

## **Załącznik 2**

### **Autoreferat**

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

## **Dr Bożena Pawlikowska-Pawłęga**

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii  
Instytut Biologii i Biochemii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
[bozka1996@o2.pl](mailto:bozka1996@o2.pl)  
tel. +48 81 537 59 28

### **AUTOREFERAT**

#### **1. Imię i Nazwisko**

Bożena Pawlikowska-Pawłęga

#### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

**Tytuł magistra** - Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek biologia, specjalność biologia ogólna, 15.06.1990

Tytuł pracy: „Aktywność wybranych dehydrogenaz w hodowlach komórkowych raka szyjki macicy ludzkiej HeLa S3 poddanych działaniu obniżonych temperatur”

**Stopień doktora** - Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia, 23.05.2001

Tytuł rozprawy: „Badania nad oddziaływaniem kwercetyny na błony komórkowe”

#### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (w 2011 roku przekształcony w Wydział Biologii i Biotechnologii)

1.09.1990 - 31.08.1991 asystent stażysta w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Biologii

1.09.1991 - 28.02.1995 asystent mianowany w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Biologii

1.03.1995 - 31.05.2001 samodzielne stanowisko pracy (biolog) w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii

1.06.2001 - 30.06.2003 specjalista inżynierjno-techniczny w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii

1.07.2003 - obecnie adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii

#### **4. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**

##### **a) Praca magisterska**

Po zdaniu egzaminu maturalnego w 1985 roku rozpoczęłam studia na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii). Wybraną przeze mnie specjalnością była biologia ogólna. W trakcie studiów, brałam udział w wyjazdach naukowych dotyczących restytucji susła perełkowanego *Spermophilus suslicus* w Guciowie i Tyszowcach. Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Biologii Komórki pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Górskiego. Tematyka przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczyła aktywności wybranych dehydrogenaz w hodowlach ludzkich komórek raka szyjki macicy człowieka (HeLa S3) inkubowanych w temperaturze +17 °C oraz +4 °C. Badano ponadto oddziaływanie obniżonej temperatury na wzrost i podział komórek. Białko oznaczano metodą Bradforda zaś aktywność enzymów specyficznymi metodami biochemicznymi. Badano następujące dehydrogenazy: dehydrogenazę mleczanową (LDH) - enzym szlaku glikolitycznego, dehydrogenazę jabłczanową (MDH) i izocytrynianową (ICDH) - enzymy cyklu Krebsa, dehydrogenazę glutaminianową (GLDH) i sorbitolową (SDH) - enzymy węglowodanowej i azotowej przemiany materii. Badano również zużycie glukozy przez komórki metodą toluidynową. Aktywność enzymatyczną oraz stężenie glukozy przeliczano na mikrogram białka komórkowego. W badanych hodowlach komórek oznaczano też indeks mitotyczny po wybarwieniu ich hematoksyliną i eozyną oraz, po wybarwieniu komórek metodą Alvareza, fazy cyklu komórkowego.

Stwierdzono, że obniżenie temperatur inkubacji komórek powodowało zmianę aktywności poszczególnych enzymów. Zaobserwowano zmniejszenie aktywności LDH i MDH oraz zwiększenie aktywności GLDH, SDH i ICDH. Zanotowano również zmniejszenie zużycia glukozy przez komórki oraz obniżenie ilości białka w komórkowego. Wykazano także, że hipotermia zmniejsza aktywność enzymów co prowadzi do obniżenia poziomu białka oraz metabolizmu białek i węglowodanów. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono także około 3-krotne zmniejszenie wartości indeksu mitotycznego. Wykazano również wyraźne zmniejszenie ilości komórek w metafazie oraz anafazie. Analiza faz cyklu komórkowego pozwoliła stwierdzić, że obniżenie temperatury blokuje przejście komórek z fazy S do G2 cyklu komórkowego, przy czym największy procent komórek stanowiły komórki w fazie G2.

Dnia 15 czerwca 1990 roku obroniłam pracę magisterską z wynikiem bardzo dobrym, a studia ukończyłam z wyróżnieniem.

##### **b) Praca doktorska**

Po uzyskaniu tytułu magistra rozpoczęłam pracę w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Biologii (obecnie Instytut Biologii i Biochemii) Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział

Biologii i Biotechnologii) UMCS w zespole prof. dr hab. Michała Górskiego, początkowo na stanowisku asystenta stażysty (1.09.1990 r.), a następnie od 1.09.1991 r. na stanowisku asystenta.

W tym okresie brałam udział w badaniach dotyczących wpływu związków pochodzenia roślinnego na komórki. Do badanych substancji należały kwercetyna oraz 8-metoksypsoralen. Celem tych badań było określenie wpływu badanych związków na funkcjonowanie komórek wybranych linii prawidłowych i nowotworowych oraz na strukturę i właściwości błon erytrocytów człowieka, błon komórek roślinnych oraz na sztuczne błony (liposomy). Uczestniczyłam również w pracach dotyczących indukcji apoptozy i nekrozy oraz ekspresji białek szoku termicznego przez związki pochodzenia naturalnego w komórkach nowotworowych.

Rezultaty badań, w których uczestniczyłam opublikowano w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

- Gawron, A., **Pawlikowska, B.**, 1993: Dark effect of 8-methoxypsoralen on human erythrocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 45, 1087-1089.

**IF** 1993 / **pkt** 1993 / **IF**2013 / **pkt** 2013 = **0,950 / - pkt / 2,03 / 25 pkt**

- Rzymowska, J., Gawron, A., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Jakubowicz-Gil, J., Wojcierowski, J., 1999: The effect of quercetin on induction of apoptosis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 37 (2) 125-126.

**IF** 1999 / **pkt** 1999 / **IF**2013 / **pkt** 2013 = **0,388 / 7 pkt / 1,101/ 15 pkt**

- **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Trębacz, K., Król, E., Gawron, A., 2000: Effects of quercetin and verapamil on membrane potential in the liverwort *Conocephalum conicum*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 22 (1) 61-68., *autor korespondencyjny*

**IF** 2000 / **pkt** 2000 / **IF**2013 / **pkt** 2013 = **0, 296 / - pkt / 1,31 /15 pkt**

- **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Jakubowicz-Gil, J., Rzymowska, J., Gawron, A., 2001: The effect of quercetin on the induction of apoptosis and necrosis in human colon adenocarcinoma cell line LS180. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 39 (2) 217-218, *autor korespondencyjny*

**IF** 2001 / **pkt** 2001 / **IF**2013/**pkt** 2013 = **0,594 / 7 pkt /1,101/ 15 pkt**

Wyniki przeprowadzonych badań były również tematem 6 doniesień konferencyjnych w tym dwóch międzynarodowych.

Pracę doktorską wykonywałam pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Antoniego Gawrona. Przeprowadzone badania obejmowały obserwacje morfologii komórek fibroblastów mysich i ludzkich, erytrocytów ludzkich oraz cieni erytrocytów ludzkich przy pomocy technik mikroskopii elektronowej transmisyjnej i skaningowej oraz mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej. Oceniano również rozpuszczalność kwercetyny w środowiskach o różnej polarności oraz badano działanie kwercetyny na składniki, strukturę i właściwości błon liposomów i błon naturalnych. Otrzymywane jednowarstwowe liposomy z lecytyny żółtka jaja kurzego (EYPC) oraz wielowarstwowe liposomy z

dipalmitoylofosfatydylocholiny (DPPC) badano z wykorzystaniem techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego, kalorymetrii różnicowej oraz absorpcji ultradźwięków.

W pierwszym etapie doświadczeń rejestrowano widma absorpcji światła nasyconych roztworów kwercetyny w rozpuszczalnikach o różnej polarności, w tym także w jednowarstwowych liposomach z EYPC, i ustalono że kwercetyna posiada duże powinowactwo do środowiska o niskiej polarności, w tym także do fosfolipidów. Następnie mierząc pochłanianie ciepła przez wielowarstwowe liposomy DPPC ustalono że kwercetyna powoduje obniżenie temperatury i kooperatywności przejścia fazowego lipidów. Największe zmiany zanotowano w liposomach zawierających kwercetynę w stężeniu 10 mol%. W badaniach lipidów metodą absorpcji ultradźwięków oceniano tłumienie nadmiarowe przypadające na długość fali i wykazano wzrost absorpcji energii fali akustycznej niezbędnej do zmiany stanu skupienia fosfolipidów w obecności kwercetyny.

Kolejne badania dotyczyły zmian płynności błon pod wpływem badanego flawonoidu. Do oceny wpływu badanego związku na strukturalne i dynamiczne właściwości błon wykorzystano technikę elektronowego rezonansu paramagnetycznego znaczników w liposomach EYPC i DPPC oraz białkowo-lipidowych błonach erytrocytów. W badaniach zastosowano sondy (znaczniki) penetrujące błonę na różnej jej głębokości. 16-SASL (kwas 16-doksylostearynowy) umożliwił badanie błony w hydrofobowej warstwie fosfolipidów, 5-SASL (kwas 5-doksylostearynowy) testował uporządkowanie łańcuchów alkilowych w regionie hydrofobowym przyległym do głów polarnych. Znacznik Tempo penetrował błonę w rejonie głów polarnych. W pomiarach EPR błon erytrocytów ludzkich stosowano znaczniki: 16-SASL, Tempo (2,2,6,6-tetrametylo-piperidino-1-oksyl) oraz znacznik białkowy 4-maleimido Tempo do badania zmian konformacyjnych białek błonowych. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono niewielki wpływ kwercetyny na wartości  $2T'_{\parallel}$  w rejonie hydrofobowym w połowie głębokości błony jak i w regionie przyległym do głów. Największe zmiany w płynności błon wykazano w rejonie głów polarnych. Wykazano wzrost penetracji znacznika Tempo do fazy lipidowej w temperaturze poniżej przejścia fazowego. W temperaturach wyższych od temperatury przejścia fazowego, w warunkach większej ruchliwości lipidów, kwercetyna utrudniała penetrację znacznika pomiędzy lipidy z powodu zwiększonej inkorporacji do błony i jej przestrzennej lokalizacji. Z tego powodu wartość współczynnika podziału pomiędzy fazę lipidową a wodną zmniejszyła się. W błonach erytrocytów kwercetyna lokalizowała się również w rejonie głów polarnych. Wykazano także, że kwercetyna wpływała na konformację białek błonowych. Zmiany w lipidach i białkach błony powodowały zaburzenie ultrastruktury błon erytrocytów oraz zmniejszenie ilości białek błonowych o masie ok. 30 kD.

W celu oceny skutków „obecności” kwercetyny w błonie przeprowadzono testy odporności krwinek czerwonych na działanie czynników hemolizujących. Jak wykazały badania kwercetyna zwiększała odporność krwinek czerwonych na działanie roztworu hipotonicznego oraz potęgowała hemolizę indukowaną ciepłem.

Wykazano też hamowanie proliferacji komórek fibroblastów mysich (NCTC) *in vitro* oraz zaburzenia przebiegu mitozy w hodowlach badanych komórek pod wpływem badanego flawonoidu.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były tematem 4 artykułów opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

- **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gawron, A., 1995: Effect of quercetin on the growth of mouse fibroblast cells *in vitro*. **Polish Journal of Pharmacology**. 47, 531-535., *autor korespondencyjny*  
**IF<sub>1995</sub> / pkt<sub>1995</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = - / - pkt / - / 15 pkt**
- Wójtowicz, K., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gawron, A., Gruszecki, W.I., 1996: Modifying effect of quercetin on the lipid membrane. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 34, (1) 49-50.  
**IF<sub>1996</sub> / pkt<sub>1996</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = - / - pkt / 1,101 / 15 pkt**
- **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gruszecki, W.I., Misiak, L.E., Gawron, A., 2003: The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. **Biochemical Pharmacology**. 66, 605-612. (opublikowany po doktoracie), *autor korespondencyjny*  
**IF<sub>2003</sub> / pkt<sub>2003</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 2,993 / 21 pkt / 4,576 / 40 pkt**
- **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gruszecki, W. I., Misiak, L.E., Paduch, R., Piersiak, T., Zarzyka, B., Pawelec, J., Gawron, A., 2007: Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head groups. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1768, 2195-2204. (opublikowany po doktoracie), *autor korespondencyjny*  
**IF<sub>2007</sub> / pkt<sub>2007</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 3,640 / 24 pkt / 3,389 / 35 pkt**

oraz 11 doniesień konferencyjnych. Obrona dysertacji doktorskiej pt. „Badania nad oddziaływaniem kwercetyny na błony komórkowe” na podstawie, której uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych odbyła się 23 maja 2001 roku.

Łączny *impact factor* ww. opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **8,861** (zgodnie z rokiem 2013 **IF<sub>2013</sub> 14,608**). Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **59 pkt** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW<sub>2013</sub> 175 pkt**).

