wykazujących jego nadekspresję. Analogiczne istnieją również przykłady prób wpływania na produkcję terpenoidów na drodze transgenezy. Przykładem mogą być tu transgeniczne korzenie włośnikowate w których dochodziło do nadprodukcji dwóch enzymów (SmGGPPS oraz SmDXSII) w efekcie czego uzyskano zwiększoną akumulację tanszynonów [Shi i wsp., 2016]. Także u *Nicotiana benthamiana* udało się podwyższyć poziom tych związków stosując podejście wykorzystujące przejściową ekspresję syntazy diterpenów [Bruckner i Tissier., 2013] . Ciekawym przykładem jest również uzyskanie transformowanych roślin *Artemisia annua* do których genomu wprowadzono gen syntazy taksadienu pochodzącego z cisu w efekcie czego uzyskano zwiększenie produkcji taksadienu do poziomu 129.7 µg/g suchej masy [Li i wsp., 2015].

Aktualnie prowadzone badania opierają się na pozyskiwaniu wielu metabolitów wtórnych należących do różnych klas związków. Jedną z ciekawych grup są związki fenolowe, szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. Zróżnicowana struktura i mechanizm działania wpłynął na gwałtowny wzrost zainteresowania nimi w odniesieniu do terapii różnych zaburzeń takich jak choroby neurologiczne czy nowotwory [Anantharaju i wsp. 2016]. Większość związków fenolowych wykazuje silne właściwości przeciwrodnikowe i przeciwutleniające stanowiąc nieenzymatyczny system obrony anty-oksydacyjnej. Wykazują także właściwości

antyproliferacyjne, proapoptyczne i przeciwzapalne przez co są podstawą do stosowania ich wspomagająco w terapii chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, alergiach, stanach zapalnych oraz cukrzycy [D'Archivio i wsp. 2008]. Pod względem struktury podstawowego szkieletu węglowego można podzielić je na: kwasy fenolowe i flawonoidy. Kwasy fenolowe to związki z grupą hydroksylową i karboksylową, do których należą proste kwasy cynamonowe, benzoesowe czy też fenylooctowe. Kolejną grupę stanowią depsydy, które są połączeniem dwóch lub więcej cząsteczek fenolokwasów. Z kolei do fenolokwasów zalicza się kwasy hydroksycynamonowe, wśród których wymienić można: kwas kawowy, chlorogenowy, kumarowy, ferulowy i synapinowy. Do najważniejszych pochodnych kwasu benzoesowego zaliczamy: kwas salicylowy, kwas p-hydroksybenzoesowy, kwas protokatechowy oraz kwas galusowy [Mróz i wsp. 2012]. W roślinach kwasy fenolowe występują przeważnie w formie związanej tj. w postaci estrów oraz glikozydów, które wchodzi w skład tanin hydrolizujących i lignin. Niektóre z kwasów hydroksycynamonowych mogą występować w połączeniach estrowych z glukozą lub kwasami karboksylowymi. Badania pokazują, że kwasy fenolowe mogą być również komponentami flawonów lub antocyjanów [Jeszka i wsp., 2010], ponadto mogą również występować w połączeniach z flawonoidami, sterolami, polimerami ścian komórkowych czy też kwasami tłuszczowymi. W ostatnich latach uwaga naukowców skupiona jest wokół testowania kwasów fenolowych w różnych chorobach nowotworowych. Chociaż wykazano, że kwasy fenolowe posiadają aktywność przeciwnowotworową, skuteczność ich działania jest różna i wynika z struktury chemicznej (udziału pierścienia aromatycznego i grup hydroksylowych). Przeciwnowotworowy mechanizm działania opiera się między innymi na modulowaniu stresu oksydacyjnego w komórkach rakowych przez co dochodzi do transdukcji sygnału, aktywacji czynników transkrypcyjnych oraz ekspresji specyficznych genów, które wpływają na proliferację komórek i apoptozę [Lee i wsp. 2000, Chen i wsp. 2015]. Ponadto coraz więcej dowodów wskazuje, że mogą bezpośrednio modulować różne etapy procesu apoptotycznego i/lub ekspresję białek regulatorowych, uwalnianie cytochromu c z późniejszą aktywacją kaspazy-9 i kaspazy-3 [Ho i wsp. 2013, Kassi i wsp. 2014], wzrost poziomu kaspazy-8 i t-Bid [Lin i wsp. 2011], obniżenie ekspresji Bcl-2 i Bcl-XL, wzmocnienie ekspresji Bax i Bak [Seidel i wsp. 2014] oraz modulację czynnika transkrypcyjnego NF-κB [Wang i wsp. 2010]. Badania przeprowadzone przez Kurata i wsp., 2007 wykazały, że kwas kawowy, chlorogenowy i pochodne kwasu chlorogenowego obecne w liściach słodkiego pomidora hamują wzrost komórek raka jelita grubego (DLD-1) oraz białaczki promielocytowej (HL-60) [Kurata i wsp. 2007]. Wyniki uzyskane dla kwasu ferulowego pokazały, że może on

indukować apoptozę w komórkach kostniakomięsaka poprzez zwiększenie poziomu Bax i obniżenie Bcl-2 [Elmore, 2007]. Z kolei kwas 4-hydroksybenzoesowy i kwas prokatechowy wykazały efekt cytotoksyczny na komórki raka piersi i prostaty indukując apoptozę poprzez obniżenie potencjału mitochondrialnego oraz fragmentację DNA [Kassi i wsp ., 2014, Yin i wsp., 2009]. W przypadku kwasu *p*-kumarowego wykazano hamowanie wzrostu komórek raka jelita grubego poprzez wzrost reaktywnych form tlenu (ROS), obniżenie potencjału mitochondrialnego i zatrzymanie komórek w fazie sub-G1 cyklu komórkowego [Jaganathan i wsp., 2013]. Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej wyniki badań wydaje się, że substancje biologicznie czynne pochodzenia roślinnego o potencjale przeciwnowotworowym mogą stanowić istotne uzupełnienie stosowanych obecnie form terapii. Dodatkowo mając do dyspozycji wyrafinowane narzędzia inżynierii genetycznej jesteśmy w stanie wpływać na efektywność produkcji tych metabolitów wtórnych. Dzięki temu w przyszłości fitofarmaceutyki mogą odgrywać istotną rolę obok obecnie stosowanych leków syntetycznych pozwalając jednocześnie na obniżenie kosztów oraz zmniejszenie toksyczności stosowanych obecnie terapii u pacjentów.

C) Cel naukowy ww. prac i osiągniętych wyników:

Podstawowym celem badań składających się na rozprawę habilitacyjną było otrzymanie roślin z pędów zregenerowanych *in vitro* oraz korzeni transformowanych *Leonurus sibiricus* L. powstałych w wyniku transformacji z użyciem szczepu A4 *Agrobacterium rhizogenes* oraz korzeni transformowanych wykazujących nadekspresję czynnika transkrypcyjnego AtPAP1, analiza zdolności do wytwarzania wtórnych metabolitów (kwasy fenolowe i olejki eteryczne) oraz badania aktywności biologicznej ekstraktów uzyskanych z materiału pochodzącego z kultur *in vitro* tego gatunku.

Badania obejmowały:

1. Otrzymanie roślin *Leonurus sibiricus* L z pędów zregenerowanych *in vitro*.

2. Otrzymanie i selekcję linii kultur korzeni transformowanych *L. sibiricus*.
3. Otrzymanie i selekcję linii kultur korzeni transformowanych *L. sibiricus* z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 charakteryzującej się wysokim przyrostem biomasy
4. Identyfikację i określenie zawartości kwasów fenolowych uzyskanych w różnych kulturach *in vitro* *L. sibiricus*.
5. Badania aktywności wodno-metanolowych ekstraktów z kultur *in vitro* *L. sibiricus* pod kątem indukcji apoptozy, działania cytotoksycznego, przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego, antyoksydacyjnego, naprawczego i ochronnego na DNA, zmiany potencjału mitochondrialnego, zmiany liczby kopii mitochondrialnych a także oszacowania uszkodzeń mitochondrialnego (mtDNA) oraz jądrowego (nDNA) DNA, zmiany poziomu ekspresji genów pro i anty apoptotycznych, zmiany cyklu komórkowego.

Pierwszym etapem badań było otrzymanie roślin Leonurus sibiricus z pędów zregenerowanych in vitro.

Otrzymanie roślin Leonurus sibiricus z pędów zregenerowanych in vitro.

Rośliny *L. sibiricus* zainicjowano z wierzchołkowych części 5-tygodniowych pędów (**publikacja 1**). Eksplantaty o długości około 1 cm umieszczono na pożywce agarowej Murashige i Skoog (MS) [10] (0.7%) uzupełnionej 0,1 mg/L kwasu indolo-3-octowego (IAA) i 0.5 mg/L 6 benzyloaminopuryny (BAP) i hodowano 5 tygodni przez 6 kolejnych pasażów. Do ukorzeniania, użyto 5-tygodniowych pędów dłuższych niż 1 cm które zostały odcięte i przenoszone pojedynczo na pożywkę agarową MS uzupełnioną 0,5 mg/L IAA. Hodowle utrzymywano na świetle (fotoperiod 16h, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) w temperaturze $26^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ w pomieszczeniu hodowlanym. Po 5 tygodniach ukorzenione pędy przeniesiono do doniczek (o średnicy 10 cm) zawierających wysterylizowaną mieszaninę gleby, piasku i torfu (4: 3: 3 v / v / v) i trzymano w szklarni przez 6 miesięcy. Rośliny *L. sibiricus* otrzymane z nasion z tego samego źródła, co te używane do zapoczątkowania kultury pędów, hodowano również w szklarni przez 6 miesięcy. Przeżywalność roślin po 6 miesiącach po przeniesieniu do warunków *in vivo* wynosiła około 90% (**publikacja 1**). Uzyskane w ten sposób rośliny *L. sibiricus*, części nadziemne (AP) i korzenie (R) zostały użyte do oznaczenia zawartości związków fenolowych w odniesieniu do roślin wyprowadzonych z nasion (AP i R *in vivo*).

