

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

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

Dr Joanna Ślusarczyk

Dr Joanna Ślusarczyk

Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska
Instytut Biologii
Wydział Matematyczno - Przyrodniczy
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
j.slusarczyk@ujk.edu.pl
tel. +48 41 349 63 18

Autoreferat

I. Imię i Nazwisko: Joanna Ślusarczyk

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1990 Tytuł magistra biologii, specjalność nauczycielska

Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Kielcach; Wydział Matematyczno – Przyrodniczy;
Praca magisterska pt.: „Pasożyty mszyc (*Hymenoptera, Aphidiidae*) roślin ozdobnych na terenie miasta Kielc i jego okolic”;
Promotor - prof. dr hab. inż. Stanisław K. Wiąckowski

1999 Tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność botanika

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi;
Rozprawa doktorska pt.: „Strukturalne przejawy poziomu ekspresji genu histonu H1 w transgenicznych roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum L.*)”;
Promotor – prof. dr hab. Mieczysław Kuraś

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.10.1990 – 30.09.1991

Asystent stażysta w Katedrze Ekologii i Ochrony Środowiska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego)

1.10.1991 – 30.10.1999

Asystent w Katedrze Ekologii i Ochrony Środowiska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego)

1.11.1999 do chwili obecnej

Adiunkt w Katedrze Ekologii i Ochrony Środowiska (obecnie Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska) WSP w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego)

Przebieg pracy naukowo – badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu magistra, 1.10.1990 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Ekologii i Ochrony Środowiska, w Pracowni Biologii Rozwoju (obecnie Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska w Instytucie Biologii) Wydziału Matematyczno – Przyrodniczego Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego). Podjęta przeze mnie tematyka badawcza dotyczyła analizy składu gatunkowego pasożytniczych błonkówek z rodziny mszycarzowatych (*Hymenoptera, Aphidiidae*), naturalnych wrogów mszyc żerujących na roślinach ozdobnych w obszarze zurbanizowanym, na terenie miasta Kielce. Była ona związana z problematyką badawczą Katedry Ekologii i Ochrony Środowiska i stanowiła kontynuację badań nad pasożytami mszyc podjętych przeze mnie w pracy magisterskiej pt. „Pasożyty mszyc (*Hymenoptera, Aphidiidae*) roślin ozdobnych na terenie miasta Kielc i jego okolic”. W okresie od 16.11.1992 do 15.05.1993 roku odbyłam staż naukowy w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego, podczas którego poznałam zasady preparatyki mikroskopowej. Pozwoliło to na poszerzenie badań o cytologiczne i ultrastrukturalne aspekty żerowania mszyc na roślinach. Wyniki tych prac były przedmiotem kilku publikacji. Zdobyte doświadczenia wpłynęły także na zmianę profilu prowadzonych badań i nawiązanie współpracy z zespołem Pracowni Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu Warszawskiego. Prowadzone badania dotyczyły określenia roli histonu H1 w procesie regulacji transkrypcji w komórce eukariotycznej. Podstawowym materiałem do badań były transgeniczne rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum L.*) o dwóch przeciwstawnych charakterystykach molekularnych w odniesieniu do zawartości histonu H1 (rośliny z silną nadekspresją głównego wariantu somatycznego histonu H1 i rośliny z drastycznie zmniejszonym poziomem głównych wariantów histonu H1). Szczegółowa analiza morfologiczna, strukturalna i ultrastrukturalna tych roślin tytoniu stała się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

Rośliny z nadekspresją zawierały około 2,5 raza więcej histonu H1 niż rośliny normalne. Najbardziej charakterystyczne zmiany fenotypowe tych roślin zaczynały ujawniać się od 9 tygodnia ich rozwoju i polegały na karłowatym pokroju i niezdolności do kwitnienia. Zmianom tym towarzyszyła silna i bardzo charakterystyczna heterochromatynizacja jąder komórkowych komórek miękiszowych. Normalna budowa anatomiczna liścia roślin z nadwyżką H1 oraz nie zmniejszona liczba komórek oznaczały, że zdolność do różnicowania podstawowych struktur anatomicznych oraz zdolność do podziałów komórkowych nie zostały

zakłócone. Zmniejszony natomiast rozmiar komórek miękiszowych świadczył, że zakłóceniu uległa zdolność komórek do normalnego wzrostu. Znamienne różnice dotyczyły także budowy i liczby chloroplastów, które były większe i liczniejsze w stosunku do roślin kontrolnych, co mogło świadczyć o zakłóceniu normalnej proporcji między genomem jądrowym a genomem plastydowym. W przypadku roślin z nadekspresją histonu H1 zwracał uwagę brak istotnych różnic w komórkach epidermy, co mogło wynikać z innej organizacji strukturalnej chromatyny w tych komórkach w porównaniu z komórkami miękiszowymi.

Z kolei zregenerowane rośliny z obniżonym poziomem histonu H1 w stosunku do roślin kontrolnych wykazywały również pewne różnice fenotypowe. Polegały one na zaniku dominacji głównego pędu, co przejawiało się niższym wzrostem i krzaczastym pokrojem roślin. Ich liście były mniejsze, ale występowały w większej liczbie niż u roślin kontrolnych. Przekroje poprzeczne blaszek liściowych tych roślin wykazały, że były one grubsze o około 40% w stosunku do roślin kontrolnych, co było wynikiem zwiększonych rozmiarów komórek poszczególnych tkanek liścia. Rośliny z obniżonym poziomem histonu H1 tworzyły pąki kwiatowe, podobnie jak rośliny kontrolne, jednak w ich kwiatach znamiona słupków wyrastały ponad płatki korony i główki pręcików. Na skutek tego nie dochodziło do zapylenia i kwiaty zasychały, nie wydając owoców i nasion. Analiza mikroskopowa procesu mikrosporogenezy u tych roślin ujawniła asynchroniczny przebieg podziału mejotycznego w tkance sporogennej w stosunku do kontroli. Ponadto podczas podziału mejotycznego komórek macierzystych mikrospor obserwowano liczne aberracje chromosomowe (mosty ana- i telofazowe, zgubione chromosomy) świadczące o zaburzeniach w rozdziale materiału genetycznego. Prowadziły one do powstania zniekształconych tetrad mikrospor (poliady, tetrazy linearne, tetrazy z mikrojądrami), które stanowiły około 27 % i w konsekwencji były przyczyną powstania nieprawidłowo ukształtowanych mikrospor. Obserwacje ziaren pyłku tych roślin w TEM i SEM ujawniły, że były one mniejsze i słabiej rozwinięte. W większości mikrospor nie dochodziło do różnicującego podziału jądra, w wyniku którego powstają komórki: wegetatywna i generatywna, i ulegały one stopniowej degradacji. Tylko nieliczne ziarna pyłku roślin z obniżonym poziomem histonu H1 były normalnie ukształtowane. Nieomal w 100% ziarna te były niezdolne do kiełkowania.

Analiza cytologicznych i ultrastrukturalnych przejawów różnego poziomu ekspresji histonu H1 potwierdziła przypuszczenie, że białko to może uczestniczyć w specyficznej regulacji ekspresji określonych genów, nie jest zaś ogólnym represorem transkrypcji kontrolującym podstawowe funkcje komórki, w tym podziały i różnicowanie. Badania

wykazały również, że zmiany ilościowe stosunku H1 do DNA mogą wpływać na pewne programy genetyczne (np. kwitnienie) istotne w procesie rozwoju.

Rozprawę doktorską pt. „Strukturalne przejawy ekspresji genu histonu H1 w transgenicznym tytoniu (*Nicotiana tabacum L.*)” obroniłam 14 lipca 1999 roku na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie w dziedzinie nauk biologicznych.

Przeprowadzone badania zostały przedstawione w 5 wymienionych poniżej publikacjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. (Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, a w nawiasach zgodnie z rokiem 2015.)

1. **Ślusarczyk J.** 1994. Aphid parasites (*Hymenoptera Aphidiidae*) fund on the trees and herbaceous plants of the Kielce urban area. *Rocz. Nauk Roln.* 24 (1/2), 21-25.
IF₁₉₉₄: 0, MNiSW₁₉₉₄: 3 (IF₂₀₁₅: 0, MNiSW₂₀₁₅: 4)
2. **Ślusarczyk J.** 1994. Badania nad kompleksem pasożytów mszyc (*Hymenoptera Aphidiidae*) żerujących na sośnie. *Stud. Kiel.* 4/84, 121-126.
IF₁₉₉₄: 0, MNiSW₁₉₉₄: 1 (IF₂₀₁₅: 0, MNiSW₂₀₁₅: 1)
3. Prymakowska-Bosak M., **Ślusarczyk J.**, Przewłoka M., Jerzmanowski A., Kuraś M. 1997. Anatomia i ultrastruktura liści transgenicznego tytoniu z nadekspresją histonu H1 z *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol. Sil.* 31 (48), 92-100.
IF₁₉₉₇: 0, MNiSW₁₉₉₇: 3 (IF₂₀₁₅: 0, MNiSW₂₀₁₅: 1)
4. **Ślusarczyk J.** 1998. Uszkodzenia liści *Pelargonium sp.* i *Papaver somniferum L.* przez mszyce *Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.) i *Aphis fabae* Scop. *Stud. Kiel.* 9, 119-126.
IF₁₉₉₈: 0, MNiSW₁₉₉₈: 1 (IF₂₀₁₅: 0, MNiSW₂₀₁₅: 1)
5. **Ślusarczyk J.**, Prymakowska –Bosak M., Przewłoka M., Jerzmanowski A., Kuraś M. 1999. Ultrastructural organization of leaves of transgenic tobacco overexpressing histone H1 from *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 84, 329-335.
IF₁₉₉₉: 1,326, MNiSW₁₉₉₉: 16 (IF₂₀₁₅: 3,654, MNiSW₂₀₁₅: 40)

Wyniki badań były także zamieszczone w 4 krajowych i międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych. Łączny *impact factor* opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **1,326** (zgodnie z rokiem 2015 **IF₂₀₁₅: 3,654**). Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **24** (zgodnie z rokiem 2015 **MNiSW₂₀₁₅: 47**).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, od 1.11.1999 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Ekologii i Ochrony Środowiska (obecnie Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska) Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego), w którym pracuję do dzisiaj.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych moja problematyka badawcza była kontynuacją badań dotyczących roli histonu H1 w procesie regulacji transkrypcji w komórce eukariotycznej. Swoje zainteresowania badawcze rozszerzyłam również o zagadnienia związane z antymitotycznym i przeciwnowotworowym działaniem związków selenu. Wyniki badań eksperymentalnych z tego zakresu zostały przedstawione w 5 pracach, które weszły w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 13 oryginalnych prac eksperymentalnych, w tym 10 opublikowanych w czasopiśmie z bazy JCR oraz dwa rozdziały w monografiach krajowych (łącznie 10 punktów MNiSW). Ponadto, wyniki badań zostały przedstawione w 15 komunikatach prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Łączny *impact factor* opublikowanych po doktoracie prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **11,625** (zgodnie z rokiem 2015 **IF₂₀₁₅: 22,277**). Suma punktów MNiSW za wspomniane publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **195** (zgodnie z rokiem 2015 **MNiSW₂₀₁₅: 308**).

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego

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:

*„Cytologiczne efekty działania Selolu i sodu selenianu (IV) na komórki testu Allium oraz komórki grzybni soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceum* (Bull.; Fr. Pers). w kulturze zawieszinowej”*

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

(Przy każdej pozycji podano Impact Factor zgodnie z rokiem opublikowania oraz za rok 2015, a także punktację MNiSW wg wykazu czasopism z dn. 23.12.2015)

W skład mojego osiągnięcia naukowego wchodzi pięć prac.

1. **Ślusarczyk J.**, Dudek M., Wierzbicka M., Suchocki P., Kuraś M. 2014. Antimitotic effect of Selol and sodium selenate (IV) on Allium test cells. *Caryologia* 67(3), 250-259.

IF₂₀₁₄ **0,740**; IF₂₀₁₅ **0,740**; MNiSW₂₀₁₅ - **20 pkt**, autor korespondencyjny

2. **Ślusarczyk J.**, Wierzbicka M., Suchocki P., Kuraś M. 2015. Ultrastructural changes in onion (*Allium cepa* L.) root tip meristem cells treated with Selol and sodium selenate (IV). *Caryologia* (DOI:10.1080/00087114.2015.1109934)
IF₂₀₁₅ **0,740**; MNiSW₂₀₁₅ – **20 pkt**, *autor korespondencyjny*
3. Malinowska E., Krzyczkowski W., Herold F., Łapienis G., **Ślusarczyk J.**, Suchocki P., Kuraś M., Turło J. 2009. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme and Microbial Technology* 44, 334-343.
IF₂₀₀₉ **3,003**; IF₂₀₁₅ **2,966**; MNiSW₂₀₁₅ – **30 pkt**
4. **Ślusarczyk J.**, Malinowska E., Krzyczkowski W., Kuraś M. 2013. Influence of inorganic and organic selenium on number of living mycelial cells and their ultrastructure in culture of *Hericium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.). *Acta Biologica Hungarica* 64 (1), 96-105.
IF₂₀₁₃ **0,504**; IF₂₀₁₅ **0,590**; MNiSW₂₀₁₅ – **15 pkt**, *autor korespondencyjny*
5. **Ślusarczyk J.**, Kuraś M., Malinowska E., Skalicka-Woźniak K., Głowniak K. 2014. Ultrastructural changes in the mycelium of *Hericium erinaceum* (Bull.; Fr.) Pers. under selenium induced oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 2718-2725.
IF₂₀₁₄ **1,879**; IF₂₀₁₅ **1,714**; MNiSW₂₀₁₅ – **35 pkt**

Sumaryczny Impact Factor wymienionych wyżej publikacji, zgodny z rokiem opublikowania wynosi **6,866** (IF₂₀₁₅ **6,716**). Sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi **120**.

Informacje na temat wkładu pracy wszystkich autorów podczas przygotowywania publikacji są zawarte w załączniku nr 5 (Oświadczenia dotyczące indywidualnego wkładu habilitanta w autorstwo prac oraz oświadczenia współautorów publikacji).

Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie - przedmiot badań

Selen jest mikroelementem o bardzo szerokim oddziaływaniu biologicznym, zarówno zdrowotnym jak i toksycznym. Jest niezbędnym składnikiem organizmów roślinnych i zwierzęcych. Biologiczne znaczenie selenu zostało poznane dzięki odkryciu, że stanowi on integralną część wielu enzymów. W postaci selenocysteiny występuje on w ponad 30 selenobiałkach, jak np.: peroksydazy glutationowe selenozależne, selenoproteina P, selenoproteina W, selenoproteina G (Zhang i in. 2000) czy typ 1 jodotyroninodejodynazy (Berry i in. 1991, Kucharzewski i in. 2002). W organizmie człowieka selen występuje najczęściej w połączeniu z aminokwasami, cysteiną (selenocysteina) i metioniną (selenometionina) oraz w związkach z białkami (Gromadzińska i in. 2008, Zwolak i

Zaporowska 2012). Selen należy do grupy pierwiastków, które decydują o prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, ma właściwości przeciwutleniające, chroni organizm przed działaniem wolnych rodników tlenowych i czynników rakotwórczych (Wolf i in. 1997, Stewart i in. 1999, Rayman 2002). Ponadto do najważniejszych funkcji jakie spełniają związki selenu w organizmie należą:

- aktywacja i inaktywacja hormonów tarczycy,
- zapewnienie prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego,
- działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe,
- udział w przekazywaniu impulsów nerwowych (Stewart i in. 1999).

Selen jest mikroelementem o fundamentalnym znaczeniu dla zdrowia człowieka. Jego niedobory w diecie mają związek z etiologią wielu przewlekłych chorób, jak miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów oraz niektóre rodzaje nowotworów złośliwych (Whanger 2004, Alaejos i Diaz Romero 2000). Antyoksydacyjne właściwości selenu i peroksydazy glutationu oraz ich protekcyjną rolę w stosunku do DNA wykorzystuje się od wielu lat w terapii przeciwnowotworowej. Związki selenu wykazują dużą skuteczność w przypadku leczenia nowotworów: piersi (Dorgan 1998), prostaty (Costello 2001, Clark i Marshall 2001), płuc (Van Zandwijk i Hirsch 2003), wątroby, jelita grubego (Dayna i in. 2002) oraz gwiaździaka (Zhu i in. 1995).

Z drugiej jednak strony selen uważany jest za pierwiastek wybitnie toksyczny. Dzielne zapotrzebowanie organizmu na ten pierwiastek waha się od 50 do około 200 µg/dobę, natomiast dawkę toksyczną selenu dla człowieka określono na około 700 µg/dobę (Zagrodzki 2000, El-Bayoumy 2001). Nadmierne stężenie selenu w organizmie powoduje zahamowanie proliferacji komórek, replikacji DNA, syntezy białek i prowadzi do stresu oksydacyjnego oraz wzmożonej peroksydacji lipidów i tworzenia kompleksów z metalami odkładającymi się w komórkach mózgowych (Żbikowska 1997). Przystawalność selenu zależy od formy chemicznej i składu pożywienia oraz od indywidualnych właściwości organizmu. Najłatwiej pobierane są seleniany na +4 i +6 stopniu utlenienia, selenometionina, selenocysteina oraz aminowe związki selenu (Szymańska i Hawrylak 2007, Wierzbicka i in. 2007). Związki selenu charakteryzujące się wysoką aktywnością antyoksydacyjną i przeciwnowotworową powinny zawierać selen na +4 stopniu utlenienia (Stewart i in. 1999, Thirunavukkarasu i Sakthisekaran 2003, Chung i in. 2006), pomimo że jego wchłanianie jest różne w przypadku formy organicznej i nieorganicznej. W produktach żywnościowych selen dostarczany jest głównie w postaci selenometioniny i selenocysteiny, które zawierają selen na +2 stopniu utlenienia. W tej postaci jest on wbudowywany do centrów aktywnych enzymów

głównie w sposób niespecyficzny, co powoduje że białka takie nie wykazują aktywności biologicznej charakterystycznej dla związków selenu (McKenzie i in. 1998).

Jednym ze związków nieorganicznych, zawierających selen na +4 stopniu utlenienia, stosowanym często w terapii przeciwnowotworowej, jest sodu selenian (IV). Działa on bardzo skutecznie indukując w erytrocytach powstanie selenodiglutationu, który wywołuje apoptozę komórek nowotworowych (McKenzie i in. 1998). Jednak toksyczność sodu selenianu (IV) jest wysoka (LD_{50} 3,5 mg/kg masy ciała) co ogranicza jego wykorzystanie w skutecznej terapii, mimo że nadal stosuje się go w badaniach eksperymentalnych (Gasmi i in. 1997, Jiang i in. 2001, Van Zandwijk i Hirsh 2003, Nilsonne i in. 2006, Wierzbicka i in. 2007). Wobec tego faktu bardzo ważne są badania nowych związków selenu, które charakteryzowałyby się mniejszą toksycznością.

Kilkanaście lat temu w Zakładzie Analizy Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego opracowano syntezę organicznego związku selenu nazwanego Selolem, który zawiera selen również na +4 stopniu utlenienia (Polski Patent 1999) (Fitak i in. 1999). Stanowi on mieszaninę seleninotriglicerydów, otrzymanych na drodze estryfikacji oleju słonecznikowego kwasem selenowym (IV) (H_2SeO_3). Seleninotriglicerydy mogą występować m.in., jako Selol_{2%} zawierający 2% Se wbudowanego w pojedyncze pierścienie dioksaselenolanowe w resztach kwasu oleinowego, a także, jako Selol_{5%} zawierający 5% Se i posiadający dodatkowo sąsiadujące ze sobą pierścienie dioksaselenolanowe wbudowane w reszty kwasu linolowego. W obu tych formach Selolu selen występuje na +4 stopniu utlenienia (Suchocki i in. 2007). Dotychczasowe badania, nad mechanizmami działania tego preparatu, wykazały, że w pierwszej fazie swojego działania posiada silne właściwości prooksydacyjne i przeciwnowotworowe natomiast w drugiej fazie wykazuje właściwości antyoksydacyjne i naprawcze np. błon komórkowych lub DNA (Stańczuk i in. 2010, Książek i in. 2013). Jednocześnie charakteryzuje się stosunkowo małą toksycznością, w związku z czym w terapii może być bezpiecznie stosowany w dawkach rzędu kilku mg/kg masy ciała (Zagrodzki i in. 2000). Ponadto wykazuje on aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną wobec wielu linii komórkowych, jak np. ludzkich komórek białaczki promielocytowej HL-60, HL-60/Dox (opornych na doksorubicynę) oraz HL-60/Vinc (opornych na winkrystynę) (Suchocki i in. 2007), a także silne cytotoksyczne działanie wobec linii nowotworu jelita grubego (Caco-2)(Suchocki i in. 2010), ludzkiego androgenozależnego raka prostaty LNCaP i PC-3 (Książek i in. 2013) oraz wielu innych.

Związek ten jest również w ostatnim czasie intensywnie badany pod kątem wykorzystania go jako suplementu selenu w postaci dodatków żywnościowych.

Suplementacja selenu oraz wykorzystanie go w terapiach medycznych może przyczynić się do zmniejszenia zagrożenia licznymi chorobami cywilizacyjnymi, których przyczyny wynikają ze stresu oksydacyjnego i zaburzenia potencjału oksydoredukcyjnego komórek.

Cel badań

Badania nad związkami selenu, w tym również nad wymienionym preparatem, prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych. Podstawowe dane dotyczące efektów działania tego preparatu na roślinne, zwierzęce i ludzkie komórki są jednak niewystarczające. Niezbędne jest dokładne poznanie jego cytologicznych efektów działania, cytotoksyczności i cytostatyczności oraz przeprowadzenie szerszych badań podstawowych laboratoryjnych, przedklinicznych i klinicznych, które mogą doprowadzić do jego rejestracji jako leku przeciwnowotworowego. Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było porównanie cytologicznych efektów działania organicznego i nieorganicznego związku selenu na +4 stopniu utlenienia, tj. Selolu i sodu selenianu (IV), w oparciu o test Levana (Levan 1938) oraz badania na poziomie ultrastrukturalnym. Test Levana, powszechnie znany jako test *Allium*, został wprowadzony przez Levana w 1938 roku. Stanowią go merystematyczne komórki wierzchołków korzeni cebuli (*Allium cepa* L.), będące odpowiednikami zwierzęcych i ludzkich komórek macierzystych. Jego zaletą jest łatwość uzyskania dużej ilości genetycznie jednorodnego materiału dogodnego do wykorzystania w badaniach kariologicznych (mała liczba – 16, dużych chromosomów ułatwiająca analizę aberracji i zmian mutagennych). Test ten jest często stosowany w badaniach skriningowych i analizie potencjalnych preparatów przeciwnowotworowych pod kątem cytotoksyczności i cytostatyczności oraz działania czynników chorobotwórczych i skażeń środowiska (Majewska i in. 2000, Gabara i in. 2006, Kuraś i in. 2006, Oyeyemi i Bakare 2013). Moje badania dotyczyły porównania wpływu obu form selenu na strukturę jąder i chromosomów oraz aktywność mitotyczną komórek testu *Allium* w różnych wariantach stężeń obu związków. Analiza mikroskopowa obejmowała w szczególności:

- zmiany struktury interfazowych jąder komórkowych oraz struktury chromosomów i zaburzenia podziałów komórek kontrolnych i poddanych inkubacji w w/w związkach selenu;
- ustalenie poziomu aktywności mitotycznej (wyrażonego w postaci indeksu mitotycznego, tj. procentu dzielących się komórek na tysiąc komórek merystematycznych) (Lopez –Saez i Fernandez - Gomez 1965);

- ustalenie proporcji poszczególnych faz mitozy (indeksu fazowego) w obrębie dzielących się komórek (Lopez –Saez i Fernandez - Gomez 1965).

Kolejnym krokiem moich badań było porównanie działania obu tych związków selenu (organicznego i nieorganicznego), na ultrastrukturę komórek testu *Allium* oraz ustalenie stężenia tych związków w wierzchołkach korzeni *Allium cepa L.* poddanych działaniu Selolu i sodu selenianu (IV), w celu wykazania czy selen w formie organicznej (Selol) przenika do komórek w porównaniu do przenikania selenu w formie nieorganicznej (sodu selenian (IV)).

W swoich badaniach zajęłam się również alternatywną możliwością wykorzystania związków selenu, jako czynników wpływających stymulująco na wzrost grzybni soplówki jeżowatej (*Hericiium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w kulturze mycelialnej, w perspektywie wykorzystania jej do biosyntezy wzbogaconych w selen polisacharydów o działaniu immunostymulującym i przeciwnowotworowym. Grzyby wykazują, bowiem zdolność do akumulowania z podłoża hodowlanego wielu mikroelementów, w tym również selenu (Reilly 1998, Siegel i in. 1980) i dystrybuowania go do różnych części komórek. Składniki ściany komórkowej grzybów, takie jak polisacharydy i białka, mogą wiązać nieorganiczne związki Se na zasadzie biosorpcji (Yoshida i in. 2005). Daje to możliwość uzupełniania niedoborów tego pierwiastka poprzez jego dostarczanie w postaci zakumulowanej przez drobnoustroje (np. drożdże selenowe) (Chen i in. 2006) i grzyby wyższe (Rayman 2000, Chmielowski i in. 1994). Jednak wysoka toksyczność związków nieorganicznych ogranicza ich akumulację w komórkach grzybni (Fels i Cheldelin 1950).

W celu dokładnego poznania reakcji komórek grzybowych na działanie nieorganicznych i organicznych źródeł selenu, na podstawie badań mikroskopowych porównywałam ich wpływ na wzrost i żywotność oraz na zmiany strukturalne grzybni. W dalszej części badania zostały rozszerzone również o analizę ultrastruktury komórek grzybowych soplówki jeżowatej (*Hericiium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wgłębnej, w różnych wariantach form selenu w podłożach hodowlanych (Na_2SeO_3 , Selol_{2%}, Selol_{5%} oraz mieszaniny Na_2SeO_3 i Selolu).

Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

1. Porównanie działania Selolu i sodu selenianu (IV) na komórki merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) w oparciu o test *Allium* (Levan, 1938).

- a. Analiza struktury interfazowych jąder komórkowych oraz struktury chromosomów i zaburzeń podziałów komórek kontrolnych i poddanych inkubacji w roztworach Selolu i sodu selenianu (IV).
 - b. Analiza aktywności podziałowej komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu Allium) po działaniu Selolu i sodu selenianu (IV).
 - c. Zmiany indeksu fazowego komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu Allium) po działaniu Selolu i sodu selenianu (IV).
2. Porównanie działania dwu związków (organicznego i nieorganicznego) zawierających selen na +4 stopniu utlenienia: Selolu i sodu selenianu (IV), na ultrastrukturę komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu Allium).
 3. Analiza stężenia selenu (IV) w wierzchołkach korzeni *Allium cepa L.* poddanych działaniu Selolu i sodu selenianu (IV), czyli wykazanie czy selen w formie organicznej (Selol) przenika do komórek w porównaniu do przenikania selenu w formie nieorganicznej (sodu selenian (IV)).
 4. Zbadanie wpływu sodu selenianu (IV) i Selolu na wzrost i żywotność grzybni soplówki jeżowatej (*Heridium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wgłębnej, w perspektywie wykorzystania jej do biosyntezy polisacharydów zawierających selen.
 5. Porównanie wpływu nieorganicznych i organicznych źródeł selenu na żywotność i zmiany ultrastrukturalne grzybni soplówki jeżowatej (*Heridium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wgłębnej, jako potencjalnego źródła wzbogaconych w selen polisacharydów grzybowych.

Omówienie wyników przeprowadzonych badań

Ad 1. Porównanie działania Selolu i sodu selenianu (IV) na komórki merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) w oparciu o test Allium (Levan 1938).