## 5. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora stanowi:

- 20 prac eksperymentalnych w tym 16 w czasopismach z listy JCR
- 34 doniesień zjazdowych w tym 10 na konferencjach międzynarodowych i jedna prezentacja ustna

Łączny *impact factor* opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **36,579** (zgodnie z rokiem 2013 **IF<sub>2013</sub> 40,334**). Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **360 pkt** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW<sub>2013</sub> 521 pkt**).

Spośród artykułów naukowych opublikowanych po doktoracie 7 prac eksperymentalnych weszło w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem habilitacji.

**Wskazanie osiągnięcia wynikającego 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 ze zm.):**

### a) tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl siedmiu publikacji pod wspólnym tytułem:

***Badania lokalizacji, interakcji i molekularnego mechanizmu działania apigeniny, genisteiny oraz kwercetyny z błonami w wybranych modelach badawczych***

### b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

**Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to 7 oryginalnych prac eksperymentalnych:**

(przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania i zgodnie z rokiem 2013)

1. Pawlikowska-Pawłęga, B., Król, E., Trębacz, K., Gawron, A., 2007: The influence of apigenin on membrane and action potential in the liverwort *Conocephalum conicum*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 29, 143-149.

**IF<sub>2007</sub> / pkt<sub>2007</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,295 / 10 pkt / 1,31 / 25 pkt, autor korespondencyjny**

2. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Król, E., Trębacz, K., Gawron, A., 2009: Genistein and changes of resting and action potentials in *Conocephalum conicum*. **Journal of Plant Physiology**. 166, 712-719.

**IF** 2009 / **pkt** 2009 / **IF**2013/ **pkt** 2013 = **2,5 / 20 pkt / 2,70 / 35 pkt**, *autor korespondencyjny*

3. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Król, E., Trębacz, K., Gawron, A., 2011: Quercetin and genistein hindering effect of neomycin-action in the liverwort *Conocephalum conicum*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 33, 1335-1344.

**IF** 2011 / **pkt**2011 / **IF**2013/ **pkt** 2013 = **1,639 / 25 pkt / 1,31 / 25 pkt**, *autor korespondencyjny*

4. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Misiak, L.E., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., Gruszecki, W.I., 2012: Localization and interaction of genistein with model membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. 1818, 1785-1793.

**IF** 2012 / **pkt** 2012 / **IF**2013/ **pkt** 2013 = **3,99 / 35 pkt / 3,389 /35 pkt**, *autor korespondencyjny*

5. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Misiak, L.E., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., Gruszecki, W.I., 2013: FTIR, <sup>1</sup>H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. 1828, 518-527.

**IF**2013 / **pkt** 2013 / **IF**2013/ **pkt** 2013 = **3,389 / 35 pkt / 3,389 / 35 pkt**, *autor korespondencyjny*

6. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Dziubińska, H., Król, E., Trębacz, K., Jarosz-Wilkofazka, A., Paduch, R.,Gawron, A., Gruszecki, W.I., 2014: Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. 1838, 254-265.

**IF**2013 / **pkt** 2013 = **3,389 / 35 pkt**, *autor korespondencyjny*

7. **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Misiak L.E., Jarosz-Wilkofazka, A., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., Gruszecki, W.I., 2014: Biophysical characterization of genistein-membrane interaction and its correlation with biological effect on cells - the case of EYPC liposomes and human erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. 1838, 2127-2138.

**IF** 2013 / **pkt** 2013 = **3,389 / 35 pkt**, *autor korespondencyjn*

Łączny *impact factor* opublikowanych prac z cyklu habilitacyjnego zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **18,591** (zgodnie z rokiem 2013 **IF**2013 **18,876**). Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **195 pkt** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW**2013 **225 pkt**).



### **c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników**

#### **Wprowadzenie - przedmiot badań**

W ostatnich latach związki pochodzenia roślinnego - flawonoidy, cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na ich właściwości antyoksydacyjne i antynowotworowe. Flawonoidy są zróżnicowaną grupą metabolitów wtórnych, występujących powszechnie w roślinach. Dane literaturowe wskazują, że do grupy tej należy ponad 10000 związków (Tahara, 2007). Apigenina (4',5,7- trójwodorotlenowy flawon), genisteina (4',5,7-trójwodorotlenowy izoflawon) oraz kwercetyna (3,3',4',5,7-pięciowodorotlenowy flawon) należą do flawonoidów. Te naturalne związki występują w wielu warzywach oraz owocach. Szacuje się, że człowiek spożywa dziennie ok. 1-2 g flawonoidów. Głównym źródłem genisteiny jest soja, apigeniny - seler, pietruszka oraz pomarańcze, zaś kwercetyny - jabłka, cebula, kapusta. W mniejszych ilościach flawonoidy te występują w pomidorach, herbacie, czerwonym winie oraz grejpfrutach. Flawonoidy, ze względu na pozytywny wpływ na zdrowie, są ważnym składnikiem diety człowieka (Havsteen, 2002). Od dawna były i są wykorzystywane jako naturalne leki w terapii wielu schorzeń. Wyniki badań wskazują również, że mogą być one stosowane jako naturalne leki w terapii chorób nowotworowych (Majewska, Cieczot, 2009). Z licznych badań wynika, że flawonoidy wykazują zdolność wymiatania wolnych rodników w wielu systemach *in vitro* w tym również w wyizolowanych lipidach błonowych (Havsteen, 2002). Zatrzymują cykl komórkowy, hamują uwolnienie cytochromu c do cytozolu oraz indukują programowaną śmierć komórek - apoptozę (Pawlikowska-Pawłęga, 2001, Gupta i in., 2002, Shukla i Gupta, 2004). Wykazano, też że hamują one aktywność enzymów ważnych w promocji nowotworów czy istotnych w regulacji wzrostu komórek nowotworowych takich jak dekarboksylaza ornitynowa czy tyrozynaza. Związki te wykazują właściwości estrogenne wiążąc się z receptorami estrogenowymi, przez co odgrywają ważną rolę w terapii zaburzeń związanych z okresem menopauzy, w profilaktyce osteoporozy, a także w schorzeniach układu krążenia i układu nerwowego (Havsteen, 2002, Hendrich, 2006, Teisseyre i Michalak, 2005). Wskazuje się również na skuteczność apigeniny, genisteiny oraz kwercetyny jako modulatorów aktywności enzymów błonowych. Apigenina i kwercetyna wpływają na transport jonów wapniowych i chlorkowych poprzez oddziaływanie na kanały błonowe. Obniżają potencjał transbłonowy w mitochondriach komórek HL-60 (Wang, 1999, Pawlikowska-Pawłęga, 2000, Havsteen, 2002).

Dla biologicznych właściwości flawonoidów istotna jest ich zdolność do wchodzenia w interakcje z dwuwarstwą lipidową (Daoud, 1992, Hendrich, 2006, Michalak i Hendrich, 2002, Pawlikowska-Pawłęga, 2003, 2007) jak również z białkami błonowymi (Pawlikowska-Pawłęga, 2003, Łania-Pietrzak, 2005). Te naturalne związki mogą działać na poziomie różnych błon biologicznych jak również wewnątrz przedziałów komórkowych, które są otoczone przez błony. Tak więc by osiągnąć cel swojego działania w komórkach muszą pokonać barierę błonową. Z badań

eksperymentalnych wynika, że naturalne leki zmieniające właściwości błon generują wielorakie efekty, prowadzące finalnie, między innymi, do aktywności antynowotworowych tych związków (Hendrich, 2006).

Literatura:

Daoud, S.S., 1992: Cell membranes as targets for anti-cancer drug action. *Anti - Cancer Drugs*. 3, 443-453.

Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2002: Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*. 21, 3727-38.

Havsteen, B.H., 2002: The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*. 96 (2-3), 67-202.

Hendrich, A.B., 2006: Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. 27: 27-40.

Majewska, M., Czczot, H., 2009: Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farmacja Polska*. 65 (5), 369-377.

Michalak, K., Hendrich, A.B., 2002: The role of cell membrane lipids in multidrug resistance and its modulation. *Postępy Biochemii*. 48, 208-219.

**Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Trębacz, K., Król, E., Gawron, A., 2000: Effects of quercetin and verapamil on membrane potential in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 22 (1) 61-68.

**Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Jakubowicz-Gil, J., Rzymowska, J., Gawron, A., 2001: The effect of quercetin on the induction of apoptosis and necrosis in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 39 (2) 217-218.

**Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gruszecki, W.I., Misiak, L.E., Gawron, A., 2003: The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*. 66, 605-612.

**Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gruszecki, W. I., Misiak, L.E., Paduch, R., Piersiak, T., Zarzyka, B., Pawelec, J., Gawron, A., 2007: Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768, 2195-2204.

Shukla, S., Gupta, S., 2004: Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol. Carcinog*. 39, 114-126.

Tahara, S. 2007: A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 71, 1387-1404.

Teisseyre, A., Michalak, K., 2005: Genistein inhibits the activity of Kv1.3 potassium channels in human T lymphocytes. *J Membrane Biol*. 205, 71-79.

Wang, I.K., Lin - Shiau, S.Y., Lin, J.K., 1999: Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*. 15, 1517-25.

## Cel badań

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej, wskazały wyraźnie na aktywne działanie kwercetyny - jednego z flawonoidów, na składniki błony komórkowej. Jednocześnie liczne badania laboratoryjne i kliniczne wskazują na duże możliwości zastosowania flawonoidów w terapii wielu chorób, w tym chorób nowotworowych. Zdolność oddziaływania flawonoidów z błonami komórkowymi jest więc istotna z biologicznego i medycznego punktu widzenia i jest w części związana z zastosowaniem tych naturalnych związków jako antyoksydantów i leków przeciwnowotworowych. Równocześnie z literatury wynika, że flawonoidy mogą w różny sposób oddziaływać na cytomembranę. Przyczyna tej odmienności wynika z różnic w liczbie i rozmieszczeniu grup hydroksylowych, stopnia polaryzacji jak również obecności dodatkowych grup w pierścieniu C.

Powszechne występowanie flawonoidów w diecie, ich potencjalne właściwości farmakologiczne oraz uznanie ich jako stosunkowo bezpieczne dla człowieka (niska toksyczność i korzystne oddziaływanie na zdrowie) spowodowały, że trzy wybrane flawonoidy stały się obiektem mojego zainteresowania. Dlatego w swoich badaniach zastosowałam: apigeninę - reprezentującą flawony, kwercetynę - przedstawiciela flawonoli oraz genisteinę - należącą do izoflawonów. W badaniach szczególnie, starałam się wyjaśnić molekularny mechanizm interakcji pomiędzy badanymi flawonoidami a dwuwarstwą lipidową błony, jak również zwróciłam uwagę na skutki obecności badanych związków w błonach, na komórki i błony.

Badania obejmowały 5 głównych zagadnień:

1. Oddziaływanie flawonoidów (apigeniny, genisteiny i kwercetyny) oraz blokerów kanałów wapniowych (werapamilu i neomycyny) na elektryczne właściwości błony komórkowej wątrobowca - *Conocephalum conicum*.
2. Wpływ w/w flawonoidów na dynamiczne i strukturalne właściwości błon liposomów sporządzonych z lecytyny jaja kurzego (EYPC) lub z dipalmitoylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz błonę erytrocytów człowieka.
3. Badania molekularnego mechanizmu interakcji między badanymi flawonoidami a błonami liposomów DPPC.
4. Organizacja systemu błon wewnętrznych w wybranych komórkach prawidłowych i nowotworowych.
5. Enzymy antyoksydacyjne, poziom rodników tlenowych, morfologia i ultrastruktura komórek HeLa.

## **Omówienie wyników przeprowadzonych badań**

Flawonoidy - związki pochodzenia roślinnego, są ważne również dla roślin. Chronią bowiem rośliny przed stresem wywołanym czynnikami abiotycznymi i biotycznymi. Wychwytyują reaktywne formy tlenu, które powstają w wyniku aktywności metabolicznej organizmów roślinnych, a także pod wpływem działania czynników stresowych. Ponadto flawonoidy biorą udział w reakcjach obronnych roślin przeciwko mikroorganizmom patogennym: bakteriom, wirusom i grzybom. Flawonoidy znane są nie tylko jako atraktanty, ale także, jako substancje odstrasżające owady czyli repelenty. W organizmach roślinnych pełnią funkcje substancji przekaźnikowych, regulują poziom kwasu indolilo-3-ocetowego (IAA) w komórce. Są cząsteczkami sygnałowymi w procesach symbiozy i mikoryzy. Wydzielane przez roślinę, mogą działać, jako inhibitory kiełkowania i rozwoju roślin. Ponadto są katalizatorami transportu elektronów podczas fotosyntezy, uczestniczą w regulacji kanałów jonowych, a także pełnią funkcję inhibitorów enzymatycznych [**Acta Physiologiae Plantarum, 2007; Journal of Plant Physiology, 2009; Acta Physiologiae Plantarum, 2011**].

