

**Załącznik 2**

**AUTOREFERAT**

**Dr Magdalena Jaszek**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2016

**Dr Magdalena Jaszek**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

[magdalena.jaszek@poczta.umcs.lublin.pl](mailto:magdalena.jaszek@poczta.umcs.lublin.pl)

tel.: (81) 537–50–17

## **Autoreferat**

### **I. Imię i nazwisko**

**Magdalena Jaszek**

### **II. Posiadane dyplomy i stopnie:**

**1994 – tytuł magistra biotechnologii** uzyskany na podstawie pracy magisterskiej

pt. „Wstępna charakterystyka i oczyszczanie kinazy białkowej RAP” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Nikodema Grankowskiego (ocena bardzo dobra), Zakład Biologii Molekularnej, Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej w Lublinie

**2003 – stopień doktora nauk biologicznych** uzyskany na podstawie rozprawy pt. „Wpływ stresu oksydacyjnego na niektóre aspekty metabolizmu wtórnego u grzybów rozkładających drewno”, ukończonej pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Grzywnowicza, Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej w Lublinie

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

**01.09.1994– 30.04.2003** – asystent w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie

**01.05.2003 – do chwili obecnej** – adiunkt w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie

#### IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455])

##### A) Tytuł

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 9 publikacji z lat 2006–2016 oraz 3 zgłoszeń patentowych. Tytuł zgłoszonego osiągnięcia to:

**„Stymulacja i zastosowanie potencjału biodegradacyjnego grzybów białej zgnilizny drewna”.**

##### B) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

1. **Magdalena Jaszek**, Jerzy Żuchowski, Elżbieta Dajczak, Kamila Cimek, Marcin Grąż, Krzysztof Grzywnowicz: Ligninolytic enzymes can act as a part of multiple response system to oxidative stress in white rot Basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58 (2006), 168–175. (autor korespondencyjny) (IF=1,619), punkty MNiSW = 20
2. **Magdalena Jaszek**, Katarzyna Kos, Anna Matuszewska, Marcin Grąż, Dawid Stefaniuk, Monika Osińska–Jaroszuk, Monika Prendecka, Ewa Józwick, Krzysztof Grzywnowicz: Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: *Phellinus pini* by menadione–mediated oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174 (2014), 644–656. (autor korespondencyjny) (IF=1,735), punkty MNiSW = 20
3. **Magdalena Jaszek**, Justyna Miłek, Jerzy Żuchowski, Dawid Stefaniuk, Monika Prendecka: Effective and complex stimulation of the biodegradation system of fungus *Cerrena unicolor* by rapeseed meal fermentation. *Acta Biochimica Polonica*, 63 (2016), Epub: No 2015–1227. (autor korespondencyjny) (IF=1,187), punkty MNiSW = 15
4. Jerzy Żuchowski, Łukasz Pecio, **Magdalena Jaszek**, Anna Stochmal: Solid–state fermentation of rapeseed meal with the white–rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171 (2013), 2075–2081. (IF=1,687), punkty MNiSW = 25
5. Monika Prendecka, **Magdalena Jaszek**, Marcin Grąż, Natalia Głuszak, Katarzyna Małysz, Agata Nowak, Jerzy Żuchowski, Teresa Małecka–Massalska: Stimulation of

- the activity of a novel tannase produced in white rot fungi *Phellinus pini*, *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens* by medium supplementation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (2015), DOI: 10.1002/bab.1413. (**autor korespondencyjny**) (**IF=1,429**), **punkty MNiSW = 20**
6. **Magdalena Jaszek**, Monika Osinska–Jaroszuk, Justyna Sulej, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk, Kamil Maciag, Jolanta Polak, Łukasz Matuszewski, Krzysztof Grzywnowicz: Stimulation of the antioxidative and antimicrobial potential of the blood red bracket mushroom *Pycnoporus sanguineus* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(8) (2015), 701–712. (**autor korespondencyjny**) (**IF = 1,357**), **punkty MNiSW = 15**
7. **Magdalena Jaszek**, Monika Osińska–Jaroszuk, Grzegorz Janusz, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk, Justyna Sulej, Jolanta Polak, Marta Ruminowicz, Krzysztof Grzywnowicz, Anna Jarosz–Wilkołazka: New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures. *BioMed Research International*, 497492 (2013), 1–11. (*Journal of Biomedicine and Biotechnology*) (**autor korespondencyjny**) (**IF = 2,706**), **punkty MNiSW = 30**
8. Magdalena Mizerska–Dudka, **Magdalena Jaszek**, Adriana Błachowicz, Tomasz Rejczak, Anna Matuszewska, Monika Osińska–Jaroszuk, Dawid Stefaniuk, Grzegorz Janusz, Justyna Sulej, Martyna Kandefer–Szerszeń: Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79 (2015), 459–468. (**autor korespondencyjny**) (**IF = 3,138**), **punkty MNiSW = 25**
9. Anna Matuszewska, Marta Karp, **Magdalena Jaszek**, Grzegorz Janusz, Monika Osińska–Jaroszuk, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Waldemar Tomczak, Krzysztof Giannopoulos: Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncology Letters*, (2016), DOI: 10.3892/ol.2016.4220. (**IF = 1,482**), **punkty MNiSW = 15**

Sumaryczny Impact Factor – (**IF**) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **16,34**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **185**

**C) Inne zawodowe prace twórcze (zgłoszenia patentowe) związane z prezentowanym osiągnięciem naukowym:**

1. **P.406228.** Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych krwi. **Magdalena Jaszek.**, Anna Matuszewska, Monika Osińska–Jaroszuk, Grzegorz Janusz, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Krzysztof Giannopoulos, MartaKarp. (2013) punkty MNiSW = 2
2. **P.406573.** Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu raka szyjki macicy: Anna Matuszewska, **Magdalena Jaszek**, Grzegorz Janusz, Monika Osińska–Jaroszuk, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Jerzy Rogalski, Magdalena Mizerska–Dudka, Martyna Kandefer–Szerszeń. (2013) punkty MNiSW = 2
3. **P.411264.** Sposób wytwarzania modyfikowanego kleju epoksydowego oraz jego zastosowanie. Anna Rudawska, Tomasz Warda, Izabela Haniecka, **Magdalena Jaszek**, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk. (2015) punkty MNiSW = 2

Wszystkie wynalazki uzyskały pozytywny raport Urzędu Patentowego jako wstępną ocenę przedstawionego przedmiotu zgłoszenia.

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

**Cel naukowy wybranych prac:**

Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było poszukiwanie nowych przykładów stymulacji potencjału biodegradacyjnego grzybów białej zgnilizny drewna i propozycji zastosowania wybranych wyróżników biochemicznych będących jego elementami. Prace te miały doprowadzić do realizacji dwóch głównych założeń:

1. *Przedstawienia nowych propozycji układów doświadczalnych mających na celu intensyfikację syntezy wybranych wyróżników biochemicznych o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym.* Element nowości dotyczył w opisywanych przykładach zarówno organizmu wybranego do badań, jak i zastosowanych w danym przypadku zoptymalizowanych warunków stymulacji (modyfikacji warunków wzrostu kultur grzybowych).
2. *Wskazanie nowych możliwości zastosowania związków będących elementami potencjału biodegradacyjnego wybranych gatunków grzybów białej zgnilizny drewna, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości bioaktywnych.* Element nowości

dotyczył w tym przypadku zarówno danego preparatu, jak i wykazania możliwości jego praktycznego zastosowania biomedycznego lub przemysłowego.

## **Wprowadzenie**

Grzyby białej zgnilizny drewna, będące przedmiotem opisywanych badań, zostały wyposażone przez naturę w wiele unikatowych właściwości, w tym w najbardziej wydajny wśród organizmów żywych system biodegradacji kompleksu ligninocelulozowego. W trakcie swojego rozwoju ewolucyjnego wykształciły one strategie tolerancji stresu, umożliwiające im kolonizowanie niszy środowiskowych o zróżnicowanych, często bardzo niekorzystnych warunkach wzrostu (Zak i Wildman, 2004). Konieczność adaptacji do zmieniających się warunków zewnętrznych wymusiła wykształcenie mechanizmów biodegradacyjnych, zapewniających tym organizmom efektywne pozyskiwanie składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego przebiegu ich cyklu rozwojowego. Mechanizmy te funkcjonują przede wszystkim w oparciu o szerokie spektrum enzymów ligninolitycznych (np. lakaza, peroksydaza manganozależna, peroksydaza ligninowa), hydrolitycznych (np. jak celulazy, hemicelulazy, proteazy, tanazy) czy antyoksydacyjnych (katalazy, dysmutazy ponadtlenkowe) (Leonowicz i wsp., 1999; Sanchez, 2009). Poza czynnikami enzymatycznymi niezwykle ważną rolę odgrywają tu również substancje niskocząsteczkowe, nieodłącznie związane z reakcjami rozkładu prowadzonymi przez opisywane organizmy, takie jak kwasy organiczne, pochodne fenolowe czy reaktywne formy tlenu (Urzua i wsp., 1998; Hammel i wsp., 2002). Ze względu na bogactwo wytwarzanych przez nie metabolitów oraz możliwość namnażania ich grzybni w wystandaryzowanych warunkach laboratoryjnych, grzyby białej zgnilizny drewna od dawna cieszą się dużym zainteresowaniem szeroko pojętej biotechnologii: białej (zastosowania przemysłowe), zielonej (rolnictwo) i czerwonej (zastosowania biomedyczne). Zastosowanie enzymów grzybowych takich jak lakaza, czy peroksydaza manganozależna w procesach biotransformacji zanieczyszczeń, dekoloryzacji odpadów przemysłu tekstylnego, procesach wybielania pulpy drzewnej, przemyśle spożywczym czy w medycynie, nadaje tym organizmom szczególnego znaczenia w kontekście nowoczesnych narzędzi biotechnologicznych (Arora i Sharma, 2009). Bogactwo szczepów i możliwości praktycznego wykorzystania związków przez nie wytwarzanych skłania do ciągłych poszukiwań możliwości stymulacji ich metabolizmu poprzez zastosowanie różnorodnych czynników indukujących. Metodą często stosowaną w celu zwiększenia syntezy danego wyróżnika biochemicznego jest odpowiednia modyfikacja warunków wzrostu danego szczepu poprzez stosowanie różnych wariantów podłoż

hodowlanych wzbogaconych dodatkiem czynnika indukującego (syntetycznego lub naturalnego) oraz modyfikacja determinujących rozwój grzybni czynników fizycznych, takich jak światło (jego barwa i natężenie), temperatura, natlenienie czy mieszanie. Zastosowane zmiany warunków namnażania biomasy grzybowej mają na celu uzyskanie jak najwyższych parametrów jakościowych i ilościowych dla danego czynnika, co z kolei daje możliwość odkrycia i wprowadzenia jego potencjalnego zastosowania praktycznego. W poszukiwaniu propozycji nowych układów doświadczalnych w przypadku opisywanych organizmów ważnym atutem jest czynnik ekonomiczny. Dlatego dobrze jest, jeżeli zastosowany czynnik indukujący jest np. produktem odpadowym przemysłu drzewnego (trociny) czy przemysłu spożywczego (makuchy rzepakowe), którego bioremediacja ma dodatkowo ważne znaczenie środowiskowe.