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu zostały przedstawione w pracy: **Antimitotic effect of Selol and sodium selenate (IV) on Allium test cells. 2014. Caryologia 67(3): 250-259.**

Ad 1a. Analiza struktury interfazowych jąder komórkowych oraz struktury chromosomów i zaburzeń podziałów komórek kontrolnych i poddanych inkubacji w roztworach Selolu i sodu selenianu (IV).

W pierwszej części badań podjęłam się porównania działania Selolu i sodu selenianu (IV) na strukturę interfazowych jąder komórkowych oraz strukturę chromosomów i zaburzeń podziałów w komórkach merystematycznych wierzchołków korzeni cebuli (*Allium cepa* L.). W niniejszym eksperymencie korzenie przybyszowe cebuli inkubowano w roztworach Selolu_{2%} o stężeniu 25, 100, 400, 800 i 1600 µg Se/ml, oraz w roztworze sodu selenianu (IV) w 0,9% NaCl o następujących stężeniach: 25, 100, 200 i 400 µg Se/ml. Stężenia związków selenu dobrano na podstawie wstępnych eksperymentów i porównania aktywności podziałowej komórek w różnych zakresach stężeń, a także wyników dotychczasowych badań (Suchocki i in. 2007). Próby pobierano po 6, 24 i 48 godz. i wykonywano mikroskopowe preparaty zgniatane w acetoorceinie, które analizowano przy pomocy mikroskopu świetlnego.

W badaniach wykazano, że inkubacja w obu związkach selenu prowadziła do zmian w strukturze chromosomów polegających na ich silnej kondensacji i kontrakcji (cc chromosomy), czemu towarzyszyła stopniowa redukcja lub całkowita inhibicja podziałów komórkowych. Działanie **Selolu** na komórki testu *Allium* uwidaczniało się dopiero w wyższych stężeniach i powodował on jedynie turbageniczne zmiany w morfologii chromosomów (zgrubienia i skrócenia; chromosomy cc od ang. condensed i contracted). W czasie późnej profazy chromosomy były zgrubiałe i skrócone, a na terenie jądra występowały wyraźne przejaśnienia kariolimfy, dając typowe cc profazy. Skrócone chromosomy metafazowe układały się w płytce metafazowej, a podczas anafazy ulegały typowemu podziałowi i cc - siostrzane chromosomy rozchodziły się do biegunów komórki tworząc nieregularne skupienia chromatyny. Na etapie telofazy dłużej trwała dekondensacja chromatyny. Na tej drodze Selol doprowadzał prawie do całkowitej inhibicji aktywności mitotycznej. Selol nie powodował zmian klastogenicznych typowych dla działania sodu selenianu (IV) opisanych poniżej. Ostatecznym efektem działania Selolu była zmiana morfologicznego ukształtowania jąder, poprzez aberracje turbageniczne, skurcz i nierównomierną kondensację chromatyny doprowadzał on do wyhamowania aktywności mitotycznej. Selol nie działał więc mutagennie. Podczas dalszej inkubacji, w najdłuższych czasach i najwyższych stężeniach następowało stopniowe przechodzenie komórek w stan apoptozy i tworzenie ciał apoptotycznych.

Z kolei inkubacja w różnych stężeniach **sodu selenianu (IV)** wyraźnie zmieniała strukturę jąder interfazowych oraz morfologię ich chromosomów. Już od 6 godziny inkubacji zanikały podziały komórkowe, a struktura jąder interfazowych została pogrubiona i ujednolicona, co było prawdopodobnie efektem ich blokady w fazie G₂. We wszystkich badanych stężeniach, wśród zatrzymanych w podziale komórek dochodziło do aberracyjnych (klastogenicznych) zmian struktury chromosomów, uwidaczniających się szczególnie w metafazie i anafazie. Chromosomy części komórek ulegały pogrubieniu i skróceniu, tworząc nietypowe profazy i C-metafazy, podczas których chromosomy nie układały się w typowej płytce metafazowej, ale były rozproszone w obrębie komórki. Nie dochodziło do ich podziału, ale następowała restytucja ich struktury doprowadzająca do powstania charakterystycznych interfazowych, poliploidalnych jąder. Są to aberracje turbageniczne nie powodujące mutagenyzy. Znaczna część chromosomów meta- i anafazowych tworzyła jednak nieregularne układy wielobiegunowe inicjujące tworzenie się aberracji klastogenicznych, czyli mutagennych. W anafazie powstawały mosty, pęknięcia i gubienie fragmentów oraz całych chromosomów. Dochodziło więc do powstawania nietypowych układów chromosomów uniemożliwiających ich segregację i prawidłowy rozdział. W czasie telofazy widoczne były efekty zaburzonego rozdziału chromosomów w postaci nierównych lub nierozdzielonych jąder telofazowych, co prowadziło do powstania komórek poliploidalnych i często z mikrojądrami. Zmiany te określane są jako klastogeniczne i szczególnie w przypadku wyższych stężeń są letalne. Po przedłużonym działaniu roztworu sodu selenianu (IV) do 72 – 96 godz. dochodziło do stopniowej degradacji chromatyny i tworzenia charakterystycznych jej uwypukleń i powstawania „pseudoapoptotycznych” ciał, a w konsekwencji do całkowitej fragmentacji jąder. W wyniku powyższych zmian podczas inkubacji we wszystkich badanych stężeniach sodu selenianu(IV) dochodziło do gwałtownego obniżania indeksu mitotycznego i to nawet przy niskich jego stężeniach.

Ad 1b. Aktywność podziałowa komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu *Allium*) po działaniu Selolu i sodu selenianu (IV).

W dalszej części badań porównywałam działanie Selolu i sodu selenianu (IV) na aktywność podziałową komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*).

W **kontrolnych komórkach** testu *Allium* aktywność mitotyczna wyrażona indeksem mitotycznym wahała się średnio w granicach 12%. Wartość tę przyjęto za 100% i w stosunku do niej przedstawiono zmiany po działaniu Selolu i sodu selenianu (IV).

Działanie **Selolu** było zależne od stężenia roztworu oraz czasu trwania inkubacji. Inkubacja korzeni w roztworze o najniższym stężeniu (25µg Se/ml) wywołała wyraźną stymulację podziałów przez cały czas trwania eksperymentu. Już po 6 godz. nastąpił wzrost indeksu do 138% a po 48 godz., po przejściowym lekkim spadku wzrósł do 159%. Inkubacja w roztworze Selolu o stężeniu 100 µg Se/ml wywołała również początkowy wzrost indeksu mitotycznego do 131%, ale po 24 godz. jego wartość spadła do poziomu kontroli, a po 48 godz. obniżyła się do 84%. Po działaniu dalszych dwu stężeń (400 i 800 µg Se/ml) następowało stopniowe obniżanie indeksu mitotycznego w czasie trwania inkubacji. Niższe stężenie redukowało podziały w mniejszym stopniu poczynając dopiero od 24 godz. inkubacji. Wyższe stężenie spowodowało spadek indeksu mitotycznego już po 6 godz. do 73%. Inkubacja w roztworze o najwyższym stężeniu selenu (1600 µg/ml) spowodowała gwałtowny spadek indeksu mitotycznego do 60% już po 6 godz. inkubacji, a po 24 godz. spadł on do 0% i na tym poziomie utrzymał się do końca trwania eksperymentu.

Wpływ **sodu selenianu (IV)** na komórki testu *Allium* był odmienny w stosunku do działania Selolu. W przypadku wszystkich użytych stężeń stwierdzono nagły spadek aktywności mitotycznej w czasie trwania inkubacji. Już inkubacja w roztworze o najniższym stężeniu (25 µg Se/ml) przez 6 godz. spowodowała spadek aktywności mitotycznej o 40% w porównaniu do kontroli. Po 24 godz. indeks mitotyczny wynosił już tylko 17%, a do całkowitego wyhamowania podziałów doszło po 48 godz. Dwa wyższe stężenia (100 i 200 µg Se/ml) spowodowały całkowitą inhibicję podziałów już po 24 godz. inkubacji. Inkubacja w roztworze o stężeniu selenu 400 µg/ml wywołała spadek indeksu mitotycznego do 20% i wartość ta utrzymywała się do końca trwania eksperymentu. Spowodowane to było bardzo silnym działaniem toksycznym tej koncentracji selenu na komórki, co było przyczyną ich zatrzymania na tym etapie cyklu komórkowego, na jakim się znajdowały w 6 godz. inkubacji.

Ad 1c. Zmiany indeksu fazowego komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu *Allium*) po działaniu Selolu i sodu selenianu (IV).

Z kolei obserwacja indeksu fazowego wykazała, że w komórkach kontrolnych pozostawał on na względnie stałym poziomie i wynosił odpowiednio – profazy 57%, metafazy 17%, anafazy 5%, telofazy 21%. Chromosomy komórek podziałowych wszystkich faz mitozy miały typowy wygląd. Natomiast inkubacja w roztworach Selolu zmieniała wzajemne proporcje faz i powodowała powstawanie zmienionych mitoz (cc – chromosomy).

Inkubacja w roztworze **Selolu** o najniższym stężeniu (25 µg Se/ml) nie wpłynęła znacząco na indeks fazowy a podziały zmienione (cc profazy i cc metafazy) pojawiły się tylko przejściowo po 24 godz. inkubacji. Pod wpływem działania roztworu o stężeniu 100 µg Se/ml po 24 godz. nastąpił wyraźny spadek indeksu profaz z jednoczesnym wzrostem indeksu metafaz i telofaz. W czasie dalszej inkubacji dochodziło do wzrostu indeksu profaz i spadku indeksu telofaz. Zaobserwowano również wzrost udziału podziałów zmienionych (17% profaz i 8% metafaz). Po 6 godz. inkubacji w roztworach o stężeniu 400 i 800 µg Se/ml dochodziło do wzrostu indeksu profaz i spadku indeksu telofaz, a następnie po 24 godz. do wyraźnego spadku indeksu profaz, a wzrostu indeksu metafaz, nawet do poziomu 56% w przypadku stężenia 800 µg Se/ml. Obserwowano również w tych fazach większy udział zmian turbagenicznych. Zjawisko to było wyraźniejsze w miarę zwiększenia stężenia Selolu. Najwięcej podziałów zmienionych zaobserwowano po 48 godz. inkubacji w roztworze o stężeniu 400 µg Se/ml (40% profaz, 13% metafaz i 7% telofaz) oraz po 24 godz. inkubacji w stężeniu 800 µg Se/ml (28% profaz i 22% metafaz). Pod wpływem działania roztworu o stężeniu 1600 µg Se/ml po 6 godz. wzrósł procent profaz do 68% i metafaz do 32%. Jednocześnie około 30% profaz i 70% metafaz charakteryzowało się pogrubionymi cc chromosomami. Nie obserwowano anafaz, a telofazy stanowiły zaledwie kilka procent wśród dzielących się komórek. Następowало, więc stopniowe zatrzymywanie podziałów mitotycznych w komórkach.

Natomiast podczas inkubacji w roztworach dwu niższych stężeń (25 i 100 µg Se/ml) **sodu selenianu (IV)** po 6 godz. dochodziło do wzrostu indeksu profaz (odpowiednio do 63% i 69%) przy jednoczesnym spadku indeksu metafaz i anafaz. Podczas dalszej inkubacji w stężeniu 25 µg Se/ml doszło do spadku indeksu profaz i wzrostu indeksu metafaz i telofaz (telofazy stanowiły 35% wszystkich podziałów). Po 24 godz. inkubacji prawie wszystkie podziały były zmienione, chromosomy ulegały silnej kondensacji i często obserwowano aberracje klastogeniczne. Roztwór o stężeniu 100 µg Se/ml po 24 godz. inkubacji spowodował już całkowity zanik podziałów trwający do końca eksperymentu. Sześciogodzinna inkubacja w roztworze o stężeniu 200 µg Se/ml spowodowała spadek procentu profaz i nieznaczny metafaz oraz wzrost indeksu anafaz i telofaz, a jednocześnie prawie wszystkie podziały były podziałami zmienionymi. Inkubacja w roztworze sodu selenianu (IV) o stężeniu 400 µg Se/ml wywołała spadek indeksu profaz i metafaz po 6 godz. do poziomu ok. 10% każdy i wzrost indeksów anafaz i telofaz (odpowiednio do 29% i 51%). Dalsza inkubacja spowodowała względne wyrównanie się procentu poszczególnych faz

(odpowiednio do 28% i 19%). Bardzo ważnym był fakt, że wszystkie dzielące się komórki obserwowane od 6 godz. inkubacji charakteryzowały się, opisaną wcześniej, zmienioną strukturą jąder interfazowych (pogrubiona i ujednolicona) i w tej zatrzymanej postaci trwały do końca eksperymentu.

Oba badane związki powodowały, więc zahamowanie podziałów komórkowych z tym, że sodu selenian (IV) działał silniej toksycznie na komórki, powodując często aberracje klastogeniczne, mutagenne, czego nie stwierdzono w przypadku Selolu. Pod wpływem Selolu dochodziło do zmian struktury chromosomów, ich kondensacji i kontrakcji (zmiany turbageniczne, nie mutagenne), uniemożliwiających przejście do następnych faz podziałowych. Natomiast działanie sodu selenianu (IV) objawiało się wzrostem indeksu profaz lub pod wpływem wysokich stężeń dochodziło do zahamowania podziałów i zatrzymania komórek na poszczególnych etapach mitozy. Pod wpływem wysokich stężeń Selolu dochodziło do silnej kondensacji chromatyny komórek interfazowych, a w komórkach poddanych działaniu sodu selenianu (IV) powstawały charakterystyczne „pseudoapoptotyczne” ciała i następowała całkowita fragmentacja jąder. Uzyskane wyniki wskazują na znacznie niższą toksyczność Selolu w porównaniu z sodu selenianem (IV), co przemawia za dalszym badaniem tego związku, jako potencjalnego, bezpiecznego leku antynowotworowego.

Ad 2. Porównanie działania dwu związków (organicznego i nieorganicznego) zawierających selen na +4 stopniu utlenienia: Selolu i sodu selenianu (IV), na ultrastrukturę komórek merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa L.*) (testu *Allium*).

