

**AUTOREFERAT**

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

**dr Anna Matuszewska**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2018

**SPIS TREŚCI:**

<b>I. IMIĘ I NAZWISKO.....</b>	<b>STR.3</b>
<b>II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE.....</b>	<b>STR.3</b>
<b>III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....</b>	<b>STR.3</b>
<b>IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</b>	<b>STR.4</b>
<b>A) TYTUŁ.....</b>	<b>STR.4</b>
<b>B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</b>	<b>STR.4</b>
<b>C) PATENTY WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</b>	<b>STR.5</b>
<b>D) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....</b>	<b>STR.6</b>
<b>CEL NAUKOWY WYBRANYCH PRAC .....</b>	<b>STR.6</b>
<b>WPROWADZENIE .....</b>	<b>STR.6</b>
<b>OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</b>	<b>STR.9</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>STR.21</b>
<b>PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH WYKORZYSTANIA.....</b>	<b>STR.22</b>
<b>E) INFORMACJE O INNYCH FORMACH DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ ZWIĄZANEJ Z OSIĄGNIĘCIEM ZGŁOSZONYM DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO.....</b>	<b>STR.24</b>
<b>V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....</b>	<b>STR.25</b>
<b>A) PRACA NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....</b>	<b>STR.25</b>
<b>B) PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE .....</b>	<b>STR.29</b>
<b>VI. PLANY NAUKOWE.....</b>	<b>STR.34</b>
<b>VII. PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ.....</b>	<b>STR.36</b>

**Dr Anna Matuszewska**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej

ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

anna.matuszewska@poczta.umcs.lublin.pl

tel.: (81) 537–50–17

## **AUTOREFERAT**

### **I. IMIĘ I NAZWISKO:**

**Anna Matuszewska**

### **II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE:**

**1996 r.** – tytuł magistra biologii uzyskany na podstawie pracy magisterskiej pt. „**Badanie aktywności wybranych oksydoreduktaz w środkowej idiofazie w kulturach *Trametes versicolor***” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza (ocena bardzo dobra), Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie

**2005 r.** – stopień doktora nauk biologicznych uzyskany na podstawie rozprawy pt. „**Wpływ mediatorów na degradację modelowych preparatów ligninowych przez *Trametes versicolor***”, ukończonej pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Rogalskiego, Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie

### **III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:**

**01.10.1996 – 30.09.2006** – asystent w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie – Sklodowskiej w Lublinie

**01.10.2006 – do chwili obecnej** – adiunkt w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie – Sklodowskiej 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 6 publikacji z lat 2013–2018 oraz 2 patentów. Tytuł zgłoszonego osiągnięcia to: „*Grzyby białej zgnilizny drewna jako narzędzie biomedyczne*”.

##### B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

1. **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, (**autor korespondencyjny**), **IF = 1,39**, punkty **MNiSW = 15**.
2. **Anna Matuszewska**, Magdalena Jaszek, Dawid Stefaniuk, Tomasz Ciszewski, Łukasz Matuszewski: Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. *PLOS ONE*, (2018), 13(6): e0197044, doi: 10.1371/journal.pone.0197044, (**autor korespondencyjny**), **IF = 2,806**, punkty **MNiSW = 40**.
3. Małgorzata Statkiewicz, **Anna Matuszewska**, Magdalena Jaszek, Grzegorz Janusz, Monika Osinska, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Michał Mikula, Jerzy Ostrowski: Anti-melanomic effect of high and low molecular weight bioactive sub-fractions isolated from white rot fungus: *Cerrena unicolor*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(7) (2017), 619–628 (**autor korespondencyjny**), **IF = 1,211**, punkty **MNiSW = 20**.

4. 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, **IF = 3,138**, punkty **MNiSW = 25**.
5. 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*, ID 497492 (2013), 1–11. (*Journal of Biomedicine and Biotechnology*), **IF = 2,706**, punkty **MNiSW = 30**.
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, **IF = 1,357**, punkty **MNiSW = 15**.

#### **C) PATENTY WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:**

1. **Patent Nr 225934**. 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, Marta Karp. (2013) **punkty MNiSW = 30**.
2. **Patent Nr 225869**. 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 = 30**.

**Sumaryczny Impact Factor – (IF)** ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **12,608**

**Suma punktów** za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **205**

#### **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 bioaktywnych preparatów otrzymywanych z grzybów białej zgnilizny drewna, charakterystyka biochemiczna oraz wykazanie ich potencjału biomedycznego. Zrealizowany plan doświadczalny miał doprowadzić do realizacji dwóch głównych założeń:

1. Odkrycie, izolacja i charakterystyka nowych grzybowych frakcji bioaktywnych o potencjalnym aplikacyjnym zastosowaniu biomedycznym. Element nowości dotyczył w opisywanych przykładach zarówno organizmu wybranego do badań, jak i rodzaju otrzymywanych i badanych preparatów bioaktywnych.
2. Przedstawienie możliwości zastosowania otrzymanych związków produkowanych przez wybrane gatunki grzybów białej zgnilizny drewna, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości bioaktywnych. Element nowości obejmował w tym przypadku zarówno rodzaj preparatu, jak i wskazanie możliwości jego zastosowania biomedycznego.

##### **WPROWADZENIE:**

Grzyby i ich zastosowanie w medycynie ma długą historię sięgającą ponad 2000 lat. Pierwsze gatunki znane z literatury opisywane jako lecznicze to *Laricifomes officinalis* w Europie i *Ganoderma lingzhi* w Chinach. [Capasso i wsp., 1998, Sękara i wsp., 2015]. W tradycyjnej medycynie chińskiej i ogólnie rozumianej medycynie ludowej grzyby, np. *Wolfiporia cocos* („fu ling”) były często wykorzystywane jako źródło substancji zapobiegających chorobom, takim jak różnego rodzaju stany zapalne, choroby skóry czy choroby nowotworowe lub po prostu jako zwiększające odporność. Rosnące w Europie zainteresowanie grzybami jako źródłem biologicznie aktywnych związków wynika przede wszystkim z ich unikatowych właściwości leczniczych oraz konieczności poszukiwania nowych strategii terapeutycznych [Rathee i wsp. 2012]. Związki bioaktywne charakterystyczne dla grzybów to przede wszystkim polisacharydy (np.  $\beta$ -glukany) i białka oraz metabolity wtórne, takie jak związki fenolowe, terpeny czy sterole. Stężenie i skuteczność związków bioaktywnych są zróżnicowane i zależą od rodzaju grzyba, podłoża,

warunków owocowania, stadium rozwoju, wieku świeżego grzyba, warunków przechowywania, czy zastosowanej procedury przygotowania preparatu [Guillamón i wsp. 2010]. Pomimo wzrastającego zainteresowania środowisk naukowych grzybami leczniczymi tylko około 20 gatunków jest obecnie w powszechnym użyciu klinicznym [Worthington i Rashid, 2009]. W tej grupie znajdują się zarówno gatunki jadalne między innymi: *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Tremella mesenterica* i *Hericium erinaceus* jak i niektóre niejadalne używane wyłącznie do celów leczniczych, w tym *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* lub *Trametes versicolor*. Wiele wyników badań wykazuje, że właściwości lecznicze wynikają z ich działania przeciwzapalnego, przeciwutleniającego, immunomodulującego, przeciwwirusowego, przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego, hepatoprotekcyjnego, przeciwnowotworowego, przeciwcukrzycowego i przeciwangiogenne [Elsayed i wsp. 2014, Xu i Beelman 2015].

Grzyby białej zgnilizny drewna, będące źródłem substancji biologicznych wykorzystywanych w prezentowanych badaniach, charakteryzują się dużą zawartością unikatowych metabolitów o niezliczonych właściwościach biochemicznych, oraz posiadaniem najbardziej wydajnego wśród organizmów żywych systemu biodegradacji kompleksu ligninocelulozowego. Mechanizmy związane z rozkładem kompleksu ligninocelulozowego oparte są przede wszystkim na działaniu enzymów ligninolitycznych, takich jak lakaza, peroksydaza manganozależna, czy peroksydaza ligninowa, hydrolitycznych, jak np. celulazy, hemicelulazy, proteazy czy antyoksydacyjnych, w tym katalazy i dysmutazy ponadtlenkowe [Leonowicz i wsp., 1999; Sanchez, 2009], czyli metabolity wtórne o wysokiej masie cząsteczkowej, do których zaliczane są również polisacharydy. W procesach związanych z degradacją ligninocelulozy niezmiernie istotną rolę odgrywają również substancje niskocząsteczkowe, takie jak kwasy organiczne, związki fenolowe, nieorganiczne jony metali czy reaktywne formy tlenu [Urzua i wsp., 1998; Hammel i wsp., 2002]. Wykazano, że wyizolowane z grzybów metabolity wtórne o niskiej masie cząsteczkowej mogą wpływać na takie procesy jak apoptoza, angiogeneza, przerzutowanie, regulacja cyklu komórkowego i kaskady przekazywania sygnałów [Gonindard i wsp., 1997]. Do tej pory udało się zidentyfikować wśród nich inhibitory: czynników transkrypcyjnych (NF- $\kappa$ B i AP-1), polimeraz, metylotransferaz i topoizomeraz DNA, metaloproteinaz, kinazy tyrozynowej, kinazy PCK $\beta$ , cyklooksygenazy 2, aromatazy, a także sulfatazy. Do grupy tej możemy zaliczyć również modulatory kinazy Cdc2, czynniki alkilujące DNA, a także substancje o działaniu antyangiogenym [Gonindard i wsp., 1997].