Identyfikacja i ilościowe oznaczanie związków fenolowych wodno-metanolowych ekstraktów z L. sibiricus

Związki fenolowe zostały zidentyfikowane we wszystkich badanych wodno-metanolowych ekstraktach pochodzących z roślin *L. sibiricus* wyhodowanych *in vitro* i pochodzących z nasion (AP i R *in vitro* oraz AP i R *in vivo*) przez porównanie ich czasów retencji, widm absorpcji UV oraz widm masowych w porównaniu do wzorców (**publikacja 1**). Wśród głównych metabolitów w ekstraktach z części nadziemnej (AP *in vitro* oraz AP *in vivo*) *L. sibiricus* zidentyfikowano pochodne kwasu hydroksycynamonowego, kwas chlorogenowy (3) i kwas kawowy (4) oraz flawonol-kwercetynę (8). Kwercetyna występowała również w postaci glikozydu, jako rutyna (7). Werbaskozyd (9) był kolejnym glikozylowanym związkiem zidentyfikowanym w ekstraktach (AP i R *in vitro* oraz AP i R *in vivo*) (**publikacja 1**). Dodatkowo w ekstraktach roślinnych wykryto inne związki takie jak: kwas 4-hydroksybenzoesowy (1), (+) - katechinę (2), kwas *p*-kumarowy (5) i kwas ferulowy (6) (**publikacja 1**). Następnie metodą HPLC oznaczono zawartość związków w ekstraktach (AP i R *in vitro* i AP i R *in vivo*) roślinnych *L. sibiricus*. Wyniki wykazały, że nadziemne AP części roślin *in vitro* i AP *in vivo* różniły się zawartością związków niż korzenie (**publikacja 1**). W ekstraktach z części nadziemnych dominowała frakcja flawonoidów (2.8-9.7 mg/g DW) z

kwercetyną jako głównym składnikiem. Z kolei w korzeniach roślin *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że frakcją dominującą są kwasy fenolowe (7.6-12 mg/g DW) przy czym kwas chlorogenowy i kwas kawowy były głównymi związkami (4.4 i 6.5 mg/g DW i 3.2 i 5.5 mg/g DW) (**publikacja 1**). Z kolei werbaskozyd był akumulowany w większych ilościach w ekstraktach z korzeni (0.26-0.37 mg/g DW), niż w ekstraktach z części nadziemnych (0.18-0.19 mg/g DW). Zawartość kwercetyny w ekstrakcie roślin AP *in vitro* (9.7 mg/g DW) była około 3.5 razy większa niż w ekstrakcie roślin AP *in vivo* (2.8 mg/g DW). Ponadto stwierdzono, że zawartość kwasów fenolowych w ekstrakcie roślin R *in vitro* (12.1 mg/g DW) jest 1.5 razy większa niż w ekstrakcie roślin R *in vivo* (7.6 mg/g DW) (**publikacja 1**).

Wpływ wodno-metanolowych ekstraktów roślinnych na przeżywalność linii komórek CHO (jajnika chomika chińskiego).

Badanie testem MTT wykazało, że wraz ze wzrostem stężenia (zakres 0-6.25 mg/mL) po 24 h traktowaniu ekstraktami roślinnymi AP i R *in vitro* następuje zmiana przeżywalności komórek prawidłowych CHO (jajnika chomika chińskiego). Wartości IC₅₀ wynosiły odpowiednio 1.7 mg/mL i 2.8 mg/mL dla ekstraktów roślinnych R i AP *in vitro* *L. sibiricus* (**publikacja 1**). Przeżywalność komórek CHO po traktowaniu ekstraktami roślinnymi R i AP *in vivo* była podobna do tej uzyskanej dla ekstraktów roślinnych R i AP *in vitro* (dane niepublikowane). Na podstawie krzywej przeżywalności do dalszych badań za pomocą testu kometowego zostały wybrane następujące stężenia; 0.05, 0.1, i 0.5 mg/mL.

Badanie efektu ochronnego i naprawczego na DNA wodno-metanolowych ekstraktów AP i R in vitro i AP i R in vivo L. sibiricus w komórkach CHO indukowanych H₂O₂.

W celu sprawdzenia właściwości naprawczych, przed traktowaniem ekstraktami roślinnymi komórki eksponowane były na działanie H₂O₂ w stężeniu 75 µM przez 15 minut w temperaturze 4°C (**publikacja 1**). Procent DNA w ogonie komórek CHO inkubowanych z ekstraktami AP i R *in vitro* oraz AP i R *in vivo* (0.05-0.5 mg/mL) w czasie 0, jako po 15, 30, 60 i 120 minutach (**publikacja 1**). Komórki CHO traktowane H₂O₂ wykazały niekompletną naprawę w ciągu 2 godzin, a około 5% DNA znajdowało się w ogonie. Po inkubacji komórki wstępnie traktowane H₂O₂ i ekstraktami roślinnymi wykazywały bardziej wydajną naprawę niż te poddane działaniu samego H₂O₂ (**publikacja 1**). Poziom uszkodzeń DNA indukowanego przez H₂O₂ był mniejszy i proporcjonalny do rosnących stężeń ekstraktów

roślinnych. Spadek uszkodzeń DNA obserwowane podczas inkubacji naprawczej było istotnie wyższe po traktowaniu ekstraktami roślinnymi *in vitro*. Przy optymalnym stężeniu (0.5 mg/mL), poziom uszkodzeń DNA był znacznie wyższy, do 50%, po 15 i 30 minutach czasu inkubacji naprawczej DNA (**publikacja 1**). Po 60 minutach inkubacji naprawczej procent DNA w ogniu wynosił około 10%. Równocześnie poziom uszkodzeń DNA w komórkach CHO traktowanych tylko H₂O₂ wynosił około 25% . Wstępne traktowanie ekstraktami AP i R *in vitro* oraz AP i R *in vivo* *L. sibiricus* wykazało efekt ochronny DNA w komórkach CHO, który wzrastał proporcjonalnie do rosnących stężeń ekstraktów (**publikacja 1**). Ekstrakty AP i R *in vitro* miały znacznie silniejszy efekt ochronny niż ekstrakty AP i R *in vivo*. Jednak najsilniejszy efekt zaobserwowany został dla ekstraktu R *in vitro*. Po 15 i 30 minutach czasu inkubacji naprawczej DNA poziom uszkodzeń był znacznie zwiększony do 20-30%. Po 60 minutach inkubacji naprawczej procent DNA w ogniu wynosił około 5-10%. Komórki CHO traktowane H₂O₂ i poddane wstępnej inkubacji ekstraktem wykazały całkowitą naprawę w ciągu 2 godzin.

Zmiany ekspresji genów antyoksydacyjnych (SOD2, CAT i GPx) po działaniu wodno-metanolowymi ekstraktami AP i R in vitro i AP i R in vivo L. sibiricus w komórkach CHO indukowanych H₂O₂

W celu oszacowania zmiany poziomu ekspresji genów antyoksydacyjnych przed traktowaniem ekstraktami AP i R *in vitro* oraz AP i R *in vivo* *L. sibiricus* w stężeniu 0.5 mg/mL, komórki eksponowano na działanie H₂O₂ w stężeniu 75 µM przez 15 min (**publikacja 1**). Poziom ekspresji genów SOD2, CAT i GPx w komórkach CHO poddanych działaniu ekstraktów roślinnych bezpośrednio po inkubacji (0 godzin) nie różnił się istotnie w porównaniu z poziomem obserwowanym w komórkach kontrolnych z PBS (**publikacja 1**). Pokazano, że wszystkie testowane ekstrakty powodowały zmianę ekspresji genów SOD2, CAT i GPx około 2-5 krotnie po 24-godzinnej inkubacji co świadczy o ich właściwościach antyoksydacyjnych (**publikacja 1**).

Ze względu na wyższą zawartość związków fenolowych oraz lepsze działanie biologiczne ekstraktu z korzeni R *in vitro* *L. sibiricus* kolejnym krokiem moich badań było wyprowadzenie kultury korzeni transformowanych *L. sibiricus*.

Kolejnym etapem badań było otrzymanie korzeni transformowanych i nietransformowanych Leonurus sibiricus.

Otrzymywanie korzeni transformowanych i nietransformowanych L. sibiricus i ich wzrost w kulturze in vitro.

W celu uzyskania korzeni transformowanych pięcio-tygodniowe pędy *L. sibiricus* wyhodowane *in vitro* (około 2 cm) hodowano na podłożu agarowym Murashige i Skoog (MS) [12] (0.7%) uzupełnionym 0,1 mg/L kwasu indolo-3-octowego (IAA) i 0,5 mg/L 6-benzyloaminopuryny (BAP) a następnie zakażono szczepem A4 *Agrobacterium rhizogenes* (**publikacja 2**). Transformację przeprowadzono na międzywęźlach łodyg poprzez zranienie ich sterylną igłą zanurzoną w hodowli bakteryjnej. Korzenie (około 1-1.5 cm długości) powstałe w miejscu zranienia zostały odcięte i przeniesione pojedynczo na płynne podłoże Schenk i Hildebrandt (SH) [14] bez regulatorów wzrostu ale z 500 mg/L ampicyliny niezbędnej do eliminacji bakterii. Po kolejnych 4 tygodniach usunięto z podłoża ampicylinę i uzyskano aseptyczne korzenie, które następnie hodowano w 300 ml kolbie Erlenmeyera zawierającej 80 ml płynnego podłoża SH. Uzyskano 4 klony korzeni a jeden z nich (LS4), który wykazał najszybszy wzrost i zawierał więcej korzeni bocznych niż pozostałe klony wybrano do dalszych badań (**publikacja 2**). Kultury korzeni nietransformowanych *L. sibiricus* uzyskano przez odcięcie korzeni (około 2 cm długości) z 5-tygodniowych roślin zregenerowanych *in vitro* i hodowanie w płynnej pożywce SH uzupełnionej 0,2 mg/L kwasu indolo-3-masłowego (IBA). Hodowle utrzymywano przez 10 pasaży (po 5 tygodni), a następnie używano do badań fitochemicznych i biologicznych. Po 5 tygodniach biomasa z korzeni transformowanych wynosiła 78.9 ± 1.8 g (świeża masa) i 6.9 ± 0.2 g (sucha masa) na litr pożywki hodowlanej. Korzenie nietransformowane wykazywały słabszy wzrost niż korzenie transformowane w pożywce SH uzupełnionej 0,2 mg/L IBA. Było to około 1.5-krotne zmniejszenie się świeżej i suchej masy w stosunku do korzeni transformowanych (odpowiednio 51.3 ± 1.1 i 4.6 ± 0.1 g/L pożywki hodowlanej) (**publikacja 2**).

Potwierdzenie transformacji korzeni L. sibiricus

Transformację genetyczną korzeni *L. sibiricus* potwierdzono metodą PCR. Analiza wykazała obecność *rolB* (382 bp) i *rolC* (582 bp) genów wykrytych w korzeniach transformowanych, ale nie wykryto ich w korzeniach nietransformowanych które posłużyły jako kontrola ujemna (**publikacja 2**).