W dalszym etapie prowadzonych badań porównywałam działanie Selolu i sodu selenianu (IV) na ultrastrukturę komórek merystematycznych wierzchołków korzeni cebuli (*Allium cepa L.*). Wyniki tych prac zostały przedstawione w publikacji **Ultrastructural changes in onion (*Allium cepa L.*) root tip meristem cells treated with Selol and sodium selenate (IV). 2015. *Caryologia* (DOI:10.1080/00087114.2015.1109934).**

Pod wpływem inkubacji w roztworach **Selolu** dochodziło do zmian w ultrastrukturze komórek testu *Allium*. Zmiany te nasilały się wraz ze wzrostem koncentracji selenu w badanych roztworach oraz czasu trwania inkubacji. Już po działaniu najmniejszych koncentracji Selolu (25µg Se/ml) następowała zmiana kształtu jąder komórkowych oraz zwiększenie wakuolizacji cytoplazmy poprzez powstanie dużej ilości małych i zlewających się wakuol.

Użycie wyższych stężeń roztworu Selolu (100 i 800 $\mu\text{g Se/ml}$) lub zwiększenie czasu inkubacji powodowało wzrost kondensacji chromatyny jądrowej oraz zwiększenie się liczby jąder o bardziej nieregularnych, płatowatych kształtach. Na terenie cytoplazmy pojawiały się liczne małe wakuole, w których występowały ciemne, kłaczkowate złoże. Mitochondria występowały dość licznie na terenie komórek. Posiadały one zwykle kuliste kształty i były nieco mniejsze niż w komórkach kontrolnych. Z reguły posiadały one ciemną, gęstą matriks i liczne kristy. Inkubacja w najwyższym stężeniu Selolu (1600 $\mu\text{g Se/ml}$) powodowała silną kondensację chromatyny, a jądra przybierały często bardzo nieregularne kształty. W cytoplazmie występowały liczne rozdęte cysterny rER i aktywne struktury Golgiego. Wakuole były bardzo duże i zawierały nadal kłaczkowate złoże. Pod wpływem działania Selolu nie obserwowano uszkodzeń błon zewnętrznych ani wewnętrznych organelli komórkowych.

Z kolei po działaniu **sodu selenianu (IV)**, prawie we wszystkich badanych stężeniach i czasach inkubacji, zmiany w ultrastrukturze komórek były bardzo drastyczne i wskazywały wyraźnie na jego toksyczne działanie. Już po 6 godz. inkubacji w najniższym stężeniu (25 $\mu\text{g Se/ml}$) sodu selenianu (IV) doszło do deformacji kształtu jąder i kondensacji ich chromatyny. Na terenie zwakuolizowanej cytoplazmy występowały skupienia mitochondriów i plastydów, które posiadały elektronowo gęstą matriks. W miarę postępującego czasu inkubacji lub wzrostu stężenia roztworu sodu selenianu (IV) następowała wyraźna degradacja komórek. Inkubacja w wyższych stężeniach sodu selenianu (IV) powodowała obkurczenie jąder komórkowych i ich jąderek oraz dochodziło do dalszej silnej kondensacji chromatyny. Cytoplazma i zawarte w niej organella ulegały obkurczaniu i degradacji, często obserwowano w komórkach jedynie ich pozostałości. Po inkubacji w najwyższym z użytych stężeń (400 $\mu\text{g Se/ml}$) chromatyna była bardzo silnie skondensowana, mitochondria i plastydy były rozdęte, z przejaśnioną matriks i uszkodzonymi błonami. Na terenie cytoplazmy widoczne były bardzo długie i koncentrycznie ułożone cysterny ER oraz liczne wakuole. Cytoplazma w wielu miejscach odstawała od ściany komórkowej. Ostatecznie dochodziło do całkowitej degradacji komórek. Całą komórkę wypełniała duża wakuola zawierająca liczne ciała lipidowe, a czasami także ciała wielopęcherzykowe oraz pozostałości cytoplazmy i organelli komórkowych. Jądra komórkowe były skurczone, a otaczająca je błona jądrowa była poprzerwana. Z ich wnętrza wypływała chromatyna w formie silnie skondensowanych pęcherzyków. Długa inkubacja w najwyższym z użytych stężeń sodu selenianu (IV) (400 $\mu\text{g/ml}$) spowodowała, więc całkowitą dezintegrację cytoplazmy i organelli w niej zawartych, a komórkę wypełniały duże wakuole. Zachowywało się jedynie silnie obkurczone jądro

komórkowe bez jąderka z perforowaną chromatyną, tworzącą charakterystyczne wypustki chromatynowe.

Uzyskane wyniki potwierdzają bardziej toksyczne działanie sodu selenianu (IV) na komórki testu *Allium*. Już, bowiem najniższe stężenia tego związku użyte do inkubacji powodowały istotne zmiany w ultrastrukturalnej organizacji komórek. Jednym ze skutków była zmiana kształtu jąder komórek interfazowych na nieregularny. Jądra komórkowe zachowywały posttelofazowy kształt i miały silnie zespiralizowaną chromatynę. Tego typu zmiany są, bowiem częstą reakcją komórek roślinnych na działanie różnych toksycznych czynników, jak np. jony metali ciężkich czy związki toksyczne (Lemasters i in. 1997; Majewska i in. 2002). Zmiany te mogą być efektem zaburzeń w funkcjonowaniu cytoszkieletu, który uczestniczy także w utrzymaniu kształtu komórek. Wydłużenie inkubacji i wzrost stężenia sodu selenianu (IV) prowadziły do silnej kondensacji chromatyny jądrowej, czego następstwem była degradacja jądra i całej komórki. Inną charakterystyczną zmianą po działaniu sodu selenianu (IV) było zwiększenie wakuolizacji komórek. Wzrost wakuolizacji cytoplazmy jest odpowiedzią komórek na obcy związek chemiczny wnikający na teren komórki. Komórki roślinne mają, bowiem silnie rozwinięty mechanizm detoksyfikacji, a jego przejawem jest tworzenie dodatkowych przestrzeni apoplastu, jako magazynów substancji toksycznych czy zbędnych komórce (Antosiewicz i Wierzbicka 1999, Wójcik 2009). Obserwowane jednocześnie zmiany aktywności endoplazmatycznego reticulum mogły być wynikiem syntetyzowania przez nie białek wakuolarnych bądź sekrecyjnych, pełniących rolę lityczną i związanych z reakcjami obronnymi komórek. Z kolei wzrost wakuolizacji komórek, pojawianie się ciał lipidowych oraz silna kondensacja chromatyny jądrowej i jej specyficzna degradacja, przebiegająca w połączeniu z zaburzeniami ultrastruktury mitochondriów i plastydów, które polegały na ich nabrzmieniu i dezorganizacji błon wewnętrznych, są typowymi zmianami, które mogą wskazywać na uruchomienie w komórkach procesu programowanej śmierci. Podobne zmiany były obserwowane u roślin np. podczas degradacji trzech spośród czterech megaspor, które uznaje się za efekt procesu programowanej śmierci (PCD) np. u *Larix leptolepis* (Cecchi Fiordi i in. 2002), czy też podczas degeneracji komórek ośrodka u *Tillandsia* (Brighigna et al. 2006), lub komórek tapetum pylnikowego w procesie mikrosporogenezy (Leśniewska 2003). W przeprowadzonych badaniach, wyższe stężenie i dłuższy czas inkubacji w roztworze sodu selenianu (IV) mogły uruchomić w komórkach merystematycznych *Allium cepa* proces programowanej śmierci, który w swoim przebiegu przypominał proces apoptozy u zwierząt, charakteryzujący się tworzeniem ciał

apoptotycznych. W komórkach roślinnych proces PCD może rozwijać się, bowiem według różnorodnego wzoru (Krishnamurthy et al. 2000).

Godny uwagi jest fakt, potwierdzony we wcześniejszych badaniach (Ślusarczyk i in. 2014), że komórki poddane działaniu Selolu przestają się dzielić, jednakże struktura ich jąder interfazowych pozostaje niezmienną. Dopiero roztwór o wysokim stężeniu (około czterokrotnie wyższym) powodował zmiany w strukturze jąder komórkowych. Może to oznaczać, że Selol działa o wiele specyficzniej niż sodu selenian (IV), nie powodując ogólnego zatrucia komórek. Wskazuje na to fakt, że już po działaniu najniższych stężeń roztworu Selolu następowały zmiany w kształcie jąder komórkowych, które nasilały się po inkubacji w wyższych stężeniach Selolu. Zmianom kształtów jąder towarzyszyła postępująca kondensacja chromatyny. Jak wykazały nasze wcześniejsze badania, w takiej sytuacji następuje pogrubienie i kondensacja chromosomów (cc chromosomy), czyli zmiany turbageniczne, nie mutagenne. W wyższych stężeniach następuje stopniowe uruchamianie procesu apoptozy w komórkach. Selol nie działa, więc toksycznie na komórki tak jak sodu selenian (IV).

Ad 3. Porównanie stężenia Selolu oraz sodu selenianu (IV) w komórkach merystemów wierzchołkowych korzeni cebuli (*Allium cepa* L.) czyli wykazanie czy selen w formie organicznej (Selol) przenika do komórek w porównaniu do selenu w formie nieorganicznej (sodu selenian (IV)).

Uzupełnieniem prowadzonych badań ultrastrukturalnych było porównanie stężenia Selolu i sodu selenianu (IV) w wierzchołkach korzeni cebuli (*Allium cepa* L.). Wyniki tych prac zostały zawarte również w publikacji **Ultrastructural changes in onion (*Allium cepa* L.) root tip meristem cells treated with Selol and sodium selenate (IV). 2015. Caryologia (DOI:10.1080/00087114.2015.1109934).**

Selol jest związkiem o charakterze lipofilnym, stąd pewną trudnością w badaniach był problem dotyczący jego rozpuszczalności w wodzie. Wszystkie przedstawione doświadczenia wymagały opracowania formy Selolu, tworzącej drobno – suspensyjną frakcję micelli w roztworze wodnym. W formie micelli przygotowano również roztwór sodu selenianu (IV). Do badań stosowano Selol 2% oraz sodu selenian (IV) (Na_2SeO_3) w 0.9% NaCl zawierające 400 $\mu\text{g/ml}$ Se oraz 800 $\mu\text{g/ml}$ Se (IV). Korzenie inkubowano w Selolu i sodu selenianie (IV) przez 48 godz. Oznaczenie zawartości Se (IV) metodą spektrometrii atomowej (ASA) wykonywano po czasie 0, 6, 24 i 48 godz. w automatycznym jednowiązkowym spektrometrze absorpcji atomowej z korekcją tła efektem Zeemana (Suchocki i in. 2003).

Przeprowadzone badanie wykazało, że przenikanie i gromadzenie selenu (IV) pochodzącego z obu badanych związków było zróżnicowane i zależało od rodzaju związku, jego stężenia oraz czasu inkubacji. Najszybciej do komórek przenikał selen w postaci **sodu selenianu (IV)**, z roztworów o niższym stężeniu (400 µg Se/ml), osiągając kilkunastokrotnie wyższą koncentrację niż z roztworów o stężeniu 800 µg Se/ml. Stężenie sodu selenianu (IV) 800 µg Se/ml spowodowało uszkodzenie komórek, a przede wszystkim uszkodzenie błon struktur komórkowych, dlatego obserwowano wyższą akumulację selenu podczas inkubacji w stężeniu 400 µg/ml Se niż w 800 µg/ml. Warto zwrócić uwagę na fakt, że po 48 godz. inkubacji w roztworze sodu selenianu (IV) o stężeniu 400 µg /ml Se w korzeniach nagromadziło się 25 razy więcej selenu niż po działaniu Selolu o tym samym stężeniu selenu. Należy przypuszczać, że jest to związane z wyższą toksycznością sodu selenianu (IV), która powoduje szybsze uszkodzenia komórek w roztworach o stężeniu 800 µg Se/ml, ale także może wynikać z innej struktury chemicznej związku. Przenikanie selenu w postaci **Selolu** do korzeni również zależało od czasu traktowania korzeni, ale było znacznie wolniejsze. Dopiero po 48 godz. inkubacji, oznaczona w korzeniach ilość selenu (2,2 mg/g św. masy) była równa tej, jaka wniknęła po 6 godz. inkubacji w roztworze sodu selenianu (IV) (2,1 mg/g św. masy). Wynika z tego, że przenikanie selenu w formie organicznej (Selol) do komórek było wyraźnie wolniejsze w porównaniu do przenikania selenu w formie nieorganicznej (sodu selenian (IV)). Selol ponadto posiada bardziej złożoną budowę cząsteczkową, gdyż zawiera Se wbudowany w pojedyncze pierścienie dioksaselenolanowe w resztach kwasu oleinowego. Można, więc wysunąć wniosek, iż komórkom roślinnym łatwiej jest pobierać selen w postaci sodu selenianu (IV), co potwierdzają dane z literatury. Sodu selenian (IV) jest jedną z najlepiej przyswajalnych przez rośliny form selenu. Na podstawie literatury wiadomo, że wnika on do wnętrza komórek i w organizmie roślinnym przemieszcza się drogą symplastyczną (Whanger 2002, Szymańska i Hawrylak 2007, Wierzbicka i in. 2007). W komórce następuje jego przekształcenie m.in. do Se-metyloselenocysteiny (Wierzbicka i in. 2007). Powstały selenoaminokwas jest tzw. aminokwasem niebiałkowym. Jednakże wiadomo, że w komórkach roślinnych syntetyzowane są również selenocysteina i selenometionina. Te dwa aminokwasy podstawiane są niespecyficznie odpowiednio w miejsce cysteiny i metioniny do nowosyntetyzowanych białek, dezaktywując często ich funkcje (Whanger 2002). Na tym polega głównie toksyczne działanie selenu.

Ad 4. Zbadanie wpływu sodu selenianu (IV) i seleninotriglicerydów na wzrost i żywotność grzybni soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wgłębnej, w perspektywie wykorzystania jej do biosyntezy polisacharydów zawierających selen.