Biorąc pod uwagę fakt zwiększających się możliwości wykorzystania czynników wytwarzanych przez grzyby białej zgnilizny drewna, w mojej pracy badawczej postanowiłam zająć się poszukiwaniem nowych sposobów stymulacji syntezy wybranych elementów potencjału biodegradacyjnego grzybów oraz wskazaniem nowych możliwości zastosowań poszczególnych preparatów pochodzenia grzybowego. W związku z tym, że moja praca naukowa od początku związana była głównie z badaniem szeroko pojętego metabolizmu grzybów rozkładających drewno, cel ten wydawał się bardzo obiecującym kierunkiem badań. Prowadząc doświadczenia związane z hodowlą grzybów na podłożach zawierających różnego rodzaju produkty odpadowe takie jak trociny, pakuły bawełniane czy chemiczne induktory (np. prooksydanty), zaobserwowałam dużą wrażliwość tych organizmów na zastosowane zmiany warunków wzrostu.

Jednym z moich głównych założeń było znalezienie nowych efektywnych źródeł enzymów ważnych z punktu widzenia biotechnologicznego takich jak: lakaza, peroksydaza manganozależna,  $\beta$ -glukozydaza, chitynaza, tanaza, proteazy oraz niskocząsteczkowe metabolity wtórne. Przeprowadzone wieloetapowe badania przesiewowe dotyczące opisywanych wyróżników biochemicznych doprowadziły do wyselekcjonowania kilku efektywnych modeli doświadczalnych: grzyb – zastosowany wariant stymulacyjny.

Najbardziej interesujące wyniki otrzymałam dla następujących gatunków: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Fomes fomentarius*, *Tyromyces pubescens*, *Phellinus pini*, *Pycnoporus sanguineus* i *Cerrena unicolor* zaprezentowanych w treści opisywanego osiągnięcia naukowego. W przedstawionych eksperymentach zastosowano trzy modele stymulacji kultur grzybowych:

- a) stymulacja oksydacyjna (zwiększenie syntezy anionorodnika ponadtlenkowego poprzez wprowadzenie do kultur grzybowych menadionu jako czynnika prooksydacyjnego)
- b) stymulacja poprzez zastosowanie dodatku odpadów przemysłu spożywczego (suplementacja hodowli makuchami rzepakowymi),
- c) stymulacja termiczna (zastosowanie zmian temperatury hodowli w celu intensyfikacji produkcji niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych).

Równolegle, w związku z pojawieniem się możliwości znacznego zwiększenia syntezy wybranych wyróżników biochemicznych, rozpoczęłam poszukiwanie nowych możliwości praktycznego zastosowania preparatów grzybowych głównie pod kątem ich właściwości bioaktywnych. Wiele grzybowych metabolitów, zarówno podstawowych jak i wtórnych, może być wykorzystywanych jako substancje biomedyczne. Wzrastające zainteresowanie wprowadzaniem nowych, efektywnych związków do przemysłu spożywczego czy farmaceutycznego stymuluje poszukiwanie nowych czynników bioaktywnych pochodzenia naturalnego. W przypadku grzybów wyższych czynniki te klasyfikowane są w trzech głównych grupach: a) metabolity wtórne (terpenoidy, polifenole, alkaloidy, sterole i in., b) glikoproteiny (np. enzymy grzybowe tj. lakaza), c) wysokocząsteczkowe polisacharydy (Erjavec i wsp., 2012).

Opierając się na tym podziale, do drugiej części swoich badań, stanowiących treść prezentowanego osiągnięcia naukowego, wybrałam preparaty grzybowe należące do każdej z wymienionych grup związków, które dotąd nie były przebadane pod kątem ich właściwości bioaktywnych: niskocząsteczkowe metabolity wtórne (LMS – *low molecular weight subfraction*) z *C. unicolor* i *P. sanguineus*, lakazę (glikoproteinę) z *C. unicolor* oraz frakcję polisacharydów wewnątrzkomórkowych z *C. unicolor*. W trakcie prowadzonych badań wykazałam ich potencjalne zastosowanie biomedyczne i przemysłowe.

## **Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym prezentowanym w postępowaniu habilitacyjnym:**

### **1. Stymulacja syntezy wybranych parametrów biochemicznych związanych z potencjałem biodegradacyjnym wybranych gatunków grzybów białej zgnilizny drewna:**

- 1.1. Stymulacja oksydacyjna (zwiększenie syntezy anionorodnika ponadtlenkowego poprzez wprowadzenie do kultur grzybowych czynnika prooksydacyjnego – menadionu)



Podsumowując i przygotowując do procesu publikacyjnego wyniki badań przeprowadzonych podczas wykonywania pracy doktorskiej doszłam do wniosku, iż są one na tyle obiecujące, że warto je rozszerzyć włączając w nie kolejne gatunki grzybów (w tym grzyby lecznicze) oraz parametry biochemiczne. Ponieważ moje wcześniejsze prace wykazały, że jednym z najbardziej efektywnych, a z drugiej strony bezpiecznym w praktyce doświadczalnej czynnikiem stresowym jest menadion (2-metylo-1,4-naftochinon – syntetyczna witamina K), postanowiłam poszukać innych gatunków grzybów poza *Trametes versicolor* i *Abortiporus biennis*, wrażliwych na jego działanie i sprawdzić, czy będzie on efektywnym czynnikiem stymulującym syntezę wybranych wyróżników biochemicznych. Przeprowadzone wieloetapowe badania przesiewowe pozwoliły mi na wyselekcjonowanie trzech kolejnych gatunków grzybów białej zgnilizny drewna, reagujących na wprowadzenie wspomnianego czynnika prooksydacyjnego znacznym podwyższeniem aktywności enzymów związanych z ich potencjałem biodegradacyjnym, m.in. lakazy (LAC) i peroksydazy manganozależnej (MnP). W skład pierwszego modelu doświadczalnego weszły grzyby *Fomes fomentarius* oraz *Tyromyces pubescens*. Hodowle grzybowe rosące na mineralnych podłożach płynnych w warunkach stacjonarnych, w momencie przejścia z fazy wzrostu logarytmicznego do idiofazy poddawane były działaniu różnych stężeń wybranego czynnika stymulacyjnego. Parametrami determinującymi optymalizację zastosowanych stężeń menadionu była aktywność zewnątrzkomórkowej LAC i MnP. Okazało się, iż najwyższe aktywności tych enzymów zaobserwowano w przypadku dodania 1mM menadionu do 10–dniowych kultur grzybowych. Próbkę materiału biologicznego były pobierane w 24, 72 oraz 120 godzinie od dodania prooksydanta. Najwyższe aktywności lakazy (2-krotnie przewyższające wartości kontrolne) zanotowałam w 120 godzinie hodowli w przypadku *F. fomentarius* oraz w 24 godzinie hodowli po stymulacji oksydacyjnej w kulturach *T. pubescens*. Efekty badań dotyczących MnP były jeszcze bardziej spektakularne. Po stymulacji menadionem, aktywność MnP przekroczyła wartości kontrolne 14-krotnie w kulturach *T. pubescens* oraz 10-krotnie w kulturach *F. fomentarius*.

Prawidłowa aktywność MnP wymaga obecności nadtlenu wodoru w środowisku reakcji oraz stabilizacji jonów  $Mn^{3+}$ . W obydwu tych przypadkach znaczącą rolę odgrywa kwas szczawiowy. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej wykazały bardzo znaczący spadek stężenia tego kwasu organicznego w kulturach poddanych stymulacji oksydacyjnej. Wynik ten korelował z wysoką aktywnością MnP oraz poziomem markerów stresu oksydacyjnego tj. anionorodnika ponadtlenkowego czy formaldehydu.

W przypadku obydwu gatunków grzybów zaobserwowałam również bardzo wyraźny wzrost aktywności enzymatycznych antyoksydantów takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza oraz podwyższenie stężenia utlenionego glutationu (GSSG), co świadczy o udziale tych czynników w regulacji metabolizmu badanych grzybów w warunkach zastosowanego wariantu hodowlanego. W związku z obserwowanymi zmianami biochemicznymi celowym wydało mi się również zbadanie aktywności wybranych enzymów proteolitycznych, odpowiadających za regulację zarówno procesów dostarczających substancji odżywczych, jak i regulację komórkowego obrotu białkowego. Zjawisko to jest niezwykle ważne ze względu na istotne zależności pomiędzy działaniem czynników stresowych a wewnątrzkomórkowym obrotem białkowym (Staszczak, 2002). W przypadku *F. fomentarius* aktywności te były wyraźnie hamowane w kulturach z dodatkiem menadionu. Odwrotną sytuację obserwowano w hodowlach *T. pubescens*.

Wymiernym efektem przeprowadzonych doświadczeń jest propozycja nowego sposobu stymulacji aktywności LAC i MnP oraz wykazanie kierunków przebudowy metabolizmu komórek grzybowych, wywołanej obecnością czynnika stresu oksydacyjnego w środowisku wzrostu grzybni. Wyniki przedstawionych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Magdalena Jaszek**, Jerzy Żuchowski, Elżbieta Dajczak, Kamila Cimek, Marcin Grąz, Krzysztof Grzywnowicz: Ligninolytic enzymes can act as a part of multiple response system to oxidative stress in white rot Basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58 (2006), 168–175.

Kolejnym gatunkiem grzyba, którego hodowla w obecności prooksydacyjnego czynnika stymulacyjnego dostarczyła wyników interesujących tak pod względem parametrów ilościowych, jak i jakościowych, okazał się *Phellinus pini*. Jest on bardzo interesującym organizmem gdyż wykazano, że ekstrakty pozyskiwane z tego grzyba wykazują właściwości antywirusowe, immunostymulacyjne, przeciwbakteryjne oraz przeciwnowotworowe (Lee i wsp., 2010). Wykonane przeze mnie doświadczenia wykazały, iż zastosowanie menadionu jako czynnika stymulacyjnego, znacząco stymulowało aktywność MnP w badanych kulturach grzybowych. W przypadku tego gatunku rozszerzyłam również przedział czasowy prowadzonych eksperymentów do 10 – tej doby po dodaniu menadionu w porównaniu z *F. fomentarius* i *T. pubescens*. Najwyższe aktywności enzymu w prezentowanym układzie doświadczalnym (około 10–krotnie wyższe od wartości kontrolnych) zaobserwowałam w 5–tej dobie hodowli po stymulacji menadionem. Kolejnym elementem systemu

biodegradacyjnego badanego gatunku, który wykazywał wrażliwość na zastosowany wariant hodowlany, była chitynaza. Dodanie menadionu w stężeniu 0,75 mM bardzo wyraźnie stymulowało aktywność chitynazy w grzybniach *P. pini*. Najwyższe aktywności tego enzymu (10-krotnie wyższe od kontroli) zanotowano w 10-tej dobie trwania eksperymentu. Wyniki te sugerują prawdopodobny udział chitynazy w przebudowie metabolizmu cukrowego i zmianach w ścianie komórkowej w odpowiedzi komórek badanego gatunku na stres oksydacyjny. Analizując powyższe wyniki należy podkreślić, że możliwość stymulacji aktywności tego enzymu jest korzystna z punktu widzenia biotechnologii. Jak wiadomo chitynaza może być wykorzystywana m. in. przy produkcji chitooligosacharydów, glukoaminy, izolacji protoplastów czy ochronie roślin przed grzybowymi patogenami (Duo-Chuan, 2006; Hiscox i wsp., 2010).