Identyfikacja i ilościowe oznaczanie związków fenolowych w wodno-metanolowych ekstraktach z korzeni nietransformowanych (NR) i transformowanych (TR) L. sibiricus

Związki fenolowe obecne w ekstraktach NR i TR *L. sibiricus* zidentyfikowano przez porównanie ich czasów retencji, widm absorpcji UV i widm masowych na podstawie wzorców (**publikacja 2**). Wśród metabolitów obecnych w korzeniach NR i TR *L. sibiricus* zidentyfikowano kwasy fenolowe takie jak: (1) kwas elagowy, (2) kwas syringowy, (3) kwas chlorogenowy, (4) kwas kawowy, (5) kwas *p*-kumarowy, (6) kwas ferulowy oraz flawonoidy: (7) myricetina, (8) luteolina, (9) hesperydyna i (10) glikozyd fenyloetanoidowy-werbaskozyd. Zawartość metabolitów w ekstraktach NR i TR *L. sibiricus* oznaczono metodą HPLC. W obu przypadkach w badanych ekstraktach NR i TR *L. sibiricus*, dominowały kwasy fenolowe (odpowiednio 8.14 i 17.44 mg/g suchej masy (DW)) z kwasem chlorogenowym, kwasem kawowym i kwasem elagowym jako dominującymi związkami (**publikacja 2**). Ponadto zaobserwowano znaczące różnice ilościowe tych związków między dwoma badanymi ekstraktami. Zawartość kwasu chlorogenowego w ekstrakcie TR była około 2.5 razy wyższa niż w ekstrakcie NR (10.18 vs. 4.38 mg/g DW) a zawartość kwasu kawowego była prawie 3 razy wyższa w TR ekstrakcie (4.82 vs. 1.72 mg/g DW) niż w NR ekstrakcie. Z kolei zawartość werbaskozydu również była wyższa w ekstrakcie TR (5.9 mg/g DW) niż w ekstrakcie NR (4.62 mg/g DW) (**publikacja 2**).

Efekt cytotoksyczny i indukcja apoptozy w komórkach glejaka ludzkiego (IV stopień) po działaniu NR i TR wodno-metanolowych ekstraktów z L. sibiricus

Do przeprowadzenia badań biologicznych została użyta linia glejaka ludzkiego w IV stadium zaawansowania uzyskana z guza pacjenta i potwierdzona odpowiednimi markerami na kancerogeność (D10S1709, D10S1172 i D22S283). Test MTT wykazał efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek glejaka w zależności od stężenia po traktowaniu obydwoma ekstraktami (**publikacja 2**), ale znacznie lepsze działanie było obserwowane dla ekstraktu TR. IC₅₀ było osiągnięte dla stężenia około 2.4 mg/mL. Następnie na podstawie krzywej przeżywalności zostały wybrane stężenia potrzebne do przeprowadzenia badań które miały na celu próbę wyjaśnienia mechanizmu indukcji apoptozy po działaniu badanych ekstraktów na komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium. Badanie metodą cytometrii przepływowej komórek glejaka po traktowaniu różnymi stężeniami ekstraktów NR i TR (0.85, 1.25, 2.0 i 2.4

mg/ml) wykazało, że procent komórek apoptotycznych wzrósł z 1.5% w komórkach kontrolnych do 14% po traktowaniu ekstraktem NR i do 33% po traktowaniu ekstraktem TR **(publikacja 2)**. Ponadto badanie cyklu komórkowego wykazało wzrost komórek w fazach S i G2/M po działaniu ekstraktami NR i TR w stężeniach 1.25, 2.0 i 2.4 mg/mL po 24 h inkubacji przy czym lepsze wyniki zaobserwowano dla ekstraktu TR **(publikacja 2)**. Badania wykazały, że hamowanie wzrostu komórek glejaka po działaniu ekstraktami NR i TR może być związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie S i G2/M. Kolejnym krokiem było sprawdzenie metodą RT-PCR poziomu ekspresji genów *Bax*, *Bcl-2* i *TP53* na poziomie mRNA zaangażowanych w proces apoptozy. W tym celu na podstawie wcześniejszych eksperymentów zostało wybrane najbardziej skuteczne pojedyncze stężenie dla testowanych ekstraktów NR i TR (2.4 mg/mL). Badania wykazały, że inkubacja z ekstraktami NR i TR komórek glejaka w stężeniu 2.4 mg/mL znacząco obniżała poziom ekspresji dla genu *Bcl-2* **(publikacja 2)**. Ponadto obserwowano wzrost poziomu ekspresji dla genów *TP53* i *Bax* po 24 godzinach. Podobne wyniki zostały uzyskano na poziomie białka (*Bax*, *Bcl-2* oraz p53) przy użyciu metody Western Blot po wcześniejszej inkubacji z testowanymi ekstraktami NR i TR w stężeniu 2.4 mg/mL **(publikacja 2)**. Ostatnim etapem badań było sprawdzenie fragmentacji DNA które analizowano za pomocą typowego tworzenia się drabiny DNA, uwidocznionego na żelu agarozowym. Jak pokazano **(publikacja 2)** 24-godzinne traktowanie ekstraktami NR i TR komórek glejaka w stężeniu 2.4 mg/mL spowodowało degradację chromosomalnego DNA na małe fragmenty internukleosomalne (biochemiczna cecha komórek przechodzących apoptozę). Uzyskane w toku badań wyniki sugerują, że indukcja apoptozy w komórkach glejaka ludzkiego po traktowaniu ekstraktami NR i TR może zachodzić poprzez zmianę *Bax/Bcl-2-p53* przy czym lepsze efekty obserwowano dla ekstraktu TR *L. sibiricus*. Następnym etapem badań było wyizolowanie i oznaczenie składników olejków eterycznych w korzeniach transformowanych i nietransformowanych *L. sibiricus* i oszacowanie ich właściwości biologicznych. W tym celu dokonano izolacji olejków eterycznych z korzeni NR i TR uzyskanych przez hydrodestylację prowadzoną a aparacie Derynga. Analiza chemiczna składu olejków eterycznych została przeprowadzona metodą GC-MS.

Skład chemiczny olejków eterycznych zawartych w korzeniach NR i TR L. sibiricus.

Olejki eteryczne z korzeni NR i TR otrzymano z wydajnością odpowiednio 0.06% i 0.04%. Zidentyfikowano 85 związków **(publikacja nr 3)**. Olejki eteryczne z korzeni NR i TR zawierały złożoną mieszaninę składającą się głównie z węglowodorów seskwiterpenowych

(odpowiednio 60.2% i 64.8%), utlenionych seskwiterpenów (odpowiednio 6.8% i 13.4%) oraz węglowodorów monoterpenu (odpowiednio 6.0% i 1.5%) (**publikacja nr 3**). Dodatkowo zidentyfikowano niskie stężenie utlenionych monoterpenu (odpowiednio 2.1% i 1.9%). Dla olejku z korzeni NR zidentyfikowano siedemdziesiąt składników. Głównymi związkami były β -selinen (9.9%), selina-4,7-dien (9.7%), (E) - β -kariofyllen (7.3%), myli-4 (15)-en (6.4%) i guaia-1 (10),11-dien (5.9 %). W olejku z korzeni TR zidentyfikowano 67 związków. Głównymi składnikami olejku eterycznego z korzeni TR były : (E) - β -kariofyllen (22.6%), germakren D (19.8%) i α -copaene (5%).

Efekt cytotoksyczny olejków NR i TR z korzeni L. sibiricus na prawidłowych astrocytach ludzkich i komórkach glejaka w IV stadium

Uzyskane w toku analiz wyniki wykazały, że olejki eteryczne z korzeni NR i TR mają działanie cytotoksyczne na komórki glejaka w IV stadium dla stężenia IC_{50} wynoszącego 400 $\mu\text{g/mL}$, co powodowało 50% spadku przeżywalności komórek. Z kolei efekt ten na prawidłowych astrocytach ludzkich (NHA) dla obu testowanych olejków eterycznych po 24 h inkubacji był podobny z wartością IC_{50} około 1600 $\mu\text{g/mL}$ co pokazuje, że olejki wykazują 4 krotnie silniejsze działanie na komórki glejaka niż na prawidłowe astrocyty (**publikacja nr 3**). Nie wykazano z kolei efektu cytotoksycznego po działaniu LPS (lipopolisacharydu) w stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$ na prawidłowe astrocyty po 24 h użyciu w celu zaindukowania stanu zapalnego w komórkach (**publikacja nr 3**)

Aktywność przeciwbakteryjna olejków eterycznych uzyskanych z korzeni NR i TR L. sibiricus.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową olejków eterycznych z NR i TR korzeni *L. sibiricus* oszacowano za pomocą metod MIC i MBC/MFC. Wartości MIC i MBC/MFC olejków z NR i TR korzeni *L. sibiricus* wahały się w zakresie od 125 do 2500 $\mu\text{g/mL}$ dla MIC i od 500 do 5000 $\mu\text{g/mL}$ dla MBC/MFC (**publikacja nr 3**). Aktywność przeciwbakteryjną wykazywały obydwa testowane olejki z korzeni *L. sibiricus* przeciwko wszystkim testowanym szczepom bakteryjnym (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*) o wartościach MIC w zakresie 125-250 $\mu\text{g/mL}$, ale najsilniejsze działanie obserwowano wobec *P. aeruginosa* (125 $\mu\text{g/mL}$). Stwierdzono również, że oba testowane olejki z korzeni *L. sibiricus* posiadają aktywność przeciwgrzybiczą przeciwko *S. cerevisiae* i *C. albicans* z wartościami MIC wynoszącymi 1250 i 2500 $\mu\text{g/mL}$ i dla wartości MFC

odpowiednio 2500 i 5000 µg/mL (**publikacja nr 3**). Badania nie wykazały znaczących różnic pomiędzy testowanymi olejkami eterycznymi NR i TR korzeni *L. sibiricus*.

Aktywność antyoksydacyjna olejków eterycznych NR i TR korzeni L. sibiricus.

Aktywność antyoksydacyjną olejków eterycznych z NR i TR korzeni *L. sibiricus* oceniano za pomocą testów DPPH i ABTS. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy testowanymi olejkami eterycznymi. W teście ABTS, wartość EC50 wyniosła 92.40 ± 1.99 µg/mL dla olejku NR i 88.22 ± 1.35 µg/mL dla olejku TR. Z kolei dla testu DPPH wartość EC50 wyniosła 500.50 ± 1.37 µg/mL dla olejku NR i 489.20 ± 1.45 µg/mL dla olejku TR (**publikacja nr 3**). Oba testowane olejki wykazały niską aktywność przeciwutleniającą.

Wpływ olejków eterycznych z korzeni NR i TR L. sibiricus na poziom cytokin.

W badaniu oszacowano wpływ olejków eterycznych NR i TR z korzeni *L. sibiricus* na zmianę poziomu cytokin zapalnych i prozapalnych takich jak ; IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ i TNF-α w komórkach prawidłowych astrocytów ludzkich stymulowanych LPS w stężeniu 1 µg/mL. Wyniki pokazały, że olejki NR i TR obniżały poziom stymulowanych LPSem cytokin IL-1β, IL-6, TNF-α i IFN-γ w porównaniu do kontroli (**publikacja nr 3**). Efekt ten obserwowano przy różnych stężeniach (15, 30 i 60 µg/mL) testowanych olejków eterycznych NR i TR. Ponadto nie zaobserwowano różnic w poziomie IL-2 i IL-4 w odniesieniu do kontroli. Poza tym nie stwierdzono żadnych istotnych różnic pomiędzy dwoma badanymi olejkami eterycznymi.

