

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy oraz osiągnięcie naukowe, zgłaszane jako przedmiot postępowania habilitacyjnego, a także pozostałe osiągnięcia naukowe

Dr Marta J. Fiołka

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

LUBLIN 2016

Dr Marta J. Fiolka
Zakład Immunobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
marta.fiolka@poczta.umcs.lublin.pl
tel.: (81) 537-50-50

AUTOREFERAT

I. Imię i nazwisko:

Marta J. Fiolka

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

1993 r. Tytuł magistra biologii, specjalność biologia ogólna

Praca magisterska pt. „Wpływ hydrokortyzonu na reakcje obronne gąsienic *Galleria mellonella*” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS

Promotor: prof. dr hab. Jan Jarosz

2006 r. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność immunologia bezkręgowców

Praca doktorska pt. „Lizozymy wybranych gatunków bezkręgowców jako czynniki naturalnej odporności przeciwzakaznej” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS

Promotor: prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1993-1998 specjalista w Katedrze Higieny Zwierząt i Środowiska Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie)

Od 01.11.1998 - 30.09.2006 asystent w Zakładzie Patologii Owadów, przemianowanym na Zakład Immunologii Bezkręgowców w 2001 roku

Od 1.10.2006 - do chwili obecnej adiunkt w Zakładzie Immunobiologii (zmieniony profil i nazwa zakładu w 2012 r.) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed doktoratem

Studia rozpoczęłam w 1988 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydziale Biologii i Biotechnologii) UMCS. W 1993 roku obroniłam pracę magisterską realizowaną w Zakładzie Patologii Owadów pt. „Wpływ hydrokortyzonu na reakcje obronne *Galleria mellonella*” pod kierunkiem prof. dr. hab. Jana Jarosza. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w pracy:

1. **Fiołka M. 1998.** Działanie hydrokortyzonu na reakcje obronne typu humoralnego u *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae). Wiadomości Entomol., 17, (2), 109-119.

W 1993 roku rozpoczęłam pracę w Katedrze Higieny Zwierząt i Środowiska Akademii Rolniczej w Lublinie na stanowisku inżynierijno-technicznym. Głównym zadaniem realizowanym na moim stanowisku były badania mikrobiologiczne prób mleka krowiego z różnych miejsc regionu oraz analizy bakteriologiczne prób wody. Jednocześnie współpracowałam z pracownikami Katedry Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego i Katedry Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego, badając wpływ suplementacji diety na parametry immunologiczne zwierząt laboratoryjnych oraz analizując wskaźniki odporności wrodzonej u różnych gatunków ptaków hodowlanych. W okresie pracy w Akademii Rolniczej (1993-1998) uczestniczyłam w wielu konferencjach prezentując wyniki własnych doświadczeń oraz publikując zebrane wyniki badań interdyscyplinarnych.

Pracując w AR rozpoczęłam w 1997 roku studia doktoranckie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi w Zakładzie Patologii Owadów, a w 1998 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta w tej jednostce. W 2000 roku Zakład Patologii Owadów został przemianowany na Zakład Immunologii Bezkręgowców. W 2006 roku obroniłam pracę doktorską pt. „Lizozymy wybranych gatunków bezkręgowców jako czynniki naturalnej odporności przeciwwzakaźnej”. Promotorem pracy była prof. dr hab. Teresa Jakubowicz. Mój dorobek naukowy przed doktoratem liczy 10 oryginalnych prac badawczych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu krajowym i międzynarodowym, 16 prac eksperymentalnych opublikowanych w monografiach i materiałach konferencyjnych oraz 24 komunikaty.

Pod kierunkiem prof. dr. hab. Jana Jarosza rozpoczęłam badania nad wpływem wybranych antybiotyków na układ odpornościowy owadów *Galleria mellonella*. Po zmianie profilu Zakładu kontynuowałam doświadczenia poszerzając je o eksperymenty wykonywane

na różnych gatunkach bezkręgowców. W trakcie realizacji pracy doktorskiej prowadziłam badania nad aktywnością i ekspresją lizozymu u owadów - gąsienic i poczwerek *G. mellonella* oraz analizowałam białka typu lizozymu u innych organizmów bezkręgowych. W badaniach wykryłam kilka nowych immunoreaktywnych białek o masach 16,3 kDa, 16,8 kDa i 27 kDa rozpoznawanych przez przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi *G. mellonella* i lizozymowi białka jaja kurzego. Wykazałam, że podanie aktynomycyny D czy aktydionu lub cyklosporyny A, zaimmunizowanym gąsienicom powodowało obniżenie aktywności lizozymu, któremu towarzyszył spadek poziomu białka o masie cząsteczkowej 15 kDa, zahamowanie ekspresji białek 16,3 kDa, 16,8 kDa i 27 kDa oraz zahamowanie syntezy peptydów odpornościowych. Ponadto w badaniach izolowałam bakterie jelitowe z poczwerek szrotówka kasztanowcowiaczka *Cameraria ohridella* – groźnego szkodnika drzew. W przewodzie pokarmowym poczwerek *C. ohridella* zidentyfikowałam bakterie *Aerococcus viridans* oraz *Aeromonas salmonicida* wytwarzające substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej typu lizozymu. Po teście immunodetekcji próbek płynu pochodzącego tych bakterii stwierdziłam obecność dwóch białek o masach 15 kDa i 28 kDa rozpoznawanych przez przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi białka jaja kurzego, a w ekstrakcie z poczwerek *C. ohridella* analizowanym techniką bioautografii również zlokalizowałam dwie formy lizozymu. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

➤ **Fiołka M.**, Ptaszyńska A., Czarniawski W. **2005**. Antibacterial and antifungal lysozyme-type activity in *Cameraria ohridella* pupae. *J. Invertebr. Pathol.*, 90, 1-9.

U ślimaków wykazałam również istnienie kilku białek typu lizozymu. W jajach *Helix aspersa maxima*, przeciwciała rozpoznały trzy immunoreaktywne białka o masie cząsteczkowej wynoszącej między 13-17 kDa, zaś w wątrobotrzustce zidentyfikowałam trzy białka o masie w przedziale 34-42 kDa. W jajach największego ślimaka lądowego *Achatina achatina* wykryłam trzy białka o masie cząsteczkowej w przedziale 40-60 kDa, zaś po analizie śluzu jamy płaszczowej zidentyfikowałam dwa immunoreaktywne białka o masie 15,4 i 43 kDa. Analizując tkanki dżdżownicy *Dendrobaena veneta* również stwierdziłam obecność kilku białek korespondujących z lizozymem standardowym. Badania na ślimakach zostały opublikowane w 2004 roku (Fiołka i Witkowski, 2004), natomiast badania na dżdżownicach były kontynuowane i ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora (Fiołka i inni, 2012):

➤ **Fiołka M., Witkowski A. 2004.** Lysozyme-like activity in eggs and in some tissues of land snails *Helix aspersa maxima* and *Achatina achatina*. *Folia Biol. (Kraków)*, 52, 233-237.

➤ **Fiołka M.J., Zagaja M.P., Hulas-Stasiak M., Wielbo J. 2012.** Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). *J. Invertebr. Pathol.*, 109, 83-90.

Po obronie pracy doktorskiej, w oparciu o zebrane doświadczenia, opublikowałam dwie prace w czasopismach z listy filadelfijskiej na temat immunosupresyjnego działania cyklosporyny A na humoralne odczyny obronne u gąsienic i poczwerek *Galleria melonella*:

➤ **Fiołka M.J. 2008.** Immunosuppressive effect of cyclosporin A on insect humoral immune response. *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 287-292.

➤ **Fiołka M.J. 2012.** Immunotoxic action of cyclosporin A on the humoral immune response of *Galleria mellonella* pupae. *ISJ (Invertebrate Survival Journal)*, 9, 82-88.

Przy realizacji pracy doktorskiej, po raz pierwszy zaobserwowałam, że metabolity dwóch wyizolowanych przeze mnie gatunków bakterii z jelita i ekstraktu z poczwerek *Cameraria ohridella* (szrotówka kasztanowcowiaczka), wykazują aktywność przeciwgrzybową przeciw *Candida albicans* i przeciwprątkową skierowaną przeciw *Mycobacterium smegmatis*. Po uzyskaniu stopnia doktora swoje badania kontynuowałam, ale już na innym modelu badawczym – dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, której hodowlę mogłam poprowadzić w laboratorium, gdyż szrotówek był dostępny na drzewach jedynie sezonowo.