W literaturze, jak dotąd, nie było doniesień, na temat oddziaływania flawonoidów - apigeniny i genisteiny, na potencjał transmembranowy oraz amplitudy potencjałów czynnościowych u roślin, zwłaszcza u *Conocephalum conicum*. Dlatego przeprowadzone w tym kierunku badania miały charakter pionierski. W pierwszym etapie podjęłam serię badań [**Acta Physiologiae Plantarum, 2007; Journal of Plant Physiology, 2009; Acta Physiologiae Plantarum, 2011**] na dobrze opracowanym w elektrofizjologii modelu - wątrobowcu *Conocephalum conicum*. Jest on starą filogenetycznie rośliną porastającą wilgotne siedliska o podłożach zasadowych. Równocześnie jest bardzo pobudliwą rośliną (niski próg pobudliwości) i z tego względu jest bardzo dogodnym obiektem badań elektrofizjologicznych. Jego wielokomórkowa plecha posiada gęsto upakowane komórki połączone przez plazmodesmy. Nie ma zróżnicowanych tkanek i nie posiada wiązek przewodzących. U *Conocephalum* potencjały czynnościowe (AP) powstają w odpowiedzi na różne bodźce w tym mechaniczne, elektryczne, świetlne czy chemiczne. Potencjały czynnościowe są zgodne z prawem wszystko-albo-nic. W mechanizmie jonowym potencjału czynnościowego na początku (po podrażnieniu komórki) następuje napływ jonów wapnia do cytoplazmy. Wejście jonów wapnia do cytozolu powoduje otwieranie się zależnych od napięcia i wapnia kanałów chlorkowych w błonie komórkowej. Do depolaryzacji prowadzi więc wpływ jonów chloru. Repolaryzacja następuje w wyniku wypływu z komórki jonów potasu.

Dane literaturowe wskazywały, że apigenina (4',5,7-trójwodorotlenowy flawon) jest związkiem, którego jednym z celów biologicznych w komórce roślinnej są błony. Równocześnie moje poprzednie badania dotyczące kwercetyny wykazały aktywne działanie kwercetyny w błonach *Conocephalum*. Dlatego w pierwszym doświadczeniu określającym wpływ flawonoidów na potencjał transmembranowy oraz amplitudy potencjałów czynnościowych u wątrobowca *Conocephalum*

*conicum*, metodą wewnątrzkomórkową, zastosowałam apigeninę - flawonoid strukturalnie podobny do kwercetyny ale równocześnie posiadający mniej grup hydroksylowych [Acta Physiologiae Plantarum, 2007]. W pracy badałam oddziaływanie samej apigeniny oraz apigeniny w połączeniu z werapamillem - inhibitorem kanałów wapniowych plazmalemy. Rośliny były pobudzane zarówno bodźcami świetlnymi jak i elektrycznymi. W doświadczeniach kontrolnych średnie wartości amplitud potencjału czynnościowego (AP) wynosiły  $95 \pm 8$  mV,  $93 \pm 23$  mV,  $77 \pm 32$  mV,  $66 \pm 4$  mV, odpowiednio podczas drugiej, trzeciej, czwartej i piątej godziny eksperymentów. U roślin traktowanych apigeniną obserwowano znaczny, w porównaniu do kontroli, wzrost potencjałów czynnościowych. Pierwsze efekty obserwowano dwie godziny po dodaniu apigeniny. Przeciętna wartość amplitudy potencjału czynnościowego (AP) wynosiła odpowiednio  $156 \pm 32$  mV i  $139 \pm 35$  mV podczas 3 i 4 godziny eksperymentu. Po 5 i 6 godzinach eksperymentu amplitudy wzrosły o 131 i 100 % w odniesieniu do kontroli i wynosiły odpowiednio,  $164 \pm 22$  mV i  $171 \pm 28$  mV. Średni czas półwkowy ( $t_{1/2}$ ) potencjałów czynnościowych obniżył się u roślin traktowanych apigeniną o 54-62 %. W porównaniu do średniego potencjału transmembranowego (MP) u roślin kontrolnych ( $-147 \pm 9$  mV) obserwowano niewielki wzrost wartości MP (o 14, 18, 26 %) w czwartej, piątej i szóstej godzinie eksperymentu u roślin traktowanych apigeniną.

Z pomiarów z zastosowaniem blokerów kanałów wapniowych wiadomo, że we wczesnej fazie powstawania potencjałów czynnościowych ma miejsce napływ jonów wapnia do cytozolu, a blokery hamując ich napływ uniemożliwiają powstanie potencjału błonowego. W pracy preinkubowano rośliny z badanym flawonem aby sprawdzić czy apigenina jest zdolna do ochrony komórek przed hamującym działaniem werapamilu - inhibitora kanałów wapniowych plazmalemy. Wyniki uzyskane w drugiej części doświadczeń wykazały, że u roślin traktowanych apigeniną amplitudy potencjałów czynnościowych były utrzymywane na stosunkowo wysokim poziomie i dodanie werapamilu ( $500 \mu\text{M}$ ) nie powodowało zmian średnich wartości amplitud potencjałów czynnościowych. Wynosiły one  $122 \pm 25$  mV,  $135 \pm 22$  mV i  $129 \pm 7$  mV, odpowiednio w szóstej, siódmej i ósmej godzinie eksperymentu. Różnice w wartościach AP pomiędzy kontrolą (sam werapamil) i roślinami badanymi (werapamil + apigenina) były statystycznie znamienne. Jednocześnie odnotowano zmniejszenie czasu trwania AP. Wartości potencjału transmembranowego (MP) nie różniły się znacznie od kontroli.

Wyniki uzyskane na *Conocephalum* potwierdziły zatem oddziaływanie apigeniny na elektryczne własności błon komórkowych. Apigenina spowodowała znaczny wzrost wartości AP, MP oraz skrócenie czasu trwania AP. Badany flawon zdolny jest do ochrony komórek przed hamującym działaniem werapamilu na potencjały czynnościowe. Wydaje się więc, że apigenina może oddziaływać na białko kanału wapniowego zapobiegając w ten sposób blokującemu działaniu werapamilu.

W kolejnej pracy [Journal of Plant Physiology, 2009] badałam zmiany potencjału błonowego pod wpływem innego flawonoidu, występującego w dużej ilości w soi i

reprezentującego grupę izoflawonów. Współczynnik penetracji genisteiny między fazą lipidową a wodną (tzw. współczynnik penetracji do błony;  $K_p$ ) wynosi  $200 \pm 50$ , co wskazuje na silnie hydrofobową naturę tego związku. Można było więc przypuszczać, że tak silnie hydrofobowy polifenol jest zdolny w dużym stopniu zmieniać właściwości błony. W badaniach zastosowałam pomiary za pomocą wewnątrzkomórkowych mikroelektrod i postanowiłam zbadać oddziaływanie genisteiny oraz genisteiny w kombinacji z werapamillem na potencjały spoczynkowe i czynnościowe. Obiektem badań był, podobnie jak w poprzedniej pracy, wątrobowiec *Conocephalum conicum* - roślina łącząca glony z roślinami wyższymi.

Rośliny pobudzano zarówno bodźcami elektrycznymi jak i świetlnymi. W eksperymentach kontrolnych, przeciętne wartości amplitud AP wynosiły  $95 \pm 8$  mV,  $94 \pm 8$  mV,  $78 \pm 13$  mV i  $64 \pm 4$  mV, odpowiednio podczas drugiej, trzeciej, czwartej i piątej godziny eksperymentu. Zastosowanie roztworu genisteiny o stężeniu  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  spowodowało znaczny (o 13-62%), w porównaniu do kontroli, wzrost potencjałów czynnościowych. Średnia wartość amplitudy potencjału czynnościowego (AP), niezależnie od rodzaju stymulacji, wynosiła odpowiednio  $106 \pm 3$  mV,  $111 \pm 15,22$  mV,  $106 \pm 1,81$  mV,  $108 \pm 2,45$  mV podczas trzeciej, czwartej, piątej i szóstej godziny eksperymentu. W porównaniu do średniego potencjału transmembranowego (MP) u roślin kontrolnych ( $-145 \pm 9,5$  mV) obserwowano statystycznie znamienne i znaczny wzrost wartości MP (o 30 34, 36 %) w czwartej, piątej i szóstej godzinie eksperymentu. Zastosowanie genisteiny wywoływało też znaczne przesunięcie maksimum depolaryzacji.

W drugiej części doświadczenia rośliny traktowano wstępnie badanym izoflawonem po czym dodawano werapamil - inhibitor kanałów wapniowych błony komórkowej. Zastosowanie werapamilu ( $500 \mu\text{M}$ ) w połączeniu z genisteiną nie powodowało zmian średnich wartości amplitud potencjałów czynnościowych. Utrzymywały się one na stosunkowo wysokim poziomie i wynosiły  $117 \pm 7$  mV,  $97 \pm 17$  mV i  $89 \pm 7$  mV, odpowiednio w szóstej, siódmej i ósmej godzinie eksperymentu. Natomiast zastosowanie samego werapamilu powodowało silne obniżenie wartości potencjałów czynnościowych, a w siódmej godzinie eksperymentu całkowity ich zanik. Różnice w wartościach AP pomiędzy kontrolą (sam werapamil) i roślinami badanymi (werapamil + genisteina) były statystycznie znamienne. Wartości potencjału transmembranowego (MP) różniły się znacznie od kontroli. Średnie wartości MP wynosiły odpowiednio  $-178 \pm 5$  mV,  $-172 \pm 5$  mV,  $-171 \pm 5$  mV,  $-163 \pm 7$  mV podczas 5, 6, 7 i 8 godziny eksperymentu.

Wyniki uzyskane na *Conocephalum* potwierdziły zatem silne oddziaływanie genisteiny na elektryczne właściwości błon. Spowodowała ona nie tylko wzrost wartości AP ale również MP. W odpowiedzi na perfuzję komórek genisteiną obserwowano hiperpolaryzację stąd też wywnioskowano że obserwowany wzrost wartości AP musiał być związany ze wzrostem potencjału spoczynkowego. Ponieważ działanie pompy protonowej jest istotne w powstawaniu AP, szczególnie w fazie repolaryzacji (utrzymywanie wysokiego MP) wydaje się więc, że genisteina może modulować

aktywność werapamilu w stosunku do pompy protonowej ( $H^+$  ATPazy) i zmieniać elektryczne reakcje komórek plechy. Nie należy wykluczać oddziaływania genisteiny na białko kanału wapniowego.

Podsumowując powyższe obserwacje, wykazałam, że zarówno apigenina jak i genisteina zmieniają odpowiedzi elektryczne komórek, jak również zapobiegają blokującemu działaniu werapamilu (inhibitora kanałów wapniowych w błonie komórkowej) na potencjały czynnościowe u *Conocephalum conicum*.

Ze względu na udział kanałów wapniowych w generowaniu potencjałów czynnościowych i fakt, że źródła jonów wapnia mogą być różne w komórkach roślinnych, w dalszej części badań [**Acta Physiologiae Plantarum, 2011**] postanowiłam sprawdzić wpływ flawonoidów (apigeniny, genisteiny i kwercetyny) w połączeniu z inhibitorem wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych - neomycyną, na pobudliwość wątrobowca *C. conicum*. Organella komórkowe posiadają bowiem znaczne zasoby jonów wapnia. Do tej pory wykazano występowanie kanałów wapniowych w błonie wakuolarnej, tylakoidowej, jądrowej i retikulum endoplazmatycznego (ER). Kanały wapniowe wewnętrznych błon komórkowych pozwalają na przepływ  $Ca^{2+}$  z wewnętrznych organelli komórkowych do cytoplazmy i są głównie aktywowane przez trisfosforan inozytoli ( $IP_3$ ), który z kolei jest wytwarzany w odpowiedzi na aktywację fosfolipazy C (PLC).  $IP_3$  powoduje otwieranie kanałów wapniowych błon ER. Produkcja  $IP_3$  jest efektem działania różnych bodźców m.in. światła. Jest również napięciowo-zależna. Neomycyna, hamując aktywność PLC powoduje blokowanie wypływu jonów wapnia z wewnętrznych magazynów komórki tj. retikulum endoplazmatycznego.