Duża różnorodność enzymów oraz substancji niskocząsteczkowych, jak również możliwość efektywnej standaryzacji hodowli grzybowych w warunkach laboratoryjnych spowodowały rosnące zainteresowanie i szerokie wykorzystanie tej grupy organizmów w procesach biotechnologicznych. Dobrym przykładem tego typu zastosowań jest wykorzystanie 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, przez co zasłużyły one na miano nowoczesnych narzędzi biotechnologicznych [Arora i Sharma, 2009].

Biorąc pod uwagę, iż moja praca naukowa od początku związana była z badaniem metabolizmu grzybów rozkładających kompleks ligninocelulozowy, oraz ze względu na bogactwo substancji wytwarzanych przez te grzyby, jak również ich ogromny potencjał biotechnologiczny postanowiłam wykorzystać te organizmy jako źródło preparatów bioaktywnych do zastosowania w medycynie. Ten kierunek badań jest ściśle związany z moimi zainteresowaniami medycznymi. W swoich badaniach bowiem zajmowałam się problematyką medyczną dotyczącą wpływu bisfosfonianów na metabolizm tkanki kostnej. Badania te prowadziłam przy współpracy z pracownikami naukowymi Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W trakcie tych badań opracowałam metodę identyfikacji wybranych bisfosfonianów za pomocą elektroforezy kapilarnej oraz HPLC. Badałam również zmiany poziomu markerów obrotu kostnego w surowicy zwierząt, którym wszczepiano implanty z cementu kostnego wzbogaconego pamidronianem, oraz uczestniczyłam w badaniach dotyczących właściwości biomechanicznych tak zmodyfikowanego cementu kostnego. Wszystkie wyniki uzyskane w trakcie tych badań okazały się na tyle obiecujące, iż obecnie po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej, cement kostny wzbogacony pamidronianem stosowny jest u ludzi. Badania zaś dotyczące wpływu pamidronianu uwalnianego z cementu kostnego na poziom markerów obrotu kostnego u człowieka są kontynuowane. Medyczne ukierunkowanie moich badań oraz doświadczenia związane z hodowlą grzybów i otrzymywaniem enzymów zaangażowanych w procesy degradacji drewna, takich jak np. lakaza, skłoniły mnie do sprawdzenia aktywności biologicznej tego enzymu związanej z ewentualnym działaniem przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym czy antyoksydacyjnym. Oprócz tego jednym z moich głównych założeń było znalezienie nowych nieenzymatycznych frakcji o potencjale biomedycznym. W związku z tym, iż podczas otrzymywania zewnątrzkomórkowej lakazy z płynu pohodowlanego, pozostają bardzo duże ilości frakcji niskocząsteczkowej, która jak dotąd nie była przedmiotem zainteresowania



szerokiego kręgu badaczy, a wręcz traktowana była jako zbędny produkt otrzymywany podczas preparatyki enzymatycznej, postanowiłam zbadać właściwości biochemiczne i biologiczne tej właśnie frakcji charakteryzującej się masą cząsteczkową poniżej 10 kDa.

Najbardziej obiecujące z punktu widzenia terapeutycznego wyniki otrzymałam dla preparatów z dwóch gatunków grzybów: *Pycnoporus sanguineus* i *Cerrena unicolor* zaprezentowanych w treści opisywanego osiągnięcia naukowego. Eksperymenty przedstawione w osiągnięciu prowadziłam na trzech grupach preparatów otrzymanych z wymienionych gatunków grzybów: niskocząsteczkowych metabolitach wtórnych (LMS – low molecular weight subfraction) z *C. unicolor* i *P. sanguineus*, lakazie oraz frakcji polisacharydów wewnątrzkomórkowych. W trakcie prowadzonych badań wskazałam możliwości ich potencjalnych zastosowań biomedycznych.

#### **OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:**

Substancje bioaktywne wytwarzane przez grzyby można podzielić na dwie główne grupy: związki o małej masie cząsteczkowej, np. terpenoidy, związki fenolowe czy kwasy organiczne i związki o wysokiej masie cząsteczkowej, np. polisacharydy i enzymy [Cheung, 2013]. Obie grupy związków wykazują aktywności biologiczne, takie jak działanie przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, immunostymulujące, przeciwmiażdżycowe, neuroprotekcyjne, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz hipoglikemiczne. Opierając się na tym podziale, do swoich badań, stanowiących treść prezentowanego osiągnięcia naukowego, wybrałam preparaty grzybowe należące do obu wymienionych grup związków, które dotąd nie były badane pod kątem ich właściwości bioaktywnych: niskocząsteczkowe metabolity wtórne (LMS – low molecular weight subfraction) z *C. unicolor* i *P. sanguineus*, lakazę (glikoproteinę) z *C. unicolor* (ex-LAC) oraz frakcję polisacharydów wewnątrzkomórkowych z *C. unicolor* (c-EPL).

W moich badaniach wykorzystałam dwa gatunki grzybów rozkładających drewno *C. unicolor*, gatunek będący źródłem wysokoaktywnej lakazy i innych enzymów uczestniczących w procesach biodegradacji jak i znacznych ilości niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, oraz *P. sanguineus*, będący źródłem substancji niskocząsteczkowych. Pierwszy etap badań dotyczył analizy właściwości biochemicznych, antyoksydacyjnych oraz przeciwbakteryjnych wybranych frakcji uzyskanych z grzyba *C. unicolor*. Gatunek ten syntetyzuje w warunkach laboratoryjnych duże ilości zewnątrzkomórkowej lakazy (EC 1.10.3.2) utleniającej związki fenolowe i aminy aromatyczne [Leonowicz, 1997], oraz

posiadającej inne interesujące właściwości biochemiczne, odróżniające ten enzym od pozostałych lakaz grzybowych [Janusz i wsp., 2015]. Uczestniczy ona również w procesie ligninolizy, czyli rozkładu ligniny. Współpracuje z peroksydazami, dioksygenazami, monooksygenazami i oksydazą glukozową czy dehydrogenazą celobiozową w procesach prowadzących do biodegradacji ligniny. Wielu badaczy uważa, że lakaza może utleniać ligninę bezpośrednio lub za pośrednictwem niskocząsteczkowych mediatorów, takich jak np. ABTS czy HBT [Breen i Singleton, 1999]. Bourbonnais i wsp. (1998) sugerują, że aktywność systemów lakaza – mediator wobec substratu, jakim jest lignina, zależy prawdopodobnie od kombinacji dwóch głównych czynników: potencjału redoks enzymu oraz stabilności i reaktywności rodników powstających przez utlenianie mediatora. Wszystko to powoduje, że lakaza jest enzymem o szerokim spektrum zastosowań w różnych procesach przemysłowych, m.in. w oczyszczaniu ścieków przemysłowych, w procesie bielenia masy celulozowej, czy zastosowanie enzymu jako sensora w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [Bourbonnais, 1997; Mayer, 2002]. Tak znaczący potencjał biotechnologiczny tego enzymu skłonił mnie do podjęcia badań dotyczących sprawdzenia również jego właściwości biologicznych. Jednocześnie postanowiłam zweryfikować właściwości związków o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa, które były dotąd traktowane jako zbędny produkt odpadowy otrzymywany przy preparatyce białkowej frakcji enzymatycznej, w tym lakazy. Do badań wykorzystałam również wewnątrzkomórkowe polisacharydy, ze względu na znane z literatury właściwości prozdrowotne tej grupy związków [Zhang, 2007].

W związku z tym, iż problemy związane z profilaktyką i leczeniem chorób nowotworowych są ważnym wyzwaniem dla współczesnej nauki i medycyny, a jednym z możliwych kierunków jest ciągle poszukiwanie nowych substancji bioaktywnych, w szczególności pochodzących ze źródeł naturalnych, postanowiłam sprawdzić, czy uzyskane z grzyba *C. unicolor* i niebadane jak dotąd pod tym kątem preparaty wykazują potencjał przeciwwirusowy, przeciwnowotworowy oraz immunostymulacyjny. Badania te mogłam przeprowadzić dzięki współpracy z pracownikami naukowymi Zakładu Wirusologii i Immunologii UMCS, Zakładu Hematoonkologii Doświadczalnej UM w Lublinie, Centrum Onkologii w Warszawie oraz Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej.