Przebieg pracy naukowo-badawczej po doktoracie

Z jelita środkowego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wyizolowałam dwa szczepy bakterii *Raoultella ornithinolytica* i *Bacillus pumilus*, które wytwarzają zewnątrzkomórkowe metabolity o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych. Poszukując symbiontów w jelicie dżdżownic wzorowałam się na badaniach prowadzonych na owadach *Galleria mellonella* przez prof. dr. hab. Jana Jarosza (Jarosz, 1975, 1983). Prezentowane przeze mnie wyniki dotyczą charakterystyki metabolitów jednego wybranego gatunku bakterii *Raoultella ornithinolytica*. Drugi wyizolowany szczep *B. pumilus* będzie dokładnie charakteryzowany w kolejnym etapie badań. Dotychczas zanalizowano działanie jego

metabolitów zewnątrzkomórkowych na *Mycobacterium smegmatis*. Sposób izolacji obu szczepów uzyskał ochronę patentową, a liofilizaty szczepów są zdeponowane w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie w celach patentowych. Ponadto w prowadzonych badaniach charakteryzowany był płyn celomatyczny dżdżownicy *D. veneta* pod kątem działania przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybowego i przeciwnowotworowego. Selektywne działanie płynu na komórki raka płuc A549 w hodowli *in vitro* zostało zgłoszone do ochrony patentowej.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, obejmuje 13 publikacji z listy JCR o łącznym IF 29,556 oraz 6 prac znajdujących się poza bazami międzynarodowymi (w tym 5 rozdziałów w monografiach) oraz 50 komunikatów konferencyjnych. Z tych prac do osiągnięcia naukowego wybrałam 6 publikacji z listy JCR (posiadających IF 2,042-2,669). Ponadto w skład osiągnięcia zaliczam trzy uzyskane patenty krajowe i dwa opracowane wynalazki zgłoszone do ochrony patentowej. Wynalazki otrzymały pozytywne raporty Urzędu Patentowego RP. Za aktywność na tym polu zostałam nagrodzona Odznaką Honorową za Zasługi dla Wynalazczości przyznaną przez Prezesa Rady Ministrów w 2015 roku.

Wyniki zawarte w osiągnięciu badawczym zostały zaprezentowane na wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych. W kilku przypadkach zostały one nagrodzone, jak prezentacja plakatowa pt. „Antifungal and antitumor action of new glyco-protein complex obtained from metabolites of gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from earthworm *Dendrobaena veneta*” na konferencji: „First Central and Eastern European Conference on Sepsis” w Budapeszcie w 2012 roku (1. nagroda). Nagrodzone lub wyróżnione zostały również wystąpienia ustne i plakaty na konferencjach krajowych w Olsztynie, Łodzi, Warszawie i Lublinie. Wyniki prowadzonych doświadczeń z kolejnych etapów prac badawczych zostały zaprezentowane w 40. doniesieniach zjazdowych. Wygłosiłam 9 referatów z tematu osiągnięcia naukowego na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Otrzymywanie i charakterystyka substancji przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych z wyizolowanych bakterii i tkanek dżdżownicy *Dendrobaena veneta*”

B) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

(Przy każdej pozycji podano Impact Factor zgodnie z rokiem opublikowania.)

Prace eksperymentalne w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz praca przeglądowa:

- P1. **Fiołka M.J.**, Zagaja M.P., Hułas-Stasiak M., Wielbo J. **2012**. Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). J. Invertebr. Pathol., 109, 83-90 (**IF 2,669**) *autor korespondencyjny*
- P2. **Fiołka M.J.**, Zagaja M.P., Piersiak T. D., Wróbel M., Pawelec J. **2010**. Gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida: Oligochaeta) possesses antimycobacterial activity. J. Invertebr. Pathol., 105, 63-73 (**IF 2,049**) *autor korespondencyjny*
- P3. **Fiołka M.J.**, Grzywnowicz K., Mendyk E., Zagaja M., Szewczyk R., Rawski M., Keller R., Rzymowska J., Wydrych J. **2015**. Antimycobacterial action of a new glycolipid-peptide complex obtained from extracellular metabolites of *Raoultella ornithinolytica*. APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica) 123, 1069-1080 (**IF 2,042**) *autor korespondencyjny*
- P4. **Fiołka M.J.**, Grzywnowicz K., Chlebiej K., Szczuka E., Mendyk E., Keller R., Rzymowska J. **2012**. Anti-*Candida albicans* action of the glyco-protein complex purified from metabolites of gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from earthworms *Dendrobaena veneta*. J. Appl. Microbiol., 113, 1106-1119 (**IF 2,196**) *autor korespondencyjny*
- P5. **Fiołka M.J.**, Lewtak K., Rzymowska J., Grzywnowicz K., Hułas-Stasiak M., Sofińska-Chmiel W., Skrzypiec K. **2013**. Antifungal and anticancer effects of a polysaccharide-protein complex from the gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from the earthworm *Dendrobaena veneta*. Pathogens and Disease, 69, 49-61 (**IF 2,554**), *autor korespondencyjny*

- P6. **Fiolka M.J.**, Grzywnowicz K., Rzymowska J., Lewtak K., Szewczyk R., Mendyk E., Keller R. **2015**. Antitumour and apoptotic effects of a novel Tris-peptide complex obtained after isolation of *Raoultella ornithinolytica* extracellular metabolites. J. Appl. Microbiol., 118, 1357-1369 (**IF 2,479**) *autor korespondencyjny*

Sumaryczny Impact Factor ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania - 13,989.

Uzyskane patenty i wynalazki zgłoszone do ochrony patentowej wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Patenty krajowe:

- 1. PL 212077**, Nowy szczep bakterii *Raoultella ornithinolytica* wyizolowany z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta* oraz sposób wyizolowania tego szczepu z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.
- 2. PL 218745**, Nowy szczep bakterii *Bacillus pumilus* AF-11 do zastosowania w profilaktyce lub terapii zakażeń wywołanych przez *Mycobacterium* oraz sposób wyselekcjonowania tego szczepu z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.
- 3. Zgłoszenie P.405944**. Decyzja o przyznaniu patentu z dnia 4 grudnia 2015. Kompleks Tris-peptydowy otrzymany ze szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica* do zastosowania w leczeniu nowotworu szyjki macicy ludzkiej.

Wynalazki zgłoszone do ochrony patentowej:

- 2. P.408451**, Kompleks polisacharydowo-peptydowy otrzymany ze szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica* do zastosowania w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez bakterie z rodzaju *Mycobacterium*.
- 3. P.411346**, Płyn celomatyczny dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuc.

Powyższe wynalazki uzyskały pozytywny raport Urzędu Patentowego stanowiący wstępną ocenę przedmiotu zgłoszenia.

Zarówno w przypadku prac eksperymentalnych jak i wynalazków mam wiodący udział w badaniach od koncepcji po opracowanie i opublikowanie wyników. Jestem koordynatorem badań prowadzonych we współpracy z kilkoma ośrodkami naukowymi, gdyż

podjęte nowe zadania wymagają wspólnego działania specjalistów z wielu dyscyplin. Charakterystyka metabolitów nowego szczepu bakterii jest trudnym wyzwaniem i niemożliwym do samodzielnego zrealizowania. Z tego względu utworzono sieć badawczą skupiającą specjalistów z wielu dyscyplin, mających niezbędne doświadczenie naukowe oraz dysponujących specjalistycznym sprzętem.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

W ostatnich kilku latach, pierścienice stały się popularnym modelem w badaniach nad odpornością bezkręgowców. Posiadają one konserwatywne mechanizmy odporności nieswoistej, właściwej zarówno dla bezkręgowców jak i kręgowców (w tym ssaków). Zainteresowanie odpornością pierścienic znacznie wzrosło z chwilą, gdy zaczęto wykorzystywać je jako biologiczne indykatory zmian wywołanych skażeniem środowiska.

Dotychczas opublikowane wyniki badań z udziałem pierścienicy *Dendrobaena veneta* dotyczyły głównie odporności komórkowej, a także wpływu metali ciężkich lub komunalnych osadów ściekowych na ten typ odpowiedzi immunologicznej (Wieczorek-Olchawa i inni, 2003, Rorat i inni, 2013). Najnowsze badania wskazują również na udział układu immunologicznego w proces regeneracji „mózgu” u tej dżdżownicy (Molnar i inni, 2015). Analiza mechanizmów odrzucania przeszczepów przez pierścienice przyczyniła się do znacznego postępu w immunologii transplantacji.

W erze wzrostu oporności na antybiotyki poszukuje się nowych, naturalnych źródeł środków terapeutycznych. Dżdżownice w medycynie Południowej Azji są wykorzystywane od dawna jako składnik farmaceutyków stosowanych w wielu chorobach od opryszczki po nowotwory (Trisina i inni, 2011). Do niedawna badania prowadzone na pierścienicach, koncentrowały się głównie na poznaniu zależności między dżdżownicami a środowiskiem. Od kilku lat jednak intensywnie poszukuje się w tych bezkręgowcach aktywnych substancji, które mogłyby być wykorzystane w walce z chorobami człowieka.

Ekstrakty i związki aktywne z dżdżownic wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciwwirusowe oraz przeciwnowotworowe (Yanqin i inni, 2007, Liu i inni 2012, Vasanthi i inni, 2013, Chauhan i inni, 2014). Dodatkowo ekstrakty z dżdżownic są źródłem aktywności przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej i „hepato-ochronnej”, gdyż wpływają modulująco na działanie enzymów wątrobowych (Balamurugan i inni, 2008).

Wielokierunkowe działanie związków i ekstraktów z dżdżownic zostało opisane na podstawie dostępnej literatury światowej w pracy przeglądowej pt. „Dżdżownice w medycynie – aktywność przeciwnowotworowa i nie tylko”, W: Wybrane zagadnienia biologii i medycyny (Fiołka i Bilaska, 2015).