W pierwszej części badań oceniałam wpływ neomycyny. W roślinach infiltrowanych wyłącznie roztworem standardowym średnie wielkości amplitud AP wynosiły  $87 \pm 7$  mV,  $95 \pm 7$  mV,  $88 \pm 6$  mV,  $78 \pm 6$  mV,  $67 \pm 6$  mV odpowiednio w pierwszej, drugiej, trzeciej, czwartej i piątej godzinie eksperymentu. Zastosowanie neomycyny spowodowało statystycznie znaczne obniżenie wartości amplitud potencjałów czynnościowych ( $21 \pm 7$  mV) czemu towarzyszyła znaczna depolaryzacja MP. W kontrolnym eksperymencie średnia wartość potencjału transmembranowego wynosiła  $-147 \pm 5.5$  mV podczas gdy u roślin traktowanych neomycyną ta wartość zmalała nawet o 49 %. Zanotowano również przesunięcie maksimum depolaryzacji w kierunku mniej ujemnych wartości oraz zwiększenie czasu trwania potencjałów czynnościowych mierzonych w połowie wysokości amplitudy.

W drugiej części eksperymentów, po wstępnej infiltracji roślin roztworem standardowym z badanym flawonoidem, następowała wymiana roztworu na roztwór zawierający oprócz flawonoidu neomycynę. Inkubacja roślin z apigeniną i neomycyną powodowała stopniowe, powolne obniżenie wielkości amplitud AP. Równocześnie następowało przesunięcie maksimum depolaryzacji w kierunku bardziej ujemnych wartości i skrócenie czasu trwania AP.

Zastosowanie genisteiny albo kwercetyny w kombinacji z neomycyną zapobiegało blokującemu działaniu neomycyny. Po sześciu godzinach obserwowano wciąż wysokie wartości potencjałów czynnościowych ( $79 \pm 7$  mV w przypadku genisteiny oraz  $84 \pm 7$  mV dla kwercetyny). Wartości MP

różniły się znacznie od wartości kontrolnych i wynosiły w przypadku roślin inkubowanych z genisteiną  $-124 \pm 7$  mV w ósmej godzinie eksperymentu, zaś w przypadku roślin traktowanych roztworem kwercetyny i neomycyny  $-159 \pm 18$  mV w tej samej godzinie eksperymentu. Oba flawonoidy powodowały znaczne skrócenie czasu trwania APs.

Podsumowując powyższe obserwacje, wykazałam, że kwercetyna i genisteina zapobiegały inhibicji wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych przez neomycynę. Natomiast apigenina nie wpływała na działanie neomycyny na błony. Działaniu kwercetyny towarzyszył skrócony czas trwania APs oraz hiperpolaryzacja błon *Conocephalum*, co może wskazywać na stymulujące działanie kwercetyny na pompę protonową.

Na bazie powyższych wyników jak również innych prac można było przypuszczać, że flawonoidy wchodzą w interakcje z błonami bezpośrednio lub pośrednio. Zmiana właściwości lipidów błonowych może mieć nie tylko znaczenie dla antyoksydacyjnego działania flawonoidów ale również może modulować aktywność białek integralnych błon i w konsekwencji wpływać na transport i inne procesy związane z błonami. Dlatego w kolejnej fazie eksperymentów [**Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2012; Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2013**] postanowiłam dokonać analiz płynności błon sporządzonych z dipalmitoylofosfatydylocholino (DPPC) techniką  $^1\text{H}$  NMR (jądrowy rezonans magnetyczny) w połączeniu z analizą tego samego parametru metodą EPR (elektronowy rezonans paramagnetyczny) w celu uzupełnienia danych i ich porównania. Wzięłam pod uwagę fakt, że stosunkowo niewiele prac wykorzystuje technikę EPR do badań oddziaływań flawonoidów z błonami. Ponadto, nowym elementem proponowanych badań była próba stwierdzenia, za pomocą techniki FTIR (absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera), w jaki sposób i w jakim stopniu badane flawonoidy - genisteina oraz apigenina oddziałują z lipidami DPPC. W literaturze nie było bowiem dotychczas danych dotyczących molekularnego mechanizmu interakcji genisteiny i apigeniny z błonami, ważnego z punktu widzenia biologicznego jak i medycznego. Badania uzupełnione zostały analizą zmian organizacji systemu błon wewnętrznych komórek linii prawidłowych w mikroskopie fluorescencyjnym oraz elektronowym. Te badania były częściowo wykonane w ramach grantu „Molecular Spectroscopy for BioMedical Science” finansowanego przez FNP nr TEAM/2011-7/2 oraz grantu Prorektora UMCS NB-14/2008.

Analiza widm  $^1\text{H}$  NMR liposomów, w których widoczne są odpowiednie pasma rezonansowe pochodzące z różnych fragmentów cząsteczek lipidów ulokowanych w różnych rejonach dwuwarstwy lipidowej błony, pozwoliła na dokładne sprawdzenie oddziaływania genisteiny na błony [**Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2012**]. W widmach bowiem widoczne są pasma rezonansowe  $^1\text{H}$  w grupach  $-\text{CH}_2$  i  $-\text{CH}_3$  z regionu hydrofobowego oraz pasma reprezentujące region cholinowych głów polarnych. Na skutek zastosowania jonów prazeodymu ( $\text{Pr}^{3+}$ ), po uformowaniu liposomów, sygnały rezonansowe pochodzące od protonów w grupach cholinowych ulegają rozdzieleniu. Pasma przesunięte w kierunku wyższych wartości (ppm) odpowiada strefie grup cholinowych zewnętrznej warstwy liposomów pozostającej w kontakcie z  $\text{Pr}^{3+}$ , zaś pasmo przesunięte



w kierunku niższych wartości (ppm) odpowiada strefie grup cholinowych wewnętrznej warstwy liposomów. Badania techniką NMR wykazały że dodanie genisteiny zwiększyło wartości szerokości połówkowej maksimum odpowiadającego grupom  $-CH_3$  w warstwie hydrofobowej lipidów ( $\nu$ ) o 56 % i maksimum odpowiadającego grupom  $-CH_2$  o 142 %. Równocześnie obserwowano zwiększenie wartości szerokości połówkowej maksimum z rejonu grup polarnych fosfolipidów z wewnętrznej warstwy liposomów o 344 %. Obecność izoflawonu spowodowała też zmniejszenie parametru rozszczepienia ( $\delta$ ) maksimum odpowiadającego grupom cholinowym o 54 %. Dane NMR wskazały zatem na silnie usztywniające działanie genisteiny w stosunku do błon DPPC. Genisteina oddziałuje na warstwę hydrofobową łańcuchów alkilowych i lokalizuje się w rejonie głów polarnych, zmniejszając penetrację jonów  $Pr^{3+}$  w tym obszarze błony. W ramach przeprowadzonych doświadczeń analizowałam również zmiany strukturalnych i dynamicznych właściwości błon pod wpływem genisteiny za pomocą techniki EPR. Wyniki potwierdziły usztywniające działanie badanego związku w rejonie hydrofobowym w fazie ciekło-krystalicznej ( $L_\alpha$ ). Genisteina w stężeniu 5 mol% obniżyła wartości wysokości linii centralnej ( $h_0$ ) otrzymane dla znacznika 16-SASL (kwas 16-doksylostearynowy) powyżej temperatury głównego przejścia fazowego (41 °C).

W celu poznania molekularnego mechanizmu interakcji pomiędzy błonami a genisteiną w dalszej części badań zastosowałam spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni (FTIR), która jest czułą techniką umożliwiającą analizy oddziaływań molekularnych, między innymi w błonach lipidowych. Dzięki tej metodzie możliwe jest zbadanie wpływu dodatkowych składników na właściwości błony jak również wpływ samej błony na znajdujące się w niej cząsteczki. W widmach absorpcyjnych w podczerwieni czystych liposomów naniesionych na kryształ ZnSe poprzez odparowanie buforu przygotowanego na bazie  $D_2O$  są widoczne pasma odpowiadające różnym drganiom. Rejon widma 3500-3000  $cm^{-1}$  jest charakterystyczny dla drgań rozciągających O-H. Region 2800-3000  $cm^{-1}$  odpowiada drganiom rozciągającym (symetrycznym i antysymetrycznym) grup  $-CH_2$  i  $-CH_3$ . Stosunkowo silne pasmo z maksimum w 1735  $cm^{-1}$  jest charakterystyczne dla drgań rozciągających estrowych grup karbonylowych w DPPC. Pasma 1467  $cm^{-1}$  reprezentuje drgania nożycowe grup  $-CH_2$ , zaś pasmo 1380  $cm^{-1}$  odpowiada drganiom parasolowym grup  $-CH_3$ .

Drgania w obszarze grup polarnych fosfolipidów reprezentowane są przez trzy główne pasma: antysymetryczne rozciągające grup  $-PO_2^-$  (1243  $cm^{-1}$ ), symetryczne rozciągające grup  $-PO_2^-$  (1087  $cm^{-1}$ ) częściowo nachodzące na pasmo reprezentujące drgania rozciągające grupy C-O-P-O-C oraz pasmo odpowiadające drganiom antysymetrycznym rozciągającym grupy  $N^+-CH_3$  (971  $cm^{-1}$ ). Tak więc, analiza widmowa FTIR umożliwia badania oddziaływania różnych cząsteczek z lipidami w błonie, w różnych jej rejonach.

Badania genisteiny w modelowych błonach lipidowych utworzonych z DPPC wskazują na istotny wpływ tego flawonu na dwuwarstwę lipidową. Analiza widm wykazała obecność pasma z maksimum przy 3180  $cm^{-1}$  o dużej intensywności charakterystycznego dla drgań rozciągających O-H. Pasma to może być przypisane grupom hydroksylowym genisteiny jak również wskazywać na

zwiększone przyłączanie cząsteczek wody przez próbki lipidu z dodatkiem genisteiny. Przesunięcie pasma z maksimum przy  $1368\text{ cm}^{-1}$  odpowiadającego drganiom rozciągającym grup C–O genisteiny w kierunku niższych liczb falowych ( $1296\text{ cm}^{-1}$ ), po jej włączeniu do błony, potwierdza, że grupy hydroksylowe genisteiny mogą przyłączać cząsteczki wody za pomocą wiązań wodorowych. Wiązanie genisteiny do błony może również następować za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy grupami ketonowymi flawonu a tlenem grup lipidowych, między innymi, również z udziałem mostków  $\text{H}_2\text{O}$ . Obecność cząsteczek wody w próbkach z genisteiną (określona na podstawie drgań rozciągających O–H) potwierdza dodatkowo fakt, że obserwowano przesunięcie pasma z maksimum przy  $1653\text{ cm}^{-1}$  reprezentującego drgania rozciągające grup C=O w kierunku niższych liczb falowych ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ).

Widma FTIR błon lipidowych zawierających genisteinę wykazały znaczące i wyraźne zmiany w obszarze drgań rozciągających grupy C–O–P–O–C lipidu. Maksimum tego pasma zostało przesunięte w kierunku niższych liczb falowych oraz nastąpił wzrost intensywności tego pasma w porównaniu do czystego lipidu. Wskazuje to wyraźnie na miejsce interakcji badanego flawonu oraz oddziaływanie pomiędzy głowami hydrofilowymi lipidu a polarnymi grupami badanego izoflawonu za pomocą wiązań wodorowych.

W ramach przeprowadzonych doświadczeń analizowano zmiany w organizacji błon wewnętrznych ludzkich komórek miofibroblastów okrężnicy. Komórki, inkubowane z genisteiną w stężeniu  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ , wykazywały zmiany w organizacji błon wewnętrznych, szczególnie w obszarach przyjądrowych i przybłonowych zaś żywotność komórek, zmierzona testem czerwieni obojętnej, nie była zmieniona po 4 godzinach inkubacji ( $95 \pm 3,2\%$ ). Po inkubacji trwającej 24 godziny komórki fibroblastów skóry człowieka, wykazywały zmiany w ultrastrukturze, szczególnie w strukturach błoniastych, podczas gdy żywotność wynosiła  $143 \pm 2,2\%$ .

Moje badania wykazały, że genisteina wbudowuje się do błon DPPC za pomocą wiązań wodorowych, które tworzą się pomiędzy segmentem C–O–P–O–C polarnych głów lipidowych a grupami hydroksylowymi flawonu. Wchodząc w interakcje z błonami wykazuje silne, usztywniające działanie warstwy hydrofobowej łańcuchów alkilowych jak również głów polarnych fosfolipidów. Genisteina zmienia organizację struktur błoniastych komórek linii prawidłowych nie mając równocześnie wpływu na przeżywalność badanych komórek.