Wpływ olejków NR i TR L. sibiricus na zmianę poziomu ekspresji genów; IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ i TNF-α indukowanych LPS.

W celu sprawdzenia zmiany ekspresji genów *IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ i TNF* prawidłowe astrocyty ludzkie inkubowano z LPS w stężeniu 1 µg/mL, a następnie z olejkami eterycznymi NR i TR w stężeniu 60 µg/mL. Badania pokazały obniżenie poziomu ekspresji genów *IL-1β, IL-6, IFN-γ i TNF-α* w komórkach stymulowanych LPS dla obu testowanych olejków eterycznych (**publikacja nr 3**), przy czym nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji dla genów *IL-2 i IL-4*. Ponadto nie wykazano znaczących różnic pomiędzy testowanymi olejkami.

Ostatnim etapem badań było otrzymanie korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 w celu zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych.

Otrzymywanie korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 i potwierdzenie transformacji

Ze względu na wyższą zawartość kwasów fenolowych w korzeniach transformowanych (TR) *L. sibiricus* w porównaniu do korzeni nietransformowanych (NR) (**publikacja nr 2**) oraz korzeni roślin zregenerowanych *in vitro* (**publikacja nr 1**), następnym etapem badań była próba zwiększenia produkcji kwasów fenolowych w korzeniach *L. sibiricus* z wykorzystaniem narzędzi inżynierii genetycznej poprzez transformację genetyczną z wykorzystaniem bakterii *A. rhizogenes* posiadających zmodyfikowany wektor pCAMBIA 1305.1 niosący kasetę ekspresyjną zawierającą gen kodujący czynnik transkrypcyjny AtPAP1. Literatura donosi, że uzyskane w ten sposób rośliny mogą produkować zwiększoną ilość kwasów fenolowych poprzez zmianę ekspresji genów w szklaku fenylopropanoidowym [Qiu i wsp., 2014]. W tym celu został skonstruowany roślinny wektor ekspresyjny w oparciu o wektor binarny pCAMBIA 1305.1. Sekwencja kodująca AtPAP1 została zsyntetyzowana przez firmę Biomatik Co. (Kanada) i wklonowana do finalnej wersji wektora z wykorzystaniem miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez enzymy *NcoI* i *Eco72I* do wektora pCAMBIA 1305.1-AtPAP1 zastępując gen GUSPlus. Tak przygotowany wektor użyto dalej do transformacji.

Do transformacji użyto 5-tygodniowe wyhodowane *in vitro* pędy *L. sibiricus*. Kasetę ekspresyjną zawierającą gen kodujący czynnik transkrypcyjny AtPAP1 (pochodzący z *A. thaliana*) znajdujący się pod kontrolą konstytutywnego promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S) została wklonowana do wektora binarnego pCAMBIA 1305.1. Przeniesienie odpowiedniego fragmentu T-DNA do *L. sibiricus* nastąpiło na drodze transformacji z wykorzystaniem *A. rhizogenes* szczepu A4. Pierwsze korzenie zaobserwowano po 2 tygodniach od inokulacji, a na 68.5% eksplantatów korzenie pojawiły się po kolejnych 3 tygodniach (**publikacja nr 4**). Otrzymano cztery klony korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika AtPAP1 (1 do 4) i jeden klon TR korzeni *L. sibiricus* powstały po transformacji *A. rhizogenes* nie zawierający zmodyfikowanego wektora pCAMBIA 1305.1, które hodowano przez 5 tygodni w płynnej pożywce SH. Po tym czasie, świeża masa pochodząca ze wszystkich klonów korzeni wzrosła 33-35 razy z 2.5 do 83-87 g/L, a sucha

masa wzrosła około 29-31 razy. Świeża masa TR korzeni bez konstruktu wykazała niższe przyrosty biomasy (53 g/L świeżej masy i 9.2 g/L suchej masy) (**publikacja nr 4**). Potwierdzenie transformacji przeprowadzono metodą PCR przy użyciu specyficznych starterów dla fosfotransferazy higromycyny (*hptII*) dla transgeniczných klonów korzeni 1-4 AtPAP1 *L. sibiricus*. Powstałe amplikony wielkości 1026 bp zaobserwowano w próbkach korzeni transgeniczných, ale nie w linii kontrolnej TR. Kolejnym badaniem było sprawdzenie ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny AtPAP1 w badanych klonach za pomocą qRT-PCR (**publikacja nr 4**). Wyniki pokazały nadekspresję genu dla AtPAP1 we wszystkich transgeniczných klonach korzeni *L. sibiricus*. Niższa ekspresja była obserwowana w korzeniach TR (**publikacja nr 4**).

Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w korzeniach transformowanych (TR) i korzeniach (1-4) z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1

Wyniki analizy HPLC pokazały większą akumulację kwasu kawowego, kwasu ferulowego, kwasu *p*-kumarowego i kwasu chlorogenowego w transgeniczných korzeniach 1-4 wykazujących nadekspresję czynnika AtPAP1 niż w korzeniach TR (**publikacja nr 4**). Najbardziej produktywnym klonem był klon 1 AtPAP1 TR *L. sibiricus* który charakteryzował się największą produkcją wszystkich wyżej wymienionych kwasów fenolowych w porównaniu do korzeni TR. Zawartość kwasu chlorogenowego w korzeniach klonu 1 AtPAP1 TR *L. sibiricus* wynosiła 19.392 mg/g suchej masy to jest 4.72 razy więcej niż w korzeniach TR *L. sibiricus* (4.104 mg/g suchej masy) (**publikacja nr 4**). Z kolei kwasu kawowego w korzeniu klonu 1 AtPAP1 TR *L. sibiricus* było 11.380 mg/g suchej masy, tj. 2.72 razy więcej niż w korzeniu TR *L. sibiricus* (4.176 mg/g suchej masy). Badania wykazały również, że akumulacja kwasu chlorowodorowego, *p*-kumarowego i kwasu ferulowego jest 2.25, 1.73 i 1.77 razy większa w korzeniu klonu 1 AtPAP1 TR *L. sibiricus* niż w korzeniu TR *L. sibiricus*. Z kolei dla klonów 2 i 3 AtPAP1 TR *L. sibiricus* kwas chlorogenowy wzrósł do 18.016 mg/g suchej masy i odpowiednio 98.128 mg/g suchej masy a kwas kawowy do 8.792 mg/g suchej masy i 6.634 mg/g suchej masy w porównaniu z korzeniem TR *L. sibiricus*. Klon 4 AtPAP1 TR *L. sibiricus* nie wykazał znaczących różnic w produkcji kwasów fenolowych w porównaniu do korzenia TR *L. sibiricus*.

Z czterech transgeniczných klonów korzeni *L. sibiricus*, klon 1 AtPAP1 TR *L. sibiricus* wykazał najszybszy wzrost w pożywce SH, najwyższy poziom ekspresji genu AtPAP1 oraz

zawierał najwyższą ilość kwasów fenolowych, dlatego został wybrany do dalszych badań biologicznych.

Przeżywalność komórek glejaka w IV stadium oraz prawidłowych astrocytów ludzkich po działaniu wodno-metanolowym ekstraktem z klonu 1 korzeni AtPAP1 TR L. sibiricus.

Badanie testem MTT przeprowadzono na komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium po traktowaniu ekstraktem z korzeni klonu 1 AtPAP1 TR L. sibiricus po 24 godzinach. Wyniki pokazały, że badany ekstrakt nie wykazywał działania cytotoksycznego na prawidłowe komórki astrocytów ludzkich w zakresie stężeń 0-1 mg/mL po 24 godzinach. Stwierdzono natomiast, że ekstrakt ma działanie cytotoksyczne na komórki glejaka ludzkiego w IV stadium przy stężeniu IC_{50} wynoszącym 0.75 mg/mL (**publikacja nr 4**). Warto zauważyć, że stężenie to jest niższe niż stężenie dla ekstraktu z korzeni transformowanych TR $IC_{50}=2.4$ mg/mL prezentowane na tej samej linii glejaka ludzkiego w IV stadium (**publikacja nr 2**).

Aktywności przeciwdrobnoustrojowa po działaniu wodno-metanolowego ekstraktu z korzeni klonu 1 AtPAP1 TR L. sibiricus.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktu z korzeni klonu 1 AtPAP1 TR L. sibiricus określono ilościowo przy użyciu testów MIC i MBC/MFC (**publikacja nr 4**). Wartości MIC i MBC/MFC klonu 1 AtPAP1 TR L. sibiricus występowały w przedziale 125-2500 $\mu\text{g/mL}$ dla MIC i 500-5000 $\mu\text{g/mL}$ dla MBC/MFC dla wszystkich badanych szczepów. Aktywność przeciwbakteryjną wykazano przeciwko wszystkim szczepom bakteryjnym (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*) z wartościami MIC w zakresie 125-250 $\mu\text{g/mL}$. Najlepsze wyniki zaobserwowano w przypadku *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. faecalis* przy wartości MIC =125 $\mu\text{g/mL}$. Ponadto wykazano, że ekstrakt posiada również aktywność przeciwgrzybiczą przeciwko *S. cerevisiae* i *C. albicans* z wartościami MIC wynoszącymi 625 $\mu\text{g/mL}$ dla obydwu szczepów, oraz z wartości MFC odpowiednio 625 i 1250 $\mu\text{g/mL}$. Uzyskane wyniki pokazują, że zarówno ekstrakt z korzeni L. sibiricus z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 jak i olejki (**publikacja nr 3**) posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie działania ekstraktu z korzeni klonu 1 AtPAP1 TR L. sibiricus na indukcję apoptozy na drodze uszkodzeń DNA, zmianie poziomu PARP1 i

H2A.X oraz zmianie poziomu ekspresji genów *DNMT1* oraz *UHRF1* w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium oraz w linii komercyjnej glejaka U87MG. Badanie cytotoksyczności testem MTT dla linii glejaka U87MG wykazało spadek przeżywalności po traktowaniu ekstraktem TR z wartością $IC_{50}=2.5$ mg/mL, a dla AtPAP1 TR z wartością około 1.5 mg/mL.

Badanie uszkodzeń DNA po działaniu wodno-metanolowych ekstraktów AtPAP1 TR oraz TR L. sibiricus

Uzyskane wyniki pokazały wzrost uszkodzeń DNA w obu liniach komórkowych w zależności od testowanej dawki (**publikacja nr 5**). Poziom uszkodzeń DNA w ogonie wynosił około 65% w przypadku najwyższego użytego stężenia w komórkach U87MG po działaniu ekstraktu z korzeni AtPAP1 TR i około 50 % w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium po traktowaniu ekstraktem z korzeni AtPAP1TR. Badania wykazały, że ekstrakt z korzeni AtPAP1 TR działa silniej indukując większą ilość uszkodzeń w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium oraz w linii komercyjnej glejaka U87MG (**publikacja nr 5**).