W przeprowadzonych badaniach analizowałam aktywność typu lizozymu u dżdżownicy *D. veneta* oraz charakteryzowałam aktywność przeciwpłatkową, przeciwgrzybową i przeciwnowotworową metabolitów bakterii wyizolowanej z jelita dżdżownicy. Jelito dżdżownic działa selektywnie w stosunku do bakterii i grzybów dostających się do niego wraz z rozkładającą się masą organiczną. Pewne mikroorganizmy są w jelicie wybiórczo zabijane, a następnie trawione, inne bez przeszkód przechodzą przez cały przewód pokarmowy dżdżownicy, zaś liczebność niektórych bakterii w jelicie istotnie wzrasta (Byzov i inni, 2007). Przeciwygrzybowa i przeciwbakteryjna aktywność związków w jelicie dżdżownic jest w ostatnich latach przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Wśród mikroorganizmów bytujących w środowisku życia dżdżownic, znajdują się również bakterie z rodzaju *Mycobacterium*.

Gruźlica, pomimo wysokiego poziomu nowoczesnych metod współczesnej medycyny, stanowi wciąż ogromny problem biomedyczny na całym świecie. Szacuje się, że 1/3 populacji ludzkiej przeszła zakażenie prątkami *Mycobacterium*. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wskazują, że *M. tuberculosis* jest przyczyną 2 mln zgonów rocznie. Wg opinii ekspertów w ciągu najbliższych 20 lat około 200 mln ludzi zachoruje, a 35 mln umrze z powodu tej choroby. Najczęściej stosowanym sposobem zapobiegania transmisji gruźlicy jest wczesne wykrywanie i właściwe leczenie polegające na szybkim diagnozowaniu choroby zakaźnej i wskazaniu optymalnego lub optymalnych metod leczenia z zastosowaniem antybiotyków. Z oficjalnych danych, podawanych w różnych krajach wynika, że w ostatnich latach wzrasta częstość pojawiania się prątków opornych na dotychczas stosowane leki przeciwgruźlicze. Coraz częściej notuje się koinfekcję prątkami z wirusem HIV. Dlatego też, konieczne jest poszukiwanie nowych i tanich antybiotyków przeciwgruźliczych. Dotychczas nie opublikowano badań o wykorzystaniu aktywności przeciwbakteryjnej związków wyizolowanych z dżdżownic, wykazujących działanie skierowane przeciwko bakteriom z rodzaju *Mycobacterium*.

Grzybica - kandydoza, zwana również drożdżycą jest najczęściej wywoływana przez grzyby z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. lusitaniae*), ale głównie przez *C. albicans*. Szacuje się, że w krajach rozwiniętych na tę chorobę cierpi powyżej 30% populacji, a obecnie tego typu infekcje są 15

razy częstsze niż 15 lat temu. W ciągu ostatnich lat częstość zakażeń grzybiczych wzrosła z powodu różnych czynników zwiększających podatność ludzi na choroby grzybowe, takich jak AIDS, leczenie przeciwnowotworowe i immunosupresyjne, częstsze stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum, wzrost liczby transplantacji narządów (Wingard, 2003, Aoki i inni, 2013). Ponadto coraz częściej wskazuje się na związek przyczynowo - skutkowy między grzybem *C. albicans* a chorobami neurologicznymi (Malhotra i inni, 2010).

Grzyby z rodzaju *Candida* występują powszechnie – obecnie znanych jest prawie 200 gatunków, z których przynajmniej 15 ma właściwości chorobotwórcze. Stosowane w leczeniu antybiotyki, które są produktami grzybów o właściwościach bakteriobójczych, oprócz bakterii chorobotwórczych, eliminują bakterie spełniające pozytywną rolę w organizmie. Efektem jest zaburzenie równowagi między bakteriami działającymi korzystnie, a grzybami z rodzaju *Candida*, co prowadzi do groźnej choroby jaką jest kandydoza. W świetle powyższych danych nie ulega wątpliwości, że rozwój nowych strategii zapobiegania i leczenia grzybic jest jednym z najważniejszych wyzwań, jakie stawia się współczesnej nauce zajmującej się tym zagadnieniem.

Choroby nowotworowe stanowią jeden z największych problemów współczesnej medycyny. Ograniczeniem dla wielu leków przeciwnowotworowych jest ich niezdolność do penetrowania tkanki guza, co prowadzi do zmniejszenia skuteczności i negatywnego wpływu na prawidłowe komórki. Ponieważ dżdżownice zajmują ważne miejsce we współczesnym świecie terapii uzupełniających i medycyny alternatywnej, przede wszystkim jako potencjalne źródło aktywnych związków do leczenia nowotworów (Cooper i inni, 2004, Yanqin i inni, 2007, Hua i inni, 2011) zasadne jest poszukiwanie w tych organizmach substancji bioaktywnych o takim działaniu.

Celem przeprowadzonych badań było:

1. Przebadanie przeciwbakteryjnej aktywności typu lizozymu w organizmie dżdżownicy *Dendrobaena veneta*;
2. Określenie wpływu immunizacji przy zastosowaniu bakterii *Escherichia coli* na aktywność typu lizozymu w płynie celomatycznym i ekstrakcie z celomocytów *D. veneta*;
3. Ocena aktywności przeciwnowotworowej płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta*;

4. Izolacja, identyfikacja i analiza działania mikroorganizmów wytwarzających metabolity o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej, wyizolowanych z jelita *D. veneta*;
5. Izolacja, identyfikacja i analiza działania aktywnych związków z zewnątrzkomórkowych metabolitów bakterii *Raoultella ornithinolytica*, pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybowej i przeciwnowotworowej.

Kolejne etapy badań były następstwem wcześniej otrzymanych rezultatów, a poszczególne cele kształtowały się podczas analizy wyników przeprowadzonych doświadczeń.

1. Aktywność przeciwbakteryjna dżdżownicy *Dendrobaena veneta*

1a. Aktywność typu lizozymu u dżdżownicy *D. veneta*

Wyniki przedstawiono w pracy eksperymentalnej:

- P1. **Fiolka M.J.**, Zagaja M.P., Hułas-Stasiak M., Wielbo J. **2012**. Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). J. Invertebr. Pathol., 109, 83-90.

Podczas wykonywania badań do pracy doktorskiej zaobserwowałam, że aktywność typu lizozymu w płynie celomatycznym dżdżownicy *Dendrobaena veneta* jest kilkadziesiąt razy wyższa niż w hemolimfie gąsienic i poczwerek barciaka większego *Galleria mellonella*. Kontynuowałam zatem badania w tym kierunku i u dżdżownicy *Dendrobaena veneta* przeanalizowałam aktywność typu lizozymu skierowaną przeciw bakterii indykatorowej *Micrococcus luteus*. Aktywność oceniałam w płynie celomatycznym, ekstrakcie z celomocytów, homogenacie z kokonów oraz homogenacie z różnych odcinków jelita *D. veneta*. Badane były zarówno dżdżownice kontrolne, nie traktowane żadnym induktorem immunologicznym, jak i immunizowane. Dżdżownice były pobudzane immunologicznie poprzez zakażenie bakterią *Escherichia coli*, a aktywność typu lizozymu w płynie celomatycznym i ekstrakcie z celomocytów była oznaczana po 4 godzinach od immunizacji.

U dżdżownic zakażonych aktywność przeciw *Micrococcus luteus* wzrastała trzykrotnie w przypadku płynu celomatycznego, natomiast czterokrotnie w przypadku ekstraktu z celomocytów. Dodatkowo sprawdzałam, czy przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi białka jaja kurzego (HEWL) i lizozymowi ludzkiemu rozpoznają białka w analizowanych preparatach. Przeprowadzony immunobloting wykazał, że przeciwciała

skierowane przeciw HEWL rozpoznały jedno białko w przypadku analizy preparatów płynu celomatycznego, homogenatu z kokonów i ekstraktu z celomocytów. Przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi ludzkiemu rozpoznały w płynie celomatycznym dodatkowo białko o masie 22 kDa. Przeprowadzona bioautografia, po analizie elektroforetycznej w warunkach natywnych, wykazała dwie strefy lizy komórek *Micrococcus luteus*, spowodowane działaniem białek płynu celomatycznego, a trzy strefy - działaniem ekstraktów z celomocytów i homogenatów z kokonów. Uzyskane rezultaty sugerują istnienie kilku form białek typu lizozymu o różnym ładunku elektrycznym. Badając aktywność typu lizozymu w przewodzie pokarmowym dżdżownicy *D. veneta*, stwierdziłam najwyższy poziom w homogenacie z jelita środkowego, a przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi ludzkiemu wywołały pozytywny sygnał w komórkach jelita. Pomimo faktu, że lizozym dżdżownic należy do lizozymów typu *i*, a ludzki lizozym należy do typu *c*, to przeprowadzone badania pozwalają wnioskować o molekularnych podobieństwach. Bachali i współpracownicy (2002) przedstawili dowody, że centralny egzon genu kodującego lizozym typu *i* bezkręgowców jest homologiczny do drugiego egzonu genu lizozymu kurzego należącego do typu *c*.