Poza opisanymi parametrami bardzo ciekawe dane otrzymano analizując aktywności enzymów proteolitycznych trypsynopodobnych i subtylizynopodobnych wobec wybranych substratów syntetycznych. Wykazano wyraźny wzrost aktywności tych enzymów tak w płynach pohodowlanych, jak i grzybniach w hodowlach po stymulacji menadionem, co może potwierdzać ich kluczową rolę w dynamicznych zmianach w komórkowym obrocie białkowym koniecznym dla prawidłowego przebiegu mechanizmów odpowiedzi komórek grzybowych na stres. Wyraźnemu podwyższeniu ulegała również aktywność katalazy, standardowego enzymatycznego czynnika antyoksydacyjnego odpowiedzialnego za usuwanie nadmiaru nadtlenu wodoru. Poza zmianami parametrów enzymatycznych, zastosowane warunki doświadczalne spowodowały znaczne zwiększenie wytwarzania zewnątrzkomórkowych niskocząsteczkowych pochodnych fenolowych, które mogą odgrywać ważną rolę antyoksydacyjną, a w przypadku grzybów białej zgnilizny drewna mogą być substratami enzymów takich jak LAC, peroksydaza manganozależna (MnP) oraz peroksydaza ligninowa (LiP). W ten sposób wspomniane pochodne fenolowe mogą uczestniczyć jako mediatory w reakcjach biodegradacji kompleksu ligninowego (Leonowicz i wsp., 1999; Polak i Jarosz – Wilkołazka, 2012). Opierając się na uzyskanych wynikach można stwierdzić, iż w przypadku grzyba *P. pini* przedstawiony wariant stymulacji oksydacyjnej może znaleźć zastosowanie jako droga efektywnego pozyskiwania zarówno ważnych biotechnologicznie enzymów takich jak MnP, chitynaza czy proteazy, jak i frakcji niskocząsteczkowych fenolowych metabolitów wtórnych. Wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Magdalena Jaszek**, Katarzyna Kos, Anna Matuszewska, Marcin Grąz, Dawid Stefaniuk, Monika Osińska-Jaroszuk, Monika Prendecka, Ewa Józwick, Krzysztof Grzywnowicz. Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: *Phellinus pini* by menadione-mediated oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174 (2014), 644–656.

## 1.2. Stymulacja potencjału biodegradacyjnego grzybów białej zgnilizny drewna poprzez modyfikację źródła węgla w podłożu (zastosowanie suplementacji hodowli makuchami rzepakowymi i kwasem taninowym)

Zachęcona obiecującymi wynikami badań uzyskanymi dla kultur grzybów hodowanych na podłożach z dodatkiem menadionu, postanowiłam poszukać innych możliwości zwiększania potencjału biodegradacyjnego gatunków należących do opisywanej grupy organizmów. Biorąc pod uwagę swoje wcześniejsze doświadczenia naukowe, dotyczące hodowli grzybów jadalnych na podłożach, zawierających odpady przemysłu odzieżowego czy spożywczego, postanowiłam poszukać suplementu pochodzenia naturalnego, którego koszt i dostępność byłyby korzystne z punktu widzenia zastosowań biotechnologicznych. Po prześledzeniu danych literaturowych oraz konsultacjach naukowych prowadzonych w ramach współpracy z pracownikami Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, postanowiłam do swoich badań włączyć makuchy rzepakowe – półprodukt, powstający w procesie tłoczenia oleju rzepakowego. Założyłam, iż obecny w tym odpadzie kwas synapinowy (jeden z najefektywniejszych induktorów aktywności LAC) (Kwang-Soo i Chang-Jin, 1998; Lacki i Duvnjak, 1998), liczne komponenty fenolowe oraz pozostałości ligninocellulozowe okażą się efektywnymi stymulatorami metabolizmu grzybów białej zgnilizny drewna. Na podstawie badań przesiewowych i przeprowadzonych optymalizacji warunków hodowli, do pierwszej serii badań wybrałam gatunek *Cerrena unicolor* znany w dostępnej literaturze głównie jako źródło lakazy. Zastosowałam warianty hodowli na podłożach półpłynnych. Monitorowanie zmian biochemicznych, zarówno jakościowych jak i ilościowych, pozwoliło stwierdzić, iż 3,5% dodatek makuchów rzepakowych spowodował bardzo wyraźną przebudowę metabolizmu komórkowego badanego grzyba w kierunku zwiększonej syntezy czynników takich jak LAC,  $\beta$ -glukozydaza, chitynaza, czy komponenty fenolowe. Hodowle wytrząsane prowadzono przez 15 dni. W przypadku LAC i  $\beta$ -glukozydazy zmiany dotyczyły zarówno znacznego wzrostu aktywności, jak i zmian w profilach zymograficznych. W efekcie zastosowanej suplementacji, aktywność lakazy w 11 dniu hodowli niemal 4-krotnie przewyższyła wartości kontrolne. Zanotowano również pojawienie się na wykonanych zymogramach dwóch dodatkowych prążków, wykazujących aktywność lakazową w preparatach zewnątrzkomórkowych oraz jednego w próbkach

wewnątrzkomórkowych. Bardzo wyraźny efekt stymulacyjny zaobserwowałam również w przypadku  $\beta$ -glukozydazy (aktywności ponad 8-krotnie wyższe od kontroli w przypadku płynów pochodzących i ponad 2-krotnie wyższe w przypadku preparatów wewnątrzkomórkowych). Zależność tą potwierdziły również analizy elektroforetyczne. Wykorzystanie specyficznego substratu fluorescencyjnego pozwoliło również ocenić zmiany aktywności chitynazy w komórkach *C. unicolor*. Również w tym przypadku aktywności enzymu w hodowlach wzbogaconych dodatkiem makuchów rzepakowych były wyraźnie wyższe od wartości kontrolnych. Analiza elektroforetyczna pozwoliła stwierdzić obecność jednego prążka wykazującego aktywność chitynazy. Ponadto efekt stymulacyjny makuchów zaobserwowałam również w przypadku niskocząsteczkowych metabolitów o charakterze fenoli. Ich stężenie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe znacznie przekraczało wartości kontrolne. Zaproponowany model modyfikacji warunków hodowli *C. unicolor* wskazuje na możliwość jego zastosowania w celu pozyskiwania ważnych biotechnologicznie czynników pochodzenia naturalnego. Wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Magdalena Jaszek**, Justyna Miłek, Jerzy Żuchowski, Dawid Stefaniuk, Monika Prendecka: Effective and complex stimulation of the biodegradation system of fungus *Cerrena unicolor* by rapeseed meal fermentation. Acta Biochimica Polonica, 63 (2016), Epub: No 2015–1227.

Dalsze eksperymenty, w których zastosowano makuchy rzepakowe jako składnik podłoż hodowlanych, potwierdziły zależności zaobserwowane w poprzednim etapie badań. Kolejna seria doświadczeń miała na celu sprawdzenie, jakie zmiany jakościowe w składzie substratu zachodzą podczas fermentacji grzybowej makuchów rzepakowych i czy inne gatunki grzybów białej zgnilizny drewna reagują na ten rodzaj suplementacji pojawieniem się podwyższonych aktywności enzymów ważnych biotechnologicznie, takich jak lakaza. W odróżnieniu od wcześniejszych eksperymentów, w tej serii analiz kultury grzybowe namnażano na podłożach stałych w celu intensyfikacji przemian biodegradacyjnych wykorzystanego materiału odpadowego. Przeprowadzone badania wykazały, iż dwa gatunki grzybów – *Trametes versicolor* i *Pleurotus ostreatus* – bardzo efektywnie rozkładały obecny w makuchach rzepakowych kwas synapinowy – jeden z kwasów fenolowych, które wraz z innymi komponentami takimi jak taniny, obniżają właściwości odżywcze badanego suplementu. Warto wspomnieć, że zawartość tych związków znacznie zmniejsza przyswajalność makuchów rzepakowych, a tym samym możliwości ich wykorzystania jako np. dodatku paszowego. Przeprowadzona analiza chromatograficzna wykazała, że zawartość kwasu synapinowego po 28 dniach fermentacji spadła do 7 % w przypadku *T. versicolor*, a do

6,8% w kulturach *P. ostreatus*. Zmianom tym towarzyszył bardzo znaczący wzrost aktywności lakazy zewnątrzkomórkowej. Najwyższe parametry zanotowano w 21 i 28 dniu trwania hodowli grzybowych. Aktywności lakazy w kulturach *T. versicolor* niemal 5-krotnie przewyższały aktywności obserwowane w przypadku *P. ostreatus*. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż dodatek makuchów rzepakowych do podłoży hodowlanych wybranych gatunków grzybów białej zgnilizny drewna może być istotną modyfikacją produkcji tych enzymów na skalę biotechnologiczną. Należy podkreślić, że dodatek ten jest tanim i nietoksycznym produktem odpadowym. Jednocześnie prowadzone przez grzyby procesy biodegradacyjne mogą zwiększać możliwości wykorzystania makuchów rzepakowych jako źródła cennych składników odżywczych poprzez usuwanie składników obniżających ich jakość, takich jak kwas synapinowy. Wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

Jerzy Żuchowski, Łukasz Pecio, **Magdalena Jaszek**, Anna Stochmal: Solid-state fermentation of rapeseed meal with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171 (2013), 2075–2081.

Podobnie jak w przypadku kwasów fenolowych, jednym z czynników znacznie obniżającym możliwości wykorzystania właściwości odżywczych makuchów rzepakowych są taniny. Enzymem odpowiedzialnym za pierwsze etapy degradacji tych związków jest tanaza – enzym katalizujący hydrolizę wiązań estrowych w kompleksie tanin (Aguilar i wsp., 2007). W wyniku reakcji powstaje kwas galusowy, wykorzystywany w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy biomedycznym. Biorąc pod uwagę możliwości aplikacyjne tanazy, postanowiłam poszukać nowych modyfikacji biotechnologicznej produkcji tego enzymu, w tym przypadku z wykorzystaniem grzybów białej zgnilizny drewna. Zrealizowany program eksperymentalny zakładał wprowadzenie do podłoży hodowlanych czynników stymulujących aktywność tanazy. W tym przypadku były to makuchy rzepakowe (o wysokiej zawartości tanin) oraz kwas taninowy jako naturalny substrat tanazy. Do badań wybrano gatunki grzybów wcześniej przebadane pod kątem stymulacji oksydacyjnej: *Phellinus pini*, *Fomes fomentarius* oraz *Tyromyces pubescens*. Wykonane analizy spektrofotometryczne i elektroforetyczne (z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej) pokazały, że zastosowana modyfikacja podłoży hodowlanych poprzez wprowadzenie makuchów rzepakowych i kwasu taninowego jako głównego źródła węgla spowodowała wyraźne zmiany aktywności tanazy zarówno w grzybniach, jak i płynach pohodowlanych. Makuchy rzepakowe nie okazały się w tym przypadku uniwersalnym induktorem aktywności badanego enzymu. Wyraźny efekt stymulacyjny zaobserwowałam jedynie w przypadku grzyba *P. pini*. Dla dwóch pozostałych

gatunków grzybów aktywności tanazy były bardzo wyraźnie podwyższone w kulturach hodowanych na podłożach zawierających kwas taninowy jako główne źródło węgla. Najwyższe aktywności enzymu zanotowałam w płynach pohodowlanych otrzymanych z hodowli *T. pubescens* z dodatkiem kwasu taninowego. Wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

Monika Prendecka, **Magdalena Jaszek**, Marcin Grąż, Natalia Głuszak, Katarzyna Małysz, Agata Nowak, Jerzy Żuchowski, Teresa Małecka–Massalska: Stimulation of the activity of a novel tannase produced in white rot fungi *Phellinus pini*, *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens* by medium supplementation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (2015), DOI: 10.1002/bab.1413.