Przewlekła białaczka limfatyczna (CLL) jest najczęściej obserwowanym nowotworem hematologicznym występującym u osób dorosłych w krajach zachodnich. Pomimo faktu, że ostatnie lata doprowadziły do zwiększenia odsetka całkowitych remisji, CLL pozostaje nadal chorobą nieuleczalną. Stanowi ona prawie 30% wszystkich przypadków białaczki

udokumentowanych na całym świecie. CLL dotyka szczególnie osób starszych, ponieważ mediana wieku rozpoznania wynosi 72 lata, chociaż ostatnio odnotowano wzrost zachorowalności wśród młodszych pacjentów. Częstość występowania CLL wynosi 2-6 przypadków / 100 000 pacjentów / rok i wzrasta wraz z wiekiem. Ryzyko rozwoju nowotworu jest dwukrotnie większe u mężczyzn niż u kobiet. CLL jest zaburzeniem limfoproliferacyjnym, które może charakteryzować się gromadzeniem małych, homogennych, dojrzałych skupisk różnicowania (CD) 5+ CD19 + limfocytów B we krwi obwodowej, szpiku kostnym i wtórnych narządach limfatycznych [Ghia i wsp., 2007]. Przebieg kliniczny CLL jest zróżnicowany. Niektórzy pacjenci wykazują korzystny przebieg choroby ze stabilną lub wolno rosnącą limfocytozą, długą przeżywalnością i brakiem konieczności leczenia, podczas gdy inni pacjenci doświadczają agresywnego, postępującego przebiegu CLL, który wymaga natychmiastowej intensywnej terapii [Ghia i wsp., 2007]. Dlatego też postanowiłam zbadać aktywność cytotoksyczną lakazy wobec wybranych nowotworów krwi. Aktywność cytotoksyczną lakazy testowałam wobec linii komórkowych HL-60, Jurkat, RPMI 8226, K 562 oraz pierwotnych komórek przewlekłej białaczki limfocytarnej izolowanych z krwi pacjentów.

W wyniku przeprowadzonych badań obejmujących zarówno testy XTT jak i badania apoptozy techniką cytometrii przepływową i mikroskopii fluorescencyjnej oraz wizualizację powierzchni komórek nowotworowych techniką SEM stwierdziłam, że lakaza z *C. unicolor* wykazuje aktywność cytotoksyczną oraz proapoptotyczną wobec zastosowanych linii komórek nowotworowych. Wyniki testów XTT przeprowadzonych w niniejszym badaniu wskazały, iż cytotoksyczność indukowana przez lakazę w komórkach linii HL-60, K562, RPMI 8226, Jurkat i pierwotnych komórkach CLL zależna jest od stężenia enzymu. Wyniki ujawniły również, że zastosowana lakaza była w stanie hamować proliferację ludzkich linii białaczkowych w sposób zależny od stężenia, przy czym stężenia te były niższe niż opisywane dotąd w literaturze dla ekstraktów z innych gatunków grzybów rozkładających drewno [Lau i wsp., 2004]. Uzyskane wartości  $IC_{50}$  po 48 godzinach inkubacji z lakazą wynosiły odpowiednio 0,9, 0,4, 1,1 i 1,0  $\mu\text{g/ml}$  dla komórek HL-60, Jurkat, RPMI 8226 i K562. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz wizualizacji powierzchni komórek nowotworowych techniką SEM zaobserwowałam liczne zmiany morfologiczne w komórkach Jurkat i RPMI 8226 po 48 godzinach traktowania ich różnymi stężeniami lakazy. W przeciwieństwie do komórek kontrolnych, na które nie działałam lakazą, i które miały regularny, owalny kształt, komórki nowotworowe po 48 godzinach traktowania ich badanym

enzymem, charakteryzowały się zmniejszeniem objętości, pęcherzykowaniem błony i tworzeniem ciał apoptotycznych. Celem potwierdzenia apoptozy, komórki kontrolne oraz traktowane lakazą zostały wybarwione aneksyną V i jodkiem propidyny, a następnie wizualizowane pod mikroskopem fluorescencyjnym. W porównaniu z komórkami kontrolnymi komórki traktowane lakazą wykazywały zmiany apoptotyczne, w tym kondensację i fragmentację jąder komórkowych. W niniejszym badaniu, zaobserwowałam wskaźniki apoptotyczne w zakresie od 88,98 do 98,90% w komórkach Jurkat po 48 godzinach stosowania lakazy, podczas gdy opisywane w literaturze wskaźniki uzyskane w badaniach nowotworów krwi są zazwyczaj znacznie niższe (np. w zakresie 5,29 - 28,88% wg. Zhang i wsp., 2014).

Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały aktywność cytotoksyczną lakazy z *C. unicolor* wobec komórek nowotworowych krwi. W porównaniu z innymi związkami pochodzenia grzybowego, uzyskane wartości  $IC_{50}$  dla lakazy były znacznie mniejsze od opisywanych w literaturze, co wskazuje na wysoką aktywność przeciwnowotworową tego enzymu. Potwierdziłam również zdolność lakazy do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych nawet przy małym stężeniu enzymu, co może sugerować, że zastosowana w badaniach lakaza prawdopodobnie może być nowym środkiem terapeutycznym w leczeniu hematologicznych nowotworów złośliwych. Działanie przeciwnowotworowe LAC z *C. unicolor* stało się przedmiotem ochrony patentowej:

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 (Patent nr 225934)

Wyniki opisanych badań zostały 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 (autor korespondencyjny)

W kolejnych etapach badań postanowiłam sprawdzić aktywność biomedyczną niskocząsteczkowych frakcji wyizolowanych z hodowli *C. unicolor* wobec najczęściej

występującego nowotworu u kobiet, jakim jest rak piersi oraz dosyć częstego u mężczyzn raka prostaty. Rak piersi stanowi obecnie jeden z największych problemów epidemiologicznych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia stanowi on ponad 25% wszystkich nowotworów u kobiet. Leczenie jest wieloetapowe, obejmujące oprócz interwencji chirurgicznej chemioterapię, zaś przyszłość leczenia upatruje się w terapii celowanej, opartej na szeroko pojętej biotechnologii zakładającej ingerencję w procesy molekularne i biochemiczne na etapie komórkowym. Rak prostaty zaś jest złośliwym nowotworem układu moczowo-płciowego, który atakuje mężczyzn najczęściej powyżej 45 roku życia. Warunki anatomiczne i fizjologiczne prostaty sprzyjają rozwojowi raka i utrudniają jego leczenie, dlatego też stale poszukuje się nowych możliwości walki z tym nowotworem. W związku z tym jeden z etapów moich badań dotyczył działania przeciwnowotworowego wobec wyżej wymienionych nowotworów, antyoksydacyjnego i przeciwbakteryjnego bioaktywnych frakcji niskocząsteczkowych z *C. unicolor*. W tych badaniach frakcję zawierającą związki poniżej 10 kDa rozdzieliłam na dwie podfrakcje (o masach cząsteczkowych poniżej i powyżej 700 Da) - ex-LMSI i ex-LMSII. Dodatkowo tę samą wyjściową frakcję (poniżej 10 kDa) wytrąciłam stosując roztwór nasycony siarczanu amonu i poddałam dializie uzyskując trzecią podfrakcję związków niskocząsteczkowych - ex-LMSIII. Wszystkie trzy podfrakcje zostały scharakteryzowane biochemicznie pod kątem zawartości białka, substancji fenolowych oraz węglowodanów. Analiza ta ujawniła wyraźne różnice pomiędzy badanymi preparatami. Frakcja ex-LMSIII wykazała oczywiście większe stężenia białka (43,7 µg/ml) niż ex-LMSI (2,25 µg/ml) i ex-LMSII (4,87 µg/ml). Stężenie związków fenolowych było natomiast znacznie wyższe we frakcji ex-LMSI (20,56 µM) w porównaniu z ex-LMSII (4,45 µM) i ex-LMSIII (5,8 µM). Natomiast stężenie węglowodanów całkowitych było najwyższe we frakcji ex-LMSI, tj. 36,82 µg/ml. Analizowane podfrakcje wykazały w związku z tym również różnice w aktywności biologicznej. Frakcja ex-LMSIII charakteryzowała się najwyższą aktywnością zmiatania wolnych rodników potwierdzoną metodami z DPPH i ABTS, wśród wszystkich analizowanych podfrakcji. Wartości IC<sub>50</sub> wynosiły odpowiednio dla ex-LMSIII - 20,39, dla ex-LMSII - 49,22 i dla ex-LMSI - 64,1 µg/ml (dla metody z DPPH), oraz 81,12 µg/ml (ex-LMSI), 39,78 µg/ml (ex-LMSII) i 31,49 µg/ml (ex-LMSIII) dla metody z ABTS. W oparciu o porównanie wartości IC<sub>50</sub> ustaliłam, że kolejność aktywności wychwytywania rodników hydroksylowych była następująca: frakcja ex-LMSIII > frakcja ex-LMSII > frakcja ex-LMSI. Zazwyczaj silna aktywność antyoksydacyjna ekstraktów grzybowych jest skorelowana z wysoką zawartością związków fenolowych. Uzyskane wyniki wykazały jednak najsilniejszą

aktywność antyoksydacyjną podfrakcji ex-LMSIII, która miała znacznie mniejszą zawartość fenoli w porównaniu z podfrakcją ex-LMSI, co sugeruje, że fenole nie są głównym czynnikiem aktywności przeciwutleniającej analizowanych frakcji grzybowych. W związku z tym, iż wyniki poprzednich prac oraz dane literaturowe wskazują na potencjał przeciwbakteryjny substancji grzybowych w dalszej części badań sprawdziłam aktywność przeciwbakteryjną analizowanych preparatów. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zostało wykazane silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wszystkich podfrakcji wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *B. subtilis*) i Gram-ujemnych (*E. coli*). Uzyskane wartości strefy zahamowania wzrostu wykazały, że *S. aureus* był najbardziej wrażliwą bakterią, oraz że podfrakcja ex-LMSII była najskuteczniejsza w stosunku do wszystkich badanych mikroorganizmów. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi wykazującymi, że na ogół bakterie Gram-dodatnie są uważane za bardziej wrażliwe na różne naturalne i syntetyczne związki niż bakterie Gram-ujemne ze względu na różnice w strukturze ich ścian komórkowych. Rezultaty te potwierdziły uzyskane wartości MIC dla analizowanych frakcji ex-LMS. Wykazałam, że ex-LMSI i ex-LMSII wywierały większy efekt hamowania na *S. aureus* niż na *B. subtilis* i *E. coli*, a frakcja ex-LMSII była najefektywniejsza. Wartości MIC dla tej frakcji względem *B. subtilis*, *S. aureus* i *E. coli* wynosiły odpowiednio 12,5, 6,25 i 100 mg/ml. Wyniki te pokazały, że metabolity wtórne o małej masie cząsteczkowej pochodzące z płynu hodowlanego *C. unicolor*, zwłaszcza frakcja ex-LMSII, mogą być interesującym źródłem substancji przeciwbakteryjnych.