Kolejnym etapem moich badań było porównanie wpływu nieorganicznego i organicznego źródła selenu, na wzrost, żywotność i zmiany strukturalne komórek grzybni soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wgłębnej, w perspektywie wykorzystania jej do biosyntezy polisacharydów wzbogaconych w selen. Grzyby stanowią, bowiem cenne źródło związków biologicznie aktywnych zapobiegających powstawaniu wielu chorób, m.in. chorób nowotworowych i układu krążenia oraz wspomagających ich leczenie. Właściwości przeciwnowotworowe grzybów wynikają z obecności w ich owocnikach związków polisacharydowych (Liu i in. 1997; Wasser 2002; Konno i in. 2002; Leung i in. 2006, Zhang i in. 2007), które są strukturalnymi składnikami ściany komórkowej grzybów. Związki te występują zarówno w owocnikach rosnących w stanie naturalnym, jak i w biomasie pochodzącej z hodowli *in vitro*. Grzybnia soplówki jeżowatej (*H. erinaceum*) produkuje wewnątrzkomórkowe polisacharydy (IPS) i wydzielane do pożywki zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS) o aktywności przeciwnowotworowej i immunostymulującej (Son i in. 2006, Lee i Hong 2010). Wstępna analiza strukturalna grzybni soplówki hodowanej na pożywkach wzbogaconych w sodu selenian (IV) (Na_2SeO_3), Selol_{2%}, Selol_{5%} oraz na podłożu kontrolnym (bez dodatków selenu) została przedstawiona w pracy **Malinowska E., Krzyczkowski W., Herold F., Łapienis G., Ślusarczyk J., Suchocki P., Kuraś M., Turło J.: Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. 2009. *Enzyme and Microbial Technology* 5: 334–343**). W badaniach wykazano, że grzybnia *H. erinaceum* hodowana na pożywce podstawowej, nie zawierającej selenu, miała postać okrągłych agregatów (peletek) o średnicy 2–5 mm. W obrazie mikroskopowym pojedynczej peletki widoczne były liczne splecione strzępki grzybni oraz rozmieszczone pomiędzy nimi owalnego kształtu zarodniki. Niektóre z nich znajdowały się w fazie kiełkowania, z wyraźnymi nitkami młodych strzępek. W porównaniu z kontrolą grzybnia rosnąca w obecności sodu selenianu (IV) charakteryzowała się słabszym przyrostem i bardziej rozluźnioną strukturą. Miało to również negatywny wpływ na wydajność biosyntezy polisacharydów wewnątrzkomórkowych (IPS), przyczyniając się równocześnie do wzrostu produkcji polisacharydów zewnątrzkomórkowych (EPS), co mogło wynikać z obumierania komórek grzybowych.

Z kolei grzybnia pochodząca z hodowli na podłożu zawierającym seleninotriglicerydy, zarówno w formie Selolu_{2%} jak i Selolu_{5%}, miała wygląd zbliżony do grzybni kontrolnej, a pomiędzy strzępkami można było zaobserwować liczne krople Selolu o różnej wielkości. W przypadku Selolu_{5%} ich nagromadzenie było większe, co może wskazywać na odmienny sposób metabolizowania seleninotriglicerydów w obu tych formach Selolu. Zaobserwowano, że grzybnia *H. erinaceum* ma zdolność do absorbowania lipidów ze środowiska zewnętrznego, a następnie stopniowego ich wykorzystywania do swojego wzrostu i produkcji polisacharydów. Grzybnia *H. erinaceum* wykazywała wysoką tolerancję w stosunku do związków selenu na +4 stopniu utlenienia, w formie organicznych seleninotriglicerydów, w postaci Selolu_{2%} oraz nieco mniejszą w przypadku Selolu_{5%} (odpowiednio 200 i 500 mg/l Se). Seleninotriglicerydy stymulowały wzrost grzybni i produkcję EPS. W przypadku nieorganicznego sodu selenianu (IV) (100 mg/l Se), obserwowano toksyczny wpływ na rozwój grzybni, czego przejawem było zahamowanie jej rozwoju.

Powyższe badania stały się punktem wyjścia do kolejnych analiz, w których porównano działanie nieorganicznej formy selenu w postaci sodu selenianu (IV) (Na₂SeO₃) i mieszaniny (sodu selenianu (IV) + Selolu_{2%}), na komórki grzybni soplówki jeżowatej w aspekcie zmian cytologicznych oraz ich żywotności. Zostały one przedstawione w pracy: **Ślusarczyk J., Malinowska E., Krzyczkowski W., Kuraś M.: Influence of inorganic and organic selenium on number of living mycelial cells and their ultrastructure in culture of *Hericium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.). 2013. Acta Biologica Hungarica 64 (1): 96-105.** Grzybnię hodowano na podłożach zawierających sodu selenian (IV) (Na₂SeO₃), mieszaninę sodu selenianu (IV) + Selolu_{2%} oraz na podłożu kontrolnym (bez dodatków selenu). Wykazano, że grzybnia hodowana na podłożu kontrolnym zawierała po 3 dniach hodowli prawie w 100% żywe komórki, a po 24 dniach ponad 80% żywych komórek. Natomiast hodowla grzybni w pożywce zawierającej sodu selenian (IV) charakteryzowała się drastycznym spadkiem liczby żywych komórek do 11,8% i 9,1% odpowiednio po 3 i 24 dniach. Pod wpływem toksycznego działania selenu nieorganicznego (Na₂SeO₃) ultrastrukturalna organizacja komórek grzybowych została stopniowo zdegradowana. Z kolei dodanie selenu organicznego (Selolu_{2%}) spowodowało ponowny wzrost liczby żywych komórek w kulturze do poziomu około 90% po 24 dniach hodowli. Odwrócenie negatywnego wpływu nieorganicznego selenu, wyraziło się zarówno przez zwiększenie liczby żywych komórek jak i brak zmian degradacyjnych w ultrastrukturze komórek grzybowych. Jedyne różnice w stosunku do kontroli przejawiały się w zwiększonej ilości ciał lipidowych w cytoplazmie komórek grzybowych. Niektóre z nich posiadały wyraźne nadtrawione jasne obszary, a na terenie

cytoplazmy obserwowano agregacje elektronowo ciemnych struktur, prawdopodobnie rybosomów i związków fenolowych. Powyższe wyniki mogą wskazywać na prewencyjne działanie Selolu_{2%}, chroniące komórki grzybowe przed toksycznym wpływem jonów nieorganicznego selenu.

Uzyskane wyniki dotyczące przeżywalności komórek grzybni *H. erinaceum* potwierdziły wcześniejsze badania i wykazały, że w pożywce zawierającej sodu selenian (IV) następuje zahamowanie wzrostu grzybni. Interesujący był fakt, że w hodowli zawierającej jednocześnie sodu selenian (IV) i Selol_{2%} nie zaobserwowano hamującego wpływu selenu nieorganicznego. Zjawisko to spowodowane było prawdopodobnie uruchomieniem enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów obrony antyoksydacyjnej (m.in. zwiększenie aktywności peroksydazy glutationowej), minimalizujących toksyczny wpływ sodu selenianu (IV) (Suchocki i in. 2007). Z kolei mniejsza ilość żywych komórek w pożywce kontrolnej po 24 dniach hodowli wynika z intensywnego metabolizmu i wyczerpywania się składników pokarmowych podłoża.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że różne źródła Se w podłożu hodowlanym wywierają odmienne działanie na ultrastrukturę i żywotność grzybni. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w budowie chemicznej tych związków, a także z różnic w toksyczności względem komórek grzybowych.

Ad 5. Porównanie wpływu nieorganicznych i organicznych źródeł selenu na zmiany strukturalne i ultrastrukturę grzybni soplówki jeżowatej (*Hericum erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) w hodowli wglębnej, jako potencjalnego źródła wzbogaconych w selen polisacharydów grzybowych.

We wcześniejszych pracach wykazano, że organiczne seleninotriglicerydy (Selol) przyczyniają się do zwiększenia biosyntezy egzopolisacharydów (EPS), zawierających duże ilości Se (Malinowska et al., 2009). Wykazano też, że różnice w budowie chemicznej Selolu_{2%} oraz Selolu_{5%}, jak również inna zawartość selenu w tych dwóch związkach (odpowiednio 200 i 500 mg/l Se) determinująca ich toksyczność, skutkują różnicami w przyroście biomasy grzybni i biosyntezy polisacharydów. Wyniki powyższych badań stały się powodem przeprowadzenia szerszych analiz w zakresie zmian cytologicznych i ultrastrukturalnych zachodzących w komórkach grzybni, które przedstawiono w pracy: **Ultrastructural changes in the mycelium of *Hericum erinaceum* (Bull.; Fr.) Pers. under selenium induced oxidative stress. 2014. Journal of the Science of Food and Agriculture 94: 2718-2725.** W badaniach grzybnię soplówki jeżowatej (*Hericum erinaceum* (Bull.; Fr.)

Pers.) hodowano na podłożach zawierających sodu selenian (IV) (Na_2SeO_3), $\text{Selol}_{2\%}$, $\text{Selol}_{5\%}$ oraz mieszaniny Na_2SeO_3 i Selolu. Próbkę grzybni pobierano 3 i 24 dnia hodowli, utrwalano i badano w TEM.

W pracy wykazano, że przez cały czas trwania hodowli w grzybni kontrolnej, bez dodatku selenu, dominowały żywe komórki, wypełnione gęstą cytoplazmą i licznymi organellami. Po 24 dniach hodowli pojawiały się wśród nich komórki zdegradowane, które stanowiły 17,9%. W przypadku pozostałych wariantów podłoża, struktura mikroskopowa komórek grzybowych była zróżnicowana w zależności od kombinacji badawczej.

Po 3 dniach hodowli grzybni z dodatkiem $\text{Selol}_{2\%}$ w obrazie mikroskopowym dominowały żywe komórki, które miały wygląd typowy dla komórek kontrolnych, z gęstą cytoplazmą i licznymi organellami. Występowały w nich liczne rybosomy, cysterny ER oraz struktury błoniaste. W centralnej części komórki położone było nieregularnego kształtu jądro. W brzeżnej części komórki występowały mitochondria o charakterystycznym wydłużonym kształcie. Na terenie cytoplazmy spotykano pojedyncze lub po kilka ciała lipidowe pokryte czasem ciemnymi ziarnistościami. Interesująca zmiana wystąpiła w strukturze ściany otaczającej komórki grzybowe. Była ona bardziej rozbudowana i utworzona z kilku warstw (3-4), podczas gdy normalnie tworzyły ją dwie warstwy, ponadto była ona silnie spęczniała. Po 24 dniach tej hodowli pojawiały się w wielu komórkach zmiany degradacyjne. W komórkach tych cytoplazma była ułożona przyściennie, z pozostałościami organelli komórkowych. Komórki z oznakami degradacji stanowiły ponad 40% wszystkich komórek.

Natomiast w kombinacji z dodatkiem $\text{Selol}_{5\%}$, po 3 dniach hodowli, również dominowały żywe komórki grzyba (68%), lecz wśród nich częściej niż po dodaniu $\text{Selol}_{2\%}$, spotykano martwe (32%). Cytoplazma żywych komórek była wypełniona licznymi skupieniami rybosomów, co nadawało komórkom charakterystyczną ciemną barwę. Ściana komórkowa tworzyła szeroką jednorodną warstwę, wyraźnie postrzępioną, na powierzchni której występowały ciemne, drobne złogi, stanowiące prawdopodobnie związki fenolowe wytrącone pod wpływem kofeiny dodanej podczas procedury utrwalania lub zdeponowane związki selenu. Natomiast po 24 dniach hodowli tej kombinacji liczba żywych komórek wzrosła do poziomu wariantu kontrolnego (75,9%).

W przypadku dodania do podłoża hodowlanego nieorganicznego selenu (tj. 100 mg/l Se sodu selenianu (IV)), już po 3 dniach hodowli w kulturze przeważały komórki z wyraźnymi zmianami degradacyjnymi (88,2%). Zmiany te mocno nasiliły się podczas trwania hodowli i po 24 dniach w kulturze dominowały komórki zdegradowane. Ich liczba osiągnęła najwyższy poziom (90,9%) wśród wszystkich kombinacji badawczych.

Zmiany degradacyjne występowały również po 3 dniach hodowli w podłożach, z dodatkiem obu form selenu, nieorganicznego w postaci sodu selenianu (IV) i organicznego w postaci 1% Selolu_{2%} lub Selolu_{5%}. Liczniejsze komórki z oznakami degradacji obserwowano jednak w przypadku dodania do podłoża sodu selenianu (IV) z Selolem_{5%}. Po 24 dniach hodowli w tej kombinacji wyraźnie jednak wzrosła liczba żywych komórek (69,8%) w porównaniu do stanu po 3 dniach hodowli (15,8%).

Z kolei w podłożu z sodu selenianem (IV) i Selolem_{2%} w obrazie mikroskopowym grzybni po 3 dniach hodowli dominowały żywe komórki (90,9%), chociaż występowały również wśród nich komórki, z oznakami degradacji (9,1%). Komórki żywe miały podobną ultrastrukturę do komórek kontrolnych. W gęstej cytoplazmie występowały jednak bardzo liczne rybosomy, co nadawało komórkom ciemną barwę. Pomiedzy nimi obserwowano cysterny rER i pojedyncze ciała lipidowe. Po 24 dniach hodowli zmiany degradacyjne obejmowały więcej komórek (10,2%), jednak w preparacie przeważały nadal komórki żywe (89,8%). Wypełniała je gęsta, cytoplazma, w której jednak stopniowo pojawiały się zmiany degradacyjne przejawiające się w tworzeniu drobnych wakuol, degradacji rybosomów i rozpadzie organelli. Natomiast komórki zdegradowane zawierały nieznaczne pozostałości cytoplazmy i wypełnione były dużymi ciałami lipidowymi. W komórkach zdegradowanych i żywych, na terenie cytoplazmy i wokół organelli, obserwowano czarne złogi, stanowiące przypuszczalnie zdeponowane związki selenu. Ściana otaczająca komórki była nieco grubsza niż po 3 dniach hodowli. Tworzyły ją dwie warstwy, wewnętrzna - szara, zbita i zewnętrzna - jasna, na powierzchni której występowały drobne ciemne depozyty, które mogły stanowić zdeponowane związki selenu.