Określenie poziomu przeciętego PARP1 (pPARP1) i poziomu ufosforylowanego histonu γ H2A.X metodą cytometrii przepływowej w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium oraz linii komercyjnej glejaka U87MG po działaniu wodno-metanolowymi ekstraktami z korzeni AtPAP1 TR oraz TR L. sibiricus.

W celu sprawdzenia markera apoptozy pPARP1, tj. przeciętej przez kaspazy PARP1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1), przeprowadzono analizę cytometrii przepływowej na linii komórkowej U87MG oraz glejaka w IV stadium. Po 24-godzinnej inkubacji z analizowanymi ekstraktami korzeni TR i AtPAP1, procent pPARP1-pozytywnych komórek znacząco wzrósł w obu testowanych liniach komórkowych (**publikacja nr 5**). Chociaż oba ekstrakty powodowały wzrost liczby komórek apoptotycznych, ekstrakt z korzenia AtPAP1 TR był bardziej skuteczny pod tym względem, podnosząc poziom komórek pPARP1-pozytywnych, w porównaniu do ekstraktu z korzenia TR *L. sibiricus*. W tym samym eksperymencie został również określony poziom ufosforylowanego histonu γ H2A.X, w celu analizy czy testowane ekstrakty wywołały dwuniciowe pęknięcia DNA i aktywowały działanie mechanizmów naprawczych DNA. W linii komórkowej U87MG poziom γ H2A.X-pozytywnych komórek nie różnił się między testowanymi ekstraktami, ale w komórkach glejaka w IV stadium ekstrakt AtPAP1 TR powodował nieznacznie większe podniesienie liczby komórek (**publikacja nr**

5). Dodatkowo, poziom γ H2A.X mierzono za pomocą testu ELISA. Wyniki wykazały, że ekstrakty z korzeni TR i AtPAP1 TR *L. sibiricus* zwiększały poziom γ H2A.X w obu testowanych liniach komórkowych ale lepsze działanie zaobserwowano dla ekstraktu AtPAP1 TR *L. sibiricus*.

Zmiana ekspresji genów DNMT1 oraz UHRF1 w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium oraz linii komercyjnej glejaka U87MG.

W badaniu określono zmianę poziomu ekspresji genów związanych z apoptozą metodą Real Time-PCR w komórkach glejaka w IV stadium oraz komórkach U87MG po działaniu ekstraktów z korzeni AtPAP1 TR i TR *L. sibiricus*. Eksperyment pokazał, obniżenie poziomu ekspresji genów *UHRF1* i *DNMT1* w obu badanych liniach, ale lepsze wyniki zaobserwowano dla ekstraktu z korzeni AtPAP1 TR w porównaniu z ekstraktem TR **(publikacja nr 5)**.

Do dalszych analiz wybrano najbardziej produktywny klon korzeni TR ze wzmocnioną ekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 *L. sibiricus* użytego do badań biologicznych we wcześniejszych pracach **(publikacja nr 4 i 5)** w celu zbadania wydajności i zawartości kwasów fenolowych w różnych objętościach podłoża (300 mL, 1 L, 3 L, 5 L) oraz 5 L rozpyłowym bioreaktorze.

Wzrost korzeni AtPAP1 TR L. sibiricus w różnych objętościach pożywki (300 mL , 1 L , 3L i 5 L) i w 5 L bioreaktorze.

Do badania użyto 6 g/L świeżej masy korzeni AtPAP1 TR *L. sibiricus* które hodowano w pożywce SH w czterech kolbach Erlenmeyera o różnej objętości: 300 ml zawierającą 80 ml pożywki, 1-litrową kolbę zawierającą 500 ml pożywki, 3-litrową kolbę zawierającą 1,5 l pożywki i 5-litrową kolbę z 2,5 l pożywki (bez fitohormonu) **(publikacja nr 6)**. Kultury korzeni AtPAP1 TR trzymano na obrotowej wytrząsarce przy 75 obrotach na minutę i inkubowano w 25 ± 2 ° C. Świeżą i suchą masę korzeni AtPAP1 TR podano po 30 dniach hodowli. Uzyskane w toku badań wyniki pokazują, że świeża masa korzeni mieściła się w zakresie od 71 do 312 g/L dla wszystkich badanych kultur. Najwyższy przyrost biomasy uzyskano dla korzeni hodowanych w bioreaktorze czyli 312 g/L , i był to około 50-krotny wzrost w stosunku do początkowego inokulum (6.0 g/L świeżej masy). Z kolei przyrost

suchej masy wahał się od 4.5 do 20.8 g/L. Najwyższy przyrost suchej masy zaobserwowano dla korzeni hodowanych w 5 L bioreaktorze (20.83 g/L) i w 1 L kolbie (13.2 g/L), wartości te były około 34- i 22-razy większe niż masy inokulum (0.6 g/L). Z kolei najniższy przyrost suchej masy zaobserwowano dla korzeni hodowanych w kolbach o pojemności 300 mL, 3 L i 5 L z wartościami odpowiednio 4.54, 4.88 i 4.63 g/L (**publikacja nr 6**).

Zawartość kwasów fenolowych i ich wydajność w korzeniach AtPAP1 TR L. sibiricus hodowanych w kolbach i 5 L rozpyłowym bioreaktorze

Za pomocą analizy HPLC (**publikacja 6**) została określona zawartość pięciu kwasów fenolowych (kwas neochlorogenowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kwas *p*-kumarowy i kwas ferulowy) w korzeniach AtPAP1 TR *L. sibiricus* rosnących w kolbach o różnej objętości i 5 L rozpyłowym bioreaktorze. Wyniki wykazały, że kwas chlorogenowy i kwas kawowy występowały w najwyższych ilościach. Najwyższą zawartość kwasu chlorogenowego zaobserwowano w 1-litrowej kolbie (23 mg/g suchej masy) i bioreaktorze (21.5 mg/g suchej masy) (**publikacja nr 6**). Kultura korzeni hodowanych w rozpyłowym bioreaktorze zawierała również wyższe ilości kwasu kawowego (14.5 mg/g suchej masy) niż te rosnące w kolbach (9.2-12.1 mg/g suchej masy). Dodatkowo, korzenie hodowane w bioreaktorze osiągnęły wyższy przyrost masy niż kultury hodowane w kolbach. Najwyższa wydajność (20 g/L suchej masy) została oszacowana dla kwasu chlorogenowego i kwasu kawowego (mg na litr pożywki) z wartościami (448 i 302 mg/L) dla kultury korzeni hodowanych w rozpyłowym bioreaktorze (**publikacja nr 6**). Ze względu na najwyższą zawartość kwasów fenolowych w kulturze korzeni AtPAP1 TR hodowanych w 5 L bioreaktorze, przygotowany ekstrakt została użyty do badań biologicznych.

Wyższa zawartość kwasów fenolowych w kulturze korzeni AtPAP1 TR hodowanych w rozpyłowym bioreaktorze może być związana ze zmianą poziomu ekspresji genów (*PAL*, *C4H* i *4CL*) zaangażowanych w szlak fenylopropanoidowy dlatego też w kolejnym etapie badań określiłem poziom ekspresji tych genów.

Ekspresja genów PAL, C4H i 4CL w korzeniach AtPAP1TR i TR

Badania wykazały wzrost poziomu ekspresji badanych genów *C4H*, *PAL*, *4CL* w korzeniach ze wzmocnioną ekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 niż w korzeniach TR bez

czynnika transkrypcyjnego AtPAP1, sugerując, że zwiększona zawartość kwasów fenolowych w korzeniach AtPAP1 TR może powstawać przez manipulacje w szklaku fenylopropanoidowym (**publikacja nr 6**).

Hamowanie wzrostu komórek czerniaka (A-2051) po działaniu wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni AtPAP1 TR i TR L. sibiricus.

Badania pokazały hamowanie wzrostu komórek czerniaka linii (A-2051) po 72-godzinnej inkubacji z ekstraktami z korzeni AtPAP1 TR i TR *L. sibiricus* w testowanym zakresie stężeń 2.5-40 µg/mL. Oba ekstrakty wykazywały hamowanie wzrostu komórek ale lepsze działanie zaobserwowano dla ekstraktu AtPAP1TR *L. sibiricus* przy stężeniu 40 µg/mL z wartością 53.3%.

Właściwości przeciwutleniające po traktowaniu wodno-metanolowymi ekstraktami z korzeni AtPAP1TR i TR L. sibiricus na osocze ludzkie.

Do sprawdzenia potencjału antyoksydacyjnego ludzkiego osocza użyto testów ABTS, DPPH oraz FRAP. Testy DPPH i ABTS wykazały, że oba testowane ekstrakty *L. sibiricus* zwiększały potencjał antyoksydacyjny w badanych stężeniach (5-50 µg/mL) (**publikacja nr 6**), jednak lepsze działanie zaobserwowano dla ekstraktu z korzeni AtPAP1 TR. Podobne wyniki uzyskano w teście FRAP, gdzie również zaobserwowano bardziej skutecznie działanie ekstraktu z korzeni AtPAP1 TR.

W kolejnym etapie badań ze względu na najwyższą zawartość kwasów fenolowych ekstraktu uzyskanego z korzeni AtPAP1 TR hodowanych w 5 L bioreaktorze sprawdzono efekt cytotoksyczny i genotoksyczny na trzech liniach komórkowych (CCRF-CEM , K562 oraz K549).

Efekt cytotoksyczny wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni AtPAP1 TR oraz TR L. sibiricus na liniach komórkowych CCRF-CEM, K-562 i A549.

Badania wykazały, że ekstrakt z korzeni TR miał słabszą cytotoksyczność niż ekstrakt z korzeni AtPAP1 TR. W przypadku komórek CCRF-CEM wartość IC₅₀ wynosiła około 0.313 mg/mL dla testowanego ekstraktu ATPAP1 TR, a około 1.25 mg/mL dla ekstraktu TR. Z

kolei dla komórek K-562, IC_{50} wynosiło 0.625 mg/mL dla AtPAP1 TR, a 1.25 mg/mL dla ekstraktu TR. Nie wykazano efektu cytotoksycznego obu testowanych ekstraktów dla linii A549 w testowanym zakresie stężeń (0.019-5 mg/mL) (**publikacja nr 7**).

Wpływ wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni AtPAP1 TR i TR z L. sibiricus na zmianę potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) w komórkach K-562 (przewlekła białaczka szpikowa), CCRF-CEM (ostra białaczka limfoblastyczna) i A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc).

Badania pokazały obniżenie potencjału mitochondrialnego po 24-godzinym traktowaniu ekstraktami z korzeni AtPAP1 TR i TR *L. sibiricus* we wszystkich testowanych liniach komórkowych (K-562, CCRF-CEM i A549) w porównaniu do kontroli. Najwyższe obniżenie potencjału mitochondrialnego było obserwowane dla linii CCRF-CEM oraz K-562, przy czym lepsze działanie wykazywał ekstrakt AtPAP1 TR (**publikacja nr 7**).