### 1.3. Stymulacja termiczna syntezy niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych (LMS–*low molecular weight subfraction*) o właściwościach antyoksydacyjnych i antybiotycznych w kulturach grzyba *Pycnoporus sanguineus*.

Poza enzymami uczestniczącymi w procesach biodegradacyjnych prowadzonych przez grzyby białej zgnilizny drewna ważną rolę odgrywają również produkowane podczas wzrostu grzybni związki niskocząsteczkowe, takie jak komponenty fenolowe, czy kwasy organiczne. Będąc substratami bądź mediatorami, związki te uczestniczą w katalizie procesów biodegradacji biopolimerów, takich jak lignina czy celuloza. Pochodne aromatyczne dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym mogą również pełnić ważną rolę w mechanizmach odpowiedzi komórek grzybowych na różnego rodzaju czynniki stresowe tj. stres oksydacyjny (Jaszek i wsp., 2006), obecność metali ciężkich (Cd) (Jarosz – Wilkołazka i wsp., 2002), czy stres termiczny (Fink–Boots i wsp., 1999). Biorąc pod uwagę wzrastające zainteresowanie preparatami bioaktywnymi pochodzenia naturalnego, zarówno w tym, jak i następnych etapach badań, moja uwaga skoncentrowała się na poszukiwaniu nowych właściwości bioaktywnych preparatów pochodzenia grzybowego takich jak lakaza, polisacharydy, czy niskocząsteczkowe metabolity wtórne oraz poszukiwaniu nowych metod stymulacji tych właściwości.

W pierwszej kolejności zajęłam się badaniem frakcji niskocząsteczkowych izolowanych z grzyba leczniczego *P. sanguineus*. Opcja ta stwarzała możliwość efektywnego wykorzystania związków o masie poniżej 10 kDa, które były dotąd traktowane jako produkt odpadowy otrzymywany przy biotechnologicznej produkcji frakcji enzymatycznej. Plan doświadczeń zakładał przebadanie właściwości bioaktywnych otrzymanych preparatów, charakterystykę biochemiczną oraz próbę stymulacji tych właściwości. W prowadzonych badaniach bardziej zależało mi na stymulacji syntezy pożądaných związków o właściwościach bioaktywnych, niż

na modulowaniu ich składu jakościowego. W związku z tym, zamiast czynników chemicznych (syntetycznych bądź naturalnych), zastosowałam czynnik fizyczny – zmiany temperatury prowadzenia hodowli. W tym celu temperatura, w której namnażałam biomasę grzybową, była sukcesywnie podnoszona o 5°C w stosunku do temperatury stosowanej standardowo. Otrzymane frakcje przebadano pod kątem właściwości bioaktywnych m. in. przeciwbakteryjnych. W wyniku tych doświadczeń udało się określić parametry hodowli, będących najbardziej efektywnym źródłem preparatów bioaktywnych. W przypadku badanego gatunku grzyba okazało się, iż podniesienie temperatury hodowli z 25°C (ex-LMSa) do 30°C (ex-LMSb) powoduje istotny wzrost zarówno właściwości antyoksydacyjnych, jak i przeciwbakteryjnych wyizolowanych frakcji. Frakcje różniły się również w znaczący sposób pod względem biochemicznym. Stężenie pochodnych fenolowych w hodowlach ex-LMSb ponad dwukrotnie przekraczało wartości zanotowane w hodowlach ex-LMSa. Analiza wyników widma FT-IR wykazała, iż obie frakcje różnią się także rodzajem występujących wiązań oraz obecnymi w ich składzie substancjami o właściwościach przeciwbakteryjnych. Dla ex-LMSa zanotowano 56,35% homologii do paromycyny, a w ex-LMSb 46,85 % homologii do dihydrostreptomycyny. Podniesienie temperatury hodowli znacznie podwyższało również potencjał antyoksydacyjny oraz bakteriostatyczny preparatów. Bezpośrednia ekspozycja komórek *Staphylococcus aureus* na działanie otrzymanych frakcji powodowała widoczne podczas analizy mikroskopowej techniką SEM zmiany morfologiczne komórek bakterii. Destrukcja komórek *S. aureus* była znacznie bardziej zaawansowana po zastosowaniu preparatu ex-LMSb. Zrealizowane doświadczenia pozwoliły na odkrycie nowych możliwości wykorzystania i stymulacji właściwości bioaktywnych frakcji niskocząsteczkowych otrzymanych z kultur *P. sanguineus*. Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Magdalena Jaszek.,** Monika Osinska-Jaroszuk, Justyna Sulej, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk, Kamil Maciag, Jolanta Polak, Łukasz Matuszewski, Krzysztof Grzywnowicz: Stimulation of the antioxidative and antimicrobial potential of the blood red bracket mushroom *Pycnoporus sanguineus* (higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 17(8) (2015), 701–712.

## **2. Poszukiwanie nowych możliwości zastosowania preparatów grzybowych o właściwościach bioaktywnych**

### **2.1. Zastosowania biomedyczne**

Wyniki prowadzonych badań otrzymane dla opisanych wcześniej gatunków grzybów, pokazujące możliwości stymulacji syntezy wielu ważnych biotechnologicznie wyróżników



biochemicznych, były podstawą do poszukiwania przeze mnie nowych możliwości wykorzystania unikatowych właściwości preparatów pochodzenia grzybowego. Opierając się na danych literaturowych dzielących grzybowe substancje bioaktywne na metabolity wtórne (terpenoidy, polifenole, alkaloidy, laktony, sterole i in.), glikoproteiny (enzymy tj. lakazy) oraz wysokocząsteczkowe polisacharydy, postanowiłam przeprowadzić badania w obrębie tych właśnie grup związków. Argumentem decydującym o tym wyborze był udział związków należących do tych grup w mechanizmach biodegradacyjnych charakterystycznych dla grzybów białej zgnilizny drewna. Przeprowadzone badania doprowadziły do wyselekcjonowania grzyba *C. unicolor*, gatunku będącego źródłem wysokoaktywnej lakazy i innych enzymów uczestniczących w procesach biodegradacji oraz znacznych ilości niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, a nieprzebadanego dotąd pod kątem zastosowań biomedycznych. Do badań zakwalifikowałam trzy rodzaje preparatów: frakcję niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych (ex-LMS) (produkt odpadowy otrzymywany w znaczących ilościach podczas produkcji lakazy), zewnątrzkomórkową lakazę (ex-LAC) oraz nieopisane do tej pory polisacharydy wewnątrzkomórkowe (c-EPL). Źródłem wszystkich frakcji były idiofazowe kultury *C. unicolor*. W pierwszym etapie badań skoncentrowałam się na analizie właściwości biochemicznych, antyoksydacyjnych oraz przeciwbakteryjnych wybranych frakcji. Okazało się, iż preparaty wykazują właściwości bakteriostatyczne wobec bakterii *Escherichia coli* (ex-LAC i ex-LMS) i *Staphylococcus aureus* (c-EPL, ex-LMS). Przeprowadzona analiza chemiluminescencyjna wykazała wysoki potencjał prooksydacyjny frakcji ex-LAC oraz potencjał antyoksydacyjny frakcji ex-LMS oraz c-EPL. Uzyskane rezultaty wskazują na możliwości wykorzystania zaproponowanych preparatów jako nowych substancji bioaktywnych. Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Magdalena Jaszek**, Monika Osińska-Jaroszuk, Grzegorz Janusz, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk, Justyna Sulej J, Jolanta Polak, Marta Ruminowicz, Krzysztof Grzywnowicz, Anna Jarosz-Wilkolazka: New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures; *BioMed Research International*, 497492 (2013), 1–11. (*Journal of Biomedicine and Biotechnology*)

Po określeniu podstawowych właściwości bioaktywnych trzech wybranych do badań frakcji (ex-LMS, ex-LAC i c-EPL), postanowiłam sprawdzić ich potencjał przeciwwirusowy, przeciwnowotworowy oraz immunostymulacyjny. Realizacja tego etapu badań była możliwa dzięki współpracy z pracownikami naukowymi Zakładu Wirusologii i Immunologii UMCS. Efekt immunostymulacyjny był badany przy wykorzystaniu makrofagów wyprowadzonych z linii THP-1, syntetyzujących IL-6 i TNF- $\alpha$ . W celu

zbadań działania antynowotworowego wykorzystano linie komórkowe raka szyjki macicy pierwotne SiHa (ATCC, HTB-35) oraz przerzutowe CaSki (ATCC, CRL 1550). Linia kontrolną były ludzkie fibroblasty (HSF). Dodatkowo linie komórkowe SiHa oraz L929 (fibroblasty mysie, ATCC, CCL-1) wykorzystano do namnażania wirusów HHV-1 (wirus opryszczki) oraz EMCV (wirus zapalenia mózgu). Po raz pierwszy wykazano efekt antywirusowy ex-LAC zarówno wobec HHV-1, jak i EMCV. Działanie lakazy zależało w tym przypadku od rodzaju wirusa i jego stadium replikacyjnego. LAC wykazywała silniejsze działanie wobec wirusa HHV-1 niż wobec wirusa EMCV. Przeprowadzone badania wykazały również działanie immunomodulacyjne frakcji c-EPL, której dodatek stymulował wytwarzanie TNF- $\alpha$  (powyżej 2000 pg/ml) oraz IL-6 (powyżej 400 pg/ml). Uzyskane wyniki wykazały, iż preparaty zawierające LAC (250  $\mu$ g/ml) oraz ex-LMS (10  $\mu$ g/ml) działają cytotoksycznie i antyproliferacyjnie. Efekt przeciwnowotworowy LAC z *C. unicolor* stał się treścią zgłoszenia patentowego:

Anna Matuszewska, **Magdalena Jaszek**, Grzegorz Janusz, Monika Osińska-Jaroszuk, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Jerzy Rogalski, Magdalena Mizerska-Dudka, Martyna Kandefer-Szerszeń. Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu raka szyjki macicy: **2013 (P.406573)**

Natomiast wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

Magdalena Mizerska-Dudka, **Magdalena Jaszek**, Adriana Błachowicz, Tomasz Rejczak, Anna Matuszewska, Monika Osińska-Jaroszuk, Dawid Stefaniuk, Grzegorz Janusz, Justyna Sulej, Martyna Kandefer-Szerszeń: Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. International Journal of Biological Macromolecules 79 (2015), 459-468.