Badania wykazały, że obecność selenu w pożywce powoduje w komórkach grzybowych, wystąpienie zmian degradacyjnych w postaci zmniejszenia się liczby organelli komórkowych, rybosomów i mitochondriów, odpowiedzialnych za procesy metaboliczne komórki. Często zmiany degradacyjne pojawiały się w komórkach *H. erinaceum* bardzo szybko, co uwidoczniło się zwłaszcza po dodaniu sodu selenianu (IV) (wyższa toksyczność), a w mniejszym stopniu Selolu_{5%}. Zjawisko to było związane ze zwiększoną absorpcją Se z pożywki, skutkującą nasileniem stresu oksydacyjnego przyczyniającego się do degradacji organelli komórkowych. Niniejsze badania potwierdzają tezę, że w niekorzystnych warunkach środowiska biosynteza, a następnie sekrecja polisacharydów (EPS) poza komórkę grzybową ulega nasileniu na skutek zmian w ciągłości ściany komórkowej i zwiększenia jej przepuszczalności, czego oznaką był wzrost zmian degradacyjnych w komórkach. W przypadku dodania Selolu_{2%} do pożywki, zmiany degradacyjne były najłagodniejsze,

najbardziej zbliżone do kontroli, choć po 24 dniach w kulturze również dominowały komórki zdegradowane. Rezultaty badań sugerują, że Selol_{2%} nie wpływa aż tak negatywnie na stan biologiczny grzybni i może stanowić dobre źródło Se przyswajalnego przez grzybnię w sposób stopniowy. Obserwowany wzrost liczby warstw ściany otaczającej komórkę grzybową może świadczyć o uruchomieniu reakcji obronnej przed toksycznym wpływem środowiska zewnętrznego, co skutkowało wzrostem syntezy polisacharydów zewnątrzkomórkowych (EPS). O toksycznym natomiast działaniu sodu selenianu (IV) na rozwój grzybni *Hericium erinaceum* świadczyły szybko występujące w komórkach zmiany degeneracyjne, które wpływały również negatywnie na wydajność biosyntezy IPS, przyczyniając się równocześnie do wzrostu produkcji EPS, na drodze obumierania komórek grzybowych.

Ciekawy był fakt, potwierdzony również w tym eksperymencie, że w hodowli zawierającej jednocześnie, jako źródło selenu sodu selenianu (IV) i Selol_{2%} nie zaobserwowano hamującego wpływu selenu nieorganicznego. Ponieważ grzybnia używa kwasów tłuszczowych zawartych w Selolu, jako źródła węgla, ilość glukozy w tej pożywce została zmniejszona do 10 g/L w celu zapobieżenia efektowi represji katabolicznej. Mniejsza ilość glukozy w porównaniu z jej zawartością w pożywce z samym sodu selenianem (IV) mogła być przyczyną zmniejszenia wchłaniania tego związku, gdyż efektywność transportu aktywnego jonu SeO_3^{2-} wzrasta w obecności cukrów (Chen i in. 2006).

Zaskakujące wyniki uzyskano w przypadku zastosowania pożywek zawierających Selol_{5%}, jak również Selol_{5%} w połączeniu z sodu selenianem (IV) (Na_2SeO_3). Liczba żywych komórek była wyższa po 24 niż po 3 dniach hodowli. Zjawisko to mogło być spowodowane wolniejszym wzrostem biomasy wynikającym z konieczności uruchomienia rezerw energetycznych w kierunku wytworzenia mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. Mogło być to również spowodowane powstawaniem depozytu selenu w martwych komórkach, przez co obniżeniu uległa toksyczność środowiska.

Polisacharydy są składnikami ściany komórkowej grzybów. Zwykle w pracach na temat podwyższenia produkcji polisacharydów grzybowych obserwowany jest rozrost ściany komórkowej grzyba (Stasinopoulos i Seviour 1990; Yong-Min i Yong Won 2006). Ściana komórkowa jest syntetyzowana w pierwszym stadium rozwoju grzybni przy udziale siateczki endoplazmatycznej i podlega ciągłemu rozrastaniu się. Jest ona odpowiedzialna za kształt komórek oraz stanowi pierwszą barierę oddzielającą cytoplazmę od środowiska. Tymczasem zwiększenie szerokości ściany komórkowej, jej kilkuwarstwową budowę obserwowano jedynie po dodaniu Selolu_{2%}. Może to sugerować, że wzrost wydzielania przez grzybnię polisacharydów (EPS), po dodaniu selenu nieorganicznego (sodu selenianu (IV)) związany

jest z procesem degradacji komórki grzybowej w reakcji na zmieniające się warunki środowiska rozwoju.

Natura efektu wywieranego przez różne źródła Se w podłożu hodowlanym, na żywotność grzybni oraz formowanie EPS i IPS wynika prawdopodobnie z różnic w ich budowie chemicznej oraz z różnic w toksyczności tych związków względem komórek. Efektem tych oddziaływań mogą być zmiany degeneracyjne komórek i związany z tym rozpad ściany otaczającej zdegradowane komórki grzybowe, czemu towarzyszy uwalnianie związków polisacharydowych do podłoża hodowlanego. Występujące zaś zmiany w strukturze ściany komórek grzybowych (zwiększenie liczby warstw) w przypadku dodania Selolu_{2%}, mogą świadczyć o uruchomieniu w komórkach mechanizmów obronnych w związku z jego łagodniejszym działaniem.

Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie w dalszych badaniach nad mechanizmem działania i wykorzystania Selolu w terapiach przeciwnowotworowych, a także w suplementacji produktów żywnościowych.

Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

- Oba badane związki selenu, Selol i sodu selenian (IV), działając na komórki testu *Allium* powodowały zmiany w strukturze chromosomów, polegające na ich silnej kondensacji i kontrakcji (cc chromosomy).
- Zarówno Selol jak i sodu selenian (IV), powodowały zahamowanie podziałów komórkowych z tym, że sodu selenian (IV) działał bardziej toksycznie na komórki, powodując często aberracje klastogeniczne, czego nie stwierdzono w przypadku Selolu.
- Ostatecznym efektem działania Selolu była zmiana morfologicznego ukształtowania jąder, poprzez aberracje turbageniczne, skurcz i kondensację chromatyny doprowadzał on do prawie całkowitej inhibicji aktywności mitotycznej. Selol nie powodował zmian klastogenicznych typowych dla działania sodu selenianu (IV). Selol nie działał mutagennie.
- Podczas inkubacji w niższych stężeniach Selolu dochodziło do synchronicznego nagromadzenia komórek na etapie interfazy i najwcześniejszych faz mitozy. Po wydłużeniu czasu inkubacji oraz w najwyższych stężeniach dochodziło do stopniowego przechodzenia komórek w stan apoptozy i tworzenia ciał apoptotycznych.

- Na podstawie analizy zmian strukturalnych komórek, ich aktywności podziałowej (indeks mitotyczny), oraz proporcji faz podziałowych (indeks fazowy) stwierdzono, że inkubacja w obu związkach selenu prowadziła do stopniowej redukcji lub całkowitej inhibicji podziałów komórkowych.
- Analiza zmian ultrastrukturalnych potwierdziła bardziej toksyczne działanie sodu selenianu (IV) na komórki testu *Allium*. Już bowiem najniższe stężenia tego związku użyte do inkubacji powodowały istotne zmiany w ultrastrukturalnej organizacji komórek. Jednym ze skutków była zmiana kształtu jąder komórek interfazowych na nieregularny. Jądra komórkowe zachowywały posttelofazowy kształt i miały silnie zespiralizowaną chromatynę. Wydłużenie inkubacji i wzrost stężenia sodu selenianu (IV) prowadziły do silnej kondensacji chromatyny jądrowej i w następstwie do degradacji jądra i całej komórki.
- Działanie Selolu nie powodowało tak drastycznych zmian w ultrastrukturze. Obejmowały one stopniowy wzrost heterochromatynizacji jąder komórkowych oraz zmianę ich kształtu skorelowaną ze wzrostem stężenia roztworów Selolu oraz czasu inkubacji.
- Porównanie stężenia obu związków w wierzchołkach korzeni *Allium cepa L.* wykazało, że przenikanie i gromadzenie selenu (IV) w formie organicznej (Selol) i selenu w formie nieorganicznej (sodu selenianu (IV)) było zróżnicowane i zależało od rodzaju związku, jego stężenia oraz czasu inkubacji. Najszybciej do komórek przenikał selen w postaci sodu selenianu (IV), z roztworów o niższym stężeniu (400 µg Se/ml), osiągając kilkunastokrotnie wyższą koncentrację niż z roztworów o stężeniu 800 µg Se/ml.
- Selen w formie organicznej (Selol) przenikał wyraźnie wolniej w porównaniu do przenikania selenu w formie nieorganicznej (sodu selenianu (IV)), co mogło być związane z bardziej złożoną strukturą chemiczną Selolu.
- Wyniki badań nad wpływem różnych źródeł selenu na wzrost grzybni soplówki jeżowatej (*H. erinaceum* (Bull.; Fr.) Pers.) wykazały, że dodanie sodu selenianu (IV) do podłoża hodowlanego powoduje zahamowanie wzrostu grzybni. Świadczy to o toksycznym działaniu sodu selenianu (IV) na komórki grzybni *H. erinaceum*, i przejawiało się szybko występującymi zmianami degeneracyjnymi w komórkach. Miało to również negatywny wpływ na wydajność biosyntezy polisacharydów wewnątrzkomórkowych (IPS),

przyczyniając się równocześnie do wzrostu produkcji polisacharydów zewnątrzkomórkowych (EPS), na skutek obumierania komórek grzybowych.

- Badania potwierdziły tezę, że w niekorzystnych warunkach środowiska biosynteza, a następnie sekrecja polisacharydów (EPS) poza komórkę grzybową ulega nasileniu na skutek zmian w ciągłości ściany komórkowej i zwiększenia jej przepuszczalności, czego oznaką był wzrost zmian degradacyjnych w komórkach.
- Dodatek Selolu_{2%} do podłoża hodowlanego nie powodował zaburzeń w ultrastrukturze komórek, lecz przyczyniał się do pogrubienia ściany komórkowej, co sugerowało wpływ na biosyntezę polisacharydów (EPS), będących składnikami ściany komórkowej. Rezultaty tych badań wykazały, że Selol_{2%} nie wpływa negatywnie na stan fizjologiczny grzybni i może stanowić dobre źródło Se przyswajalnego przez grzybnię w sposób stopniowy.
- W przypadku hodowli zawierającej w podłożu jednocześnie Selol_{2%} i sodu selenian (IV) nie zaobserwowano hamującego wpływu selenu nieorganicznego. Zjawisko to spowodowane było prawdopodobnie uruchomieniem enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów obrony antyoksydacyjnej minimalizujących toksyczny wpływ sodu selenianu (IV).
- Zastosowanie pożywek zawierających Selol_{5%}, jak również Selol_{5%} w połączeniu z sodu selenianem (IV) spowodowało wzrost liczby żywych komórek grzybowych pod koniec hodowli. Zjawisko to mogło być spowodowane wolniejszym wzrostem biomasy wynikającym z konieczności uruchomienia rezerw energetycznych w celu wytworzenia mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. Mogło to być również spowodowane powstawaniem depozytu selenu w martwych komórkach, przez co obniżeniu uległa toksyczność środowiska.
- Wyniki badań wskazują na znacznie niższą toksyczność Selolu w porównaniu z sodu selenianem (IV), co przemawia za dalszym badaniem tego związku, jako potencjalnego, bezpiecznego leku antynowotworowego. Może również stanowić dobre źródło selenu w postaci suplementów żywnościowych.

Literatura

Alaejos M.S., Diaz Romero C. 2000. Selenium and cancer: some nutritional aspects. Nutrition. 16: 376–383.