Tak scharakteryzowane frakcje wykorzystałam do sprawdzenia aktywności wobec komórek raka piersi (MCF7 - linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi i MDA-MB-231 - linia komórkowa potrójnie ujemnego gruczolakoraka piersi) oraz raka prostaty (linia komórkowa PC3). W tym celu linie ludzkich komórek nowotworowych: MCF7, MDA-MB-231 i PC3 były inkubowane z różnymi stężeniami badanych podfrakcji ex-LMSI, ex-LMSII, i ex-LMSIII. Potencjalnie cytotoksyczny wpływ badanych preparatów oceniłam za pomocą testu MTT. Wykazałam hamowanie żywotności wszystkich trzech linii komórek nowotworowych przy udziale podfrakcji ex-LMSI, ex-LMSII i ex-LMSIII, podczas gdy nie wpłynęły one na żywotność prawidłowych ludzkich fibroblastów. Uzyskane wyniki potwierdziły, że podfrakcja ex-LMSIII wykazuje najwyższą aktywność hamującą wobec komórek linii MDA-MB-231, PC3 i MCF7, a wartości IC<sub>50</sub> wynosiły odpowiednio 52,25 µg/ml, 60,66 µg/ml i 54,92 µg/ml. Najwyższy procent zahamowania uzyskałam przy stężeniu 300 µg/ml w stosunku do wszystkich badanych linii komórek nowotworowych, a frakcja ex-

LMSIII okazała się najskuteczniejsza. Procent hamowania powyżej 50 wobec linii nowotworowej MDA-MB-231 uzyskałam natomiast już przy stężeniu 15 µg/ml właśnie dla frakcji ex-LMSIII.

Pomimo niezaprzeczalnego postępu w leczeniu chorób nowotworowych oraz wprowadzania nowych chemioterapeutyków, współczesna medycyna nadal boryka się z problemem w pełni skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Konieczność poszukiwania nowych związków o efektywnym przeciwnowotworowym działaniu i niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych, sprzyja weryfikowaniu wielu różnorodnych chemicznie i strukturalnie związków, również naturalnych. Dlatego też opisane przeze mnie wyniki badań wydają się być bardzo obiecujące w kontekście naturalnych substancji pochodzenia grzybowego o działaniu przeciwnowotworowym.

Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

**Anna Matuszewska**, Magdalena Jaszek, Dawid Stefaniuk, Tomasz Ciszewski, Łukasz Matuszewski: Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. PLOS ONE, 2018; 13(6): e0197044, doi: 10.1371/journal.pone.0197044 (**autor korespondencyjny**)

Wykazany w poprzednich doświadczeniach bioaktywny potencjał gatunku *C. unicolor*, skłonił mnie do rozszerzenia badań o kolejne linie nowotworowe, oraz zwrócenia uwagi na wartość terapeutyczną wybranych frakcji wysoko- i niskocząsteczkowych otrzymanych z podłoża pochodowlanego tego gatunku białej zgnilizny drewna. W trakcie przeprowadzonych doświadczeń zbadalam więc wpływ tych substancji na jeden z najbardziej złośliwych nowotworów występujących u ludzi, jakim jest czerniak wywodzący się z melanocytów. Leczeniem z wyboru jest oczywiście zabieg chirurgiczny, ale duża część pacjentów cierpi niestety na nieoperacyjną lub wielogniskową postać choroby, leczoną m.in. inhibitorami BRAF. Ze względu jednak na niską skuteczność stosowanych metod leczenia i wysoką śmiertelność pacjentów, ciągle prowadzi się intensywne prace związane z opracowaniem nowych strategii terapeutycznych, oraz wyodrębnieniem efektywnych środków hamujących rozrost nowotworowy. Wiele z tych substancji jest pochodzenia naturalnego, jak np. taksol. Postanowiłam więc sprawdzić aktywność substancji grzybowych wobec linii komórkowej mysiego czerniaka B16-F10.

W badaniach zostały wykorzystane metody z użyciem testów MTT, z fioletem krystalicznym, oraz test zdolności formowania kolonii *in vitro* jak i obserwacje mikroskopowe w celu zbadania właściwości cytotoksycznych i antyproliferacyjnych zastosowanych frakcji z *C. unicolor*. Na podstawie przeprowadzonych testów (MTT i z fioletem krystalicznym) wykazałam, że zarówno lakaza jak i frakcja niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych ma wpływ na proliferację mysich komórek nowotworowych już po 24 godzinach inkubacji. W przypadku ex-LMS (1%) spadek żywotności komórek wynosił około 42% (test MTT) i 26% (test z fioletem krystalicznym). Oceniona została również zdolność formowania kolonii *in vitro* (PE) i frakcję przeżywającą (SF), tj. dwa czynniki, które oszacowały populację komórek, które przeżyły inkubację z testowanymi czynnikami. Obliczono została również liczbę kolonii pochodzących z pojedynczych komórek po 7 dniach od zaszczepienia. 50-krotnie niższe stężenie lakazy niż stężenie, które było zastosowane w testach MTT i z fioletem krystalicznym całkowicie zatrzymywało proliferację komórek B16-F10. W przypadku ex-LMS kolonie były liczniejsze, ale znacznie mniejsze, a przy stężeniu 0,125% (8-krotnie niższym niż zastosowane we wcześniejszych testach) potencjał komórek do tworzenia kolonii wynosił około 60%, a większość tych kolonii składała się ze zmniejszonej liczby komórek. Liczba komórek traktowanych LAC i ex-LMS analizowana była również przy użyciu mikroskopu, wykazując istotne różnice między komórkami kontrolnymi i traktowanymi badanymi preparatami. Przy niższych stężeniach hamowanie proliferacji komórek było widoczne, natomiast efekt cytotoksyczny obserwowałam przy wyższych stężeniach. Nie odnotowałam natomiast znaczącej zmiany liczby komórek nowotworowych po ekspozycji na wewnątrzkomórkowy polisacharyd z *C. unicolor*, zarówno w obserwacjach mikroskopowych, jak i przy użyciu zastosowanych testów, co jest zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują polisacharydy jako czynniki immunomodulujące. Dlatego też została sprawdzona aktywność immunomodulacyjna zastosowanych polisacharydów i w ten sposób potwierdziłam, iż stymulowały one nadekspresję cytokin w linii komórkowej m-IMCD3, co jest bardzo obiecującym wynikiem, ponieważ w leczeniu chorób nowotworowych cytokiny stosowane są jako wzmacniacze odporności. Cytokiny, takie jak np. IL-2 czy INF $\alpha$  są zatwierdzone przez FDA m.in. w leczeniu czerniaka, chłoniaka, białaczki i mięsaka Kaposiego. W przeprowadzonych badaniach wykazałam zwiększoną ekspresję jednego receptora Toll-podobnego: Tlr2 (1,6 razy) i cytokin: TNF $\alpha$  (15,3 razy), CCL2 (4,7 razy), IL-1 $\alpha$  (1,4 razy) i IL-6 (1,8 razy). Cytokiny te mają wpływ na proliferację, różnicowanie i aktywację komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną po kontakcie z antygenami.



Na podstawie przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykazałam, że dwie bioaktywne frakcje z *C. unicolor*, tj. frakcja o małej masie cząsteczkowej (ex-LMS) i oksydaza polifenolowa (LAC) mają właściwości antyproliferacyjne wobec mysich komórek czerniaka B16-F10. Ponadto, trzecia badana frakcja c-EPL wykazała aktywność immunomodulacyjną, bardzo pożądaną w leczeniu niektórych rodzajów nowotworów.

Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w następującej pracy naukowej:

Małgorzata Statkiewicz, **Anna Matuszewska**, Magdalena Jaszek, Grzegorz Janusz, Monika Osinska, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Michał Mikula, Jerzy Ostrowski: Anti-melanomic effect of high and low molecular weight bioactive sub-fractions isolated from white rot fungus: *Cerrena unicolor*. International Journal of Medicinal Mushrooms, 19(7) (2017), 619–628 (**autor korespondencyjny**)

Co roku na świecie, na raka szyjki macicy zapada około 500 000 kobiet. W Europie, co 18 minut z powodu raka szyjki macicy umiera kolejna kobieta. W Polsce co roku około 3 500 Polek dowiaduje się, że ma raka szyjki macicy, a połowa z nich niestety umiera. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym rozwoju zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy jest zakażenie HPV. Jednak proces powstawania nowotworów w nabłonku szyjki macicy nie zawsze wiąże się z zakażeniem HPV. W tych przypadkach mechanizmy kancerogenezy mogą obejmować, między innymi, mutacje genów białka p53 i pRb, aberracje chromosomowe i zwiększoną aktywność telomerazy [Wrede i wsp., 1991; Mitsuhashi i wsp., 1998]. Poszukiwanie nowych alternatywnych metod zapobiegania i leczenia tej choroby jest szczególnie ważne zarówno ze względów społecznych, jak i ekonomicznych. Rosnące zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego tego typu rozwiązaniami terapeutycznymi stymuluje poszukiwanie nowych bioaktywnych środków naturalnego pochodzenia. Dlatego też moje badania skupiły się również na tym typie nowotworu. W celu określenia aktywności przeciwnowotworowej analizowanych frakcji, zbadalam ich bezpośrednią cytotoksyczność i właściwości antyproliferacyjne. W badaniach zostały wykorzystane linie komórkowe raka szyjki macicy pierwotne SiHa (ATCC, HTB–35) oraz przerzutowe CaSki (ATCC, CRL 1550). Zastosowaną linią kontrolną były ludzkie fibroblasty (HSF). W przypadku lakazy jej wpływ na komórki nowotworowe był uzależniony od stężenia, podczas gdy frakcja niskocząsteczkowych metabolitów była cytotoksyczna tylko w najwyższym zastosowanym stężeniu. Ponadto wyniki wskazały, że tylko lakaza przy stężeniu 250 µg/ml wykazywała statystycznie istotną cytotoksyczność wobec komórek raka szyjki macicy (SiHa i CaSki)

w porównaniu z normalnymi fibroblastami (HSF). Wyniki te zostały potwierdzone obserwacjami mikroskopowymi, które wykazały, że zastosowana lakaza wpływa tylko na komórki nowotworowe nie uszkodzając prawidłowych komórek fibroblastów. Efekt cytotoksyczny lakazy prawdopodobnie związany jest z jej aktywnością prooksydacyjną, która została wykazana we wcześniejszych badaniach. Liczne publikacje donoszą o wpływie związków grzybowych, w tym lakazy i polisacharydów, izolowanych z różnych gatunków na proliferację komórek nowotworowych. Do tej pory *C. unicolor* była nieprzebadana w tym zakresie i dlatego sprawdziłam również jej wpływ na proliferację. Wyniki pokazały, że w sposób zależny od dawki, lakaza hamuje proliferację obu linii komórek nowotworowych (SiHa i CaSki) z wartościami  $IC_{50}$ : SiHa 2,6  $\mu\text{g/ml}$  i CaSki 6,0  $\mu\text{g/ml}$ . Otrzymane wyniki po raz kolejny wskazały, że *C. unicolor* jest bogatym źródłem czynników przeciwnowotworowych, które działają bezpośrednio przeciwko komórkom nowotworowym poprzez wpływ na proliferację, a dodatkowo zmniejszają ich żywotność. Z drugiej strony wykazałam również, że endopolisacharydy z *C. unicolor* nie wpływały na żywotność komórek nowotworowych oraz prawidłowych, co potwierdza obserwacje innych autorów sugerujące, że są to raczej czynniki niecytotoksyczne, ale immunomodulujące. Dlatego też, wykorzystując makrofagi wyprowadzone z linii THP-1, które syntetyzowały IL-6 i TNF- $\alpha$ , zbadany został efekt immunomodulacyjny. Przeprowadzone badania wykazały działanie immunostymulacyjne frakcji c-EPL, której dodatek stymulował wytwarzanie TNF- $\alpha$  (powyżej 2000 pg/ml) oraz IL-6 (powyżej 400 pg/ml). Ponadto linie komórkowe SiHa oraz L929 (fibroblasty mysie, ATCC, CCL-1) wykorzystałam do namnażania wirusów HHV-1 (wirus opryszczki) oraz EMCV (wirus zapalenia mózgu). Przeprowadzone badania wykazały po raz pierwszy efekt antywirusowy ex-LAC zarówno wobec HHV-1, jak i EMCV. Działanie lakazy uzależnione było od rodzaju wirusa i jego stadium replikacyjnego. Lakaza silniej działała wobec wirusa HHV-1 niż wobec wirusa EMCV. Ponieważ aktywność przeciwnowotworowa substancji pochodzących z grzybów często powiązana jest z ich aktywnością immunomodulacyjną wykorzystując makrofagi wyprowadzone z linii THP-1, które syntetyzowały IL-6 i TNF- $\alpha$  zbadalam również ten efekt. Przeprowadzone badania wykazały działanie immunomodulacyjne frakcji c-EPL, której dodatek stymulował wytwarzanie TNF- $\alpha$  (powyżej 2000 pg/ml) oraz IL-6 (powyżej 400 pg/ml).

Ponieważ jak dotąd nie było danych dotyczących właściwości przeciwnowotworowych związków wyizolowanych z grzyba *C. unicolor*, a przedstawione wyniki wskazały po raz pierwszy, że lakaza z tego gatunku ma działanie cytotoksyczne

wobec komórek raka szyjki macicy, jej efekt przeciwnowotworowy stał się przedmiotem ochrony patentowej:

**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 (**Patent Nr 225869**)

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.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazałam, że otrzymane z *C. unicolor* preparaty charakteryzują się szeregiem unikalnych właściwości biologicznych. Przeprowadzona analiza chemiluminescencyjna wykazała wysoki potencjał prooksydacyjny frakcji ex–LAC oraz potencjał antyoksydacyjny frakcji ex–LMS oraz c–EPL. Oszacowanie toksyczności ex-LAC przy użyciu systemu Microtox wykazało, że ekspozycja *Vibrio fischeri* na ex-LAC powodowała 38% uszkodzenie komórek po 5 min i 51% po 15 minutach działania tego enzymu. Ex-LAC okazała się również skuteczna wobec bakterii *Escherichia coli*. Eksperymenty dotyczące frakcji polisacharydów wewnątrzkomórkowych z *C. unicolor* wykazały wysoki potencjał antyoksydacyjny porównywalny z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi polisacharydów ekstrahowanych gorącą wodą z gatunków *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Lentinus edodes* i *Trametes versicolor* [Kozarski, 2011]. Preparat c-EPL wykazał również działanie przeciwbakteryjne przeciwko *Staphylococcus aureus*. Analiza widma FT-IR frakcji ex–LMS wskazała na obecność substancji homologicznych w 54,22% z siarczanem paromycyny, tj. związkiem będącym pochodną antybiotyków aminoglikozydowych. Analizy aktywności antyoksydacyjnej frakcji ex-LMS przeprowadzone trzema metodami (chemiluminescencyjną, z ABTS oraz z DPPH) wykazały zdolność tej frakcji do zmiatania wolnych rodników na tym samym poziomie lub

nawet wyższym w porównaniu z modelowymi substancjami antyoksydacyjnymi, troloksenem i kwasem askorbinowym. Badanie toksycznego działania ex-LMS na komórki bakteryjne na podstawie testu toksyczności wykazało, że ekspozycja bakterii *V. fischeri* na frakcję ex-LMS spowodowała 95% uszkodzenie komórek po 5 min i 98% po 15 minutach od dodania preparatu. Uzyskane wyniki wykazały, że ex-LMS był znacznie bardziej skuteczny niż frakcja ex-LAC w działaniu bakteriobójczym. Frakcja ex-LMS wykazała aktywność przeciwbakteryjną przeciwko *E. coli* i *S. aureus*, co może być związane z faktem, że analiza FT-IR wykazała obecność pochodnych, podobnych do znanych antybiotyków aminoglikozydowych, w badanej frakcji.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy wskazały na bardzo wysoki potencjał zmiatania wolnych rodników przez preparaty otrzymane z *C. unicolor*, takie jak endopolisacharydy i zewnątrzkomórkowe związki o niskiej masie cząsteczkowej. Wydaje się, że substancje te mogą potencjalnie zostać wykorzystane jako nowe źródło skutecznych przeciwutleniaczy, które można łatwo wytwarzać w kontrolowanych warunkach tak w skali laboratoryjnych jak i przemysłowej. 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)

Biorąc pod uwagę zachęcające, aplikacyjne wyniki uzyskane dla frakcji niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych wyizolowanych z *C. unicolor* postanowiłam sprawdzić właściwości tej grupy związków z innego gatunku grzyba, a mianowicie z grzyba leczniczego *P. sanguineus*. Gatunek ten należy do grzybów białej zgnilizny drewna podobnie jak *C. unicolor* i wytwarza szeroką gamę produktów metabolizmu wtórego w postaci enzymów, antybiotyków i barwników. *P. sanguineus* jest stosowany jako gatunek leczniczy w Australii, Kongo, Chinach i Meksyku, a także jako produkt spożywczy w Brazylii, Malawi i Papui Nowej Gwinei. Stosowany jest w leczeniu różnych chorób żołądkowo-jelitowych i zmian skórnych, używany jest jako preparat hamujący krwawienie, oraz jako lek przeciwreumatyczny i środek tonizujący. *P. sanguineus* znany jest jako nadproducent różnego rodzaju pigmentów zidentyfikowanych jako związki fenoksazynewe, w tym przeciwbakteryjnej cynnabaryny [Smânia i wsp., 2003].