Cytotoksyczny potencjał lakazy (LAC) wyizolowanej z idiofazowych kultur *C. unicolor* okazał się na tyle obiecujący, iż postanowiłam rozszerzyć badania na inne rodzaje nowotworów. Dzięki nawiązaniu współpracy z pracownikami naukowymi Zakładu Hematoonkologii Doświadczalnej UM w Lublinie możliwe stało się sprawdzenie, czy opisywany preparat grzybowy może wykazywać działanie przeciwnowotworowe wobec chorób nowotworowych krwi. Działanie LAC testowano wobec linii komórkowych HL-60, Jurkat, RPMI 8226, K 562 oraz pierwotnych komórek przewlekłej białaczki limfocytarnej izolowanych z krwi pacjentów. Wykonane testy XTT, badania apoptozy techniką cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej oraz wizualizacja powierzchni komórek nowotworowych techniką SEM wykazały wyraźny efekt cytotoksyczny oraz proapoptotyczny LAC z *C. unicolor*, co stwarza możliwości jej potencjalnego wykorzystania jako nowego

środka terapeutycznego w leczeniu nowotworów krwi. Działanie przeciwnowotworowe LAC z *C. unicolor* stało się treścią zgłoszenia patentowego:

**Magdalena Jaszek**, Anna Matuszewska, Monika Osińska-Jaroszuk, Grzegorz Janusz, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Krzysztof Giannopoulos, Marta Karp. Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych krwi: **2013 (P.406228)**

Wyniki opisanych badań zostały również opublikowane w następującej pracy naukowej:

Anna Matuszewska, Marta Karp, **Magdalena Jaszek**, Grzegorz Janusz, Monika Osińska-Jaroszuk, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Waldemar Tomczak, Krzysztof Giannopoulos: Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncology Letters*, (2016), DOI: 10.3892/ol.2016.4220.

## 2.2. Zastosowania przemysłowe

Obiecujące wyniki dotyczące właściwości bioaktywnych opisywanych preparatów grzybowych zachęciły mnie do poszukiwania nowych możliwości ich praktycznego zastosowania. Dzięki nawiązaniu współpracy z pracownikami naukowymi Politechniki Lubelskiej zrodził się pomysł wykorzystania wybranych preparatów grzybowych do modyfikacji składu klejów epoksydowych. Celem badań było min. podniesienie oporności klejów na procesy starzenia związane z różnorodnymi czynnikami zewnętrznymi. Do badań wybrane zostały frakcje ex-LMSa i ex-LMSb z *P. sanguineus* (namnażane w temp 25°C i 30° C) oraz ex-LMS i LAC z *C. unicolor*. Wyboru preparatów dokonano w oparciu o ich zdefiniowane wcześniej właściwości antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne. Próbkki pochodzenia biologicznego były dodawane do gotowych mieszanek klejowych. Zarówno przeprowadzone badania mikroskopowe, jak i analiza właściwości mechanicznych modyfikowanych mieszanek klejowych wykazała, iż dodatek frakcji niskocząsteczkowych (ex-LMSb) wyraźnie zwiększał odporność kleju na procesy starzenia oraz działanie zewnętrznych czynników środowiskowych w stosunku do kleju niemodyfikowanego. Wyniki okazały się na tyle istotne i obiecujące, iż stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego oraz przygotowanych do publikacji prac badawczych.

Anna Rudawska, Tomasz Warda, Izabela Haniecka, **Magdalena Jaszek**, Anna Matuszewska, Dawid Stefaniuk. Sposób wytwarzania modyfikowanego kleju epoksydowego oraz jego zastosowanie: **2015 (P.411264)**

## Literatura:

1. Aquilar, C.N., Rodrigez, R., Guterrez-Sanchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramirez-Coronel, A., Contreras-Esquivel, J.C., (2007) *Applied of Microbial Biotechnology* 76, 47-59.
2. Arora, D.S., Sharma, R.K., (2009) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 1760-1788.

3. Duo– Chuan L., (2006) *Mycopathologia* 161, 345–360.
4. Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., (2012) *Trends in Biotechnology* 30, 259–273.
5. Fink–Boots, M., Malarczyk, E., Leonowicz, A., (1999) *Acta Biotechnologica Hungarica* 19, 319–330.
6. Hamel, K.E., (2002) *Enzyme and Microbial Technology* 30, 445–453.
7. Hiscox, J., Baldrian, P., Rogers, H.J., Boddy, L., (2010) *Fungal Genetics and Biology* 47, 562–571.
8. Jarosz–Wilkołazka, A., Malarczyk, E., Pirszel, J., Skowroński, T., Leonowicz, A., (2002) *Cell Biology International* 26, 607–613.
9. Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., Leonowicz, A., (2006) *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85, 147–154.
10. Kwang–Soo, S., Chang–Jin, K., (1998) *Biotechnology Techniques* 12, 101–104.
11. Lacki, K., Duvnjak, Z., (1998) *Biotechnology and Bioengineering* 57, 694–703.
12. Lee, S.M., Kim, S., Lee, Y.H., Kim, W.J., Park, J.K., Park, J.I., (2010) *Macromolecular Research* 18, 602–609.
13. Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś–Wasilewska, M., Cho, N–S., (1999) *Fungal Genetics and Biology* 27, 175–185.
14. Polak, J., Jarosz–Wilkołazka, A., (2012) *Process Biochemistry* 47, 1295–1307.
15. Sanchez, C., (2009) *Biotechnology Advances* 27, 185–194.
16. Staszczak, M., (2002) *Enzyme and Microbial Technology* 30, 537–541.
17. Urzua, U., Kersten, P.J., Vicuna, R., (1998) *Applied of Environmental Microbiology* 64, 68–73.
18. Zak, J.C. Wildman, H.G., (2009) Elsevier Academic Press, Amsterdam

### **3. Podsumowanie wyników badań stanowiących treść osiągnięcia naukowego przedstawionego w postępowaniu habilitacyjnym:**

Najważniejsze osiągnięcia badawcze zrealizowanego przez mnie cyklu doświadczeń stanowiących treść osiągnięcia naukowego:

1. Nowatorskie zastosowanie stresu oksydacyjnego wywołanego poprzez dodanie 1mM menadionu do idiofazowych kultur *F. fomentarius* i *T. pubescens* wyraźnie zwiększa syntezę ważnych biotechnologicznie enzymów ligninolitycznych: lakazy i peroksydazy manganozależnej. Opisany po raz pierwszy spektakularny efekt dotyczy zwłaszcza aktywności MnP (aktywności enzymu w hodowlach poddanych stymulacji oksydacyjnej są wyższe 14–krotnie w kulturach *T. pubescens* oraz 10–krotnie w przypadku *F. fomentarius* od wartości kontrolnych). Uzyskane wyniki wskazują, że znaczące wzmocnienie mechanizmów ligninolitycznych to prawdopodobnie jedna ze strategii adaptacji opisywanych gatunków grzybów do warunków stresu oksydacyjnego. Wprowadzenia menadionu do podłoży hodowlanych poza zmianami dotyczącymi typowych czynników antyoksydacyjnych (SOD, CAT czy GSH) wywołuje również

wyraźne różnice w poziomie formaldehydu, co daje możliwość wykorzystywania tego czynnika jako markera stresu oksydacyjnego u opisywanych organizmów.

2. Lecznicy grzyb *P. pini* poddany nieopisaną do tej pory w przypadku tego gatunku stymulacji oksydacyjnej (dodanie 0,75 mM menadionu do podłoży hodowlanych) 10-krotnie zwiększa syntezę zewnątrzkomórkowej peroksydazy manganozależnej. Najwyższe aktywności MnP występują w 5-tej dobie trwania eksperymentu. Bardzo wyraźnej stymulacji ulega również system proteolityczny badanego organizmu. Aktywności proteaz trypsynopodobnych i subtylizynopodobnych, tak w grzybnicach jak i płynach pochodzących, znacznie przekraczają wartości kontrolne, co wskazuje na ich prawdopodobny udział w mechanizmach odpowiedzi *P. pini* na stres oksydacyjny. W opracowanych przeze mnie warunkach hodowlanych wielokrotnie zwiększa się również synteza zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych substancji fenolowych będących potencjalnym źródłem wielu cennych antyoksydantów i związków przeciwbakteryjnych.
3. Zastosowanie 3,5% dodatku makuchów rzepakowych jako czynnika modyfikującego warunki wzrostu grzyba *C. unicolor* powoduje bardzo wyraźny wzrost aktywności lakazy (LAC),  $\beta$ -glukozydazy i chitynazy obserwowany w tych warunkach eksperymentalnych po raz pierwszy. W przypadku LAC i chitynazy aktywności są odpowiednio niemal 4- i 3-krotnie wyższe od wartości kontrolnych. Najbardziej spektakularny efekt dotyczy  $\beta$ -glukozydazy – opracowany wariant stymulacyjny skutkuje aż 8-krotnie wyższymi wartościami w odniesieniu do hodowli kontrolnych. W kulturach z dodatkiem 3,5% makuchów rzepakowych bardzo wyraźnie wzrasta również synteza zewnątrzkomórkowych substancji fenolowych.
4. Hodowla grzybów *T. versicolor* i *P. ostreatus* na makuchach rzepakowych powoduje bardzo wyraźne obniżenie stężenia kwasu synapinowego w zastosowanym podłożu hodowlanym. Zawartość ta po 28 dniach hodowli zmniejsza się do 7% w przypadku *T. versicolor* i 6,8% w przypadku *P. ostreatus*. W przypadku obydwu gatunków występuje znaczący wzrost aktywności lakazy w badanych podłożach hodowlanych. Otrzymane dane wielokrotnie przewyższają wartości kontrolne.
5. Zastosowanie makuchów rzepakowych lub kwasu taninowego jako głównego źródła węgla w hodowlach *P. pini*, *F. fomentarius* i *T. pubescens* wyraźnie zwiększa wytwarzanie opisanego po raz pierwszy w przypadku tych gatunków enzymu – tanazy. Wykazano, że makuchy rzepakowe stymulują wyraźnie syntezę tanazy w kulturach

*P. pini*, natomiast w przypadku *F. fomentarius* i *T. pubescens* aktywności enzymu wyraźnie wzrastają przy wprowadzeniu kwasu taninowego jako głównego źródła węgla. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość biotechnologicznego wykorzystania opisanych gatunków jako potencjalnych producentów tanazy.