- Antosiewicz DM, Wierzbicka M. 1999. Localization of lead in *Allium cepa* L., cell by electron microscopy. *Journal of Microscopy*. 195:139-146.
- Berry M., Banu L., Larsen P. 1991. Type I jodothyronine deiodinase is a selenocysteine containing enzyme. *Nature* 349, 438-440.
- Brighigna L, Milocani E, Papini A, Vesprini JL. 2006. Programmed cell death in the nucellus of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Caryologia*. 59 (4):334-339.
- Cecchi Fiordi A, Papini A, Brighigna L. 2002. Programmed Cell Death of the nonfunctional megaspores in *Larix leptolepis* (Sieb Et Zucc.) Gordon (Pinaceae): ultrastructural aspects. *Phytomorphology*. 52 (2-3):187-195.
- Chen T., Zheng W., Wong Y.S., Yang F., Bai Y. 2006. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresource Technology* 97: 2260–2265.
- Chmielowski J., Kłapcińska B., Tyflewska A. Bioakumulacja selenu. In: Szteke B. (red.) Kabata-Pendias A. 1994. Arsen i selen w środowisku – problemy ekologiczne i metodyczne. *Zeszyty Naukowe PAN Człowiek i Środowisko*.
- Chung Y.W., Kim T.S., Lee S.Y., Lee S.H., Choi Y., Kim N., Min B-M., Jeong D-W., Kim I.Y. 2006. Selenium-induced apoptosis of osteoclasts mediated by the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* 160: 143-150.
- Clark L.C., Marshall J.R. 2001. Randomized, controlled chemoprevention trials in populations at very high risk for prostate cancer: elevated prostate-specific antigen and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*. 57(4a):185–187.
- Costello A. J. 2001. A randomized, controlled chemoprevention trial of selenium in familial prostate cancer: rationale, recruitment, and design issues. *Urology* 57 (suppl 4a): 182–184.
- Dayna S., Hill K., Burk R., Palmer I. 2002. Selenoprotein levels in patients with colorectal adenomas and cancer. *The American Journal of Gastroenterology*. 97(3): 745-748.
- Dorgan J.F. 1998. Relationships of serum carotenoids, retinol, cc-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control* 9(1): 89-97.
- El-Bayoumy K. 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res.* 475: 123-139.
- Fels I., Cheldelin V.H. 1950. Selenate inhibition studies. IV. Biochemical bases of selenate toxicity in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 185: 803–811.
- Fitak B.A., Grabowski M., Suchocki P. 1999. Patent-B. Preparat przeciwnowotworowy i sposób jego wytwarzania. Pol. PL, 176530.
- Gabara B., Kalwinek J., Koziróg A., Żakowska Z., Brycki B. 2006. Influence of N, N – bis (aminopropyl)dodecylamine on the ultrastructure of nuclei in *Aspergillus niger* mycelium and on cell proliferation and mitotic disturbances in *Allium cepa* L. root meristem. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 48(1): 45-52.
- Gasmi A., Garnier R., Galliot-Guilley M., Gaudillat C., Quartenoud B., Buisine A., Djebbar D. 1997. Acute selenium poisoning; *Vet Hum Toxicol*. 39(5):304-308.
- Gromadzińska J., Reszka E., Bruzelius E., Wąsowicz W., Akesson B. 2008. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur. J. Nutr.* 47 suppl 2: 29-50.
- Jiang C., Wang Z., Ganther H., Lu J., 2001. Caspases as Key of Methyl Selenium – induced apoptosis (Anoiks) of DU – 145 Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 61: 3062–3070.
- Konno S., Aynehchi S., Dolin D.J., Schwartz A.M., Choudhury M.S., Tazaki H. 2002. Anticancer and hypoglycemic effects of polysaccharides in edible and medicinal maitake mushroom [*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray]. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 185–195.
- Krishnamurthy KV, Krishnaraj R, Chozhavendan R, Samuel CF. 2000. The programme of cell death in plants and animals- A comparison. *Current Science*. 79(9):1169-1118.
- Książek I., Sitarz K., Roslon M., Anuszevska E., Suchocki P., Dudkiewicz Wilczyńska J. 2013. The influence of Selol on the expression of oxidative stress genes in normal and malignant prostate cells. *Cancer Genomics and Proteomics* 10: 225-232.

- Kucharzewski M., Braziewicz J., Majewska U., Góźdz S. 2002. Concentration of selenium in the whole blood and the thyroid tissue of patients with various thyroid diseases. *Biol. Trace. Elem. Res.* 88: 25-30.
- Kuraś M., Nowakowska J., Śliwińska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Zobel A., Gulewicz K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 211-221.
- Lemasters J., Nieminen A., Qian T., Trost L., Herman B. 1997. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol. Cell Biochem.* 174: 159-165.
- Lee J.S., Hong E.K. 2010. *Hericium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*. 297: 144-154.
- Leśniewska J. 2003. Tapetum pylnikowe w aspekcie programowanej śmierci komórki. *Kosmos*. 52 (4): 399-412.
- Leung M.Y.K., Liu C., Koon J.C.M., Fung K.P. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* 105: 101-114.
- Levan A. 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24: 471-486.
- Liu F., Ooi V.E.C., Chang S.T. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* 60 (10): 763-771.
- Lopez-Saez J.F., Fernandez-Gomez E. 1965. Partial mitotic index and phase indices. *Experientia* 21: 591-592.
- Majewska A., Furmanowa M., Śliwińska E., Głowniak K., Guzewska J., Kuraś M., Zobel A. 2000. Influence of extract from shoots of *Taxus baccata* var. "elegantissima" on mitotic activity of meristematic cells of *Allium cepa* L. roots. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 69 (3): 185-192.
- Majewska A., Furmanowa M., Głowniak K., Guzewska J., Zobel A., Kuraś M. 2002. Influence of extract from shoots of *Taxus baccata* var. elegantissima on ultrastructure and tubulin cytoskeleton of meristematic cells of *Allium cepa* L. roots. *Acta Soc. Bot. Pol.* 71 (3): 211-221.
- Malinowska E., Krzyczkowski W., Herold F., Łapienis G., Ślusarczyk J., Suchocki P., Kuraś M., Turło J. 2009. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme Microb. Technol.* 44:334-343.
- McKenzie R.C., Rafferty T.S., Beckett G.J. 1998. Selenium: an essential element for immune function. *Immunol. Today* 19: 342-345.
- Nilsson G., Sun X., Nyström C., Rundlöf A.K., Fernandes A.P., Björnstedt M., Dobra K. 2006. Selenium induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic. Bio. Med.* 41: 874-885.
- Oyeyemi I.T., Bakare A.A. 2013. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L., and *Luffa cylindrical* L. on *Allium cepa* root tip cells. *Caryologia*. 66, 4: 360-367.
- Rayman M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 356: 233-241.
- Rayman M.P. 2002. The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 203-215.
- Reilly C. 1998. Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science and Technology*. 9: 114-118.
- Siegel S.M., Galun M., Siegel B.Z. 1980. Filamentous fungi as metal biosorbents: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*. 53: 335-344.
- Son C.G., Shin J.W., Cho J.H., Cho C.K., Yun C.H., Chung W. 2006. Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Hericium erinaceum*. *International Immunopharmacology*. 6: 1363-1369.
- Stańczyk M., Jaworska M., Wilk M., Suchocki P., Anuszevska E. 2010. The effect of selenium on redox state and thiols changes in lung tissue after Selol, a new organoselenium (V) compound, administration. *Experimental Immunology* 35(3): 115-122.
- Stasinopoulos S.J., Seviour R.J. 1990. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 778-782.

- Stewart M.S., Spallholz J.E., Neldner K.H., Pence B.C. 1999. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 42-48.
- Suchocki P., Jakoniuk D., Fitak B.A. 2003. Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium (IV) in selenitetriglycerides. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32: 1029-1036
- Suchocki P., Misiewicz I., Skupinska K., Waclawek K., Fijalek Z., Kasprzycka-Guttman T. 2007. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. *Oncology Reports*. 18(4): 893-899.
- Suchocki P., Misiewicz-Krzemińska I., Skupińska K., Niedźwiecka K., Lubelska K., Fijalek Z., Kasprzycka-Guttman T. 2010. Selenitetriglycerides affect CYP1A1 and QR activity by involvement of reactive oxygen species and Nrf2 transcription factor. *Pharmacological Reports* 62: 352-361.
- Szymańska M., Hawrylak B. 2007. Selen w roślinach, In: Wierzbicka M., Pyrzyńska K., Bulska E. (red.) *Selen – pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza*. Malamut, Warszawa, pp. 69-87.
- Ślusarczyk J., Malinowska E., Krzyczkowski W., Kuraś M. 2013. Influence of inorganic and organic selenium on number of living mycelial cells and their ultrastructure in culture of *Hericium erinaceum* (Bull.: Fr. Pers.) *Acta Biol. Hung.* 64:100-109.
- Ślusarczyk J., Dudek M., Wierzbicka M., Suchocki P., Kuraś M. 2014. Antimitotic effect of Selol and sodium selenate (IV) on Allim test cells. *Caryologia* 67(3): 250-259.
- Thirunavukkarasu C., Sakthisekaran D. 2003. Sodium selenite, dietary micronutrient, prevents the lymphocyte DNA damage induced by N-nitroso diethylamine and Phenobarbital promoted experimental hepatocarcinogenesis. *J. Cell. Biochem.* 88(3): 578-588.
- Van Zandwijk N., Hirsch F.R. 2003. Chemoprevention of lung cancer: current status and future prospects; *Lung Cancer* 42: 71-79.
- Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 258-274.
- Whanger P. D. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of The American College of Nutrition* 21 (3): 223-232.
- Whanger P. D. 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*. 91: 11-28.
- Wierzbicka M.H., Dutkiewicz J., Wysocka I.A., Bulska E., Janssens K. 2007. Biotransformacja selenu w roślinach, In: Wierzbicka M., Pyrzyńska K., Bulska E. (red.) *Selen – pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza*. Malamut, Warszawa, pp. 88-102.
- Wolf C., Lewis A., Adams D., Allan D., Ansel D. 1997. The role glutathione in determining the response of normal and tumors cells to anticancer drugs. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 728-730.
- Wójcik M. 2009. Vacuole as a multifunctional compartment in plant responses to stress factors, W: "Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False", Maksymiec W. (Red.), Transworld Research Network, Kerala, India, 91-123
- Yong-Min L., Yong-Won Y. 2006. Enhanced production of exopolysaccharides by supplementation of toluene in submerged culture of an edible mushroom *Collybia maculata* TG-1. *Proc. Biochem.* 41: 1620-1626.
- Yoshida M., Sugihara S., Inoue Y., Chihara Y., Kondô M., Miyamoto S., Sukcharoen B. 2005. Composition of chemical species of selenium contained in selenium-enriched shiitake mushroom and vegetables determined by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 51: 194-199.
- Zagrodzki P. 2000. Selen w żywieniu człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.* 33: 209-214.
- Zhang Z., Miyatake S.I., Saiki M., Asahi M., Yukawa H., Toda H., Kikuchi H., Yoshimura S.I., Nashimoto N. 2000. Selenium and glutathione peroxidase mRNA in rat glioma. *Biol. Trace. Elem. Res.* 73: 67-76.
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*. 18: 4-19.
- Zhu Z, Kimura M, Itokawa Y, Nakatsu S, Oda Y, Kikuchi H. 1995. Effect of selenium on malignant tumor cells of brain. *Biological Trace Element Research* 49(1):1-7.

Zwolak I., Zaporowska H. 2012. Selenium interactions and toxicity: a review. Cell Biol. Toxicol. 28: 31-46.

Żbikowska H.M. 1997. Metabolizm selenu w komórce i organizmie człowieka. Postępy Biol. Kom. 24: 303-313.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania nad przeciwnowotworowym działaniem Selolu w porównaniu z sodu selenianem (IV). Doświadczenia będą przeprowadzone na wybranych liniach komórek nowotworowych i obejmować będą indukcję procesu apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego oraz analizę zmian ultrastrukturalnych. Badania kontynuowane będą również na komórkach roślinnych (test *Allium*) w celu porównania wpływu obu związków na zmiany w strukturze cytoszkieletu. Kolejnym krokiem dalszych prac będzie zbadanie działania Selolu w połączeniu ze związkami pochodzenia naturalnego, biopierwiastkami, a także ze stosowanymi w chemioterapii cytostatykami.

Swoją pracę naukową zamierzam również kontynuować w zakresie możliwości biotechnologicznego wykorzystania seleninotriglicerydów, jako stymulatorów biosyntezy różnych substancji czynnych pozyskiwanych z hodowli *in vitro*, a także do uzyskiwania tą drogą wzbogaconych w selen związków aktywnych biologicznie z wybranych gatunków roślin i grzybów.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Równolegle do przedstawionych badań, które stanowiły podstawę osiągnięcia naukowego, prowadziłam lub uczestniczyłam również w innych badaniach naukowych, dotyczących następujących problemów badawczych:

Zaburzenia mikrosporogenezy i rozwoju pyłku w transgenicznym roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum L.*) z obniżonym poziomem histonu H1.

Badania były kontynuacją tematyki, podjętej w pracy doktorskiej, dotyczącej roli histonu H1 w regulacji transkrypcji w komórce. Analizowano transgeniczne rośliny tytoniu, w których poziom histonu H1 został drastycznie obniżony. Rośliny te, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, charakteryzowały się zmienioną budową kwiatów, polegającą na wydłużeniu szyjki słupka i wyniesieniu znamienia ponad główki pręcików i płatki korony, co uniemożliwiało samozapylenie. Zmianom tym towarzyszyły zaburzenia procesu mikrosporogenezy, związane z nieprawidłowym parowaniem i segregacją chromosomów

homologicznych podczas mejozy. Obserwowano liczne aberracje chromosomowe i asynchroniczny przebieg mejozy, co potwierdziły obliczenia indeksów fazowych i indeksów aberracji. Badania ultrastrukturalne (TEM) wykazały, że w procesie tworzenia ziaren pyłku, w mikrosporach tych roślin nie dochodziło do podziału różnicującego, i nie powstawały w nich komórki, wegetatywna i generatywna. Analiza w SEM ujawniła, że tak powstające ziarna pyłku były mniejsze i słabiej rozwinięte, w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Prawie w 100% ziarna pyłku tych roślin nie kiełkowały.

Badania wykazały, że zaburzenie naturalnej stechiometrii i rozmieszczenia wariantów histonów łącznikowych, wpływają na zakłócenie prawidłowego przebiegu procesu rozwoju męskiego gametofitu.

Wyniki powyższych badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- Prymakowska –Bosak M., Przewłoka M.R., **Ślusarczyk J.**, Kuraś M., Lichota J., Kiljańczyk B., Jerzmanowski A. 1999. *Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. Plant Cell 11: 2317-2329.*
- **Ślusarczyk J.**, Prymakowska –Bosak M., Przewłoka M., Jerzmanowski A., Kuraś M. 2001. *Disturbances of pollen development in tobacco plants with low level of histone H1. Biol. Bull. Poznań. (obecnie Biological Letters), 38(1): 55-61.*
- **Ślusarczyk J.**, Prymakowska –Bosak M., Przewłoka M., Jerzmanowski A., Kuraś M. 2001. *Disorders of microsporogenesis in transgenic tobacco plants with disturbed proportions of native histone H1 variants. Acta Biol. Crac. Series Bot., 43: 69-78.*

Wpływ zmiany proporcji wariantów histonu H1 na mikrosporogenezę i rozwój gametofitu męskiego oraz tapetum w transgenicznym roślaku tytoniu (*Nicotiana tabacum L.*).

Kontynuując badania nad mechanizmem działania histonu H1, kluczowego składnika białkowego chromosomów wszystkich organizmów eukariotycznych, analizowano transgeniczne rośliny tytoniu z różnym poziomem wariantów histonu H1. Tytoń posiada sześć wariantów sekwencyjnych histonu H1: dwa duże (H1A i H1B) stanowiące około 90% wszystkich H1 i cztery małe (H1C, H1D, H1E i H1F) występujące w śladowych ilościach. Badano następujące grupy roślin: K – grupa kontrolna z pełnym składem wariantów histonowych, - AB – z wyłączonymi wariantami A i B, - ABCD – z wyłączonymi wariantami A, B, C i D oraz – CD – z wyłączonymi wariantami C i D.