Oprócz przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybowego, lizozymy wykazują także działanie przeciwwirusowe np. mają zdolność niszczenia wirusa HIV (Singh i inni, 2005). Przeciwwirusowe działanie lizozymów jest związane raczej z ładunkiem tych białek, a nie z ich aktywnością lityczną (Losso i inni, 2000). Lizozymy dobrze znane są jako czynniki immunomodulujące, immunostymulujące oraz wykazujące działanie przeciwnowotworowe (Mine i Kovacs-Nolan, 2004). Ze względu na wielokierunkowość działania wciąż zasadne jest analizowanie nowych form lizozymów u bezkręgowców.

Wstępnie przeanalizowano aktywność płynu celomatycznego w stosunku do innych gatunków bakterii i stwierdzono wrażliwość *Legionella gormanii*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* na działanie płynu jamy ciała *D. veneta*. Wyniki tych badań były prezentowane na konferencjach międzynarodowych w Lublinie i Wrocławiu w 2013 i 2014 roku. Aktywność skierowana na szczepy chorobotwórcze skłania do dalszych badań.

Przeprowadzona analiza aktywności przeciwbakteryjnej typu lizozymu oraz immunodetekcja lizozymu w różnych tkankach dżdżownicy *Dendrobaena veneta* potwierdziła wcześniejsze obserwacje, że tkanki jelita środkowego tego gatunku dżdżownicy stanowią źródło aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

1b. Aktywność przeciwpłatkowa *Dendrobaena veneta*

Wyniki przedstawiono w poniższych pracach eksperymentalnych zawartych w osiągnięciu:

P2. **Fiołka M.J.**, Zagaja M.P., Piersiak T. D., Wróbel M., Pawelec J. **2010**. Gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida: Oligochaeta) possesses antimycobacterial activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 105, 63-73,

P3. **Fiołka M.J.**, Grzywnowicz K., Mendyk E., Zagaja M., Szewczyk R., Rawski M., Keller R., Rzymowska J., Wydrych J. **2015**. Antimycobacterial action of a new glycolipid-peptide complex obtained from extracellular metabolites of *Raoultella ornithinolytica*. *APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)* 123, 1069-1080

oraz pracy eksperymentalnej niewchodzącej w skład osiągnięcia:

- **Fiołka M.**, Komosa Z., Grzywnowicz K., Sofińska-Chmiel W., Keller R., Lewtak K., Szewczyk R., Mendyk E., Rawski M., Skrzypiec K., Mardarowicz M. **2014**. Spektroskopia FTIR oraz SERS kluczem do identyfikacji nowego związku o aktywności przeciwpłatkowej. W: *Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, 57-61, Lublin.

Jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych jest gruźlica, a głównymi jej sprawcami są mykobakterie - *Mycobacterium tuberculosis*. Inne gatunki jak: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* czy *Mycobacterium microti* wywołują choroby zwane mykobakteriozami, które z reguły nie infekują zdrowych, dorosłych osób, natomiast są często spotykane u ludzi z upośledzeniem odporności np. w przebiegu AIDS. Specyficzną cechą tych bakterii jest duża odporność zarówno na czynniki zewnętrzne środowiska powodujące wysychanie, kwasoodporność, jak i oporność na działanie różnych substancji chemicznych, szkodliwych dla innych bakterii.

Ze względu na synergizm gruźlicy z AIDS i wielolekooporność oraz całkowitą oporność szczepów wywołujących gruźlicę, istnieje potrzeba nie tylko lepszego diagnozowania i zapobiegania gruźlicy, ale także postępu w badaniach podstawowych i stosowanych w celu opracowania nowych skutecznych leków.

Ze ściany jelita środkowego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wyizolowano dwa nowe szczepy bakterii: *Raoultella ornithinolytica* oraz *Bacillus pumilus* wytwarzające metabolity o działaniu przeciwpłatkowym (Fiołka i inni, 2010). W prowadzonych badaniach skupiono się na charakterystyce pierwszego z nich - *Raoultella ornithinolytica*. Przy zastosowaniu metod biochemicznych - testów w kierunku wytwarzania histaminy i indolu

oraz dekarboksylacji ornityny potwierdzono obecność tej bakterii u wszystkich (40.) badanych osobników. Bakterię zidentyfikowano testem API 20E, a następnie 18 szczepów poddano identyfikacji molekularnej - analizie sekwencji genu 16S rDNA, która wykazała 99% podobieństwo do bakterii *Raoultella ornithinolytica* w przypadku każdego zidentyfikowanego szczepu.

Mikroorganizm ten wykazuje aktywność skierowaną przeciw czterem badanym gatunkom prątków saprofitycznych: *Mycobacterium butiricum*, *Mycobacterium jucho*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*. Wyizolowany szczep został zdeponowany w celach patentowych w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie pod numerem 02/01/2009, a sposób izolacji został opatentowany (patent PL 212077). Po namnożeniu wyizolowanej bakterii na podłożu Sautona zawierającym prątki saprofityczne zaobserwowano, iż zewnątrzkomórkowe metabolity uwalniane w czasie namnażania bakterii powodowały lizę prątków w podłożu, co zostało wykazane metodami dyfuzyjnymi oraz udokumentowane za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM). Po inkubacji prątków z ekstraktem z bakterii *R. ornithinolytica* obserwowano deformacje komórek prątków oraz zaburzenia podziału komórkowego. Do obrazowania komórek poddanych działaniu ekstraktu wykorzystano różne techniki mikroskopowe takie jak: mikroskopia świetlna oraz elektronowa, zarówno skaningowa jak i transmisyjna. Ponadto zanotowano istotnie obniżoną przeżywalność mykobakterii poddanych działaniu ekstraktu.

Analizując frakcję metabolitów zewnątrzkomórkowych o masie cząsteczkowej powyżej 100 kDa przy zastosowaniu chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sepharose otrzymano trzy subfrakcje (Fiołka i inni, 2015). Subfrakcja pierwsza (S1), cechowała się największą aktywnością przeciwprątkową ocenianą testem przeżywalności.

Subfrakcję S1 scharakteryzowano nie tylko pod kątem aktywności, ale także budowy chemicznej. Do charakterystyki działania przeciwprątkowego użyto szczepu saprofitycznego *Mycobacterium smegmatis*. Zaobserwowano działanie lityczne S1 wobec prątków, stosując metodę płytkową na podłożu Sautona. Analiza komórek prątków przy zastosowaniu elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) pozwoliła stwierdzić, że komórki po inkubacji z aktywną subfrakcją miały wyraźną tendencję do zlepiania się w aglomeraty, ściana komórkowa ulegała zniszczeniu lub uszkodzeniu, a komórki rozpadały się. Analiza komórek prątków za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego (TEM) pozwoliła zaobserwować liczne ubytki w ścianie komórkowej, po traktowaniu aktywną subfrakcją S1. Stwierdzono też obecność licznych form morfologicznie zmienionych – silnie skróconych lub powstałych z kilku połączonych ze sobą komórek. Przy użyciu mikroskopu sił atomowych

(AFM) udowodniono obecność bruzd w ścianie komórkowej prątków poddanych działaniu aktywnej subfrakcji, a także utratę spójnego kształtu komórki, będącego wynikiem dezintegracji ściany.

Do analizy chemicznych zmian w ścianie komórkowej prątków zastosowano technikę SERS – powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana. Zredukowanie azotanu srebra na powierzchni komórek *Mycobacterium* pozwoliło na stwierdzenie zmian w składzie ściany komórek eksponowanych na działanie aktywnej substancji w stosunku do komórek hodowli kontrolnej. Badanie struktur molekularnych przy zastosowaniu metody SERS wykazało zwiększenie sygnału odpowiadającego cukrom i białkom, co sugeruje przyłączenie związków o takim charakterze podczas inkubacji z aktywną subfrakcją. Badana subfrakcja została dodatkowo rozdzielona przy zastosowaniu sączenia molekularnego na dwie podfrakcje różniące się masą cząsteczkową, a analiza metodą spektrometrii masowej MalDI-TOF/TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight) wykazała, że w skład charakteryzowanej subfrakcji wchodzi polimer zbudowany ze związków o masie 560-3200 m/z oraz peptyd o masie 8565 Da. Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas GC-MS (Gas-liquid Chromatography – Mass Spectrometry) pozwoliła natomiast stwierdzić, że w skład polimeru wchodzi cukry: glukoza i galaktoza oraz kwas stearynowy. Analiza DIP-MS (Direct Insertion Probe – Mass Spectrometry) potwierdziła obecność długich łańcuchów węglowodorowych różniących się grupą CH₂ oraz obecność jonów m/z = 50 i 51 charakterystycznych między innymi dla cukrów. Subfrakcja analizowana w podczerwieni jako całość po względem budowy wiązań chemicznych wykazywała wysokie podobieństwo do nizyny – peptydu wytwarzanego przez bakterię *Lactococcus lactis* w przewodzie pokarmowym człowieka.