Oszacowanie uszkodzeń mitochondrialnego (mtDNA) i jądrowego (nDNA) DNA oraz kopii mitochondrialnych po działaniu wodno-metanolowych ekstraktów AtPAP1 TR i TR L. sibiricus.

Uzyskane w toku badań wyniki nie wykazały zmian liczby kopii mtDNA dla wszystkich testowanych linii komórkowych (K-562, CRF-CEM i A549) po działaniu ekstraktami AtPAP1 TR oraz TR. Jedynie niewielki wzrost zaobserwowano w liniach K-562 i CCRF-CEM (**publikacja nr 7**).

Do sprawdzenia uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA) oraz jądrowego DNA (nDNA) została zastosowana metoda SLR-qRT-PCR. W przypadku linii komórkowych CCRF-CEM i K-562 dla mitochondrialnego DNA (mtDNA) stwierdzono znaczny wzrost uszkodzeń w regionie *ND1* w porównaniu do kontroli. Dla komórek CCRF-CEM z wartością 7.8 uszkodzeń na 10 kb DNA po działaniu ekstraktu TR i uszkodzeń na 10 kb DNA po inkubacji z ekstraktem AtPAP1 TR. Z kolei dla komórek K-562 około 4 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem TR i 6 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem AtPAP1 TR *L. sibiricus*. W regionie *ND5*, dla linii CCRF-CE zaobserwowano około 4.5 uszkodzeń na 10 kb DNA w komórkach traktowanych ekstraktem TR i 6.2 uszkodzeń na 10 kb DNA po działaniu ekstraktu AtPAP1 TR. Dla linii K-562 zaobserwowano około 4.0 uszkodzeń na 10 kb DNA dla ekstraktu TR i 5.3 uszkodzeń na 10 kb DNA dla ekstraktu AtPAP1 TR.

Badania nie wykazały znaczących różnic między testowanymi ekstraktami. W przypadku komórek linii A549 nie stwierdzono różnic między ekstraktami AtPAP1 TR i TR a kontrolą w poziomie uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA) w regionie *ND1* lub *ND5* (**publikacja nr 7**).

Wyniki uzyskane dla jądrowego DNA (nDNA) pokazują wzrost uszkodzeń w regionie TP53 dla komórek K-562, CCRF-CEM po działaniu ekstraktami TR i AtPAP1 TR. W przypadku komórek K-562 zaobserwowano 3.1 uszkodzeń na 10 kb DNA po działaniu ekstraktem TR i 4.2 uszkodzeń na 10 kb DNA po inkubacji z ekstraktem AtPAP1 TR. W przypadku komórek CCRF-CEM stwierdzono 5.6 uszkodzeń na 10 kb DNA po traktowaniu ekstraktem TR i 6.9 uszkodzeń na 10 kb DNA po ekstrakcie AtPAP1 TR. W przypadku komórek linii A549 nie stwierdzono różnic między ekstraktami TR i AtPAP1 TR i kontrolą w odniesieniu do poziomu uszkodzeń jądrowego DNA (nDNA) w regionie *TP53*. Z kolei w regionie *HPRT1*: nie stwierdzono żadnych istotnych różnic pomiędzy badanymi ekstraktami AtPAP1 TR i TR a kontrolą w ilości uszkodzeń jądrowego DNA (nDNA) dla komórek K-562, CCRF-CEM i A549 (**publikacja nr 7**).

Podsumowanie:

1. Po raz pierwszy uzyskano zregenerowane *in vitro* rośliny *Leonurus sibiricus* i porównano ich profil fitochemiczny pod kątem zawartości kwasów fenolowych z roślinami wyhodowanymi z nasion rosnących w gruncie.
2. Wykazano po raz pierwszy właściwości antyoksydacyjne dla genów *SOD2*, *CAT* i *GPx*, a także efekt ochronny i naprawczy na DNA ekstraktów uzyskanych z części nadziemnej i podziemnej roślin *in vitro* oraz z gruntu na prawidłowe komórki jajnika chomika chińskiego (CHO) indukowane nadtlaniem wodoru.
3. Po raz pierwszy po transformacji *Agrobacterium rhizogenes* (szczep A4) uzyskano kulturę korzeni transformowanych *Leonurus sibiricus*. Korzenie te intensywnie rosły w kolbach Erlenmeyera w płynnym podłożu Schenk'a i Hildebrandt'a (SH).
4. Przygotowany z korzeni transformowanych wodno-metanolowy ekstrakt *L. sibiricus* wykazał wysoką zawartość kwasów fenolowych jak również zdolność indukcji apoptozy w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i G2/M, fragmentację DNA oraz zmianę Bax/Bcl-2-p53.

5. Po raz pierwszy oznaczono profil chemiczny olejków eterycznych w korzeniach transformowanych *L. sibiricus* metodą GC-MS oraz sprawdzono jego właściwości biologiczne. Wykazano, że olejki posiadają właściwości cytotoksyczne na komórki glejaka w IV stadium, antybakteryjne i przeciwzapalne.
6. Po raz pierwszy wyprowadzono kulturę korzeni transformowanych *L. sibiricus* z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 w celu zwiększenia produkcji kwasów fenolowych. Ponadto wykazano, że korzenie te wykazują wzrost poziomu ekspresji genów w szlaku fenylopropanoidowym (*PAL*, *C4H* oraz *4CL*) w porównaniu do korzeni bez konstruktów.
7. Uzyskany z korzeni transgeniczných wodno-metanolowy ekstrakt z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 wykazywał właściwości antybakteryjne oraz przeciwgrzybicze a także efekt cytotoksyczny na komórki glejaka w IV stadium. Efekt ten był obserwowany w stężeniu niższym niż w przypadku ekstraktu z korzeni transformowanych bez konstruktów.
8. Przygotowany z korzeni transgeniczných wodno-metanolowy ekstrakt z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 wykazał zdolność indukcji apoptozy poprzez wzrost uszkodzeń DNA, a także zmianę poziomu PARP1 oraz H2A.X oraz obniżenie genów *DNMT1* i *UHRF1* w komórkach glejaka ludzkiego w IV stadium (uzyskanego od pacjenta) oraz w linii komercyjnej glejaka U87MG.
9. Po raz pierwszy określono zawartość kwasów fenolowych metodą HPLC w różnych objętościach kolb (300 mL, 1L, 3L, 5L) oraz 5 L rozpyłowym bioreaktorze korzeni transgeniczných z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 *L. sibiricus*. Wykazano wyższą zawartość kwasów fenolowych (kwas chlorogenowy i kwas kawowy) w 5L bioreaktorze w porównaniu do korzeni hodowanych w kolbach.
10. Wykazano, że wodno-metanolowy ekstrakt z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 z najwyższą zawartością kwasów fenolowych hodowany w 5L rozpyłowym bioreaktorze hamował wzrost komórek czerniaka oraz wykazywał wzrost potencjału antyoksydacyjnego na osoczu ludzkim.
11. Wykazano, że wodno-metanolowy ekstrakt z korzeni transgeniczných z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 z 5 L bioreaktora wykazuje efekt cytotoksyczny na linii komórkowej białaczkowej CCRF-CEM oraz K562. Nie wykazano tego efektu na linii A549. Ponadto wykazano, że ekstrakt indukuje apoptozę poprzez zmianę potencjału mitochondrialnego a także wzrost uszkodzeń mitochondrialnego mtDNA

oraz jądrowego nDNA w testowanych regionach genów *ND1*, *ND5* *TP53* oraz *HPRT1*.

Najważniejsze osiągnięcia i perspektywy dalszych badań:

Badania biotechnologiczne doprowadziły do otrzymania różnych kultur *in vitro* *Leonurus sibiricus* tj. roślin zregenerowanych z pędów, korzeni transformowanych oraz korzeni transgenicznych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1. Przeprowadzone badania wykazały, że wodno-metanolowe ekstrakty wykazują różne właściwości biologiczne przy czym najlepszy efekt obserwowany był dla korzeni transgenicznych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 co może być związane z wyższą zawartością kwasów fenolowych. Ponadto wykazałem, że wodno-metanolowe ekstrakty odznaczały się zdolnością do naprawy i ochrony DNA, aktywnością przeciwdrobnoustrojową, a także indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych (K562, CCRF-CEM, U87MG, glejak IV stadium, czerniaka) poprzez różne szlaki apoptotyczne. Ze względu na duży przyrost biomasy i wyższą zawartość metabolitów wtórnych w korzeniach transgenicznych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 hodowanych w rozpyłowym bioreaktorze, kolejnym etapem będzie dalsza manipulacja w szlaku metabolicznym poprzez wprowadzanie nowych konstruktów do rośliny. Następnym krokiem będzie próba izolacji czystych związków występujących w najwyższych ilościach i dalsze badania biologiczne w celu sprawdzenia nowych właściwości leczniczych.

1. a) Wysokińska H.: „Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych”. *Biotechnologia* 2000, 4, 32-9.
2. Abu S, Ashraful A, Shariful I, Taif A, Emdad U, Abu Z.S, Aslam A, Mahdi H-O. *Leonurus sibiricus* L. (honeyweed): A review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2016, 6(12): 1076–1080
3. Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MB, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*. 2016, 15:99 DOI 10.1186/s12937-016-0217-2

4. b) Wysokińska 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
5. Bensaddek L, Villarreal M.L, Fliniaux M.A. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electron. J. Integr. Biosci.* 2008; 3: 2-9
6. Bernabeu E, Gonzalez L, Cagel M, Gergic E.P, Moretton M.A, Chiappetta D.A. Novel Soluplus®-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2016, 140: 403–411
7. Brückner K, Tissier A. High-level diterpene production by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*. 2013, 9:46 doi.org/10.1186/1746-4811-9-46
8. Canter PH, Thomas H, Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2005, 23:180–5
9. Chen M, Meng H, Zhao Y, Chen F, Yu S. Antioxidant and in vitro anticancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses. *BMC Complement Altern Med.* 2015, 15:313.
10. D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masell R, Giovannini C. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9: 213-228
11. Douer D. Efficacy and safety of vincristine sulfate liposome injection in the treatment of adult acute lymphocytic leukaemia. *Oncologist*, 2016, 21: 840–847.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35:495–516.
13. Georgiev M.I, Agostini E, Ludwig-Müller J, Xu J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.* 2012, 30: 528-537
14. Goel M.K, Mehrotra S, Kukreja A.K. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 165: 1342-1355
15. Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol* . 2006, 9:341-346
16. Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Lin WL, Wang CJ. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB,

- downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NFkappaB activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013, 266:76–85.
17. Hussain S, Fareed S, Ansari S, Rahman A, Ahmad I.Z, Saeed M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012, 4(1): 10–20. doi: 10.4103/0975-7406.92725
 18. Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2013, 19:7726–34.
 19. Jeszka M, Flaczyk E, Kobus-Cisowska J, Dziedzic K. Związki fenolowe-charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przyroda Technologie, Dział: Nauki o Żywności i Żywieniu.* 2010, Tom 4, Zeszyt 2.
 20. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 2009, Vol. 3(13), pp. 1222-1239
 21. Kassi E, Chinou I, Spilioti E, Tsiapara A, Graikou K, Karabournioti S, Manoussakis M, Moutsatsou P. A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-kappaB activity and IL-6 secretion. *Phytomedicine.* 2014, 21:1483–9.
 22. Kim J-A, Kim Y-S, Choi Y-E. Triterpenoid production and phenotypic changes in hairy roots of *Codonopsis lanceolata* and the plants regenerated from them. *Plant Biotechnology Reports.* 2011, doi.10.1007/s11816-011-0180-5
 23. Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *J Agric Food Chem.* 2007, 55:185–90.
 24. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 2000, 153:51–6.
 25. Lewko W.M, Oldham R.K. Cytokines. W: *Principles of Cancer Biotherapy*, red.: R.K. Oldham, R.O. Dillman. Springer Netherlands. 2009, 155-276
 26. Li X, Gao MJ, Pan HY, Cui DJ, Gruber MY. Purple canola: *Arabidopsis* PAP1 increases antioxidants and phenolics in *Brassica napus* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (3):1639–1645 DOI: 10.1021/jf903527y
 27. Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kappaB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *Br J Pharmacol.* 2011, 162:237–54.