Wszystkie warianty roślin, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, wykazywały w stosunku do kontroli zaburzenia w rozwoju kwiatu polegające na wydłużeniu szyjki słupka ponad poziom główek pręcikowych i nie dochodziło w nich do samozapylenia i w efekcie wytwarzania nasion. Analiza mikrosporogenezy u tych roślin, ujawniła zróżnicowany poziom

asynchroniczności przebiegu mejozy, występowanie aberracji chromosomowych i w efekcie powstawanie sterylnych ziaren pyłku. Największą liczbę sterylnych ziaren pyłku i aberracji obserwowano u roślin z wyłączonymi wariantami AB oraz ABCD (odpowiednio: 84,4% oraz 81,4%). W roślinach – CD procent aberracji i sterylnych ziaren pyłku (13%) był zbliżony do poziomu materiału kontrolnego (8%). Obserwacje mikrosporogenezy w TEM wykazały, że w przypadku roślin z wyłączonymi wariantami AB oraz ABCD powstające ziarna pyłku były w znacznej części zdegradowane. Najmniej zdegradowanych ziaren pyłku w stosunku do kontroli obserwowano u roślin z wyłączonymi wariantami CD.

Powszechnie wiadomo, że jednym z warunków wykształcenia płodnego pyłku jest obecność prawidłowo funkcjonującego tapetum. Przeprowadzone obserwacje ultrastruktury komórek tapetum pylnikowego w kontekście zaburzeń, jakie występowały w procesie mikrosporogenezy u tych roślin wykazały, że rozwój tapetum we wszystkich grupach badanych roślin odbywał się prawidłowo i sekwencja zmian była typowa jak w kontroli. Jednak pewne różnice ultrastrukturalne uwidoczniły się w okresie funkcjonowania tapetum, jako tkanki sekrecyjnej i w fazie degradacji. W cytoplazmie komórek tapetum, przy udziale rER, powstawały ciała lipidowe, które po przedostaniu się na powierzchnię komórki i do loculus uczestniczyły w formowaniu sporodermy ziaren pyłku. W kontroli i we wszystkich kombinacjach z wyjątkiem –ABCD, ciała te wyglądały podobnie: były one szare, homogenne i otoczone czarnymi kłaczkowatymi złogami. Natomiast u roślin z wyłączonymi wariantami A, B, C i D ciała te były jaśniejsze, nieco rozrzedzone i nie otaczały ich czarne strzępiaste złogi. Z kolei u roślin –CD pomiędzy pozostałościami zdegradowanych komórek tapetum, częściej niż w kontroli i w pozostałych kombinacjach badawczych, obserwowano duże lipidowe złogi.

W badaniach wykazano, że warianty C i D histonu H1 są alternatywne dla normalnego wzrostu i rozwoju roślin tytoniu. Natomiast indukcja męskiej sterylności u tytoniu jest związana ze zmianą proporcji dużych i małych wariantów histonu H1, a nie zależy od nadekspresji wariantów C i D. Wyłączenie poszczególnych wariantów histonu H1 wpływa, więc głównie na przemiany zachodzące w tkance sporogennej podczas mikrosporogenezy, i powoduje tylko nieznaczne zmiany w komórkach warstwy tapetum, związane z tworzeniem ciał Übisha.

Wyniki powyższych badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- *Przewłoka M.R., Wierzbicki A., Ślusarczyk J., Kuraś M., Grasser K.D., Stemmer C., Jerzmanowski A. 2002. The „drought-inducible” histone H1s of tobacco play no role in male sterility linked to alterations in H1 variants. Planta, 215: 371-379.*

- **Ślusarczyk J.** Wierzbicki A., Przewłoka M., Tykarska T., Jerzmanowski A., Kuraś M. 2003. Influence of change in the proportion of H1 histone variants on microsporogenesis and development of male gametophyte in transgenic plants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 72 (1): 25-35.
- **Ślusarczyk J.** Tykarska T., Wierzbicki A., Jerzmanowski A., Kuraś M. 2006. Tapetum development in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) with modified level histone H1 variants. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 75(1): 95-105.

Badania składu gatunkowego pasożytów mszyc Polski centralnej i południowej oraz analiza zmian ultrastrukturalnych i cytochemicznych spowodowanych żerowaniem mszycy pelargoniowej (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)).

Studia dotyczyły rozpoznania składu gatunkowego pasożytów mszyc występujących w różnych ekosystemach, rejonach uprzemysłowionych, terenach leśnych i miejskich terenach rekreacyjnych i związane były z problematyką badawczą Zakładu Ekologii i Ochrony Środowiska. Badania prowadzono na 128 gatunkach drzew, krzewów i roślin zielnych. Ogółem wyhodowano 60 gatunków pasożytniczych błonkówek, należących do 11 rodzajów, ze 113 gatunków mszyc. Najliczniej obecny był rodzaj *Aphidius*, reprezentowany przez 20 gatunków pasożytów. Mniej liczne w gatunki były rodzaje: *Trioxys* (10), *Praon* (9), *Ephedrus* (4), *Lysiphlebus* (4). Z pozostałych rodzajów pasożytów wyhodowano po jednym gatunku.

Z kolei analiza zmian ultrastrukturalnych i cytochemicznych, w liściach pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium hederifolium* hort.), wywołanych żerowaniem mszycy pelargoniowej (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)), wykazała podwyższenie ilości związków fenolowych. Wiele depozytów fenolowych było ulokowane w wakuolach, w przestrzeniach między membraną plazmatyczną a ścianą komórkową oraz w przestrzeniach międzykomórkowych. Rośliny wykształciły, bowiem mechanizmy obrony przed szkodnikami, które mają inny charakter niż analogiczne reakcje u zwierząt. Nie zapobiegają one samej infekcji, ale mogą skutecznie zahamować proces jej rozwoju. Polega on m.in. na nagromadzeniu w miejscu żerowania owadów związków chemicznych o szerokim spektrum działania i znacznej toksyczności wobec patogenów. W przypadku pelargonii związki te należą głównie do grupy fenoli, co wykazały obserwacje mikroskopowe i analiza biochemiczna. W roślinach zasiedlonych przez mszyce obserwowano także wzrost aktywności organelli komórkowych oraz oddzielanie się uszkodzonych przestrzeni w postaci degradacji membrany plazmatycznej. W rejonie żerowania mszyc, na terenie cytoplazmy komórek miękiszowych, obserwowano zmiany degradacyjne chloroplastów, uszkodzenia w obrębie tonoplastu i liczne pęcherzykowate depozyty w pobliżu membrany plazmatycznej. W

komórkach wzrastała ilość endoplazmatycznego retikulum, struktur mielinowych i mitochondriów, których krysty były wydłużone i powiększone. U wielu roślin odpowiedzią obronną jest tzw. reakcja nadwrażliwości, polegająca na obumieraniu komórek roślinnych w miejscu infekcji patogena. Zjawisko to zapobiega rozprzestrzenianiu się infekcji w czasie potrzebnym roślinie do uruchomienia innych mechanizmów obronnych, np. syntezy allomonów. Obserwowane zmiany degradacyjne były przypuszczalnie oznaką takiej reakcji.

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- *Wiąckowski S., Wiąckowska I., Werstak K., Ślusarczyk J. 2000. Parazytoidy mszyc (Hymenoptera : Aphidiidae) Polski centralnej i południowej. Wiad. Entom., 20(1-2): 57-65.*
- *Ślusarczyk J. 2004. W jaki sposób rośliny bronią się przed czynnikami patogenicznymi? W: „IV Kielecki Festiwal Nauki. Prezentacje festiwalowe.” Grysa K. (Red.), Akademia Świętokrzyska Press, Kielce, 16-17.*
- *Ślusarczyk J. 2006. Zmiany ultrastrukturalne i cytochemiczne w liściach pelargonii (Pelargonium sp.) spowodowane żerowaniem mszycy pelargoniowej (Acyrtosiphon pelargonii (Kalt.). Acta Agrobotanica, 59, (2): 59-67.*

Perspektywy wykorzystania związków selenu na +4 stopniu utlenienia, jako potencjalnych preparatów leczniczych w chorobach nowotworowych.

W pracy przedstawiono stan wiedzy na temat rodzajów i roli związków selenu w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów oraz możliwości wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Selen jest niezbędnym składnikiem organizmów żywych. W łańcuchu pokarmowym przechodzi z gleby do roślin, a następnie z pokarmem roślinnym dostaje się do organizmów zwierząt. Zawartość selenu w diecie człowieka jest zależna od zasobności gleby w ten pierwiastek. Chroni on organizm przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych, nadtlenu wodoru i niektórych nadtlenków organicznych. W organizmach zwierzęcych selen występuje w postaci selenoprotein, które uczestniczą w szeregu procesów biochemicznych odpowiadając za prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Związki selenu wykazują dużą skuteczność w leczeniu m.in. chorób nowotworowych. Uważa się, że niski poziom selenu w organizmie może być traktowany, jako jedna z przyczyn powstawania nowotworu. Zainteresowanie, tak ważnym dla zdrowia populacji ludzkiej, działaniem selenu zapoczątkowało wiele badań nad metabolizmem i rolą związków organicznych i nieorganicznych tego pierwiastka. Jedne z pierwszych badań prowadzono ze związkami nieorganicznymi tzn. selenianem (IV) i selenianem (VI). Wykazały one hamujące działanie na wzrost komórek nowotworowych, lecz przez odmienne mechanizmy. Selenian (VI)

charakteryzuje się odwracalną inhibicją i hamuje fazę G₂ cyklu komórkowego, zaś selenian (IV) powoduje nieodwracalne zahamowanie cyklu komórki w fazie S. Jednym z jego związków nieorganicznych, zawierających selen na +4 stopniu utlenienia jest sodu selenian (IV). Badania *in vitro* wykazały, że działa on bardzo skutecznie jednak jego wysoka toksyczność (LD₅₀ 3,5 mg/kg masy ciała) znacznie ogranicza stosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Związkiem organicznym, również zawierającym selen na +4 stopniu utlenienia, o działaniu przeciwnowotworowym, jest zsyntetyzowany w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym preparat o nazwie Selol. Wykorzystuje on podwójny efekt działania selenu na +4 stopniu utlenienia, prooksydacyjny a następnie antyoksydacyjny. Działanie prooksydacyjne związane jest z wysokim stężeniem glutationu w komórkach i redukcją selenu (IV) do selenu na +2 stopniu utlenienia. Powstaje wtedy duża ilość jonorodników ponadtlenkowych, które mogą uszkadzać komórki nowotworowe i powodować apoptozę. Przy niskim stężeniu glutationu proces redukcji selenu przebiega wolniej. Wytwarzane jonorodniki ponadtlenkowe ulegają procesowi dysmutacji i następnie detoksykacji przy udziale peroksydazy glutationowej. Selen spełnia swoją funkcję antyoksydacyjną głównie jako kofaktor selenoprotein, takich jak selenozależne peroksydazy glutationowe i reduktaza tioredoksynowa. Indukowany przez glutation stres oksydacyjny jest jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczne działanie związków selenu (IV) oraz indukcję apoptozy w komórkach.

Praca o charakterze przeglądowym stanowiła rozdział w niniejszej monografii:

- *Suchocki P., Suchocka Z., Wierzbicka M., Ślusarczyk J., Zobel A., Nowakowska J., Kuraś M. 2007. Selen IV nadzieją w walce z nowotworami. W: „Aktualne problemy immunodiagnostyki i immunotoksykologii.” Siwicki A.K. i Skopińska - Różewska E. (Red.), Wyd. Edycja, Olsztyn, 93-107.*

Nowe możliwości wykorzystania obszarów wiejskich w działalności edukacyjno – wychowawczej społeczeństwa oraz jako miejsce wytwarzania zdrowej, ekologicznej żywności.

W pracy, będącej wynikiem współpracy z nauczycielami i uczniami, przedstawiono aktualne problemy i nowe możliwości wykorzystania i zaktywizowania terenów wiejskich regionu świętokrzyskiego w dziedzinie edukacji, agroturystyce oraz produkcji żywności ekologicznej. Wzrost popytu na żywność ekologiczną powoduje, że wielu rolników przechodzi na ekologiczne metody gospodarowania. Do nowych inicjatyw w środowiskach wiejskich należy zaliczyć także turystykę zrównoważoną, turystykę wiejską, agroturystykę czy ekoturystykę. Gospodarstwa ekologiczne mogą stać się również, godną polecenia dla

nauczycieli, formą edukacji, w ramach której kształtuje się pozytywna postawa ucznia wobec środowiska, czyli postawa proekologiczna. Opracowane programy obejmują treści wychowawczo-edukacyjne, związane z pracą na roli, rzemiosłem artystycznym, nawiązujące do minionych okresów. MEN wprowadziło w programach szkolnych tzw. międzyprzedmiotową ścieżkę edukacyjną pt. „Edukacja regionalna – dziedzictwo kulturowe regionu”, która proponuje taką właśnie realizację zajęć szkolnych.

Praca stanowiła rozdział w niniejszej monografii:

- *Ślusarczyk J. 2012. Obszary wiejskie: nowe perspektywy, nowe inicjatywy, nowe zagrożenia w stylu życia i odżywiania. W: „Współczesne kształcenie i doskonalenie zawodowe nauczycieli przedmiotów przyrodniczych na obszarach wiejskich i miejskich.” Fudali I., Żeber-Dzikowska I., Buchcic E. (Red.), Wyd. Perpetuum Mobile, Kielce, 447-466.*

Sumaryczny Impact Factor przedstawionych powyżej publikacji, w których opisano pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, nie włączane do osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, wynosi **4,759** (IF zgodny z rokiem publikacji; IF₂₀₁₅ – **15,561**). Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją z dnia 23.12.2015) wynosi **188**.

Joanna Ślusarczyk