Przeanalizowano również toksyczność aktywnej subfrakcji względem fibroblastów ludzkich i stwierdzono brak efektu cytotoksycznego po 72 godzinach inkubacji, co predysponuje otrzymany kompleks do dalszych badań w kierunku aplikacyjnym. Kompleks ten został zgłoszony do ochrony patentowej (zgłoszenie P.408451). Działanie powyższego związku będzie sprawdzane w stosunku do chorobotwórczych szczepów *Mycobacterium* w jednostkach uprawnionych do prowadzenia tego typu badań.

Z frakcji wysokocząsteczkowej zewnątrzkomórkowych metabolitów bakterii *R. ornithinolytica* otrzymano dodatkowo dwie subfrakcje S2 i S3. Subfrakcja S2 wykazywała aktywność przeciwgrzybową scharakteryzowaną poniżej, zaś subfrakcja S3 działała również przeciwprątkowo, lecz w słabszym stopniu niż pierwsza opisana. Aktywność bakteriobójcza subfrakcji S3 oceniana zdolnością przeżywalności komórek po inkubacji, była niższa o kilka

procent, zaś budowa chemiczna związku nie wykazywała takiego zróżnicowania jak w przypadku subfrakcji pierwszej S1.

Charakterystyka powyższych subfrakcji, które w każdym przypadku okazały się kompleksami jest zagadnieniem złożonym, wymagającym wielokierunkowej analizy.

Działanie przeciwpłatkowe drugiego wyizolowanego szczepu *Bacillus pumilus* zostało scharakteryzowane w opisie patentowym (patent PL 218745).

2. Aktywność przeciwgrzybowa *Raoultella ornithinolytica*

2a. Aktywność anty-*Candida albicans* frakcji wysokocząsteczkowej metabolitów zewnątrzkomórkowych bakterii *R. ornithinolytica*

Wyniki przedstawiono w pracach eksperymentalnych wchodzących w skład osiągnięcia:

P4. **Fiołka M.J.**, Grzywnowicz K., Chlebiej K., Szczuka E., Mendyk E., Keller R., Rzymowska J. **2012**. Anti-*Candida albicans* action of the glyco-protein complex purified from metabolites of gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from earthworms *Dendrobaena veneta*. J. Appl. Microbiol., 113, 1106-1119,

P5. **Fiołka M.J.**, Lewtak K., Rzymowska J., Grzywnowicz K., Hułas-Stasiak M., Sofińska-Chmiel W., Skrzypiec K. **2013**. Antifungal and anticancer effects of a polysaccharide-protein complex from the gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from the earthworm *Dendrobaena veneta*. Pathogens and Disease, 69, 49-61

oraz dwóch pracach eksperymentalnych niewchodzących w skład osiągnięcia:

- **Fiołka M.**, Grzywnowicz K., Chlebiej K., Nowak A., Keller R., Rzymowska J., Mendyk E. **2012**. Aktywność anty-*Candida albicans* kompleksu gliko-proteinowego otrzymanego z metabolitów bakterii *Raoultella ornithinolytica* wyizolowanej ze ściany jelita dżdżownic *Dendrobaena veneta*. Sepsis, 5, 223-228,
- **Fiołka M.**, Grzywnowicz K., Mendyk E., Sofińska-Chmiel W., Komosa Z., Keller R., Chlebiej K. **2012**. Zastosowanie metod spektroskopowych do badania substancji przeciwgrzybowej anty-*Candida albicans* wyizolowanej z metabolitów bakterii jelitowej dżdżownicy *Dendrobaena veneta*. W: Nauka i przemysł – metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, 300-305, Lublin.

Z frakcji wysokocząsteczkowej metabolitów zewnątrzkomórkowych bakterii *R. ornithinolytica* wyizolowano subfrakcję białkową (S2) o aktywności skierowanej wobec grzyba *Candida albicans* (Fiołka i inni, 2012). Przeanalizowano wpływ tej subfrakcji na aktywność metaboliczną oraz morfologię badanego grzyba. Do analizy morfologii

zastosowano mikroskop optyczny z kontrastem Nomarskiego oraz technikę barwienia przy użyciu fluorochromu calcofluor-white. Aktywność metaboliczną grzybów oceniano testem LIVE/DEAD. Subfrakcja S2 otrzymana po chromatografii jonowymiennej DEAE-Sepharose była rozdzielona przy zastosowaniu filtracji żelowej, a następnie jej składowe były identyfikowane przy zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni FTIR oraz powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana - SERS. Wyizolowana subfrakcja S2 została zidentyfikowana jako kompleks gliko-proteinowy. Powodował on istotne obniżenie aktywności metabolicznej komórek *C. albicans* poddanych jego działaniu oraz wyraźne zmiany morfologiczne komórek. Mikroskopia optyczna pozwoliła zaobserwować miejscowe zgrubienia ściany komórkowej, powiększone wakuole w komórkach i tworzenie komórek olbrzymich. Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM) uwidoczniała zaburzenia podziału komórkowego, tworzenie łańcuszków z komórek niemogących się od siebie oddzielić oraz tworów wielokomórkowych złożonych z większych i mniejszych komórek, połączonych ze sobą miejscowo ścianą. Warto dodać, że otrzymane składniki kompleksu, analizowane oddzielnie nie wykazywały żadnej aktywności przeciwgrzybowej. Działanie na grzyba *Candida albicans* jest zatem spowodowane efektem synergistycznym obu składowych kompleksu. Nie stwierdzono istotnego efektu cytotoksyczności wobec ludzkich fibroblastów (1%), co kwalifikuje otrzymany kompleks do dalszej analizy jako związku przeciwgrzybowego o potencjalnym zastosowaniu.

W kolejnych badaniach ww. kompleksu stwierdzono, że powodował on zwiększenie właściwości adhezyjnych komórek grzyba *C. albicans* (Fiołka i inni, 2013). Po inkubacji z kompleksem widoczne były grupy komórek połączonych ze sobą substancją zewnątrzkomórkową. Komórki w skupiskach traciły aktywność metaboliczną, co w efekcie prowadziło do śmierci części z nich. W hodowli traktowanej aktywnym kompleksem zanotowano zwiększoną liczbę komórek nieaktywnych metabolicznie oraz komórek martwych, w stosunku do liczby takich komórek w hodowli kontrolnej. Elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM) uwidoczniała pęknięcia ścian komórek egzystujących w skupiskach oraz obecność substancji wypełniającej przestrzenie między komórkami zgrupowanymi w aglomeraty. Analiza z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych (AFM) pozwoliła na porównanie powierzchni ścian komórek grzyba z hodowli kontrolnej oraz z hodowli traktowanej badanym kompleksem. Komórki po inkubacji z kompleksem gliko-proteinowym charakteryzowały się szorstką ścianą komórkową z widocznymi na powierzchni nierównościami i ziarnistościami. Między komórkami ujawniała się substancja zlepiająca je ze sobą, tworząc strukturę wielokomórkową. Analiza przekrojów komórek przy zastosowaniu

elektronowej mikroskopii transmisyjnej (TEM) potwierdziła obserwacje z analiz przeprowadzonych innymi technikami mikroskopowymi. Na przekrojach wyraźnie widoczne są miejsca, gdzie trzy lub cztery komórki łączą się ze sobą fragmentem ściany komórkowej. Przeprowadzone obserwacje skłoniły do zastosowania techniki barwienia przy wykorzystaniu tioflawiny T, aby sprawdzić czy substancją zlepiającą komórki może być amyloid. Charakterystyczne dla tioflawiny T intensywne świecenie w miejscach połączeń oraz na powierzchni komórek, potwierdza przypuszczenia o działaniu amyloidu - zewnątrzkomórkowym gromadzeniu białka, które najprawdopodobniej utrudnia oddzielanie się od siebie pojedynczych komórek, zaburza podział i w efekcie prowadzi do utraty aktywności metabolicznej *C. albicans*.

Bakterie symbiotyczne bezkręgowców wytwarzają metabolity o właściwościach antybiotycznych, skierowane zarówno przeciw bakteriom jak i przeciw grzybom. Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają, że bakteria *R. ornithinolytica* związana z przewodem pokarmowym dżdżownicy *D. veneta* wytwarza metabolity przeciwgrzybowe, które prawdopodobnie odgrywają pewną rolę w regulacji składu mikroflory jelitowej. Warto dodać, że *R. ornithinolytica* została również wyizolowana przez innych badaczy z przewodu pokarmowego bezkręgowców takich jak np. ślimaki, termity, kleszcze i inne (Montaser 2005, Dunn i Stabb 2005, Charrier i inni, 2006, Cardoza i inni, 2006, Ngugi i inni, 2007).

Ten temat badawczy jest również ciekawy z perspektywy zastosowania otrzymanego kompleksu do analizy mechanizmu działania na komórki grzyba i wytwarzania amyloidu, gdyż istnieją teorie sugerujące powiązanie choroby Alzheimera z obecnością amyloidu wytwarzanego przez grzyby *Candida albicans* w organizmie człowieka, a blaszki amyloidu zawsze stwierdzane są w mózgach osób chorych na Alzheimera (Garcia i inni, 2013).