W drugim etapie badań sprawdzałam oddziaływanie apigeniny z błonami DPPC [**Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2013**]. Apigenina pod względem budowy chemicznej różni się od genisteiny tym, że pierścień fenylowy B przyłączony jest w pozycji C-2, tworząc układ 2-fenylochromonu i reprezentuje 4',5,7- trójwodorotlenowy flawon. Jednocześnie w ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie apigeniną, ze względu na jej korzystny wpływ na zdrowie człowieka oraz niską toksyczność. W ramach przeprowadzonych doświadczeń analizowałam zmiany strukturalnych i dynamicznych właściwości błon pod wpływem apigeniny za pomocą techniki EPR. W badaniach zastosowałam sondy (znaczniki spinowe) penetrujące błonę na różnej głębokości. 16-

SASL umożliwiał badanie błony w hydrofobowej warstwie fosfolipidów w połowie głębokości błony. 5-SASL testował uporządkowanie łańcuchów acylowych w regionie hydrofobowym przyległym do głów polarnych. Zaś znacznik Tempo penetrował błonę w rejonie głów polarnych. W uzyskanych widmach analizowałam szerokość linii centralnej ( $\Delta H_0$ ), a w przypadku znacznika Tempo współczynnik podziału między fazą lipidową a wodną (tzw. współczynnik penetracji znacznika do błony). Błony DPPC traktowane apigeniną (5 mol%) wykazywały znaczne zmiany w płynności na głębokości penetrowanej przez znacznik 5-SASL. Otrzymane wartości  $\Delta H_0$  dla tego znacznika w błonach inkubowanych z apigeniną były wyższe o 0,2 do 0,5 mT w stosunku do wartości kontrolnych we wszystkich punktach temperaturowych. W wykonanych badaniach wykazałam również, że apigenina zwiększyła wartości tego samego parametru (o około 0,2 do 0,4 mT) otrzymane dla znacznika 16-SASL, którego grupa wolno rodnikowa znajdowała się w warstwie hydrofobowej fosfolipidów. Wpływ apigeniny na rejon głów polarnych fosfolipidów błony badano używając znacznik spinowy Tempo. Wysokopolowe widma EPR tego znacznika ulegają rozszczepieniu na dwie linie, które odpowiadają znacznikowi rozpuszczonemu w fazie wodnej (A) i w fazie lipidowej (B). W widmach badano współczynnik B/A. Apigenina (zarówno w temperaturze niższej jak i wyższej niż temperatura głównego przejścia fazowego) ograniczała penetrację znacznika do warstwy polarnej błony zmniejszając współczynnik podziału. Jej działanie było widoczne w fazie  $P_{\beta}$  (faza pośrednia - „pofałdowana”) oraz szczególnie silne w fazie płynnej błony ( $L_{\alpha}$ , faza ciekło - krystaliczna). Wyniki EPR wykazały zatem usztywniające działanie badanego związku, co zostało potwierdzone również przez analizy widm NMR. Dodanie apigeniny zwiększyło bowiem wartości szerokości połówkowej maksimum odpowiadającego grupom -CH<sub>2</sub> w warstwie hydrofobowej lipidów ( $\nu$ ) o 52 %. Obecność izoflawonu spowodowała też zmniejszenie parametru rozszczepienia ( $\delta$ ) maksimum odpowiadającego grupom cholinowym o 24 %. Tak więc, ten etap badań wykazał że, apigenina działa na warstwę hydrofobową łańcuchów alkilowych i lokalizuje się w rejonie głów polarnych, zmniejszając penetrację jonów Pr<sup>3+</sup> w tym obszarze błony. Wyniki badań wykazały też, że apigenina zmieniła współczynnik  $I_{out}/I_{in}$  z 0,63 w czystych liposomach na 0,93 w liposomach z dodatkiem flawonoidu. Pomimo wielu badań dotyczących wpływu apigeniny na błony modelowe, w których stosowano różne techniki nie było do tej pory danych, które wyjaśniałyby molekularny mechanizm interakcji apigeniny z błonami. Dlatego podjęłam próby mające na celu wyjaśnienie za pomocą techniki absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera w jaki sposób i w jakim stopniu apigenina oddziałuje z liposomami DPPC. Analiza widm wykazała obecność pasma z maksimum przy 3186 cm<sup>-1</sup> o dużej intensywności, charakterystycznego dla drgań rozciągających O-H, reprezentującego grupy hydroksylowe apigeniny ale może również wskazywać na zwiększone przyłączanie cząsteczek wody przez próbki lipidu z dodatkiem apigeniny. Przesunięcie pasma z maksimum przy 1354 cm<sup>-1</sup>, odpowiadającego drganiom rozciągającym grup C-O apigeniny w kierunku niższych liczb falowych (1296 cm<sup>-1</sup>), równoległe z obserwowanym wzrostem intensywności, po jej włączeniu do błony, potwierdza, że grupy

hydroksylowe apigeniny mogą przyłączać cząsteczki wody do błony. Obserwowano również przesunięcie pasma z maksimum przy  $1653\text{ cm}^{-1}$  (reprezentującego drgania rozciągające grup  $\text{C}=\text{O}$ ) w kierunku niższych liczb falowych ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) co sugeruje, że apigenina wiąże się do strefy polarnej błony za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy grupami ketonowymi flawonu a tlenem grup lipidowych, za pośrednictwem mostków wodnych. Stosunkowo mało intensywne pasmo z maksimum przy  $1554\text{ cm}^{-1}$  odpowiada prawdopodobnie drganiom szkieletowym grup  $-\text{C}=\text{C}-$ , w związanej z błonami apigeninie.

Największe zmiany odnotowano w widmach FTIR w obszarze drgań rozciągających grupy  $\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}$  lipidu. Maksimum tego pasma zostało przesunięte w kierunku niższych liczb falowych oraz nastąpił wzrost intensywności tego pasma w porównaniu do czystego lipidu. Wskazuje to wyraźnie na miejsce interakcji apigeniny oraz na oddziaływanie pomiędzy głowami polarnymi lipidu a badanym flawonem za pomocą wiązań wodorowych.

W ramach przeprowadzonych eksperymentów przeanalizowałam również zmiany w organizacji błon wewnętrznych ludzkich komórek miofibroblastów okrężnicy linii prawidłowej, które inkubowano z apigeniną w stężeniu  $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  i obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym. W tym celu komórki zastosowałam barwnik DIL, który selektywnie wybarwia błony wewnętrzne komórek. Żywotność komórek, po 4 godzinach inkubacji, nie była zmieniona ( $99 \pm 4,6\%$ ) zaś komórki wykazywały obniżoną intensywność fluorescencji. Efekt ten wskazuje na zmiany w organizacji błon wewnętrznych, szczególnie w obszarach przy jądrowych i przy błonie komórek.

W badaniach sprawdzono również jak apigenina wpływa na ultrastrukturę komórek fibroblastów skóry człowieka. Badania ujawniły zmiany w ultrastrukturze w obrębie strukturach błoniastych. Równocześnie apigenina nie obniżała żywotności komórek po 24 godzinach inkubacji.

Podsumowując badania prowadzone z zastosowaniem technik EPR i NMR, wnioskować można, że apigenina wchodzi w interakcje z liposomami DPPC i wykazuje usztywniające działanie w rejonie hydrofobowym łańcuchów alkilowych jak również w strefie głów polarnych fosfolipidów. Badany flawonoid lokalizuje się w górnej części błony, zawierającej łańcuchy kwasów tłuszczowych w strefie przyległej do głów, glicerol i głowy polarne. Apigenina wbudowuje się do błon DPPC za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy segmentem  $\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}$  polarnych głów lipidowych, a grupami hydroksylowymi flawonu. Wiązania wodorowe tworzą się również pomiędzy grupami ketonowymi apigeniny a głowami fosfolipidów DPPC.

Kolejnym etapem przeprowadzonych doświadczeń w ramach zgłaszanego osiągnięcia naukowego były badania [**Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2014**], których celem było poznanie mechanizmu działania kwercetyny - pięciowodorotlenowego flawonolu na błony. Kwercetyna, w odróżnieniu od apigeniny i genisteiny, posiada aż pięć grup wodorotlenowych, których obecność determinuje jej polarność i słabe właściwości kwasowe. Grupy te obecne są w pozycjach: 5 i 7 pierścienia A, pozycji 3 pierścienia C oraz w pozycjach 3' i 4' pierścienia B. Z drugiej strony część aromatyczna, na którą składają się dwa pierścienie A i B połączone pierścieniem

heterocyklicznym zawierającym tlen, wykazuje powinowactwo do środowiska hydrofobowego. Taka budowa kwercetyny umożliwia jej interakcje z błonami komórkowymi i w konsekwencji zmiany w ich właściwościach i funkcjonowaniu. Z uwagi na fakt, że do tej pory niewiele było wiadomo na temat wpływu kwercetyny na elektryczne właściwości błon komórkowych w pracy sprawdzałam również, stosując metodę patch-clamp, wpływ kwercetyny na wolno-aktywujące się kanały tonoplastu (SV) u mszaka *Conocephalum conicum*. Jedną z funkcji tych kanałów jonowych zlokalizowanych w błonie wakuolarnej jest utrzymywanie pH i homeostazy jonowej, w związku z czym odgrywają one dużą rolę w pobudzeniu komórki roślinnej. Ponieważ oddziaływanie kwercetyny na kanały jonowe może być zależne od jej wpływu na lipidy w badaniach zastosowałam również inny model błon - wielowarstwowe liposomy DPPC oraz technikę  $^1\text{H}$  NMR. W celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu interakcji kwercetyny z błonami DPPC użyto spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Biorąc pod uwagę potencjalne protekcyjne działanie kwercetyny przeciw nowotworom oraz stresowi tlenowemu, inkubowałam komórki raka szyjki macicy człowieka z kwercetyną w celu określenia jej wpływu na wybrane enzymy układu antyoksydacyjnego, zdolności kwercetyny do redukcji wolnych rodników tlenowych i jej wpływu na poziom anionorodników ponadtlenkowych oraz na morfologię i ultrastrukturę badanych komórek z hodowli *in vitro*.

Badania techniką  $^1\text{H}$  NMR wykazały, że dodanie kwercetyny zmniejszyło wartości szerokości połówkowej maksimum odpowiadającego grupom  $-\text{CH}_2$  w warstwie hydrofobowej lipidów ( $\nu$ ) o 40 %. Równocześnie, obserwowano zwiększenie wartości szerokości połówkowej maksimum z rejonu grup cholinowych z wewnętrznej warstwy liposomów o 33%. W tych samych badaniach wykazano też, że kwercetyna zmieniła współczynnik  $I_{\text{out}}/I_{\text{in}}$  z 0,086 w czystych liposomach na 0,62 w liposomach z dodatkiem kwercetyny. Z badań wywnioskowano więc, że kwercetyna modyfikuje własności fizyczne dwuwarstw lipidowych, przejawiające się w formowaniu liposomów wielowarstwowych o większych rozmiarach. Badany flawonol lokalizuje się w błonach w rejonie głów polarnych i wykazuje dualistyczne działanie. Kwercetyna obecna w rejonie głów cholinowych wpływa na konformację łańcuchów alkilowych upłynniając je. Efekt ten można wytłumaczyć zwiększeniem średniej powierzchni zajętej przez cząsteczki lipidów i w efekcie osłabieniem oddziaływań van der Waalsa pomiędzy łańcuchami alkilowymi. Jednocześnie, zlokalizowana w rejonie głów polarnych usztywnia ten rejon błony.

Badania za pomocą techniki FTIR pozwoliły zrozumieć interakcje kwercetyny z błonami lipidowymi DPPC na poziomie molekularnym. Analiza widm wykazała obecność pasma z maksimum przy  $3182\text{ cm}^{-1}$  o dużej intensywności charakterystycznego dla drgań rozciągających O–H. Ponieważ występuje ono w szerokim rejonie odpowiadającym drganiom rozciągającym charakterystycznym dla ugrupowań C–H i O–H kwercetyny i wykazało zwiększoną intensywność, pasmo to zostało przypisane drganiom rozciągającym grup O–H kwercetyny zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych. Badania wykazały, że kwercetyna wbudowuje się również do strefy

łańcuchów alifatycznych błony, co stwierdzono na podstawie obecności pasma z maksimum przy  $2809\text{ cm}^{-1}$ , które zostało przypisane małemu fragmentowi łańcuchów alkilowych o ograniczonej ruchliwości. Pasma tego nie obserwowano w czystych liposomach DPPC, ale zawsze w próbkach lipid-kwercetyna i dlatego zinterpretowano go jako pasmo reprezentujące molekularną interakcję między dwoma badanymi komponentami czyli lipidem i kwercetyną. Alternatywnym wyjaśnieniem obecności tego pasma w próbkach lipidu z dodatkiem kwercetyny może być niewielkie przesunięcie częstości drgań rozciągających ugrupowań C–H w kierunku niższych wartości, które można przypisać słabym wiązaniom wodorowym z grupami OH czy innymi grupami. Obie interpretacje potwierdzają koncepcję interakcji kwercetyny z hydrofobowym rejonem błony lipidowej.