Otrzymane z tego gatunku frakcje przebadalam w kierunku ich właściwości bioaktywnych. Wyzaczyłam również parametry hodowli, sprzyjające uzyskaniu najbardziej efektywnych preparatów bioaktywnych. Okazało się, iż podniesienie temperatury hodowli z 25°C (ex-LMSa) do 30°C (ex-LMSb) powoduje wzrost zarówno właściwości antyoksydacyjnych, jak i przeciwbakteryjnych analizowanych frakcji, które różniły się również pod względem biochemicznym. Przeprowadzone analizy wykazały, iż frakcja ex-LMSb charakteryzowała się dwukrotnie wyższym stężeniem białka oraz znacząco wyższym stężeniem związków fenolowych w porównaniu z frakcją ex-LMSa. Analizy FT-IR wykazały różnice w rodzaju wiązań chemicznych występujących w obu frakcjach i obecność substancji o charakterze związków aminoglikozydowych. Dla frakcji ex-LMSa odnotowałam 56,35% homologii do paromycyny, a w ex-LMSb 46,85% homologii do dihydrostreptomycyny. Zmiana temperatury podczas hodowli powodowała wzrost potencjału antyoksydacyjnego oraz bakteriostatycznego analizowanych preparatów. Analiza mikroskopowa techniką SEM komórek *Staphylococcus aureus* poddanych działaniu otrzymanych frakcji wykazała zmiany morfologiczne w komórkach bakteryjnych, przy czym zmiany destrukcyjne w komórkach bakterii były bardziej nasilone po zastosowaniu preparatu otrzymanego z hodowli prowadzonej w wyższej temperaturze. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły potencjał bioaktywny frakcji niskocząsteczkowych otrzymanych z kultur grzyba białej zgnilizny drewna *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.

#### LITERATURA:

1. Capasso, L. (1998) *Lancet*, 352 (9143), 1864.
2. Sękara, A., Kalisz, A., Grabowska, A. and Siwulski, M. (2015) *Sydowia*, 67, 1-10.
3. Rathee S, Rathee D, Rathee D et al. (2012) *Braz J Pharmacog* 22 (2), 459–474.
4. Guillamón S, García-Lafuente A, Lozano M. et al. (2010) *Fitoterapia*. 81(7), 715–723. doi:10.1016/j.fitote.2010.06.005
5. Worthington J., Rashid S. (2009) The therapeutic potential of mushroom extracts. In *Natural Products as Future Medicinal Agents*. Old City Publishing Inc., USA.
6. Elsayed EA., Enshasy HE., Wadaan MAM. et al. (2014) *Mediat Inflamm*. 1, 1–15.

7. Xu T., Beelman RB. (2015) *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 1(2), 62–65.
8. Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., et al (1999) *Fungal Genetics and Biology* 27, 175–185.
9. Sanchez C., (2009) *Biotechnology Advances* 27, 185–194.
10. Gonindard C., Bergonzi C., Denier C. et al. (1997) *Cell Biology and Toxicology* 13, 141-153.
11. Urzua U., Kersten PJ., Vicuna R., (1998) *Applied of Environmental Microbiology* 64, 68–73.
12. Arora DS., Sharma RK. (2009) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 1760–1788.
13. Cheung PCK. (2013) *Food Sci. Human Wellness* 2,162–166.
14. Leonowicz A., Gianfreda L., Rogalski J., Jaszek M., et al. (1997), *Proc. Int. Sem. for Sci.*, 15-34.
15. Janusz G., Jaszek M., Matuszewska A., Drączkowski P., Osińska-Jaroszuk M. (2015) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 122, 330–338.
16. Breen A., Singleton FL. (1999) *Curr. Op. Biotechnol.* 10, 252-258.
17. Bourbonnais R. Leech D., Paice M.G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1379, 381-390.
18. Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4627-4632.
19. Mayer AM., Staples RC. (2002), *Phytochemistry* 60, 551-565.
20. Zhang M., Cui SW., Cheung PCK., Wang Q. (2007) *Trends in Food Science and Technology* 18, 1, 4–19.
21. Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Jakovljevic D., Helsper JPEG., van Griensven JLD. (2011) *Food Chemistry* 129, 4, 1667–1675.
22. Lau CB., Ho CY., Kim CF., Leung KN., et al. (2004) *Life Sci* 75, 797-808.
23. Zhang Y., Liu Z., Ng TB., Chen Z., Qiao W., Liu F. (2014) *Biochimie* 99, 28-37.
24. Ghia P., Ferreri AM., Caligaris-Cappio F. (2007) *Crit Rev Oncol Hematol* 64, 234-246, 2.
25. Wrede D. et al. (1991) *Molecular Carcinogenesis*, 4(3), 171-175.
26. Mitsuhashi A. et al. (1998) *Gynecologic Oncology*, 70(3), 339-347.
27. Smânia A., Marques CJS., Smânia EFA., et al. (2003) *Phytother Res.* 17,1069–72.

## PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH TREŚĆ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM ORAZ OMÓWIENIE EWENTUALNEGO ICH WYKORZYSTANIA:

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

1. Wykazano po raz pierwszy działanie cytotoksyczne, oraz proapoptotyczne zewnątrzkomórkowej lakazy z *C. unicolor* wobec linii komórkowych nowotworów krwi, takich jak HL–60, Jurkat, RPMI 8226, K 562 oraz pierwotnych komórek przewlekłej białaczki limfocytarnej izolowanych z krwi pacjentów. W porównaniu z innymi związkami pochodzenia grzybowego, uzyskane wartości IC<sub>50</sub> dla lakazy były

znacznie mniejsze od opisywanych w literaturze, co wskazuje na wysoką aktywność przeciwnowotworową tego enzymu. Analiza mikroskopowa wykazała, iż w porównaniu z komórkami kontrolnymi komórki traktowane lakazą miały wyraźne zmiany apoptotyczne, w tym kondensację i fragmentację jąder komórkowych. Wyniki zaprezentowanych badań okazały się na tyle interesujące, iż zostały objęte ochroną patentową (**Patent Nr 225934**).

2. W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykazano, że produkt otrzymywany podczas preparatyki enzymów otrzymywanych z *C. unicolor* zawierający metabolity wtórne o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa może być bogatym źródłem naturalnych substancji przeciwnowotworowych, antyoksydacyjnych i przeciwbakteryjnych. Wykazano, że trzy niskocząsteczkowe frakcje metabolitów wtórnych z *C. unicolor* wykazują aktywność wobec najczęściej występującego nowotworu u kobiet, jakim jest rak piersi (MCF7 i MDA-MB-231) oraz dosyć często występującego u mężczyzn raka prostaty (linia komórkowa PC3). Najwyższy procent zahamowania żywotności komórek nowotworowych odnotowany był przy stężeniu 300 µg/ml w stosunku do wszystkich badanych linii, a frakcja ex-LMSIII okazała się najskuteczniejsza. Procent hamowania powyżej 50 wobec linii nowotworowej MDA-MB-231 uzyskano już przy stężeniu 15 µg/ml właśnie dla frakcji ex-LMSIII.
3. Po raz pierwszy wykazano, że dwie bioaktywne frakcje z *C. unicolor*, tj. frakcja o małej masie cząsteczkowej (ex-LMS) i oksydaza polifenolowa (LAC) mają właściwości antyproliferacyjne wobec mysich komórek czerniaka B16-F10. Ponadto stwierdzono, że frakcja wewnątrzkomórkowych polisacharydów wykazuje aktywność immunomodulacyjną, bardzo pożądaną w leczeniu niektórych rodzajów nowotworów. Wykazano zwiększoną ekspresję jednego receptora Toll-podobnego: Tlr2 (1,6 razy) i wybranych cytokin: TNF $\alpha$  (15,3 razy), CCL2 (4,7 razy), IL-1 $\alpha$  (1,4 razy) i IL-6 (1,8 razy), które mają wpływ na proliferację, różnicowanie i aktywację komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną po kontakcie z antygenami.
4. Po raz pierwszy opisano aktywność przeciwwirusową zewnątrzkomórkowej lakazy z *C. unicolor* (wobec wirusów HHV-1 i EMCV), cytotoksyczną i antyproliferacyjną (wobec komórek raka szyjki macicy). Działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne na komórki raka szyjki macicy w porównaniu do zdrowych komórek fibroblastów (HSF) było na tyle istotne statystycznie, iż stało się przedmiotem patentu (**Patent Nr225869**). Działanie cytotoksyczne wykazała również frakcja niskocząsteczkowych

metabolitów wtórnych, ale tylko przy najwyższych zastosowanych stężeniach. Frakcja polisacharydów z grzybni *C. unicolor* miała wyraźne działanie immunostymulacyjne (zwiększenie syntezy TNF $\alpha$  i IL-6 przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1).