2b. Aktywność anti-*Candida albicans* płynu celomatycznego *D. veneta*

Zaobserwowano, że płyn celomatyczny dżdżownicy *D. veneta* również wykazuje aktywność skierowaną przeciw *Candida albicans*. Do zobrazowania komórek grzyba wykorzystano mikroskopię optyczną (barwienie fluorochromem calcofluor-white oraz kontrast interferencyjno-różniczkowy DIC (Differential Interference Contrast), a także elektronową mikroskopię skaningową. Analiza przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych (AFM) wykazała zmiany powierzchni ściany komórkowej po działaniu płynu celomatycznego, a test na przeżywalność potwierdził efekt toksyczny wobec komórek badanego grzyba. Analiza ściany komórkowej przy zastosowaniu spektroskopii Ramana,

wykazuje zmiany w budowie chemicznej ściany komórek *C. albicans* poddanych działaniu płynu. Wstępne badania pokazujące zmiany morfologii komórek po inkubacji z płynem celomatycznym przedstawiono w pracy analizującej źródła aktywności przeciwgrzybowej u dżdżownic, a powstałej pod moim kierunkiem we współautorstwie również ze studentami:

- Syryjczyk P., Miziak P., Kołodziejczyk J., **Fiołka M.**, Grzywnowicz K. **2015**. Różne źródła aktywności przeciwgrzybowej u dżdżownic. W: Wybrane substancje: znaczenie dla organizmu oraz możliwe zastosowania, 132-143, Lublin.

3. Aktywność przeciwnowotworowa *Dendrobaena veneta*

3a. Aktywność przeciwnowotworowa frakcji wysokocząsteczkowej zewnątrzkomórkowych metabolitów bakterii *R. ornithinolytica*

Wyniki przedstawiono w poniższej pracy eksperymentalnej:

- P5. **Fiołka M.J.**, Lewtak K., Rzymowska J., Grzywnowicz K., Hułas-Stasiak M., Sofińska-Chmiel W., Skrzypiec K. **2013**. Antifungal and anticancer effects of a polysaccharide-protein complex from the gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Pathogens and Disease*, 69, 49-61.

Kompleks polisacharydowo–białkowy wyizolowany z frakcji wysokocząsteczkowej płynu pochodzącego *R. ornithinolytica* (S2), wykazywał nie tylko działanie przeciwgrzybowe przeciw *C. albicans*, ale również działanie przeciwnowotworowe na komórki linii T47D (rak piersi) oraz na komórki linii TOV-112D (rak jajnika) *in vitro*. Cytotoksyczność kompleksu była określana przy zastosowaniu testu BrdU i wynosiła 20% względem T47D oraz 15% względem TOV-112D. Komórki nowotworowe po inkubacji z aktywną frakcją obrazowano za pomocą mikroskopii optycznej. Barwiąc hodowlę mieszaniną barwników Hoechst oraz jodek propidyny zaobserwowano, że komórki ginęły zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy. Cytotoksyczność względem komórek prawidłowych – fibroblastów była znikoma i wynosiła zaledwie 1% po trzech dobach inkubacji. Kompleks polisacharydowo–białkowy wykazywał zatem działanie dwukierunkowe: zarówno na grzyby, jak i na nowotwory przy prawie całkowitym braku cytotoksyczności na fibroblasty. To czyni go interesującym pod względem aplikacyjnym, a aktywność łącząca oba działania zarówno przeciwgrzybowe jak i przeciwnowotworowe jest pożądaną właściwością poszukiwanych biologicznie aktywnych związków.

3b. Aktywność przeciwnowotworowa frakcji zawierającej związki o masie poniżej 100 kDa zewnątrzkomórkowych metabolitów bakterii *R. ornithinolytica*

Wyniki przedstawiono w poniższych pracach eksperymentalnych wchodzących w skład osiągnięcia:

P6. **Fiołka M.J.**, Grzywnowicz K., Rzymowska J., Lewtak K., Szewczyk R., Mendyk E., Keller R. **2015**. Antitumour and apoptotic effects of a novel Tris-peptide complex obtained after isolation of *Raoultella ornithinolytica* extracellular metabolites. *J. Appl. Microbiol.*, 118, 1357-1369

oraz pracy eksperymentalnej niewchodzącej w skład osiągnięcia:

- **Fiołka M.**, Rzymowska J., Grzywnowicz K., Lewtak K., Szewczyk R., Mendyk E., Komosa Z., Keller R., Sofińska-Chmiel W., Rawski M. **2015**. Metody spektroskopowe w badaniach kompleksu Tris-peptydowego o właściwościach przeciwnowotworowych. W: *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, 393-397, Lublin.

Po rozdziale frakcji zawierającej związki o masie poniżej 100 kDa, z płynu pohodowlanego bakterii *R. ornithinolytica* otrzymano związek o aktywności przeciwnowotworowej skierowanej przeciw komórkom nowotworowym należącym do różnych linii. Otrzymana frakcja była poddana chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sepharose, a następnie filtracji żelowej. Po chromatografii sita molekularnego otrzymano dwie subfrakcje. Frakcja przed rozdziałem na sicie molekularnym wykazywała aktywność przeciwnowotworową na poziomie 30% na komórki linii HeLa, 40% na komórki linii T47D oraz 95% na komórki linii nowotworu jajnika TOV-112D. Subfrakcje powstałe po rozdziale drogą filtracji żelowej wykazywały niższą aktywność przeciwnowotworową w przypadku T47D - 10% i TOV-112 - 5%. Aktywność cytotoksyczna przeciw linii HeLa pozostała na niezmiennym poziomie, natomiast cytotoksyczność w stosunku do komórek prawidłowych (fibroblastów) została obniżona z 15% do 0. Świadczy to selektywnym działaniu otrzymanego związku. Komórki linii HeLa po działaniu otrzymanego związku zostały zobrazowane za pomocą mikroskopii świetlnej i mikroskopii skaningowej. Zarówno otrzymany związek, jak i jego składowe były identyfikowane metodami chemicznymi.

Na podstawie otrzymanych wyników aktywny związek scharakteryzowano jako kompleks Tris-peptydowy, który powstał najprawdopodobniej przez przyłączenie peptydu wytworzonego przez bakterię *Raoultella ornithinolytica* z Trisem użytym jako bufor do rozdziału chromatograficznego. Tris jest powszechnie znanym dodatkiem do leków cytostatycznych stosowanym przez firmy farmaceutyczne.

Aktywny związek został zanalizowany za pomocą spektroskopii w podczerwieni, FTIR oraz spektroskopii Ramana. Masa cząsteczkowa składowej kompleksu została określona przy zastosowaniu spektrometrii masowej Maldi TOF/TOF na 1430,6576 Da, natomiast sekwencja peptydu zawierała fragment sekwencji kazeiny. Przeprowadzone badania i ich wyniki wyraźnie wskazują, że Tris jest związkiem wzmacniającym przeciwnowotworowe działanie peptydu zawierającego fragment kazeiny. Fragment ten prawdopodobnie może pochodzić ze składników pożywki wykorzystywanych w trakcie namnażania bakterii lub może też być motywem strukturalnym wycinanym z zewnątrzkomórkowych białek bakterii.

W literaturze opisane są liczne peptydy zawierające sekwencję kazeiny jako związki o działaniu immunomodulacyjnym i antyoksydacyjnym (Phelan i inni, 2009). Są one aktywowane podczas enzymatycznej hydrolizy lub fermentacji mikrobiologicznej oraz procesu trawienia. Scharakteryzowano dotychczas wiele związków o działaniu przeciwnowotworowym, które zawierają w swojej strukturze Tris (Pruchnik i inni, 2001, Marzano i inni, 2006, Stepanova i inni, 2010). Otrzymany kompleks został zgłoszony do ochrony patentowej, a patent na ten wynalazek został udzielony 4 grudnia 2015 roku:

- P.405944. Kompleks Tris-peptydowy otrzymany ze szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica* do zastosowania w leczeniu nowotworu szyjki macicy ludzkiej.

Otrzymane związki o działaniu przeciwnowotworowym ze względu na swój potencjał aplikacyjny będą dalej analizowane zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

3c. Aktywność przeciwnowotworowa płynu celomatycznego *D. veneta*

W przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że płyn celomatyczny dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Zaobserwowano też, że pobudzenie immunologiczne dżdżownic za pomocą bakterii saprofitycznej *Escherichia coli* powodowało podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej płynu jamy ciała 4-5 godzin po immunizacji. W wykonanych doświadczeniach stwierdzono wysoką cytotoksyczność wobec komórek raka jajnika TOV-112D, raka płuc A549, komórek linii HeLa *in vitro*.

Zanotowano też porównywalną cytotoksyczność na komórki prawidłowe – mysie fibroblasty L929. Poddanie płynu celomatycznego krótkiemu gotowaniu powoduje całkowite zniesienie aktywności przeciwnowotworowej wobec wszystkich badanych rodzajów nowotworów, a także cytotoksyczności na fibroblasty.