Z kolei przesunięcie pasma z maksimum przy  $1360\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadającego drganiom rozciągającym grup C–O kwercetyny, w kierunku niższych liczb falowych ( $1296\text{ cm}^{-1}$ ), po jej włączeniu do błony potwierdza, że grupy hydroksylowe kwercetyny mogą przyłączać cząsteczki wody do lipidu. W badaniach obserwowano również przesunięcie pasma z maksimum przy  $1658\text{ cm}^{-1}$ , reprezentującego drgania rozciągające grup C=O, w kierunku niższych liczb falowych ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ). Efekt ten był spowodowany wiązaniem kwercetyny do błony za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy grupami ketonowymi flawonu a tlenem grup lipidowych, między innymi za pośrednictwem mostków  $\text{H}_2\text{O}$ . Obecność mało intensywnego pasma z maksimum przy  $1552\text{ cm}^{-1}$  wskazuje na drgania szkieletowe –C=C– kwercetyny związanej z błoną. Najbardziej znaczące i wyraźne zmiany obserwowano w obszarze drgań rozciągających grupy C–O–P–O–C ( $1054\text{ cm}^{-1}$ ) lipidu. Maksimum tego pasma zostało przesunięte w kierunku niższych liczb falowych oraz nastąpił wzrost intensywności tego pasma w porównaniu do czystego lipidu. Wskazało to wyraźnie na miejsce interakcji badanego flawonolu, który za pomocą wiązań wodorowych łączy się z głowami polarnych fosfolipidów DPPC.

Metoda patch-clamp, służąca do badania prądów płynących przez kanały jonowe dała podstawę do wnioskowania o wpływie kwercetyny na ich przepuszczalność i sposób otwierania. W badaniach nad wolno aktywowującymi się kanałami tonoplastu (SV) *Conocephalum conicum* zastosowano wyjściową konfigurację whole - vacuole (WV), która pozwalała na rejestracje prądów płynących przez kanały całego tonoplastu. Kanały SV rejestrowano po zastosowaniu symetrycznego roztworu  $100\text{ mM KCl}$  oraz  $2\text{ mM CaCl}_2$  po obu stronach błony tonoplastu.

Badania wykazały, że kwercetyna obniża wartości prądu i powoduje natychmiastowy wzrost oporności błon. Dlatego w dalszej części eksperymentu starano się wyjaśnić spowodowane przez kwercetynę nagłe obniżenie prądu na poziomie pojedynczych kanałów. W tym celu zastosowano konfigurację vacuole - attached pozwalającą na rejestrację pojedynczych kanałów, po której następowała konfiguracja vacuole - out.

Z zapisów aktywności pojedynczych kanałów wynika, że przewodnictwo jednostkowe tych kanałów przy ujemnych potencjałach nie różniło się pomiędzy kontrolą ( $35 \pm 7\text{ ps}$ ) a kwercetyną ( $35 \pm 3\text{ ps}$ ). Wykazano więc, że kwercetyna zmniejszyła możliwość otwierania się tych kanałów lub utrzymywała te kanały w stanie zamknięcia. Ponieważ perfuzja roztworem z flawonolem

powodowała zamykanie kanałów SV, powyższe wyniki potwierdziły dane otrzymane metodą whole - vacuole (WV). W badaniach obserwowano zależne od stężenia kwercetyny hamowanie badanych kanałów. Kwercetyna w stężeniu 5 µg/ml nie miała wcale lub tylko niewielki wpływ na prądy płynące przez kanały w ciągu 20 minut rejestracji. Natomiast w stężeniach 10 i 15 µg/ml powodowała całkowite zamknięcie kanałów SV odpowiednio po  $7 \pm 0,8$  min i  $3,8 \pm 0,6$  min, zaś w dawce 25 µg/ml hamowała SV już podczas perfuzji.

Uzyskane wyniki badań za pomocą technik  $^1\text{H}$  NMR i FTIR, wykazały, że kwercetyna wbudowuje się do błon i zmienia właściwości biofizyczne błony lipidowej. Tak więc, obserwowane efekty kwercetyny w izolowanych błonach wakuol można przypisać działaniu kwercetyny na lipidy błonowe. Nie można jednak wykluczać bezpośredniego oddziaływania flawonoidu na białka kanałowe.

W kolejnej serii doświadczeń badałam wpływ kwercetyny na poziom anionorodników nadadtlenkowych, aktywność enzymów układu antyoksydacyjnego oraz ilość glutationu w ludzkich komórkach raka szyjki macicy (HeLa). Komórki preinkubowałam z flawonoidem i następnie poddawałam działaniu nadadtlenku wodoru. Szok tlenowy powodował w komórkach raka szyjki macicy zwiększenie ilości glutationu i anionorodników nadadtlenkowych oraz aktywności katalazy i reduktazy glutationu. W hodowlach komórek HeLa traktowanych kwercetyną przed szokiem oksydacyjnym obserwowano statystycznie znamienne obniżenie aktywności katalazy o około 20 % oraz obniżenie aktywności reduktazy glutationu. Największe (ponad 60 %) obniżenie aktywności odnotowano w komórkach inkubowanych z kwercetyną w stężeniu 5 µg/ml. Równocześnie wykazano statystycznie znamienne zwiększenie aktywności dysmutazy nadadtlenkowej o ponad 59 i 56 % w stosunku do komórek szokowanych nadadtlenkiem wodoru w stężeniach 10 i 15 µg/ml. Poziom glutationu wzrósł w hodowlach zawierających 10 i 15 µg/ml flawonoidu o 40 i 95 % zaś ilość anionorodników nadadtlenkowych została obniżona zależnie od stężenia. Największe obniżenie poziomu tych rodników powodowała kwercetyna w w stężeniu 15 µg/ml (o 51 %).

Antyoksydacyjne działanie kwercetyny dodatkowo określano spektrofotometrycznie w teście z DPPH (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylowy). „Wymiatanie” rodników przez kwercetynę wyrażano jako procent redukcji DPPH. Badania wykazały, że działanie kwercetyny było zależne od stężenia. Kwercetyna w stężeniu 15 µg/ml neutralizowała rodnik DPPH o ok. 3 razy więcej niż syntetyczna witamina E.

W badaniach uwzględniono również ocenę zmian ultrastrukturalnych komórek raka szyjki macicy HeLa. Komórki kontrolne miały wyraźnie wyodrębnione jądra komórkowe z równomiernie rozmieszczoną chromatyną jądrową w postaci eu - i heterochromatyny. W jądrach znajdowało się po kilka jąderek. Cytoplazma zawierała organella komórkowe o niezmienionej ultrastrukturze. Żywotność komórek kontrolnych wynosiła 100 %. Inkubacja komórek z nadadtlenkiem wodoru znacznie obniżyła żywotność komórek do  $47,4 \pm 7,95$  %. Równocześnie w hodowlach traktowanych nadadtlenkiem wodoru obserwowano komórki o zmienionej cytoplazmie. W niektórych

komórkach cytoplazma była obrzmiała i piankowata z licznymi wakuolami, zaś w innych zgęszczona. Obserwacje w mikroskopie elektronowym tych komórek wykazały obkurczenie komórek, zagęszczenie chromatyny czy wypuklenia błony komórkowej. Obserwowano też zwiększoną wakuolizację cytoplazmy. Komórki preinkubowane z kwercetyną wykazywały nieregularną kondensację chromatyny jądrowej i obrzmiałą cytoplazmę. Inne komórki posiadały zagęszczoną, ziarnistą cytoplazmę, skondensowane jądra z brzezną heterochromatyzacją. Jednocześnie odnotowano też komórki o niezmienionej morfologii i ultrastrukturze. Żywotność komórek oceniona testem czerwieni obojętnej wynosiła w tym wariancie doświadczalnym  $41,63 \pm 11,01$  %. Sama kwercetyna obniżyła żywotność komórek w niewielkim stopniu ( $89,14 \pm 8,41$  %). Badania ultrastruktury ujawniły obecność komórek o niezmienionej strukturze jak również komórek z obrzmiałą cytoplazmą i mitochondriami czy ciałkami apoptotycznymi. Ponieważ nadtlenek wodoru w stężeniu 2 mM znacznie obniżył żywotność komórek podczas gdy sama kwercetyna w niewielkim stopniu wywierała efekt cytotoksyczny i jednocześnie odnotowano dużo większe obniżenie żywotności dla komórek preinkubowanych z kwercetyną, wywnioskowano, że kwercetyna uwrażliwiła komórki na działanie nadtlenu wodoru. Z drugiej jednak strony, obserwowano, że preinkubacja komórek z kwercetyną poprawiała równowagę redoks komórek, co przejawiało się poprzez obserwowane zwiększenie ilości glutationu, aktywności SOD i obniżenie poziomu rodników.

Podsumowując, badania wykazały, że kwercetyna wbudowuje się do błon DPPC i usztywnia rejon głów cholinowych. Kwercetyna oddziałuje też na łańcuchy alkilowe co wykazały badania  $^1\text{H}$  NMR i FTIR. Ugrupowanie C–O–P–O–C głów polarnych fosfolipidów jest strefą do której przyłącza się badany flawonol za pomocą wiązań wodorowych, a w molekularne oddziaływanie kwercetyny zaangażowane są jej grupy hydroksylowe. Kwercetyna stabilizuje błony tonoplastu *Conocephalum conicum* i promuje stan zamknięcia wolno aktywujących się (SV) kanałów tonoplastu. Ochronne działanie kwercetyny na komórki HeLa jest związane z jej antyoksydacyjną aktywnością.

Ważnym aspektem prowadzonych badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy i jaki wpływ ma genisteina na inne modele błon biologicznych. Dlatego w kolejnej pracy [**Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2014**] starałam się uzupełnić informacje dotyczące interakcji pomiędzy genisteiną a błonami i zastosowałam inne od poprzednich modele błon. Zdecydowałam się zastosować fosfolipidy z lecytyny jaja kurzego (EYPC), które są nienasyconymi lipidami i przypominają swym składem naturalne błony występujące w komórce ponieważ posiadają dużą ilość fosfatydylocholiny. Drugi model badawczy stanowiły naturalne, białkowo-lipidowe błony erytrocytów człowieka. Ponadto, w tych doświadczeniach, starałam się skorelować skutki oddziaływania genisteiny na błony z niektórymi jej biologicznymi właściwościami. W badaniach zastosowałam technikę EPR w celu oceny wpływu genisteiny na konformację białek błonowych jak również płynność lipidów. Badania zostały uzupełnione metodą  $^1\text{H}$  NMR. Do oceny wpływu genisteiny na komórki raka szyjki macicy człowieka i erytrocyty zastosowałam techniki mikroskopii elektronowej skaningowej i transmisyjnej oraz fluorescencyjnej. Dodatkowo wykonałam testy



antyoksydacyjne, w tym test DPPH, spektrofotometryczne oznaczanie poziomu anionorodników ponadtlenkowych oraz badania aktywności wybranych enzymów układu antyoksydacyjnego komórki. Badania techniką  $^1\text{H}$  NMR wykazały, że genisteina zmniejszyła wartości szerokości połówkowej maksimum odpowiadającego grupom  $-\text{CH}_2$  w warstwie hydrofobowej lipidów ( $\nu$ ) o 17 % zaś wartości  $\nu$  odpowiadającego grupom  $-\text{CH}_3$  o 13 %. Jednocześnie wyniki ujawniły silnie usztywniające działanie genisteiny w rejonie grup cholinowych z wewnętrznej warstwy liposomów gdzie obserwowano zwiększenie wartości szerokości połówkowej maksimum o 101 %. W tych samych badaniach wykazano też, że genisteina zmieniła współczynnik  $I_{\text{out}}/I_{\text{in}}$  z 0,21 w czystych liposomach EYPC na 0,18 w liposomach z dodatkiem genisteiny. Z badań NMR wywnioskowano, że genisteina lokalizuje się w błonach EYPC w rejonie głów polarnych.

W badaniach techniką EPR analizowano parametr maksymalnego rozszczepienia linii widmowej ( $2T'_{\parallel}$ ). Błony EYPC traktowane genisteiną wykazywały znaczne zmiany w płynności błon na głębokości penetrowanej przez znacznik 5-SASL. Otrzymane wartości  $2T'_{\parallel}$  dla tego znacznika w błonach inkubowanych z genisteiną były wyższe o 2,5 - 3 G w stosunku do wartości kontrolnych. Badania te poparły więc usztywniające działanie genisteiny. Niewielkie zmiany obserwowano zaś w rejonie hydrofobowym penetrowanym przez znacznik 16-SASL. Wpływ genisteiny na płynność białkowo-lipidowych błon krwinek czerwonych człowieka badano w rejonie głów cholinowych używając znacznik spinowy Tempo. Genisteina ograniczała penetrację znacznika do warstwy polarnej błony zmniejszając jego współczynnik podziału pomiędzy fazę lipidową i wodną (B/A). W największym stopniu genisteina ograniczała penetrację znacznika w temperaturze 35°C. Błony znakowano również znacznikiem maleimido-Tempo, w celu określenia wpływu genisteiny na konformację białek błonowych. Znacznik ten tworzy w błonie wiązania kowalencyjne z grupami SH białek zaś w widmie EPR linie niskopolowe rozszczepiają się na pik pochodzący od znacznika słabo (W) i silnie unieruchomionego (S). Zmiany konformacyjne białek powodują zmianę stosunku W/S. Inkubacja cieni erytrocytów spowodowała zależne od stężenia genisteiny obniżenie współczynnika W/S. Wartości tego współczynnika zmniejszyły się z  $5,01 \pm 0,35$  w kontroli na  $3,31 \pm 0,40$  dla błon inkubowanych z genisteiną w stężeniu 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Wywnioskowano więc, że genisteina ograniczała ruchliwość fragmentu wolnorodnikowego znacznika związanego z białkami prowadząc do zwiększenia interakcji białko-białko w błonach.