6. Zastosowana w zaproponowanej formie oryginalna modyfikacja warunków namnażania grzybni *P. sanguineus* (podwyższenie temperatury hodowli z 25°C (ex-LMSa) do 30°C (ex-LMSb)), powoduje wyraźną zmianę właściwości bioaktywnych (antyoksydacyjnych i przeciwbakteryjnych) syntetyzowanych przez grzyb frakcji zewnątrzkomórkowych, niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych (ex-LMS). Analiza FT-IR wykazała obecność związków o strukturze zbliżonej do paromycyny w ex-LMSa oraz dihydrostreptomycyny w ex-LMSb. Frakcja ex-LMSb zawiera znacznie wyższą ilość substancji fenolowych, wykazuje silniejsze działanie antyoksydacyjne oraz przeciwbakteryjne. Bezpośrednia ekspozycja komórek *Staphylococcus aureus* na działanie preparatu ex-LMSb powoduje wyraźne zmiany destrukcyjne komórek bakteryjnych widoczne podczas analizy mikroskopowej techniką SEM.
7. Scharakteryzowane po raz pierwszy trzy nowe grzybowe preparaty bioaktywne wyizolowane z kultur *C. unicolor*: 1) ex-LAC (zewnątrzkomórkowa lakaza), 2) ex-LMS (frakcja zewnątrzkomórkowych, niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych) i 3) c-EPL (wewnątrzkomórkowe polisacharydy) wykazują: a) potencjał prooksydacyjny (zewnątrzkomórkowa lakaza – ex-LAC), b) antyoksydacyjny (ex-LMS i wewnątrzkomórkowe polisacharydy – c-EPL) oraz c) bakteriostatyczny (ex-LAC, ex-LMS i c-EPL). Frakcja ex-LAC hamuje namnażanie się komórek *E. coli*, a frakcja c-EPL komórek *S. aureus*. Wprowadzenie do podłoża preparatu ex-LMS działa bakteriostatycznie zarówno wobec komórek *Escherichia coli* jak i *S. aureus*. Ex-LMS wykazuje również najwyższy potencjał antyoksydacyjny (EC<sub>50</sub> wobec ABTS = 25 µg/ml).
8. Frakcja lakazy (ex-LAC) z *C. unicolor* poza opisanymi wcześniej właściwościami, wykazuje także nieopisane do tej pory działanie przeciwwirusowe (wobec wirusów HHV-1 i EMCV), cytotoksyczne i antyproliferacyjne (wobec komórek raka szyjki macicy). To działanie w porównaniu do zdrowych komórek fibroblastów (HSF) jest na tyle istotne statystycznie, iż stało się przedmiotem zgłoszenia patentowego (**P.406573**). Działanie cytotoksyczne wykazuje również preparat ex-LMS jednak w tym przypadku

efekt jest widoczny jedynie przy najwyższych zastosowanych stężeniach. Wyraźne działanie immunostymulacyjne (zwiększenie syntezy TNF $\alpha$  i IL-6 przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1) stwierdzono dla frakcji polisacharydów izolowanych z grzybni *C. unicolor*.

9. Preparat lakazy (ex-LAC) z *C. unicolor* wykazuje również opisane po raz pierwszy działanie cytotoksyczne, oraz proapoptotyczne wobec linii komórkowych nowotworów krwi: HL-60, Jurkat, RPMI 8226, K 562 oraz pierwotnych komórek przewlekłej białaczki limfocytarnej izolowanych z krwi pacjentów. Wizualizacja mikroskopowa struktury powierzchniowej komórek poddanych działaniu lakazy wskazuje na wyraźne uszkodzenia ich powierzchni. Wyniki zaprezentowanych badań okazały się na tyle interesujące, iż zostały zgłoszone do ochrony patentowej jako potencjalna droga terapeutyczna w kierunku leczenia nowotworów krwi (**P.406228**).
10. Dodanie preparatu ex-LMSb (o wysokim potencjale antyoksydacyjnym) izolowanego z hodowli *P. sanguineus*, do epoksydowych mieszanin klejowych, wyraźnie zwiększa odporność otrzymanego kleju na procesy starzenia i wpływ warunków zewnętrznych. Nowatorski charakter przeprowadzonych badań dał podstawę do zgłoszenia opisanego działania jako przedmiotu ochrony patentowej (**P.411264**).

#### **E) Informacje o innych formach działalności naukowo-badawczej związanej z osiągnięciem zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego**

##### **1. Współpraca z jednostkami naukowymi:**

W ramach realizacji osiągnięcia zgłaszanego do oceny w postępowaniu habilitacyjnym współpracowałam z następującymi jednostkami badawczymi:

- a) **Zakład Wirusologii i Immunologii**, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie
- b) **Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej**, II Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- c) **Zakład Biochemii i Jakości Plonów**, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach (JUNG-PIB)
- d) **Katedra Podstaw Inżynierii Produkcji**, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

## V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych

### A) Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w 1994 roku w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Marii Curie–Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza. Dzięki jego wielkiej pasji i zaangażowaniu od samego początku mojej drogi zawodowej byłam szczególnie związana z realizowanym w obrębie zespołu badawczego nurtem szeroko pojętej biotechnologii grzybów, w tym szczególnie grzybów należących do Basidiomycota. W pierwszych latach moje prace obejmowały min. optymalizację laboratoryjnej hodowli sześciu gatunków japońskich grzybów jadalnych: *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota nameko*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* i *Lyophyllum ulmarium* na odpadach pochodzących z przemysłu drzewnego i spożywczego, w ścisłej współpracy z Prof. Toshio Fukuzumii reprezentującym Japońską Agencję Współpracy Międzynarodowej (JICA). Badania miały na celu wykazanie możliwości efektywnej hodowli japońskich grzybów jadalnych w Polsce w celu popularyzacji tych produktów na terenie naszego kraju i w innych częściach Europy. Poza sukcesem w postaci wyhodowania pełnowartościowych owocników, objęły one także analizę zmian aktywności enzymów związanych z degradacją kompleksu ligninocelulozowego (głównie lakazy) w podłożach pohodowlanych. Do badań wykorzystywałam szczepy grzybów japońskich otrzymane z Kaneko Farm w Japonii.

Moje dalsze prace naukowe związane były głównie z projektami dotyczącymi enzymatycznej degradacji kompleksu ligninocelulozowego efektywnie prowadzonej przez grzyby białej zgnilizny drewna. Moje szczególne zainteresowanie dotyczyło udziału w tych procesach lakazy – oksydazy polifenolowej, będącej ważnym biokatalizatorem wydzielanym do podłoża przez wiele gatunków grzybów wyższych rozkładających drewno. Prowadzone doświadczenia miały na celu poszukiwanie najbardziej obiecujących źródeł naturalnych tego enzymu oraz badanie możliwości indukcji jego wydzielania. W wyniku tych prac wyselekcjonowano jeden z najbardziej aktywnych pod względem syntezy lakazy szczep – *C. unicolor*. W trakcie prowadzonych eksperymentów oczyszczałam, charakteryzowałam i badałam różnego rodzaju właściwości lakazy wyizolowanej z tego gatunku. Moje prace dotyczyły również immobilizacji otrzymanego enzymu na nośnikach takich jak żel krzemionkowy i szkło porowate. Badania były częściowo realizowane we współpracy z zespołem naukowym pod kierownictwem Prof. Nam Sek Cho (Uniwersytet w Chengju, Korea). W tym czasie uczestniczyłam również w badaniach dotyczących otrzymywania



i właściwości grzybowej peroksydazy manganozależnej prowadzonych we współpracy z dr Dirkiem Zigenhagenem (Uniwersytet w Jenie, Niemcy).

W wyniku badań obejmujących grzyby jadalne wymagające szoku termicznego do rozpoczęcia prawidłowego owocnikowania, pojawiła się koncepcja badania lakazy i innych wyróżników biochemicznych, syntetyzowanych przez grzyby białej zgnilizny drewna jako białka odpowiedzi stresowej wybranych gatunków grzybów wyższych. Do zainteresowania się tematyką adaptacji organizmów z tej grupy do warunków stresowych zachęcił mnie również zupełny brak doniesień naukowych dotyczących tego tematu. Badania prowadzone przez zespół w którym pracowałam, dotyczące wpływu szoku termicznego na aktywność lakazy, skłoniły mnie do podjęcia próby określenia odpowiedzi grzybów na innego typu czynniki stresowe. Ponieważ dostępne dane literaturowe sugerowały znaczącą rolę przemian oksydo–redukcyjnych w procesach biodegradacyjnych prowadzonych przez grzyby białej zgnilizny drewna, tematem mojej pracy stało się badanie ogólnej odpowiedzi komórek grzybowych na wybrane czynniki stresu oksydacyjnego. Prace objęły zarówno czynniki standardowo opisywane jako elementy ich systemu biodegradacyjnego, takie jak lakaza czy peroksydaza manganozależna, jak i typowe antyoksydanty: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i glutation. Poza wymienionymi parametrami zbadałam również zmiany w aktywnościach enzymów proteolitycznych i ich naturalnych inhibitorów jako jeden z potencjalnych mechanizmów regulacji obrotu białkowego w warunkach stresowych. Zastosowałam trzy czynniki stresu oksydacyjnego: parakwat (methylviologen – herbicyd) i menadion (syntetyczna witamina K) – substancje indukujące nadprodukcję anionorodnika ponadtlenkowego w tzw. cyklach redox oraz nadtlenek wodoru – jako typowy utleniacz. Badania przeprowadziłam na dwóch gatunkach grzybów białej zgnilizny drewna: *Trametes versicolor* (szczep o wysokich aktywnościach konstytutywnie syntetyzowanej lakazy) oraz *Abortiporus biennis* (szczep o niskich aktywnościach lakazy). Wyniki przeprowadzonych analiz zostały stały się treścią przygotowanej rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ stresu oksydacyjnego na niektóre aspekty metabolizmu wtórnego u grzybów rozkładających drewno”.

Wyniki doświadczeń prowadzonych przeze mnie przed obroną doktoratu stały się częścią następujących opracowań naukowych:

1. Luterek J., Gianfreda L., Wojtaś–Wasilewska M, Cho N.S., Rogalski J., **Jaszek M.**, Malarczyk E., Staszczak M., Fink–Boots M., Leonowicz A. (1998) Activity of free and immobilized extracellular

- Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents, *Holzforschung* 52, 589–595. **IF = 0,901 punkty MNiSW = 21**
2. Leonowicz A., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś–Wasilewska M., Malarczyk E., Ginalska G., Fink–Boots M., Cho N. S. (1999) Cooperation of fungal laccase and glucose 1–oxidase in transformation of Bjorkman lignin and some phenolic compounds. *Holzforschung* ( ISSN 0018–3830) 53, 376–380. **IF = 0,995 punkty MNiSW = 21**
  3. Cho N. S., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś–Wasilewska M., Malarczyk E., Fink–Boots M., Leonowicz A. (1999) Effect of coniferyl alcohol addition on removal of chlorophenols from water effluent by fungal laccase. *Journal of Wood Science (Japan)* ( ISSN 1435–0211) 45, 174–185. **IF = 0,56 punkty MNiSW = 6**
  4. Cho N. S., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś–Wasilewska M., Malarczyk E., Fink–Boots M., Leonowicz A. (1999) Effect of coniferyl alcohol addition on removal of chlorophenols from water effluent by fungal laccase. *Journal of Wood Science (Japan)* ( ISSN 1435–0211) 45, 174–185. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  5. Luterek J., Gianfreda L. Wojtaś– Wasilewska M, Rogalski J., **Jaszek M.**, Malarczyk E., Staszczak M., Fink–Boots M., Leonowicz A. (1997) Immobilization of *Cerrena unicolor* laccase and ist activity in organic solvents. *Proceedings of '97 International Seminar on Forest Science*. Cheongju: Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 35–48. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  6. Leonowicz A., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś– Wasilewska M, Malarczyk E., Fink–Boots M., Ginalska G., Cho N.S. (1997) Feed–back activity of fungal laccase and glucose oxidase in transformation of Bjorkman lignin and some phenolic compounds. *Proceedings of '97 International Seminar on Forest Science*. Cheongju: Chungbuk National University, Chengju, Korea, 59–70. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  7. Luterek J., Gianfreda L., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś–Wasilewska M., Malarczyk E., Dawidowicz A., Fink–Boots M., Ginalska G., Zawistowska H., Cho N.S. (1997) Purification and function of laccase isolated from the best producing fungus *Cerrena unicolor*. *Proc Korean Soc. Wood Sci. Technol. Ann. Meeting, Korea*, 7–17. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  8. Cho N.S., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś–Wasilewska M., Malarczyk E., Staszczak M., Fink–Boots M., Leonowicz A. (1997) Removal of chlorophenols from water effluent by fungal laccase in the presence of coniferyl alkohoil. *Proceedings of '97 International Seminar on Forest Science*. Cheongju: Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 71–80. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  9. Ginalska G., Łobarzewski J., Cho N. S., Park J.M., **Jaszek M.**, Leonowicz A. (1999) Keratin as a matrix for laccase immobilization. *Proceedings of International Seminar "New Horizon of Biosciences in Forest Products Fields"*, April 21–22, Chungbuk National University Cheongju, Korea, 164–174. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
  10. Cho N. S., Park J.M., Choi T.H., Matuszewska A., **Jaszek M.**, Grzywnowicz K., Malarczyk E., Trojanowski K., Leonowicz A. (1999) Carminic acid, Remazol Brilliant Blue R and Hardwood KP bleaching effluent can be decolorized by of wood–rotting fungi and laccase.. *Proceedings of International Seminar "New Horizon of Biosciences in Forest Products Fields"*, April 21–22, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 143–151. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**