Analiza elektroforetyczna pozwoliła zaobserwować mniej prążków odpowiadających związkom wysokocząsteczkowym, a więcej niskocząsteczkowym, po poddaniu preparatu wysokiej temperaturze. Do określania cytotoksyczności zastosowano test MTT. Barwienie komórek nowotworowych w kierunku identyfikacji zmian apoptotycznych i nekrotycznych w hodowli uwidocznilo, że śmierć komórek pod wpływem płynu celomatycznego od dżdżownic natywnych lub immunizowanych następowała na drodze apoptozy lub/i nekrozy w zależności od frakcji płynu zawierających związki o różnych masach cząsteczkowych. Komórki nowotworowe poddane inkubacji z płynem celomatycznym obrazowano technikami mikroskopowymi, z użyciem zarówno mikroskopu optycznego, jak i elektronowego mikroskopu skaningowego. Analiza frakcji płynu celomatycznego rozdzielonego drogą ultrafiltracji udowodniła, że największą aktywność przeciwnowotworową wykazuje frakcja zawierająca związki o masie powyżej 50 kDa, a chromatografia jonowymienna pozwoliła na izolację czterech aktywnych subfrakcji białkowych. Spektroskopia w podczerwieni FTIR wykazała podobieństwo widm tych związków do widma ferredoksyny typu V bakterii *Clostridium*. Jednak cytotoksyczność rozdzielonych subfrakcji względem komórek prawidłowych – fibroblastów była nadal wysoka i wynosiła od 40% do 80%.

Wobec uzyskanych powyższych wyników stało się zasadne znalezienie takich warunków doświadczenia, w których płyn celomatyczny wykazywałby działanie selektywne w stosunku do komórek nowotworowych. Poddając licznym analizom płyn celomatyczny w różnych stężeniach, traktowany różną temperaturą znaleziono warunki, w których wykazywał on 70-80% cytotoksyczności w stosunku do komórek raka płuc A549, a jednocześnie nie działał cytotoksycznie na komórki prawidłowe – fibroblasty mysie w warunkach *in vitro*. Wykorzystując te obserwacje sprawdzono, czy płyn celomatyczny tak otrzymany nie wykazuje działania cytotoksycznego również na komórki krwi człowieka. Nie stwierdzono litycznego działania w stosunku do erytrocytów, co jest charakterystyczne dla płynu celomatycznego niepoddanego żadnej obróbce termicznej. Obraz leukocytów i płytek krwi pozostał również niezmienny. Pozytywne wyniki analizy hematologicznej pozwoliły na zgłoszenie płynu celomatycznego dżdżownicy *D. veneta* o selektywnym działaniu na komórki raka płuc A549 *in vitro* do ochrony patentowej w 2015 roku:

- Zgłoszenie P.411346, Płyn celomatyczny dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuc.

Wyniki prac doświadczalnych ze względu na ochronę nowości wynalazku niedawno zostały wysłane do opublikowania. Specyficzna aktywność płynu celomatycznego po odpowiedniej obróbce termicznej uzasadnia celowość kontynuacji dalszych badań. Nowy bioaktywny preparat o istotnym i selektywnym działaniu przeciwnowotworowym na komórki raka płuc A549 *in vitro* w najbliższej przyszłości będzie testowany na modelu zwierzęcym.

Podsumowanie najważniejszych prezentowanych osiągnięć:

1. Wykazano, że różne tkanki i komórki (płyn celomatyczny, celomocyty, tkanki jelita, tkanki kokonów) dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową typu lizozymu, a pobudzenie układu odpornościowego dżdżownicy po immunizacji powodowało istotny wzrost tej aktywności;
2. Z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wyizolowano bakterie dwóch gatunków: *Raoultella ornithinolytica* oraz *Bacillus pumilus*, które wytwarzają metabolity o działaniu przeciwpłatkowym. Sposoby izolacji tych szczepów zostały opatentowane;
3. Po raz pierwszy z metabolitów bakterii *Raoultella ornithinolytica* wyizolowano kompleksy o działaniu przeciwpłatkowym (przeciw *M. smegmatis*) przeciwgrzybowym (przeciw *C. albicans*) i przeciwnowotworowym (przeciw komórkom linii HeLa, komórkom raka piersi T47D oraz raka jajnika TOV-112). Sposób otrzymywania kompleksu o aktywności przeciwpłatkowej został zgłoszony do ochrony patentowej, natomiast kompleksu o selektywnym działaniu na raka szyjki macicy – opatentowany;
4. Stwierdzono, że płyn celomatyczny dżdżownicy *D. veneta* wykazuje aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek należących do kilku linii (raka płuc A549, raka jajnika TOV-112D oraz na komórki linii HeLa), a immunizacja dżdżownic, analogicznie jak w przypadku aktywności lizozymu, powodowała istotny wzrost aktywności przeciwnowotworowej płynu celomatycznego;
5. Opracowano preparat z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazujący wysoką aktywność na komórki raka płuc A549 (70-80%), przy braku cytotoksyczności na komórki prawidłowe - fibroblasty. Wynalazek został zgłoszony do ochrony patentowej.

Piśmiennictwo

1. Aoki W., Ueda T., Tatsukami Y., Kitahara N., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M. (2013) Time-course proteomic profile of *Candida albicans* during adaptation to a fetal serum. *Pathog. Dis.* 67: 67–75.
2. Bachali S., Jager M., Hassanin A., Shoentgen F., Jollès P., Fiala-Medioni A., Deutsch J.S. (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.* 54: 652-664.
3. Balamurugan M., Parthasarathi K., Ranganathan L.S., Cooper E.L. (2008) Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9:141-147.
4. Byzov B.A., Khomakov N.V., Kharin S.A., Kurakov A.V. (2007) Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *Eur. J. Soil. Biol.* 43: S149-S156.
5. Cardoza Y.J., Klepzig K.D., Raffa K.F. (2006) Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecol. Entomol.* 31: 636–645.
6. Charrier M., Fonty G., Gaillard-Martinie B., Ainouche K., Andant G. (2006) Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Res.* 39: 669-681.
7. Chauhan P.S., Tomar J., Prasad G.B.K.S., Agrawal O.P. (2014) Evaluation of antimicrobial activity of earthworm *Eudrilus eugeniae* tissue extract. *J. Chem. Pharm. Res.* 6: 28-38.
8. Cooper E.L., Ru B., Weng N. (2004) Earthworms: sources of antimicrobial and anticancer molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* 546: 359-389.
9. Dunn A.K., Stabb E.V. (2005) Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8784-8794.
10. Garcia M.C., Lipke P.N., Klotz S.A. (2013) Pathogenic microbial amyloids: Their function and the host response. *OA Microbiol.* 1: 1-11.
11. Hua Z., Wang Y.H., Cao H.W., Pu L.J., Cui Y.D. (2011) Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharm. Biol.* 49: 269-275.
12. Jarosz J. (1975). Lysozyme like lytic enzyme of *Streptococcus faecalis* and its role in the larval development of wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 26: 275-281.
13. Jarosz J. (1983). *Streptococcus faecium* in the intestine of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Microbios Lett.* 23: 125-128.
14. Liu Z., Wang J., Zhang J., Yu B., Niu B. (2012) An extract from the earthworm *Eisenia fetida* non-specifically inhibits the activity of influenza and adenoviruses. *J. Tradit. Chin. Med.* 32: 657-663.
15. Losso J.N., Nakai S., Charter E.A. (2000). Lysozyme. W: Naidi, A.S. (Red.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Inc., New York, s. 185-210.
16. Malhotra S., Nirmaljit K., Bhatia M.S., Kumar P., Hans C. (2010) Yeast infection and psychiatric disorders. *Dehli Psychiatry Journal* 13, 345-350.
17. Marzano C., Pellei M., Colavito D., Alidori S., Lobbia G.G., Gandin V., Tisato F., Santini C. (2006) Synthesis, characterization, and *in vitro* antitumor properties of tris (hydroxymethyl) phosphine copper(I) complexes containing the new bis(1,2,4-triazol-1-yl)acetate ligand. *J. Med. Chem.* 49: 7317-7324.