Obserwacje wykonane za pomocą mikroskopu świetlnego, elektronowego transmisyjnego i skaningowego ujawniły znaczący wpływ genisteiny na wielkość i kształt erytrocytów. Analiza przeprowadzonych pomiarów mikrometrycznych wykazała zależność pomiędzy stężeniem genisteiny, a średnicą krwinek czerwonych. Zwiększanie stężenia genisteiny powodowało zmniejszanie średnicy badanych komórek. Średnica erytrocytów inkubowanych z genisteiną w stężeniu 10, 25 i 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  była mniejsza o 17, 18 i 28 % w stosunku do komórek kontrolnych. Obserwacje w skaningowym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym oraz świetlnym wykazały istotne oddziaływanie genisteiny na kształt krwinek czerwonych. Krwinki kontrolne posiadały charakterystyczną postać

dwuwklęsłych krążków zaś erytrocyty inkubowane z a genisteiną w stężeniu 50 µg/ml w znacznym stopniu straciły swój specyficzny kształt. Ich powierzchnia uległa pofałdowaniu, a swoiste dla prawidłowych krwinek zagłębienia, w erytrocytach inkubowanych z izoflawonem były słabo widoczne. Krwinki posiadały postać echinocytów. Obserwacje dowiodły, że wraz ze wzrostem stężenia genisteiny w roztworze zwiększała się liczba zdeformowanych krwinek. W próbie kontrolnej krwinki zdeformowane stanowiły 0,9 % wszystkich komórek, w roztworze zawierającym 10 µg/ml genisteiny stwierdzono około 15 % zmienionych komórek, a w roztworze z 50 µg/ml genisteiny ich ilość wynosiła niemalże 35 %.

Badania żywotności komórek HeLa wykazały, że genisteina po 4 godzinach inkubacji nie miała efektu cytotoksycznego we wszystkich badanych stężeniach (żywotność wynosiła  $106,27 \pm 7,01$  % dla 15 µg/ml) zaś po 24 godzinach inkubacji z genisteiną w stężeniu 15 µg/ml żywotność była mniejsza o 25 % ( $74,71 \pm 4,99$  %). Obserwacje za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, że komórki traktowane genisteiną posiadały ziarnistą cytoplazmę i wykazywały lokalne poszerzenia błony jądrowej oraz cystern retikulum endoplazmatycznego. Organizacja struktur błonowych komórek była więc zmieniona, co również potwierdziły badania wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Komórki traktowane nadtlakiem wodoru posiadały zwiększoną aktywność katalazy, dysmutazy ponadtlakowej oraz poziom anionorodników ponadtlakowych (SAR). Preinkubacja komórek HeLa z genisteiną spowodowała obniżenie aktywności dysmutazy we wszystkich badanych stężeniach. Największe obniżenie (o 13 %) odnotowano dla stężenia 15 µg/ml. Podobnie, obniżenie aktywności katalazy, obserwowano dla wszystkich badanych stężeń flawonoidu. Genisteina obecna przed szokiem tlenowym powodowała zależne od stężenia obniżenie poziomu SAR. Największe obniżenie (49 %) odnotowano dla stężenia 15 µg/ml. Antyoksydacyjne działanie genisteiny określano też spektrofotometrycznie przez rodnikowy test DPPH i wykazano, że działanie genisteiny było zależne od stężenia. Najwyższą aktywność wymiatającą odnotowano w stężeniu 15 µg/ml.

Podsumowując, stwierdzono, że genisteina wbudowując się do błon, wykazuje silne działanie usztywniające w rejonie głów cholinowych i rejonie przyległym do niego, zarówno w błonach liposomów EYPC jak i w naturalnych białkowo-lipidowych błonach erytrocytów człowieka. Badany izoflawonoid zmienia również konformację białek cieni erytrocytów. Jednym ze skutków obecności genisteiny w błonach jest powstawanie krwinek posiadających formę echinocytów o zmniejszonej średnicy. Genisteina poprawia równowagę redoks komórek HeLa traktowanych nadtlakiem wodoru poprzez obniżanie poziomu anionorodników ponadtlakowych.

**Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 7 oryginalnych prac eksperymentalnych:**

- Apigenina i genisteina silnie modyfikują właściwości i odpowiedzi elektryczne błon komórkowych u wątrobowca *Conocephalum conicum*. Apigenina powoduje wzrost amplitud potencjałów czynnościowych oraz skrócenie czasu połowkowego potencjałów czynnościowych ( $t_{1/2}$ ) zaś genisteina dodatkowo wywołuje znaczny wzrost potencjału transmembranowego (MP) oraz przesunięcie maksimum depolaryzacji.
- Apigenina i genisteina zapobiegają działaniu werapamilu (inhibitora kanałów wapniowych plazmalemmy) u *Conocephalum conicum*. Nie wyklucza się oddziaływania tych flawonoidów na białko kanału wapniowego.
- Genisteina i kwercetyna zapobiegają inhibicji wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych przez neomycynę. Apigenina nie wpływa na działanie neomycyny na błony.
- Kwercetyna stabilizuje tonoplast i promuje stan zamknięcia wolno aktywujących się (SV) kanałów tonoplastu *Conocephalum conicum*. Badany flawonol skraca czas trwania APs oraz wywołuje hiperpolaryzację błon *Conocephalum*, co może wskazywać na stymulujące działanie kwercetyny na pompę protonową.
- Widma błon lipidowych zawierających badane flawonoidy wykazują znaczące i wyraźne zmiany w obszarze drgań rozciągających grupy C–O–P–O–C lipidu. Wyniki badań z zastosowaniem techniki FTIR wskazują więc, że ugrupowanie C–O–P–O–C głów polarnych fosfolipidów jest strefą do której przyłączają się badane flawonoidy za pomocą wiązań wodorowych, a w molekularne oddziaływanie zaangażowane są ich grupy hydroksylowe. Wiązania wodorowe tworzą się również pomiędzy grupami ketonowymi badanych związków a głowami fosfolipidów DPPC.
- Dane  $^1\text{H}$  NMR i EPR ujawniają silnie usztywniające działanie genisteiny w rejonie hydrofobowym błony w fazie ciekło-kryształicznej ( $L_\alpha$ ) w błonach liposomów formowanych z DPPC. Genisteina lokalizuje się w rejonie głów polarnych co zmniejsza penetrację jonów  $\text{Pr}^{3+}$  w tym obszarze błony.
- Genisteina zmienia również organizację struktur błoniastych w ludzkich komórkach fibroblastów skóry oraz miofibroblastów okrężnicy, nie ma to jednak wpływu na żywotność komórek linii prawidłowych po 4 i 24 godzinach inkubacji z badanym związkiem.

- Apigenina (zarówno w temperaturze niższej jak i wyższej niż temperatura głównego przejścia fazowego) ogranicza penetrację znacznika spinowego Tempo do warstwy polarnej błony zmniejszając współczynnik podziału. Działanie apigeniny jest widoczne w fazie  $P_{\beta}$  oraz jest szczególnie silne w fazie płynnej błony ( $L_{\alpha}$ ). Wyniki  $^1\text{H}$  NMR potwierdzają usztywniające działanie badanego związku w błonach DPPC zarówno w rejonie hydrofobowym łańcuchów alkilowych jak również w strefie głów polarnych fosfolipidów.
- Błony prawidłowych komórek są wrażliwe na działanie apigeniny. Wywołwana przez apigeninę stabilizacja membran może mieć istotne znaczenie dla antyoksydacyjnego działania apigeniny zarówno na poziomie błon i komórek.
- Kwercetyna i apigenina modyfikują własności fizyczne dwuwarstw lipidowych, przejawiające się w formowaniu liposomów wielowarstwowych o większych rozmiarach.
- Z badań  $^1\text{H}$  NMR wynika, że kwercetyna lokalizuje się w błonach formowanych z DPPC w rejonie głów polarnych i wykazuje dualistyczne działanie. Obecna w rejonie głów cholinowych wpływa na konformację łańcuchów alkilowych upłynniając je. Jednocześnie zlokalizowana w rejonie głów polarnych usztywnia ten rejon błony.
- Stres oksydacyjny wywołany przez nadtlenek wodoru powoduje wzrost aktywności katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i poziomu anionorodników ponadtlenkowych w komórkach HeLa *in vitro*. Inkubacja komórek z nadtlakiem wodoru znacznie obniża żywotność komórek.
- Obserwacje z użyciem mikroskopu elektronowego wykazują, że komórki traktowane genisteiną posiadają ziarnistą cytoplazmę i lokalne poszerzenia błony jądrowej oraz cystern retikulum endoplazmatycznego. Zmienioną organizację struktur błonowych komórek potwierdzają badania wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Genisteina, po 24 godzinach inkubacji, wykazuje działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek raka szyjki macicy HeLa.
- Genisteina, jak wykazano za pomocą technik EPR i  $^1\text{H}$  NMR, wykazuje działanie usztywniające w stosunku do błon erytrocytów człowieka jak i błon liposomalnych sporządzonych z EYPC.

- Głowy polarne fosfolipidów i rejon przyległy do głów jest miejscem interakcji genisteiny z błonami liposomów EYPC i naturalnymi błonami białkowo-lipidowymi krwinek czerwonych.
- Genisteina zmienia konformację białek błonowych krwinek czerwonych człowieka zwiększając interakcje pomiędzy tymi białkami. Krwinki czerwone człowieka przybierają formę echinocytów i mają zmniejszoną średnicę pod wpływem genisteiny.
- Genisteina i kwercetyna obecne przed szokiem tlenowym wykazują działanie ochronne na komórki HeLa poprzez obniżanie poziomu anionorodników ponadtlenkowych lub wzrost poziomu glutationu i aktywności SOD (w przypadku kwercetyny).
- Zarówno genisteina jak i kwercetyna posiadają zdolność wymiatania rodnika DPPH wykazując silniejsze działanie w porównaniu do syntetycznej witaminy E.

### **Plany przyszłych badań**

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące sposobu oddziaływania związków pochodzenia naturalnego, w tym flawonoidów, na właściwości błon jak również uzupełnić te badania o eksperymenty, które pozwolą zrozumieć w pełni interakcje tych związków z błonami, tj. zarówno z białkami jak i z lipidami, na poziomie molekularnym. Doświadczenia będą przeprowadzone na modelowych błonach lipidowych, naturalnych błonach białkowo-lipidowych, błonach tonoplastów i komórkach. Swoją pracę naukową zamierzam poszerzyć o badania w oparciu o nowoczesne i zaawansowane techniki tj. czasowo-rozdzielcze FTIR oraz stacjonarne i czasowo-rozdzielcze techniki fluorescencyjne włączając mikroskopię typu FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Dodatkowo, będę uczestniczyć w badaniach z wykorzystaniem techniki mikroskopii elektronowej transmisyjnej i skaningowej do obrazowania zmian w morfologii i ultrastrukturze mikroorganizmów bakteryjnych i grzybowych jak również komórek człowieka.

### **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Równolegle do badań nad wpływem apigeniny, genisteiny i kwercetyny na błony komórkowe uczestniczyłam w pracach eksperymentalnych dotyczących wpływu związków roślinnych, flawonoidów i furanokumaryn na indukcję śmierci komórkowej w różnych warunkach doświadczalnych. W badaniach dotyczących wpływu kwercetyny na komórki HeLa sprawdzano czy i jak kwercetyna oraz szok termiczny wpływa na poziom i rozmieszczenie białek szoku termicznego

Hsp 72. W badaniach wykazano, że po zastosowaniu kwercetyny białka te znajdowano zarówno w cytoplazmie jak i jądrach komórkowych. Po szoku termicznym poziom tych białek wzrósł znacznie, szczególnie w jądrach komórkowych. Natomiast preinkubacja szokowanych komórek z kwercetyną hamowała ekspresję Hsp 72 i powodowała zmianę w rozmieszczeniu tych białek. Badania immunocytochemiczne na poziomie mikroskopu świetlnego oraz elektronowego dowiodły, że kwercetyna blokowała translokację białek szoku termicznego z cytoplazmy do jądra komórkowego, co prawdopodobnie zwiększało wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję apoptozy.