11. Leonowicz A., Gianfreda L., Rogalski J, **Jaszek M**, Luterek J., Wojtas –Wasilewska M, Malarczyk E., Rogalski J., Dawidowicz A., Fink–Boots M., Ginalska G., Cho N.S. (1997) Purification of extracellular *Cerrena unicolor* laccase by means of affinity chromatography. J. Korean. Tappi 29 (4), 7–17. **IF =0 punkty MNiSW= 3**
12. Jarosz–Wilkołazka A., **Jaszek M.**, Malarczyk E., Leonowicz A., Cho N.S. (2000) The role of laccase in a response of white–rot fungi to stres conditions. Proceedings of International Seminar ”New Horizon of Biosciences in Forest Products Fields”, Chungbuk National University Cheongju, Korea, 174–178. **IF = 0 punkty MNiSW=3**
13. Leonowicz A., Gianfreda L., Rogalski J., **Jaszek M.**, Luterek J., Wojtaś– Wasilewska M., Malarczyk E., Dawidowicz A., Fink–Boots M., Ginalska G., Cho N.S. (1997) Apperance of laccase in wood–rotting fungi and its inducibility. Journal of the Korean Wood Science and Technology (ISSN 1017–0715 ) 25, 29–36 **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
14. Cho N. S., Park J.M., Choi T.H, Matuszewska A., **Jaszek M.**, Grzywnowicz K., Malarczyk E., Trojanowski K., Leonowicz A. (1999) The effect of wood rotting fungi and laccase on destaining of dyes and KP bleaching effluent. Journal of the Korean Wood Science and Technology (ISSN 1017–0715) 4, 72–79. **IF = 0 punkty MNiSW = 3**
15. Luterek J., Gianfreda L., Wojtaś–Wasilewska M., Rogalski J., **Jaszek M.**, Malarczyk E., Dawidowicz A., Fink–Boots M., Ginalska G., Leonowicz A. (1997) Screening of wood–rotting fungi for laccase production. Acta Microbiologica Polonica 46, 297–312. **IF = 0 punkty MNiSW = 5**

Wyniki badań w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora stały się również treścią streszczeń zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (11) oraz krajowych (5).

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) moich prac, opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł: **2,46**

Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora zgodnie z rokiem opublikowania: **86 pkt.**

## **B) Przebieg mojej pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora oraz realizowane aktualnie zadania badawcze**

Wyniki uzyskane podczas badań dotyczących odpowiedzi grzybów *Trametes versicolor* i *Abortiporus biennis* na stymulację oksydacyjną zachęciły mnie do kontynuowania nurtu badań związanego z poszukiwaniem nowych układów doświadczalnych, mogących stworzyć realną możliwość ich praktycznego zastosowania. Moje zainteresowania badawcze z opisywanego okresu pracy naukowej można podzielić na kilka grup tematycznych:

1. Kontynuacja nurtu badań dotyczących stresu oksydacyjnego pod kątem zarówno dalszego poznania mechanizmów odpowiedzi na stres, jak i możliwości ich

biotechnologicznego wykorzystania. W ramach tego projektu rozszerzyłam obszar swoich poszukiwań, czego rezultatem było odkrycie innych gatunków grzybów w tym grzybów leczniczych tj.: *F. fomentarius*, *T. pubescens* czy *P. pini*, reagujących na ten rodzaj modyfikacji warunków wzrostu wyraźnymi zmianami zarówno w aktywnościach syntetyzowanych enzymów, jak i poziomie związków niskocząsteczkowych. Wyniki tych badań weszły w skład prac przedstawionych w osiągnięciu naukowym zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego.

2. Badanie odpowiedzi bakterii z rodzaju *R. leguminosarum* na stres oksydacyjny w zależności od różnic jakościowych i ilościowych zewnątrzkomórkowego egzopolisacharydu. Projekt, którego byłam kierownikiem, uzyskał dofinansowanie z grantu Prorektora UMCS d/s Badań Naukowych i Współpracy Międzynarodowej: „Wpływ genów *pssA* uczestniczących w syntezie egzopolisacharydu na zdolności adaptacyjne do stresu oksydacyjnego *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*”.
3. Badania szeroko pojętych procesów proteolizy prowadzonych przez grzyby białej zgnilizny drewna. Badania te są prowadzone zarówno w kontekście udziału procesów proteolitycznych w odpowiedzi stresowej, jak i regulacji aktywności proteaz (serynowych, aspartylowych, cysteinowych i metaloproteaz) przez ich naturalne inhibitory. Moje prace dotyczyły również poszukiwania, izolacji oraz charakterystyki naturalnych inhibitorów proteaz serynowych oraz aspartylowych, co miało bezpośredni związek z częściową opieką merytoryczną nad dwoma pracami doktorskimi realizowanymi w tym czasie w zespole badawczym, w którym pracuję. Do intensyfikacji syntezy enzymów proteolitycznych o właściwościach kolageno- i fibrynolitycznych wykorzystałam stres azotowy oraz odpady przemysłowe w postaci mączki mięsno-kostnej. Wyniki tych badań są obecnie w fazie przygotowania do publikacji. Prace te są kontynuowane w ramach moich aktualnych zainteresowań, dotyczących możliwości biotechnologicznego wykorzystania proteaz grzybowych oraz ich inhibitorów. W chwili obecnej są one na etapie poszukiwania nowych efektywnych źródeł tych czynników oraz oceny ich właściwości bioaktywnych w kierunku procesów nowotworzenia oraz hemostazy.
4. Określenie wzajemnych zależności regulacyjnych pomiędzy enzymami ligninolitycznymi takimi jak lakaza a enzymami proteolitycznymi w celu wyjaśnienia mechanizmów indukcji w zmieniających się warunkach wzrostu oraz potencjalnego zastosowania biotechnologicznego. Badania, których jestem współwykonawcą, są

obecnie realizowane również w oparciu o projekt finansowany przez NCN „Znaczenie lakazy *C. unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska” (2013/09/B/NZ9/01829). Wyniki doświadczeń dotyczących modyfikacji proteolitycznych lakazy z *C. unicolor* zostały opublikowane w 2015 roku.

5. Badanie możliwości stymulacji i regulacji potencjału biodegradacyjnego, a tym samym biotechnologicznego grzybów, przez zmieniające się warunki wzrostu namnażanych kultur, w tym modyfikację składu podłoży hodowlanych (przez zastosowanie jako suplementów odpadów przemysłu spożywczego tj. makuchy rzepakowe lub drzewnego – trociny) czy zmianę czynników fizycznych tj. barwa światła. Wyniki tych badań weszły częściowo w skład prac przedstawionych w osiągnięciu naukowym zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego. Część prac jest realizowana w ramach grantu finansowanego ze środków NCN (nr (2013/09/B/NZ9/01829). Badania dotyczące wpływu światła na metabolizm grzybów białej zgnilizny drewna zostały częściowo opublikowane. Projekt „ Wpływ światła na metabolizm *C. unicolor*” (nr 2014/15/B/NZ9/01990) dotyczący tego tematu, którego jestem współwykonawcą, uzyskał w bieżącym roku finansowanie z NCN i jest obecnie na etapie realizacji.
6. Poszukiwanie nowych preparatów grzybowych o unikatowych właściwościach bioaktywnych oraz podejmowanie prób wykazania ich potencjału aplikacyjnego (zastosowania biomedyczne lub przemysłowe). Badania te dotyczą trzech głównych grup związków bioaktywnych produkowanych przez grzyby: a) niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, b) glikoprotein oraz c) polisacharydów, w tym nanocząsteczek otrzymanywanych na ich bazie. Moja uwaga koncentruje się w dużej mierze na poszukiwaniu i oczyszczaniu nowych związków bioaktywnych, pochodzących z kultur grzybowych zmodyfikowanych przez działanie wybranych czynników fizycznych i chemicznych. Badania przeciwnowotworowe zostały poszerzone o komórki czerniaka (badania zrealizowane we współpracy z Zakładem Genetyki, Centrum Onkologii Instytut Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie, których wyniki są obecnie na etapie publikacji). Byłam głównym pomysłodawcą i obecnie uczestniczę w pracach dotyczących wykorzystania polisacharydów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego do stabilizacji aktywności enzymów lipolitycznych i ligninolitycznych. Część badań dotycząca dehydrogenazy celobiozowej jest realizowana obecnie w ramach projektu „Ocena potencjału antyoksydacyjnego i przeciw–drobnoustrojowego

grzybowej dehydrogenazy celobiozowej jako składnika opakowań aktywnych” (nr 2015/17/D/NZ9/02066), finansowanego ze środków NCN, którego jestem współwykonawcą. Współpraca z wymienionymi jednostkami Uniwersytetu Medycznego oraz Politechniki Lubelskiej stwarza realną szansę na kontynuację tych kierunków badań. Biorąc pod uwagę fakt, iż metabolity należące do jednej grupy związków zwykle różnią się pewnymi właściwościami, badania przesiewowe prowadzone są na dużej grupie grzybów białej zgnilizny drewna (w której występuje wyjątkowa ilość gatunków o uznanych właściwościach leczniczych). Część wyników tych badań stało się treścią opublikowanych prac i zgłoszeń patentowych.