5. Po raz pierwszy scharakteryzowano trzy nowe preparaty bioaktywne wyizolowane z kultur grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*: 1) zewnątrzkomórkową lakazę, 2) frakcję niskocząsteczkowych, zewnątrzkomórkowych, metabolitów wtórnych – ex-LMS i 3) wewnątrzkomórkowe polisacharydy. Wymienione preparaty wykazały potencjał prooksydacyjny (zewnątrzkomórkowa lakaza), antyoksydacyjny (ex-LMS i wewnątrzkomórkowe polisacharydy) oraz bakteriostatyczny. Lakaza okazała się skuteczna wobec bakterii *Escherichia coli*, a wewnątrzkomórkowe polisacharydy wobec *Staphylococcus aureus*. zaś frakcja ex-LMS działała bakteriostatycznie zarówno wobec komórek *E. coli* jak i *S. aureus* i wykazała również najwyższy potencjał antyoksydacyjny (EC<sub>50</sub> wobec ABTS = 25  $\mu$ g/ml).
6. Wyizolowano preparaty niskocząsteczkowe (ex-LMS) z z płynów pochodzących kultur *P. sanguineus* namnażanych w dwóch temperaturach 25°C (ex-LMSa) i 30°C (ex-LMSb). Zmiana warunków wzrostu grzyba powodowała wyraźny wzrost właściwościach bioaktywnych (antyoksydacyjnych i przeciwbakteryjnych) badanych preparatów. Niskocząsteczkowa frakcja ex-LMSb wykazywała znacznie efektywniejsze działanie antyoksydacyjne oraz przeciwbakteryjne. Przeprowadzona również analiza FT-IR wskazała na różnice w składzie chemicznym analizowanych frakcji, tj. obecność związków o strukturze zbliżonej do paromycyny we frakcji ex-LMSa oraz dihydrostreptomycyny w ex-LMSb.

## **E) INFORMACJE O INNYCH FORMACH DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ ZWIĄZANEJ Z OSIĄGNIĘCIEM ZGŁOSZONYM DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO**

### **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) Oddział Onkologii Klinicznej**, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli w Lublinie

**d) Katedra Genetyki**, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie

## **V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH**

### **A) PRACA NAUKOWA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA**

Pracę naukową rozpoczęłam w 1996 roku w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza. Od początku mojej kariery zawodowej byłam zaangażowana w realizowany w obrębie zespołu badawczego nurt szeroko pojętej biotechnologii grzybów, w tym szczególnie grzybów należących do Basidiomycota. Moje dalsze prace naukowe związane były głównie z projektami dotyczącymi enzymatycznej degradacji kompleksu ligninocelulozowego efektywnie prowadzonej przez grzyby białej zgnilizny drewna. Szczególnie zainteresowana byłam udziałem w tych procesach lakazy – oksydazy polifenolowej, będącej ważnym biokatalizatorem wydzielanym do podłoża przez wiele gatunków grzybów wyższych rozkładających drewno, peroksydaz niezbędnych w procesach degradacji drewna, a przede wszystkim niskocząsteczkowych mediatorów enzymów ligninolitycznych. W pierwszych latach moje prace dotyczyły degradacji ligniny oraz odbarwiania barwników przez niektóre gatunki grzybów. Zajął się metodą pomiaru aktywności ligninolitycznej opartą na odbarwianiu naturalnego barwnika pochodzenia roślinnego – kwasu karminowego. Przeprowadzone badania wykazały korelację pomiędzy odbarwianiem kwasu karminowego i błękitu remazolowego, a aktywnością ligninolityczną grzyba *Trametes versicolor*. Wykazałam również korelację pomiędzy poziomem aktywności odbarwiających oba barwniki przy najwyższych aktywnościach w podłożach z kwasem ferulowym zamiast glukozy. Stwierdziłam również zależności pomiędzy aktywnościami odbarwiającymi te barwniki, a aktywnością lakazy w preparatach otrzymanych z podłoży. Okazało się, że odbarwianie kwasu karminowego może być metodą alternatywną wobec odbarwiania błękitu remazolowego przy pomiarach aktywności ligninolitycznej grzybów białej zgnilizny drewna. W tym czasie uczestniczyłam również w badaniach związanych z otrzymywaniem

i właściwościami grzybowej peroksydazy manganozależnej z grzyba *Bjerkandera adusta* prowadzone we współpracy z dr Dirkiem Zigenhagenem (Uniwersytet w Jenie, Niemcy).

Wzrastające zainteresowanie problematyką biotransformacji ligniny skłoniło mnie do kontynuowania badań związanych ze szczegółową analizą mechanizmów enzymatycznego rozkładu tak złożonego kompleksu. Mikroskopia elektronowa i badania biochemiczne dotyczące degradacji ligninocelulozy przez grzyby rozkładające drewno zwróciły moją uwagę na znaczne dysproporcje mas cząsteczkowych enzymów ligninolitycznych i substratu, takiego jak lignina związana kowalencyjnie z hemicelulozami i otaczająca składnik celulozowy zgrupowany w równoległe wiązki tworzące mikrofibryle. Z jednej strony cząsteczki tych enzymów są zbyt małe, aby mogły w swoich centrach aktywnych przyłączyć tak duży i zbyt nieregularny jak na kontakt powierzchniowy substrat, z drugiej strony cząsteczki tych enzymów są zbyt duże, aby mogły penetrować nienaruszone wcześniej struktury wtórnej ściany komórkowej drewna. W oparciu o te obserwacje doniesienia naukowe została zaproponowana hipoteza opierająca się na udziale związków o małej masie cząsteczkowej w inicjacji rozkładu kompleksu ligninocelulozowego. Związki niskocząsteczkowe są w stanie dyfundować pomiędzy fibryle celulozy we wtórnej ścianie komórkowej drewna. W trakcie dalszych badań zajęłam się więc związkami niskocząsteczkowymi i ich udziałem w procesie degradacji drewna przez grzyby. W tym celu wykorzystałam kwas karminowy jako mediator pochodzenia naturalnego oraz dwa związki pochodzenia zewnętrznego (egzogennego), a więc niewytwarzane przez organizmy zdolne do rozkładu kompleksu ligninocelulozowego, tj. ABTS (kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzenotiazolino-6-sulfonowy) i HBT (1-hydroksybenzotriazol). Głównym celem tych badań było przebadanie aktywności ligninolitycznych wskaźnikowych dla procesu ligninolizy w kulturach grzyba białej zgnilizny drewna *Trametes versicolor*, w obecności mediatorów i z uwzględnieniem zmian potencjałów oksydacyjno-redukcyjnych. Zastosowałam trzy metody pomiaru aktywności ligninolitycznej: odbarwienie błękitu remazolowego i kwasu karminowego przez enzymy o aktywnościach oksydazowych, co stanowiło miarę zdolności utleniających, degradację dimeru gwajacyloglicerolo- $\beta$ -gwajacylowego, która była wskaźnikiem zdolności do rozrywania wiązania  $\beta$ -O-4, stanowiącego prawie 50% wszystkich wiązań występujących w ligninie, oraz depolimeryzację lignosulfonianów, jako wskaźnik rozrywania różnych typów wiązań i prowadzącą do powstania z wysokocząsteczkowego substratu niskocząsteczkowych katabolitów. Przeprowadziłam również badanie zmian potencjałów oksydoredukcyjnych

przy użyciu oczyszczonych frakcji odbarwiających błękit remazolowy i kwas karminowy. W efekcie okazało się, że *Trametes versicolor* wydziela do podłoża wzrostu enzymy odbarwiające błękit remazolowy oraz kwas karminowy, przy czym podłoża idiofazowe zwłaszcza zawierające kwas ferulowy zwiększały poziom odbarwienia obu barwników. Funkcja odbarwiająca związana była głównie z aktywnością lakazy. Poziom degradacji modelowych substratów ligninowych, takich jak dimer gwajacyloglicerolo -  $\beta$ -gwajacyłowy i frakcja lignosulfonianów o masie cząsteczkowej 29,5 kDa, wydajnie zwiększał się w obecności niskocząsteczkowych mediatorów takich jak ABTS, HBT czy kwas karminowy. Analizy woltamperometryczne wykazały nieodwracalny udział kwasu karminowego w procesie degradacji kwasów lignosulfonowych. Wyniki przeprowadzonych analiz stały się treścią przygotowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ mediatorów na degradację modelowych preparatów ligninowych przez *Trametes versicolor*”.