28. Łucka M, Kowalczyk T, Szemraj J, Sakowicz T. Rośliny jako alternatywne źródło białek terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2015; 69: 362-373
29. Matvieieva N.A, Kudryavets Y.I, Likhova A.A, Shakhovskij A.M, Bezdenzhnykh N.A, Kvasko E.Y. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon $\alpha 2b$ gene. *Cytol. Genet.* 2012, 46: 285-290
30. Meiya Li, Fusheng Jiang, Xiangli Yu, Zhiqi Miao. Engineering Isoprenoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the Production of Taxadiene: A Key Intermediate of Taxol. *BioMed Research International* 2015, Article ID 504932, doi.org/10.1155/2015/504932
31. Mróz P, Wilczek K, Żak M, Zielińska-Pisklak M. Chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji fenolokwasów. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.* 2012, No. 6:40-48.
32. 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.
33. Qiu J, Sun S, Luo S, Zhang J, Xiao X, Zhang L, Wang F, Liu S. Arabidopsis AtPAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic *Taraxacum brevicorniculatum*. *Plant Cell Reports.* 2014, 33(4) DOI: 10.1007/s00299-014-1585-8.
34. Ramachandra R, Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* 2002, 20: 101-153.
35. Rodney C, Toni M, Kutchan N, Lewis G. Natural Products. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and molecular biology of plants.* 2000, pp. 1253–348.
36. Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem Eng J.* 2000, 4: 89-99
37. Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. *Cancer Lett.* 2014, 343:134–46.
38. Sevón N., Oksman-Caldentey K.: „*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids”. *Planta Med* 2002, 68, 859 – 68.
39. Shi M, Luo X, Ju G, Li L, Huang S, Zhang T, Wang H, Kai G-Enhanced Diterpene Tanshinone Accumulation and Bioactivity of Transgenic *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots by Pathway Engineering. *J Agric Food Chem.* 2016, 30;64(12):2523-30. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04697.

40. Skała E, Kicel A, Olszewska MA, Kiss AK, Wysokińska H. Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Biomed Res Int*. 2015;2015:181098. doi: 10.1155/2015/181098
41. Srivastava S, Srivastava AK. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Crit Rev Biotechnol*. 2007, 27:29-43
42. Sun J, Xiao J, Wang X, Yuan X, Zhao B. Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. *Biotechnol. Lett*. 2012, 34: 563-569
43. Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Gawron A, Kawiak A, Łojkowska E, Jeziorek M, Chinou I. Enhanced production of antitumour naphthoquinones in transgenic hairy root lines of *Lithospermum canescens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2012; 108: 213-219
44. Tanaka N, Matsumoto T. Regenerants from *Ajuga* hairy roots with high productivity of 20-hydroxyecdysone. *Plant Cell Rep*. 1993 Dec;13(2):87-90. doi:
45. Vaccaro M, Malafronte N, Alfieri M, De Tommasi N, and Leone A. Enhanced biosynthesis of bioactive abietane diterpenes by overexpressing AtDXS or AtDXR genes in *Salvia sclarea* hairy roots. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2014, 119: 65–77. doi: 10.1007/s11240-014-0514-4
46. Vasilev N, Schmitz C, Dong L, Ritala A, Imseng N, Häkkinen S. Comparison of plant-based expression platforms for the heterologous production of geraniol. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 117, 373–380. doi: 10.1007/s11240-014-0446-z
47. Velde M.E, Kaspers G.L, Abbink F.C.H, Wilhelm A.J, Ket J.C.F, Berg M.H. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2017, 114:114–130
48. Wang D.J, Brandsma M, Yin Z, Wang A, Jevnikar A.M, Ma S. A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnol. J*. 2008; 6: 504-515
49. Wang LC, Chu KH, Liang YC, Lin YL, Chiang BL. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nuclear factor-kappaB and protein kinase B signalling pathways and induces caspase-3 expression in primary human CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2010, 160:223–32.

50. Wasilewska A., Królicka A.: „Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych”. *Biotechnologia* 2005, 4, 173-188.
51. Weaver, B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 2014, 25, 2677–2681. Wydawnictw i Poligrafii Akademii Medycznej, Łódź.
52. Xiang L, Zeng L.X, Yuan Y, Chen M, Wang F, Liu X.Q. Enhancement of artemisinin biosynthesis by overexpressing *dxr*, *cyp71av1* and *cpr* in the plants of *Artemisia annua* L. *Plant Omics* 5 2012, 503–507.
53. Yang CQ, Fang X, Wu XM, Mao YB, Wang LJ, Chen XY. Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *J Integr Plant Biol.* 2012, 54(10):703-12. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x.
54. Yang N, Zhou W, Su J, Wang X, Li L, Wang L, Cao X, Wang Z. Overexpression of SmMYC2 Increases the Production of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza* *Front Plant Sci.* 2017, 8: 1804.
55. Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu CK. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *J Agric Food Chem.* 2009, 57:6468–73.
56. Zhang Y, Yan YP, Wu YC, Hua WP, Chen C, Ge Q, Wang ZZ. Pathway engineering for phenolic acid accumulations in *Salvia miltiorrhiza* by combinational genetic manipulation. *Metabolic Engineering.* 2014, 21:71-80
57. Zhao J, Zhu WH, Hu Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. *Enzyme Microb Technol.* 2001, 28: 666-672
58. Zuluaga DL, Gonzali S, Loreti E, Pucciariello C, Degl’Innocenti E, Guidi L, Alpi A, Perata P. *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. *Functional Plant Biology.* 2008, 35: 606-618

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5a. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Na początku moja ścieżka naukowa związana była z genetyką medyczną a konkretnie z badaniem polimorfizmów genów zaangażowanych w rozwój różnych chorób. Tematem pracy magisterskiej był „Polimorfizm genów biorących udział w metabolizmie estrogenów w raku i rozrostach endometrium”. Celem pracy było określenie częstości rozkładów alleli i genotypów oraz ilorazu szans polimorfizmu wybranych genów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków (*CYP1B1*, *ESR1*) oraz ich dwugenowych kombinacji w grupie osób chorych na raka endometrium w stosunku do osób, u których nie zdiagnozowano tego nowotworu. Analiza korelacji pomiędzy polimorfizmem genów *CYP1B1* i *ESR1* a występowaniem raka endometrium dokonano w oparciu o metodę RFLP-PCR. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów udało mi się ustalić, że genotyp G/G polimorfizmu Arg48Gly genu *CYP1B1*, może mieć związek z występowaniem raka endometrium. Polimorfizm Leu432Val genu *CYP1B1* nie ma związku z występowaniem raka endometrium. Analiza haplotypów polimorfizmu Arg48Gly oraz Leu432Val genu *CYP1B1* wykazała związek z występowaniem tego nowotworu. Genotyp G/C polimorfizmu G975C genu *ESR1* może mieć związek z wystąpieniem tego nowotworu. Dodatkowo, dwugenowe kombinacje Arg48Gly oraz G975C wykazały zwiększone ryzyko wystąpienia raka endometrium podobnie jak kombinacja Leu432Val i G975C. Z wyników uzyskanych w pracy magisterskiej powstał artykuł w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym pod tytułem „Polymorphism of the *ER alpha* and *CYP1B1* genes in endometrial cancer in a Polish subpopulation”. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2010.

Kolejnym etapem badań na mojej drodze naukowej była próba wyjaśnienia związku pomiędzy polimorfizmami w genach *COX-2*, *LF*, *OSF-2* oraz *MET* a rozwojem polipów nosa. Dokonano analizy dwugenowych układów w grupie osób chorych na przewlekłe zapalenie zatok z polipami nosa w stosunku do osób, u których nie zdiagnozowano tego schorzenia. Oceniano również wpływ badanych polimorfizmów genów *MET*, *LF*, *COX-2*, *OSF-2* oraz ryzyko występowania polipów nosa z uwzględnieniem obecności astmy i alergii w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych. Ostatnim etapem była analiza poziomu całkowitej ekspresji *MET*, *LF*, *COX-2*, *OSF-2* w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych, u których wykryto polipy nosa oraz w grupie kontrolnej. Analizę korelacji pomiędzy polimorfizmami genów *MET*, *LF*, *COX-2*, *OSF-2*, a występowaniem przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa dokonano w oparciu o metodę RFLP-PCR. Poziom całkowitej ekspresji dokonano u oparciu o metodę RT-PCR. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazałem, że genotypy -765G/C *COX-2*, 140A/G *LF*, -33C/G *OSF-2* oraz -14C/G *MET* mogą być związane

z podwyższonym ryzykiem występowania przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa. Ponadto wykazano, że genotypy -765G/C *COX-2*, 140A/G *LF*, -33C/G *OSF-2* oraz -14C/G *MET* mogą być związane z podwyższonym ryzykiem występowania przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa z astmą, oraz genotypy -765G/C *COX-2*, 140A/G *LF*, -33C/G *OSF-2* oraz -14C/G *MET* mogą być związane z podwyższonym ryzykiem występowania przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa z alergią. Kombinacje dwugenowych układów badanych genów *COX-2*, *LF*, *OSF-2*, *MET* mogą być związane z podwyższonym ryzykiem występowania przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa. Znacznie podwyższona ekspresja badanych genów, a także korelacja z wariantami polimorficznymi sugeruje, że mogą mieć istotny związek z patogenezą polipów nosa. Tematyka związana z polimorfizmami genów zaangażowanych w rozwój polipów nosa w przebiegu przewlekłego zapalenia zatok przynosowych była przedmiotem mojej dysertacji doktorskiej. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w czasopismach: *Otolaryngologia Polska* (2012), *DNA and Cell Biology* (2012), *Molecular Biology Reports* (2012).