Wyniki prac prowadzonych przeze mnie po obronie doktoratu zostały opublikowane w następujących artykułach naukowych:

1. Osińska–Jaroszuk M., Jaszek M., Sulej J., Stefaniuk D., Urbaniak M., Siwulski M., Janusz G. (2016) Complex biochemical analysis of fruiting bodies from newly isolated polish *Flammulina velutipes* strains. Polish Journal of Microbiology. 65 (3) 295–305. **IF = 0,93 punkty MNiSW = 15**
2. Prendecka M., Mlak R., **Jaszek M.**, Osińska–Jaroszuk M., Jakubiak–Hulicz M., Leibold C., Bieser A., Wójcik W., Małecka–Massalska T. (2016) Effect of exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* on the electrical properties of mouse fibroblast cells line L929 culture using an electric cell–substrate impedance sensing (ECIS) – Preliminary study. Annales of Agricultural and Environmental Medicine, Jun 2;23 (2) 280–284 **IF = 0,895 punkty MNiSW = 15**
3. Janusz G, Sulej J, **Jaszek M.**, Osińska–Jaroszuk M. (2016) Effect of different wavelengths of light on laccase, cellobiose dehydrogenase, and proteases produced by *Cerrena unicolor*, *Pycnoporus sanguineus* and *Phlebia lindtneri*. Acta Biochimica Polonica, Epub: No 2015 1235, 63. **IF = 1,182 punkty MNiSW = 15**
4. Szałapata K., Osińska–Jaroszuk M., Bryjak J., **Jaszek M.**, Jarosz–Wilkołazka A. (2016) Novel application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 33 (2) 251–260. **IF = 0,8 punkty MNiSW = 15**
5. Janusz G., **Jaszek M.**, Matuszewska A., Drączkowski P., Osińska–Jaroszuk M. (2015) Proteolytic modifications of laccase from *Cerrena unicolor*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 122, 330–338. **IF = 2,189 punkty MNiSW = 25**
6. Banczerz R., Osińska–Jaroszuk M., **Jaszek M.**, Janusz G., Stefaniuk D., Sulej J., Janczarek M., Jarosz–Wilkołazka A., Rogalski J. (2015) New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. Biotechnology and Applied Biochemistry, 63 (1) 67–76, doi: 10.1002/bab.1351. **IF = 1,429 punkty MNiSW = 20**
7. Osińska–Jaroszuk M., Jarosz–Wilkołazka A., Jaroszuk–Ściśel J., Szałapata K., Nowak A., **Jaszek M.**, Ozimek E., Majewska M. (2015) Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota:

- production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31 (12), 1823–1844. **IF = 1,532 punkty MNiSW = 20**
8. Osińska–Jarozuk M., **Jaszek M.**, Mizerska–Dudka M., Błachowicz A., Rejczak T.P., Janusz G., Wydrych J., Polak J., Jarosz–Wilkołazka A., Kandefer–Szerszeń M. (2014) Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, nr art. 743812. **IF = 1,579 punkty MNiSW = 30**
  9. **Jaszek M.**, Janczarek M., Kuczyński K., Piersiak T., Grzywnowicz K. (2013) The response of the *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii wild type and mutants defective in exopolysaccharide production to oxidative stress. *Plant and Soil Journal*, 376, 75–94. **IF = 2,952 punkty MNiSW = 45**
  10. Mazurkiewicz T., Matuszewski Ł., Matuszewska A., **Jaszek M.** (2013) Implanted bisphosphonates in bone cement affect bone markers in rat serum. *International Orthopaedics*, Volume 37(5), 969–974. **IF = 2,019 punkty MNiSW = 30**
  11. Matuszewski Ł., Matuszewska A., Polkowska I., **Jaszek M.**, Grąz M., Mazurkiewicz T., Gągała J. (2013) Determination of pamidronate in bisphosphonate–enriched cement implanted in rats by ion–pair HPLC and capillary electrophoresis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57 (2), 257–262. **IF = 0,365 punkty MNiSW = 20**
  12. Matuszewski Ł., Matuszewska A., **Jaszek M.**, Stefaniuk D., Grzywnowicz K., Mazurkiewicz T., Gągała J., Sivastava A. (2013) The presence of pamidronate in bone cement affects biochemical markers in rats serum. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58 (2) 295–299. **IF = 0,357 punkty MNiSW = 15**
  13. Grzywnowicz K., Ciołek A., Tabor A., Grzywnowicz K., Tabor A., **Jaszek M.** (2009) Profiles of body–surface proteolytic system of honey bee: proteases and their natural inhibitors during ontogenesis and seasonal changes of *Apis mellifera* casts. *Apidologie*, 40, 4–19. **IF = 1,493 punkty MNiSW = 24**
  14. Żuchowski J., **Jaszek M.**, Grzywnowicz K. (2009) Novel trypsin inhibitors from the white rot fungus *Abortiporus biennis*. Partial purification and characterization. *Biochemistry Moscow*, 74 (2) 226–230. **IF = 1,327 punkty MNiSW = 10**
  15. **Jaszek M.**, Grzywnowicz K., Malarczyk E., Leonowicz A. (2006) Enhancement of extracellular laccase activity as a response of white–rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat–caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 147–154. **IF = 1,189 punkty MNiSW = 20**
  16. Starosielec M., **Jaszek M.** (2013) The thin line between law, society and novel biotechnology. Application of enzymatic biosensors In medical diagnostics, ISBN 978–83–63768–32–4 (45–54). **IF = 0 punkty MNiSW = 4**
  17. Szałapata K., Osińska–Jarozuk M., Bryjak J., **Jaszek M.**, Jarosz–Wilkołazka A. (2015) Badania przesiewowe nośników do kowalencyjnej immobilizacji pepsyny, *Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej w Lublinie, praca zbiorowa pod redakcją Doroty Kołodyńskiej, ISBN 978–83–939465–4–9, 177–180. **IF = 0 punkty MNiSW = 4**

18. Maciąg K., Jaszek M. (2013) Nowoczesne materiały przyszłości pochodzące z przyrody: hydrofobiny i spidroiny. Selected issues from materials engineering, Politechnika Lubelska ISBN 978-83-63569-65-5 (43-54). **IF = 0 punkty MNiSW=4**
19. Dulemba J., Matuszewska A., Stefaniuk D., Jaszek M. (2013) Perspektywy wykorzystania proteaz cysteinowych i ich inhibitorów w biotechnologii i medycynie. Progress in medical sciences. 1, Politechnika Lubelska ISBN 978-83-63569-63-1 (75-95). **IF = 0 punkty MNiSW = 4**
20. Chilkwicz M., Jaszek M., Stefaniuk D., Matuszewska A. (2013) Proteazy serynowe i ich inhibitory jako nowoczesne narzędzia wykorzystywane w medycynie i biotechnologii. Progress in medical sciences. 1, Politechnika Lubelska, ISBN 978-83-63569-63-1 (98-120). **IF = 0 punkty MNiSW = 4**
21. Grzywnowicz K., Walczyński T., Jaszek M. (2011) Natural inhibitors of metalloproteinases from various families of MA clan from wood degrading fungi. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia Sectio DDD, vol. XXIV, N3, 24 (209-215). **IF = 0 punkty MNiSW = 7**
22. Grzywnowicz K., Bielak Z., Lewellyn K., Zjawiony J., Jaszek M., Predecka M. (2010) Mushrooms from genus *Clitocybe* and *Tricholoma* as potential new sources of CNS-active agent. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia Sectio DDD, Vol. XXIII, N 2 (47-50). **IF = 0 punkty MNiSW = 9**

**Najważniejsze rezultaty naukowe po uzyskaniu stopnia doktora niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. Identyfikacja, izolacja i charakterystyka naturalnych grzybowych inhibitorów proteaz.
2. Wykazanie możliwości proteolitycznej modyfikacji lakazy z *C. unicolor* przy wykorzystaniu proteaz komercyjnych, jako metody poprawy jej parametrów katalitycznych.
3. Wykrycie zależności regulacyjnych pomiędzy lakazą, a enzymami proteolitycznymi u grzybów rozkładających drewno oraz próba wyjaśnienia mechanizmów indukcji lakazy w zmiennych warunkach wzrostu (np. zmianie gatunku drzewa).
4. Wykazanie możliwości stabilizacji aktywności enzymów lipolitycznych przy użyciu polisacharydów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego.
5. Udowodnienie po raz pierwszy związku odpowiedzi bakterii *R. leguminosarum* na stres oksydacyjny z różnicami jakościowymi i ilościowymi zewnątrzkomórkowego egzopolisacharydu i wykazanie możliwości stymulacji oksydacyjnej syntezy enzymów takich jak pektynazy,  $\beta$ -glukozydaza, katalaza czy dysmutaza ponadtlenkowa.
6. Stwierdzenie wpływu barwy światła na dynamikę zmian aktywności proteaz syntetyzowanych przez grzyby *C. unicolor*, *P. sanguineus* i *Phlebia lindtneri*.



Wyniki badań w których uczestniczyłam po uzyskaniu stopnia doktora stały się również treścią streszczeń zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (15) oraz krajowych (10).

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) moich prac, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł: **20,238**

Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania: **355 pkt.**

***Podsumowanie całego dorobku (bez uwzględnienia prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym): IF = 22,698 (punkty MNiSW = 441)***

## **VI) Plany naukowe**

Moje przyszłe plany naukowe to kontynuacja obecnie realizowanych nurtów badawczych dotyczących:

a) proteolizy grzybowej w tym roli proteaz w regulacji aktywności lakazy i innych enzymów uczestniczących w procesach biodegradacyjnych w zmieniających się warunkach wzrostu grzybni,

b) izolacji, charakterystyki i badania możliwości zastosowania biomedycznego (np. w procesach hemostazy) nowych naturalnych grzybowych inhibitorów proteaz,

c) poszukiwania nowych źródeł, syntezy i zastosowania enzymów grzybowych takich jak lakaza, peroksydaza manganozależna, chitynaza, tanaza,  $\beta$  glukozydaza czy proteazy,

d) izolacji, charakterystyki i praktycznego zastosowania niskocząsteczkowych substancji grzybowych wraz z poszukiwaniem metod stymulacji syntezy tych czynników,

e) poszukiwania nowych możliwości biomedycznego i przemysłowego zastosowania wyizolowanych metabolitów grzybowych

f) badania możliwości wykorzystania polisacharydów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego do poprawy parametrów katalitycznych enzymów min lakazy i dehydrogenazy celobiozowej.

## VII. Podsumowanie aktywności naukowej

Dane bibliometryczne	IF <sup>a</sup>	Punkty MNiSW <sup>b</sup>
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego = <b>9 publikacji</b> Inne zawodowe prace twórcze (zgłoszenia patentowe) związane z osiągnięciem naukowym= <b>3 zgłoszenia</b>	<b>16,34</b>	<b>185</b>  <b>6</b>
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego): A) przed uzyskaniem stopnia doktora = <b>3 publikacje</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>15 publikacji</b>	<b>2,46</b>  <b>20,238</b>	<b>48</b>  <b>319</b>
Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR: A) przed uzyskaniem stopnia doktora = <b>12 publikacji</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>7 publikacji</b>		<b>38</b>  <b>36</b>
Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych: A) przed uzyskaniem stopnia doktora = <b>16</b> B) po uzyskaniu stopnia doktora = <b>25</b>	–	–
<b>Łączna liczba publikacji *</b> <b>Razem = 48</b>	<b>39,038</b>	<b>632</b>
<sup>a</sup> - IF zgodnie z rokiem opublikowania <sup>b</sup> - MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania *Wykaz wszystkich prac obejmujących mój dorobek naukowy przedstawiono w Załączniku nr 3		

Ocena bibliometryczna:	
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg <i>Web of Science</i> :	<b>125</b>
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg <i>Scopus</i> :	<b>155</b>
Indeks <i>Hirscha</i> bez autocytowań (wg <i>Web of Science</i> )	<b>6</b>
Indeks <i>Hirscha</i> bez autocytowań (wg <i>Scopus</i> )	<b>7</b>

*Magdalena Jaszek*