18. Mine Y., Kovacs-Nolan J. (2004) Biologically active hen egg components in human health and disease. *J. Poult. Sci.* 41: 1-29.
19. Molnar L., Pollak E., Skopek Z., Gutt E., Kruk J., Morgan A.J., Płytycz B. (2015) Immune system participates in brain regeneration and restoration of reproduction in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Dev. Comp. Immunol.* 52: 269-279.
20. Montaser A.A. (2005) Gram-negative bacteria from the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Ixodidae) and the chicken tick *Argas persicus* (Argasidae) and their antibiotic sensitivities. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 35: 95-106.
21. Ngugi D.K., Tsanuo M.K., Boga H.I (2007) Benzoic acid-degrading bacteria from the intestinal tract of *Macrotermes michaelseni* Sjöstedt. *J. Basic Microbiol.* 47: 87-92.
22. Phelan M., Aherne A., FitzGerald R.J., O'Brien N.M. (2009) Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19: 643-654.
23. Pruchnik F.P., Starosta R., Ciunik Z., Opolski A., Wietrzyk J., Wojdat E., Dus D. (2001) Tetraacetatodirhodium (II) complexes with tris(methoxyphenyl)phosphines, their reactivity, structure, and antitumor activity. *Can. J. Chem.* 79: 868-877.
24. Rorat A., Kacprzak M., Vandenbulcke F., Płytycz B. (2013) Soil amendment with municipal sewage sludge affects the immune system of earthworms *Dendrobaena veneta*. *Appl. Soil Ecol.* 64: 237-244.
25. Singh I.P., Bharate S.B., Bhutani K.K. (2005) Anti-HIV natural products. *Curr. Sci.* 89: 269-290.
26. Stepanova E.V., Shtil A.A., Lavrenov S.N., Bukhman V.M., Inshakov A.N., Mirchink E.P., Trenin A.S., Galatenko O.A., Isakova E.B., Glazunova V.A. Dezhenkova L.G., Solomko E.Sh., Bykov E.E., Preobrazhenskaya M.N. (2010) Tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts as a novel class of antitumor agents. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed* 59: 2259-2267.
27. Trisina J., Sunardi F., Suhartono M.T., Tjandrawinata R.R. (2011) DLBS1033, a protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic activities. *J. Biomedic. Biotechnol.* doi:10.1155/2011/51965, Epub 2011 Mar 3.
28. Vasanthi K., Chairman K., Ranjit Singh A.J.A. (2013) Antimicrobial activity of earthworm (*Eudrilus eugeniae*) paste. *Afr. J Environ. Sci. Technol.* 7: 789-793.
29. Wieczorek-Olchawa E., Niklinska M., Miedzobrodzki J., Płytycz B. (2003) Effects of temperature and soil pollution on the presence of bacteria, coelomocytes and brown bodies in coelomic fluid of *Denrobaena veneta*. *Pedobiologia* 47: 702-709.
30. Wingard J.R. (2003) Aspergillosis: are we making progress? *Infect. Med.* 20: 294-304.
31. Yanqin L., Yan S., Zhenjun S., Shijie L., Chong W., Yan L., Yuhong G. (2007) Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells *in vitro*. *Eur. J. Soil Biol.* 43: S143-S148.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

1. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów wybranych roślin

Innym zagadnieniem badawczym, w które jestem zaangażowana jest działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe ekstraktów roślinnych. Uczestniczę w opiece naukowej przy badaniach do pracy doktorskiej mgr Kingi Lewtak z Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin Instytutu Biologii i Biochemii UMCS, na temat przeciwdrobnoustrojowego działania ekstraktów z wybranych gatunków roślin. Po przeanalizowaniu kilku białkowych ekstraktów z różnych roślin, stwierdzono najwyższą aktywność przeciwbakteryjną w ekstraktach z łodyżek podkwiatowych pelargonii (*Pelargonium zonale*) oraz ekstrakcie z nasion ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita*).

Pelargonium jest rośliną od wieków używaną w medycynie ludowej. Obecnie ekstrakty z pelargonii są składnikami leków przy leczeniu chorób górnych dróg oddechowych. Otrzymane ekstrakty białkowe z *P. zonale* wykazują aktywność skierowaną na komórki grzyba *C. albicans* oraz na komórki mykobakterii *M. smegmatis*. Zobrazowano zmiany morfologiczne komórek grzyba po inkubacji z otrzymanym ekstraktem oraz zanotowano istotne obniżenie aktywności metabolicznej komórek poddanych działaniu ekstraktu. Otrzymany aktywny ekstrakt z pelargonii również działał inhibicyjnie na *M. smegmatis*, a badanie struktur molekularnych za pomocą powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana wskazuje na przyłączenie się do ścian komórkowych związków o charakterze węglowodanów. Badania opisujące działanie ekstraktu z pelargonii na *C. albicans* zostały opublikowane w czasopiśmie Micron:

- Lewtak K., Fiołka M.J., Szczuka E., Ptaszyńska A., Kotowicz N., Kołodziej P., Rzymowska J. **2014**. Analysis of antifungal and anticancer effects of the extract from *Pelargonium zonale*. Micron, 66, 69-79 (IF 2.062).

Ekstrakt z nasion ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita*) również wykazywał aktywność przeciwpłatkową i przeciwgrzybową. Z ekstraktu wyizolowano cztery aktywne frakcje białkowe, które są obecnie przedmiotem analizy. Ekstrakt z nasion ślazuwca pensylwańskiego i jego działanie przeciwgrzybowe na komórki *Candida albicans* został zgłoszony do ochrony patentowej ze względu na możliwość wykorzystania w praktyce:

Zgłoszenie: P.413017. Ekstrakt z nasion ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* do zastosowania w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez grzyba *Candida albicans* (2015).

Powyższe badania były prezentowane na 6. konferencjach naukowych, w tym 5. o zasięgu międzynarodowym.

2. Udział w części eksperymentalnej innych badań

Brałam udział w badaniach prowadzonych przez inne zespoły, gdzie uczestniczyłam w części eksperymentalnej. Jestem współautorem pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Bacteriology*, w której analizowano funkcję białka karboksylotransferazy AccD6 w komórce prątka *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis*. Wykonałam obrazowanie komórek prątka gruźlicy *M. tuberculosis* szczepu H37Rv oraz mutantu *M. tuberculosis* o obniżonej ekspresji genu *accD6* (Rv2247) techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Ponadto wykonywałam analizę bakterii *Escherichia coli* za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej do badań, które ukazały się w publikacji w czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818, 2623-2635, 2012, gdzie scharakteryzowany został synergistyczny wpływ anionowego peptydu 2 i lizozymu na bakterie. Jestem też współautorem pracy opublikowanej w czasopiśmie *European Journal of Pharmacology* 49, 850-857, 2013, gdzie brałam udział w badaniach na komórkach *Candida albicans*.

Dodatkowo współpracuję z Katedrą Higieny Zwierząt i Środowiska Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, gdzie uczestniczę w badaniach nad wpływem suplementacji diety na parametry zdrowotne zwierząt hodowlanych. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Slovenian Veterinary Research*, 52, 165-171, 2015.

Sumaryczny *impact factor* – IF ww. publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego (po doktoracie) zgodnie z rokiem opublikowania - 15,567.

VI. Inne realizowane obecnie zadania badawcze

1. Przeciwgrzybowa aktywność płynu celomatycznego:

Aktualnie wraz ze studentami prowadzę badania nad aktywnością przeciwgrzybową płynu celomatycznego skierowaną przeciw *C. albicans*. Analizowane są różne warunki pobierania i przechowywania płynu celomatycznego do doświadczeń. Prowadzone są:

- analiza przeżywalności komórek *C. albicans*,
- analiza morfologii komórek za pomocą różnych technik mikroskopowych,
- analiza powierzchni przy zastosowaniu mikroskopu sił atomowych oraz
- analiza struktur molekularnych ściany komórkowej grzyba przy zastosowaniu powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS).

2. Przeciwnowotworowa aktywność płynu celomatycznego:

Obecnie we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, prowadzone są dalsze badania nad aktywnością przeciwnowotworową płynu celomatycznego dwóch gatunków dżdżownic: *Dendrobaena veneta* oraz *Eisenia fetida*. Drugi badany gatunek dżdżownicy - *E. fetida* pochodzi z profesjonalnej hodowli od przedsiębiorcy. Analizowane jest działanie cytotoksyczne na komórki linii HeLa, raka jajnika TOV-112D, raka płuc A549, raka okrężnicy LS180 oraz linie komórek prawidłowych - kontrolnych. Analizy obejmują zarówno oznaczanie cytotoksyczności, jak i dokumentację mikroskopową oraz badania molekularne.

3. Izolacja i identyfikacja związków otrzymanych z metabolitów *R. ornithinolytica* i płynu celomatycznego:

Prowadzona jest dalsza analiza biologiczna i chemiczna kompleksów otrzymanych z metabolitów bakterii *R. ornithinolytica* oraz biochemiczna analiza związków otrzymanych po rozdziale chromatograficznym białek płynu celomatycznego dżdżownicy *D. veneta*.

VII. Dalsze plany badawcze:

Dalsze moje działania będą zmierzały do wdrożenia zgłoszonych do ochrony wynalazków przy współpracy z przedsiębiorcami. W planach jest charakterystyka biochemiczna i chemiczna czynników przeciwgrzybowych oraz przeciwnowotworowych płynu celomatycznego dżdżownicy *D. veneta*. Planowane jest także przebadanie działania kompleksu glikolipid-peptyd na prątki chorobotwórcze w uprawnionej do tego celu jednostce. Będzie analizowany molekularny mechanizm działania kompleksu Tris-peptydowego o aktywności przeciwnowotworowej na kilka linii komórek nowotworowych. Charakteryzowane również będą metabolity drugiego wyizolowanego szczepu - *Bacillus pumilus*. Planowane są także badania na myszach z zastosowaniem płynu celomatycznego dwóch gatunków dżdżownic.

Do zaaplikowania kompleksu o działaniu przeciwnowotworowym niezbędne jest opracowanie technologii pozwalającej uzyskiwać aktywne frakcje z kultury bakteryjnej w dużych ilościach. Pozwoli to na zastosowanie otrzymanych związków w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych. Działania w tym kierunku są również brane pod uwagę, a doświadczenia na modelu zwierzęcym będą kolejnym krokiem w kierunku aplikacyjnym.

Marta Piotka