Furanokumaryny to wtórne metabolity szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. Wykazują wiele ciekawych właściwości w tym przeciwzapalne, przeciwbólowe i fotouczulające. Dane literaturowe wskazują też na przeciwnowotworowe działanie tych związków. W badaniach wykazano, że bergapten (5-metoksypsoralen), wyizolowany z owoców *Peucedanum tauricum* Bieb. wykazał słabe właściwości przeciwnowotworowe zaś peucedanina dużo silniejsze. Peucedanina obniżała też znacznie ekspresję białek szoku termicznego Hsp 27 o 74 % i Hsp 72 o 77,5 %. Po wybarwieniu komórek HeLa Aneksyną V wykazano, że indukowała ona śmierć apoptotyczną w około 11 % komórek.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w dwóch pracach o zasięgu międzynarodowym i krajowym:

- Jakubowicz-Gil, J., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Piersiak, T., Pawelec, J., Gawron, A., 2003: Quercetin suppresses heat shock-induced nuclear translocation of Hsp72. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 43, (3) 123-128.

**IF<sub>2005</sub> / pkt<sub>2005</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,789 / 10 pkt / 1,101 / 15 pkt**

- Bartnik, M., Głowniak, K., Jakubowicz-Gil, J., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Gawron, A., 2006: Effect of peucedanin and bergapten (5-MOP), furanocoumarins isolated from *Peucedanum tauricum* Bieb. (*Apiaceae*) fruits, on apoptosis induction and heat-shock protein expression in HeLa cells. **Herba Polonica**. 5, (4) 71-78.

**IF<sub>2006</sub> / pkt<sub>2006</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = - / - pkt / - / 8 pkt**

Uczestniczyłam również w badaniach, prowadzonych we współpracy z Katedrą Anatomii i Histologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, które dotyczyły wpływu lipopolisacharydu na morfologię i ultrastrukturę astrocytów z hipokampa szczura w pilokarpinowym modelu epilepsji. W porównaniu do komórek kontrolnych, astrocyty z pola CA1 i CA3 komórek piramidalnych hipokampa, wykazywały zmiany morfologiczne takie jak obrzmienie ciał komórek oraz obecność wypustek glejowych. Na poziomie ultrastruktury obserwowano zmniejszenie ilości organelli, które gromadziły się na biegunach komórek, silną wakuolizację cytoplazmy oraz występowanie brzeżnej heterochromatyzacji w jądrach komórkowych. Największe zmiany obserwowano w 21 dniu po podaniu pilokarpiny. Badania te były finansowane z Zespołowego Grantu Prorektora UMCS d/s. Badań Nauki i Współpracy z Zagranicą (NB-/2006) pt.: „Wpływ hartowania

chemicznego na ultrastrukturę hipokampa szczura w modelu epilepsji”, w którym byłam wykonawcą. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy o zasięgu międzynarodowym:

- Jaworska-Adamu, J., Dmowska, M., Cybulska, R., Krawczyk, A., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, 2011: Investigations of hippocampal astrocytes in lipopolysaccharide-preconditioned rats in the pilocarpine model of epilepsy. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 49 (2) 219-224.

**IF** 2011 / **pkt** 2011 / **IF**2013 / **pkt** 2013 = **0,807 / 15 pkt / 1,101 / 15 pkt**

Brałam też udział w cyklu badań, prowadzonych we współpracy z Zakładem Fizjologii Roślin oraz Zakładem Anatomii i Cytologii Roślin UMCS, dotyczących aktywności i lokalizacji lipooksygenazy w różnych gatunkach roślin jak również zmian na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym w warunkach stresu metali ciężkich. Lipooksygenaza (LOX) jest enzymem występującym w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Bierze udział w kluczowych procesach komórkowych roślin. Przy użyciu metody immunocytochemicznej na poziomie mikroskopu elektronowego badano lokalizację LOX w siewkach *Phaseolus coccineus* (L.) traktowanych 25 µM roztworem Cd. Enzym znaleziono w peryferycznych częściach protoplastu komórek kontrolnych m. in. w ścianie komórkowej, w mitochondriach, w plastydach i wzdłuż cystern retikulum. Immunoreakcja na LOX była mniej intensywna w komórkach traktowanych Cd, które wykazywały dodatkowo zmiany w ultrastrukturze. Badania aktywności LOX w pH 7 i 8 ujawniły obniżenie aktywności badanego enzymu po 4 dniach ekspozycji siewek na kadm. W innej pracy określano aktywność i rozmieszczenie LOX w tkankach *Arabidopsis thaliana* traktowanych Cd i Cu przez 7 dni. Komórki parenchymatyczne ujawniły zmiany ultrastruktury zaś LOX głównie obserwowano w cytoplazmie i w chloroplastach. W roślinach eksponowanych na działanie metali ciężkich odnotowano zmniejszoną ilość LOX, ale enzym wykazywał większą aktywność szczególnie w pH 8. Celem kolejnej pracy było zbadanie rozmieszczenia tego enzymu w mikrosporze *Gagea lutea* (L.) (Ker.- Gaw.). Enzym znaleziono w cytoplazmie, jądrze i sporodermie mikrospory. Najintensywniejszą reakcję obserwowano w cytoplazmie, gdzie cząsteczki immunozłota niekiedy były zgrupowane po kilka lub kilkanaście i wykazywały największe zagęszczenie. Najmniej cząsteczek występowało w sporodermie.

Inna praca dotyczyła lokalizacji tego enzymu w pylnikach *Gagea lutea*. LOX znaleziono w różnych częściach i typach komórek tej struktury. Komórki epidermalne i komórki endotecjum wykazywały obecność LOX w pobliżu retikulum endoplazmatycznego (ER) i w cytoplazmie. Pozytywna immunoreakcja na LOX była mniej intensywna w środkowych warstwach gdzie pojedyncze cząsteczki immunozłota były skoncentrowane przy ścianach komórkowych oraz w wakuolach, w pobliżu mitochondriów i w plastydach. LOX obserwowano też w ziarnach pyłku w warstwie egzyny, w cytoplazmie i blisko cystern ER. Na podstawie badań wywnioskowano, że występowanie enzymu w pylnikach tej rośliny może być związane z obecnością związków o charakterze lipidowym w różnych warstwach pylnika. Enzym może produkować pewne lotne pochodne, które służą jako

atraktanty bądź repelenty owadów jak również mogą być one skuteczne w obronie przed atakiem patogenów.

W kolejnej pracy badano odpowiedź i zmiany anatomiczne na poziomie tkankowym i komórkowym u korzeni i łodyg *Arabidopsis thaliana* poddanych działaniu nadmiaru miedzi w warunkach zmienionego wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu (GSH). Rosnące stężenia Cu obniżały poziom GSH w korzeniach i świeżą masę rośliny oraz podwyższały poziom GSH w łodygach. Zarówno GSH, Cu i BSO indukowały zmiany w strukturze korzeni i ultrastrukturze chloroplastów liści. Cu nie indukowało akumulacji fitochelatyn.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w pięciu pracach o zasięgu międzynarodowym i krajowym :

- Skórzyńska-Polit, E., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Szczuka, E., Plak, A., Melke, J., 2005: Localization and activity of lipoxygenase in Cd-treated seedlings of *Phaseolus coccineus*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**. 74, (3) 199-207.

**IF<sub>2005</sub> / pkt<sub>2005</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,148 / - pkt / 0,585 / 15 pkt**

- Skórzyńska-Polit, E., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Szczuka, E., Drązkiewicz, M., Krupa, Z., 2006: The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stresses. **Plant Growth Regulation**. 48, 29-39.

**IF<sub>2006</sub> / pkt<sub>2006</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,903 / 15 pkt / 1,67 / 30 pkt**

- Szczuka, E., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Skórzyńska-Polit, E., Sobieska, J., Pawelec, J., Piersiak, T., 2006: Immunolokalizacja lipooksygenazy w mikrosporze *Gagea lutea* (L.) Ker. - Gaw. **Acta Agrobotanica**. 59 (1), 83-90.

**IF<sub>2006</sub> / pkt<sub>2006</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = - / - pkt / - / 8 pkt**

- Szczuka, E., Skórzyńska-Polit, E., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Sobieska, J., Gawron, A., 2006: Immunolocalization of lipoxygenase in the anther of *Gagea lutea* (L.) Ker.-Gaw. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 48 (1), 19-26.

**IF<sub>2006</sub> / pkt<sub>2006</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,213 / - pkt / 0,612 / 20 pkt**

- Wójcik, M., **Pawlikowska-Pawłęga, B.**, Tukiendorf, A., 2009: Physiological and ultrastructural changes in *Arabidopsis thaliana* as affected by changed GSH level and Cu excess **Russian Journal of Plant Physiology**. 56, (6) 820-829.

**IF<sub>2009</sub> / pkt<sub>2009</sub> / IF<sub>2013</sub> / pkt<sub>2013</sub> = 0,5 / 10 pkt / 0,617 / 20 pkt**

W innym cyklu badań dokonywano analizy odpowiedzi grzybów wyższych na obecność metali ciężkich w podłożu hodowlanym, m. in. *Abortiporus biennis*. W ramach tych badań prowadzone były m. in. analizy morfologicznych i ultrastrukturalnych zmian grzybni wywołanych metalami ciężkimi. Grzybnie kontrolne wykazywały obecność chlamydospor jak i bazydiospor. Za pomocą klasycznej techniki mikroskopii elektronowej jak i analizy EDX wykazano, że obecność PbO w pożywce powodowała, że jony ołowiu gromadziły się w pobliżu



błon komórkowych, w ścianie komórkowej oraz w cytoplazmie. Obserwowano silną wakuolizację cytoplazmy grzybni a wzrastające stężenie PbO w podłożu hodowlanym zmniejszało zdolności akumulacyjne grzyba. W innej pracy wykazano, że ZnO, CdO i Cu<sub>2</sub>O powodowały największe zahamowanie wzrostu grzybni *A. biennis*. Jednocześnie w odpowiedzi na obecność w podłożu hodowlanym ZnO, MnO<sub>2</sub> i Cu<sub>2</sub>O obserwowano zwiększone stężenie kwasu szczawowego. Oksydaza kwasu szczawowego została rozpoznana jako enzym odpowiedzialny za degradację tego kwasu a jej zwiększone stężenie obserwowano w podłożu z dodatkiem ZnO, MnO<sub>2</sub> i Cu<sub>2</sub>O. Badania z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej wykazały zmiany w morfologii grzyba.

Rezultaty tych badań opublikowano w dwóch pracach o zasięgu międzynarodowym:

- Grąż, M., Jarosz-Wilkołazka, A., **Pawlikowska-Pawlęga, B.**, 2009: *Abortiporus biennis* tolerance to insoluble metal oxides: oxalate secretion, oxalate oxidase activity, and mycelial morphology, **Biometals**. 22, 401-410.

**IF** 2009 / **pkt** 2009 / **IF** 2013 / **pkt** 2013 = **3,172 / 15 pkt / 3,284 / 30 pkt**

- Grąż, M., Jarosz-Wilkołazka, A., **Pawlikowska-Pawlęga, B.**, 2011: Growth inhibition and intracellular distribution of PB ions by the white rot fungus *Abortiporus biennis*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 65, 124-129.

**IF** 2011 / **pkt** 2011 / **IF** 2013 / **pkt** 2013 = **2,074 / 25 pkt / 2,059 / 30 pkt**

Brałam też udział w eksperymentach dotyczących analizy zmian wewnątrzkomórkowych zachodzących w komórkach bakterii *Legionella dumoffii* pod wpływem peptydów odpornościowych defensyny i apolipoforyny III z *Galleria mellonella*. Ekstrakt hemolify ujawnił zależne od stężenia antybakteryjne działanie skierowane przeciw badanej bakterii. Dodatkowo, badania na poziomie mikroskopu elektronowego wykazały, że badane peptydy powodowały nieodwracalne uszkodzenia ścian komórkowych oraz zmiany w strukturze wewnętrznej bakterii m.in. wakuolizację i kondensację cytoplazmy.

Rezultaty tych badań opublikowano w pracy o zasięgu międzynarodowym:

- Palusińska-Szys, M., Zdybicka-Barabas, A., **Pawlikowska-Pawlęga B.**, Mak, P., Cytryńska, M., 2012: Anti-legionella dumoffii activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipophorin III. **International Journal of Molecular Sciences**. 13, 17048-17064.

**IF** 2012 / **pkt** 2012 / **IF** 2013 / **pkt** 2013 = **2,598 / 30 pkt / 2,464 / 30 pkt**

*B. Pawlikowska-Pawlęga*