5b. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych tematyka moich badań skoncentrowała się na biotechnologii roślin i genetyce oraz ich wykorzystaniem w badaniach biologicznych. Pracując na korzeniach transformowanych i nietransformowanych *L. sibiricus* wykazałem, że ekstrakt z tychże korzeni indukował apoptozę w komórkach glejaka ludzkiego w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu poprzez obniżenie potencjału mitochondrialnego, wzrost reaktywnych form tlenu (ROS), zmianę ekspresji genów *Bax*, *Bcl-2*, *TP53*, *Cas-3*, *Cas-8* i *Cas-9* zaangażowanych w zewnętrzny i wewnętrzny szlak apoptotyczny. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Pathology and Oncology Research* (2017).

W toku badań dokonałem również oceny zmienności genetycznej za pomocą metody ISSR i RAPD w różnych kulturach *in vitro* należących do trzech gatunków tj. *Rhaponticum carthamoides*, *Harpagophytum procumbens* oraz *Rehmannia glutinosa*. Z uzyskanych wyników powstały 3 publikacje, 2 w czasopiśmie; *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (2014, 2015) oraz jedna w *Acta Physiologiae Plantarum* (2014).

Brałem również udział w cyklu badań dotyczących oceny właściwości biologicznych ekstraktów pochodzących z korzeni transformowanych i nietransformowanych *Rhaponticum carthamoides*. Uzyskane w toku badań wyniki wykazały, że testowane ekstrakty mogą wpływać ochronnie na prawidłowe komórki w których indukowano stres oksydacyjny

nadtlenkiem wodoru między innymi poprzez zmiany poziomu ekspresji genów antyoksydacyjnych. Powyższe wyniki zawarto w publikacji *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016). Kolejnym etapem prac była ocena właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów korzeni transformowanych i nietransformowanych *Rhaponticum carthamoides*. Wykazano tu pozytywny wpływ związków biologicznie czynnych zawartych w ekstraktach takich jak pochodne kwasu trikawoilochinowego na indukcję apoptozy w różnych liniach komórek nowotworowych poprzez zmianę reaktywnych form tlenu (ROS), obniżenie potencjału mitochondrialnego, zmiany w fazach cyklu komórkowego, wzrost liczby uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA, zmianę liczby kopii mitochondrialnych, zmianę poziomu ekspresji genów pro i anty apoptotycznych, a także pozytywny antyoksydacyjny wpływ tychże ekstraktów na ludzkie osocze. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopismach takich jak : *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2016), *Molecular and Cellular Biochemistry* (2017), *Cytotechnology* (2018), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2018) oraz *Industrial Crops and Products* (2018).

W toku innej realizowanej pracy z moim udziałem była ocena toksycznego wpływu flawolignanów występujących między innym w *Sylibum marianum* na płytki krwi oraz komórki nowotworowe. Ustalono, że trzy główne flawonolignany takie jak ; sylibinina, silychrytyna i silydianina nie wykazywały działania cyto i genotoksycznego na badane komórki. Wykazano z kolei , że związki te mają działanie ochronne na mitochondria oraz zmniejszają spontaniczne uszkodzenia DNA. Z wyników uzyskanych w toku badań powstała publikacja w czasopiśmie naukowym (*Nutrients* 2017).

Kolejnym zagadnieniem w realizowanych z moim udziałem pracy było określenie właściwości biologicznych olejków eterycznych z korzeni transformowanych i nietransformowanych *Rhaponticum carthamoides*. Przeprowadzone badania wykazały, że związki w nich zawarte posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Z uzyskanych wyników powstała publikacja w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016).

Byłem również zaangażowany w projekt dotyczący badań nad przewlekłą obturacyjną chorobą płuc oraz analizą wpływu palenia tytoniu na zmiany zachodzące w układzie oddechowym oraz krwionośnym. Badania wykazały, że stosunek monocytów do dużych płytek krwi może być wczesnym narzędziem do wykrycia zatorowości płucnej u pacjentów z ostrym zaostrzeniem przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Ponadto wykazano, że parametry morfometryczne mitochondriów w limfocytach pochodzących od pacjentów we wczesnym okresie ECOPD (zaostrzenia przewlekłej obturacyjnej chorób płuc) wymagających

hospitalizacji zmieniają się w porównaniu do pacjentów w stabilnym okresie tejże choroby. Dodatkowo badania pokazały, że krótki okres palenia tytoniu wpływa na ekspresję genów i równowagę oksydacyjną komórek krwi, co może prowadzić do rozwoju poważnych zaburzeń, takich jak POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc). Wyniki niniejszych prac opublikowano w czasopismach: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016), *Polish Archives of Internal Medicine* (2017), *International Journal of CORD* (2018), *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2018).

Dodatkowo współpracowałem również przy projekcie mającym na celu sprawdzenie związku między ekspresją genów *POSTN*, *IL-4* oraz *IL-13* a rozwojem polipów nosa. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że wzrost poziomu ekspresji tych genów może być związany z rozwojem przewlekłego zapalenia błony śluzowej nosa i zatok przynosowych zatok. Z wyników powstała publikacja w czasopiśmie *DNA and Cell Biology* (2015).

Kolejne badania prowadzone przy moim udziale obejmowały porównanie profili ekspresji i metylacji 6 genów (*hOGG1*, *APE1*, *MUTYH*, *NEIL1*, *PARP1* oraz *XRCC1*) kodujące białka biorące udział w naprawie DNA. Do tej pory wiadomo, że nagromadzenia uszkodzeń DNA mogą prowadzić np. do rozwoju choroby Alzheimera. Wyniki pokazały istotne statystycznie zmiany w profilach ekspresji genów u osób zdrowych oraz z rozwiniętą chorobą Alzheimera. Jedynie w przypadku genu *XRCC1* nie wykazano różnic istotnych statycznie. Nie znaleziono również zmian w modelu metylacji żadnego z badanych genów. Uzyskane wyniki opublikowano w *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* (2017).

5c. Projekty badawcze

- Praca własna młodego naukowca (Nr 502-03/3-012-01/502-34-054 5, Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Tytuł projektu: „Otrzymywanie kultur *in vitro* z roślin wytwarzających diterpeny o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Badania fitochemiczne i biologiczne (2015-2017).

Udział: **kierownik projektu;**

- Praca własna młodego naukowca (Nr 502-03/3-012-01/502-34-032, Uniwersytet

Medyczny w Łodzi). Tytuł projektu: „Podwyższenie produkcji kwasów fenolowych poprzez nadekspresję czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 w korzeniach transformowanych *Leonurus sibiricus* L i właściwości biologiczne ekstraktów z korzeni transgenicznych” (2017-2019).

Udział: **kierownik projektu;**

5d. Szkolenia.

Uczestnik „Healthy Ageing Research Centre” 2014

Kurs Metodyka Nauczania w Dyscyplinach Biomedycznych 2016/2017

Kurs doszkalający dla kadry nauczycielskiej „Ready to Teach” 2018

5e. Staże zagraniczne

5f. Członkostwo towarzystw naukowych:

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

Polskie Towarzystwo Genetyczne

5g. Recenzje w latach (2014-2018)

Medical Science Monitor-1

Molecules – 5

Saudi Journal of Biological Sciences– 1

World Journal of Surgical Oncology -1

Journal of Etnopharmacology– 1

Pneumologia i Alergologia Polska - 1

International Journal of Molecular Sciences– 1

Tumor Biology– 1

3Biotech -1

International Journal of Nanomedicine-1

African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines-1

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research-1

Industrial Crops and Products-1

5h. Otrzymane nagrody

- a) Nagroda dydaktyczna dla najlepszego nauczyciela akademickiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w roku akademickim 2015\2016.
- b) Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji „Zmienność genetyczna oraz molekularne uwarunkowania chorób u ludzi “ 2012\2013
- c) Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji „Cykl prac poświęcony zagadnieniom patogenezы przewlekłych zapaleń nosa, zatok przynosowych i krtani” 2012/2013
- d) Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji „ Badania molekularne u chorych z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych oraz nowotworami głowy i szyi” 2014/2015
- e) Nagroda Naukowa Zespołowa III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji „Regeneracja roślin *Harpagophytum probumbens* w kulturze *in vitro*” 2014/2015
- f) Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji „The role of mitochondria and Oxidative/Antioxidative Imbalance in Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disaeases” 2016/2017
- g) Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji "Właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe korzeni transformowanych *Rhaponticum carthamoides*" 2016\2017
- h) Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji za cykl publikacji „*Leonurus sibiricus* - właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe korzeni transformowanych" 2016/2017
- i) Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego 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.
- j) Nagroda Naukowa Zespołowa I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji pt.: „Za cykl publikacji pt.: "Rola białka 53 w rozwoju powikłań cukrzycowych oraz naprawy DNA przez wycinanie zasad (BER) w patogenezie choroby Alzheimera" 2017
- k) Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego za cykl publikacji pt.: „*Leonurus sibiricus* - właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe olejków z korzeni transformowanych" 2017.

5i. Działalność dydaktyczna

1. Prowadzenie ćwiczeń i przygotowanie wykładów z przedmiotu „Biologia z genetyką” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Analityka Medyczna.
2. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Biologia z genetyką” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja.
3. Prowadzenie seminariów z przedmiotu „Biologia z genetyką ” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Kosmetologia
4. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Botanika Farmaceutyczna” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja.
5. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Diagnostyka parazytologiczna” dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Analityka Medyczna.
6. Przygotowanie i prowadzenie zajęć z systematyki roślin w terenie dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja.
7. Promotor dwóch prac magisterskich i jednej pracy licencjackiej na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Kosmetologia Uniwersytetu Medycznego w Łodzi .
8. Promotor jednej pracy magisterskiej na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Farmacja Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
9. Opiekun naukowy jednej pracy magisterskiej na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Farmacja Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

- a) oryginalne pełnotekstowe prace naukowe: 27 publikacji (IF; 81,962 i MNiSW= 732) i 1 publikacja poglądowa (IF=4.59 and MNiSW =30), h-index 9 (wg ISI Web of Science oraz Scopus).
- b) konferencje: krajowe - 9 i międzynarodowe 21
- c) recenzje publikacji: 16 w czasopiśmie z IF oraz jedna w czasopiśmie bez IF

d) udział w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych z funduszu dla młodych naukowców.

e) Łączna liczba punktów MNiSW, jaką uzyskały prace z moim udziałem wynosi 763, łączny IF = 86.555, liczba cytowań = 115 (wg ISI Web od science) i 155 (wg Scopus), **indeks Hirscha $h = 9$**