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

1. Nowak G., **Matuszewska A.**, Nowak M., Malarczyk E. (1997) Activities of selected oxidases in idiophasic cultures of *Trametes versicolor* and *Pleurotus eryngii*. Proc. of Second TAPPI Biological Sciences Symposium, San Francisco, 397-400. IF = 0 punkty MNiSW = 3
2. Nowak G., **Matuszewska A.**, Nowak M. (1998) Protein secretion and oxidasic activities in idiophasic cultures of *Trametes versicolor*. Proc 7th Int. Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Technical Section CPPA, Montreal, Quebec, Canada, Vol. B, 131-134. IF = 0 punkty MNiSW = 3
3. 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
4. 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
5. Leonowicz A., **Matuszewska A.**, Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N.S., Hofrichter M., Rogalski J. (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, 175-185. IF = 3,175 punkty MNiSW = 30
  6. Leonowicz A., **Matuszewska A.**, Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Hofrichter M., Rogalski J., Cho N.S. (1999). Effect of superoxide dismutase and low molecular mediators on lignin degradation. *Korean J. Wood Sci. Technol.* 27, 1-14. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  7. Leonowicz A., Luterek J., Wojtaś-Wasilewska M., **Matuszewska A.**, Hofrichter M., Ziegenhagen D., Rogalski J., Cho N.S. (1999) The role of fungal laccase in biodegradation of lignin. *Korea Tappi* 31, 1-11. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  8. Leonowicz A., **Matuszewska A.**, Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Hofrichter M., Rogalski J., Cho N.S. (1999) White-rot fungi as lignin degraders. *Proc Intern. Sem. "New Horizon of Biosciences in Forest Products Fields"*, April 21-22, Chungbuk Nat. Univ. Choengju, Korea, 175-193. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  9. Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wojtaś-Wasilewska M., **Matuszewska A.**, Hofrichter M., Ziegenhagen D., Rogalski J. (1999) Possible lignin transformation by fungal laccase. *Proc. of the Korean Society of Wood Science and Technology Annual International Meeting*, April, 23-24, Seoul, 1-19. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  10. Leonowicz A., Cho N-S., Luterek J., Jarosz-Wilkołazka A., Wojtaś-Wasilewska M., **Matuszewska A.**, Hofrichter M., Ziegenhagen D., Rogalski J. (2000) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Proc. 2nd Intern. Symp. New Horizon of Bioscience in Forest Products Fields*. (Ed. N-S Cho), Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 72-131. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  11. Leonowicz A., Cho N-S., Ohga S., Luterek J., Wilkołazka A., **Matuszewska A.**, Wojtaś-Wasilewska M., Leonowicz J., Rogalski J. (2001) Mediators of fungal laccase. *Proceedings of the Korean Society of Wood Science of Wood Science and Technology Annual Meeting*, Seoul, Korea, ISSN 1225-6811, B-8, 171-185. IF = 0 punkty MNiSW = 3
  12. Leonowicz A., Luterek J., Wilkołazka A., Wojtaś-Wasilewska M., **Matuszewska A.**, Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J., Cho N-S. (2001) Possible lignin transformation by fungal laccase. *Proc. 3 Int. Symp. "New Horizon of Bioscience in Forest Products Fields."* Choengju, Korea, 129-182. IF = 0 punkty MNiSW = 3

13. Leonowicz A., **Matuszewska A.**, Luterek J., Malarczyk E., Wilkołazka A., Luterek J., Cho N-S. (2001) Fungal laccase cooperates with acetovanillone and acetosyringone as the mediators in depolymerization of lignosulphonates. Proc. 3 Int. Symp. "New Horizon of Bioscience in Forest Products Fields", Choengju, Korea, 193-204. IF = 0 punkty MNiSW = 3
14. Leonowicz A., Cho N-S., Luterek J., Wilkołazka A., Wojtaś-Wasilewska M., **Matuszewska A.**, Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. of Basic Microbiol. 41, 3-4, 185-227. IF = 1,58 punkty MNiSW = 15
15. Leonowicz A., **Matuszewska A.**, Malarczyk E., Jarosz-Wilkołazka A., Luterek J., Janusz G., Ginalska G., Rogalski J., Cho N-S. (2003) Screening for redox mediators cooperating with immobilized laccase in depolymerization of lignosulphonates. Proc. 4 Int. Symp. "New Horizon of Bioscience in Forest Products Fields", April 24-25, Choengju, Korea, 166-178. IF = 0 punkty MNiSW = 3

Wyniki badań, w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora stały się również treścią streszczeń zaprezentowanych na **konferencjach międzynarodowych** (5) oraz **krajowych** (7).

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) moich prac, opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł: **4,755**

Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora zgodnie z rokiem opublikowania: **81** pkt.

## **B) PRZEBIEG MOJEJ PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA ORAZ REALIZOWANE AKTUALNIE ZADANIA BADAWCZE**

Moje zainteresowania badawcze z powyższego okresu pracy naukowej można podzielić na kilka grup tematycznych:

1. Badania elektrochemiczne dotyczące enzymów grzybowych, takich jak lakaza dehydrogenaza celobiozowa, oraz wykorzystanie metod elektrochemicznych do pomiaru aktywności antyoksydacyjnej.
2. Badania dotyczące metabolizmu tkanki kostnej oraz udziału bisfosfonianów w procesach związanych z tym metabolizmem. Przebudowa wewnętrzna tkanki kostnej

jest procesem wielofazowym modulowanym przez działające ogólnie hormony witaminy oraz przez czynniki miejscowe, takie jak cytokiny a wśród nich peptydowe czynniki różnicowania i wzrostu oraz prostaglandyny. Najistotniejszymi czynnikami odpowiedzialnymi za zachowanie równowagi między procesem tworzenia i resorpcji kości są RANKL i OPG. Przeprowadzone eksperymenty dotyczyły wpływu bisfosfonianów na wymienione czynniki związane z metabolizmem tkanki kostnej oraz optymalizacji warunków oznaczania dwóch wybranych bisfosfonianów (pamidronianu i zoledronianu) przy pomocy wysokosprawnej chromatografii ciekowej i elektroforezy kapilarnej. Analizowane były również właściwości fizyczne cementu kostnego wzbogaconego pamidronianem. Badania te są nadal prowadzone we współpracy z pracownikami Uniwersytetu Medycznego w Lublinie i mają na celu weryfikację odpowiedzi biochemicznej u pacjentów, którym wprowadzono cement kostny wzbogacony pamidronianem.

3. Badania procesów proteolizy prowadzonych przez grzyby białej zgnilizny drewna, kontekście ich udziału w odpowiedzi stresowej, jak i regulacji aktywności proteaz (serynowych, aspartylowych, cysteinowych i metaloproteaz) przez ich naturalne inhibitory. Prace związane były również z poszukiwaniem, izolacją oraz charakterystyką naturalnych inhibitorów proteaz serynowych oraz aspartylowych. Wyniki tych badań mogą wskazać możliwości biotechnologicznego wykorzystania proteaz grzybowych oraz ich inhibitorów, również jako czynników bioaktywnych związanych z procesami nowotworzenia oraz hemostazy.
4. Badania zmierzające do określenia wzajemnych zależności regulacyjnych pomiędzy lakazą a enzymami proteolitycznymi w celu wyjaśnienia mechanizmów tych zależności oraz potencjalnego zastosowania biotechnologicznego. Doświadczenia dotyczyły głównie modyfikacji proteolitycznych lakazy z *C. unicolor*.
5. Poszukiwanie grzybowych preparatów bioaktywnych o unikalnych właściwościach biologicznych oraz wykazanie ich potencjału aplikacyjnego (zastosowania biomedyczne). Badania te obejmowały trzy grupy związków produkowanych przez grzyby białej zgnilizny drewna: a) niskocząsteczkowe metabolity wtórne, b) glikoproteiny, takie jak np. lakaza oraz c) polisacharydy, które w dalszym ciągu są przedmiotem mojej pracy naukowej związanej z badaniem aktywności cytotoksycznej i przeciwnowotworowej substancji grzybowych. Prowadzone prace zostały

rozszerzone o kolejne linie nowotworowe, m.in. raka jelita grubego (wyniki badań zrealizowanych we współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie, są obecnie na etapie publikacji). Analizy dotyczą nie tylko weryfikacji aktywności przeciwnowotworowej, jaką wykazują frakcje niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, ale również zmagają się z izolacją i charakterystyką struktury chemicznej konkretnych związków, odpowiedzialnych za tę aktywność. Badania mają również na celu poznanie biochemicznych i molekularnych mechanizmów działania substancji izolowanych zarówno z grzybnia jak i środowiska pochodzącego gatunku *C. unicolor* na komórki nowotworowe i obecnie skupiają się na mechanizmach działania lakazy na komórki raka szyjki macicy oraz prawidłowe komórki nabłonka szyjki macicy HPV16-pozytywne. Zastosowanie w medycynie enzymów grzybowych takich jak lakaza nadaje tym organizmom szczególne znaczenie w kontekście nowoczesnych narzędzi biotechnologicznych.

6. Badania dotyczące potencjału biotechnologicznego substancji grzybowych prowadzone przy współpracy z pracownikami naukowymi Politechniki Lubelskiej, polegające na modyfikacjach składu klejów epoksydowych substancjami grzybowymi, w celu zwiększenia odporności klejów na procesy starzenia pod wpływem czynników zewnętrznych. W badaniach zastosowane były frakcje zewnątrzkomórkowych metabolitów wtórnych z *P. sanguineus* oraz z *C. unicolor*. Wyboru preparatów dokonałam w oparciu o ich zdefiniowane wcześniej właściwości antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne. Wyniki badań mikroskopowych i analiza właściwości mechanicznych modyfikowanych mieszanek klejowych wykazały, że dodatek jednej z frakcji niskocząsteczkowych z *P. sanguineus* znacząco podnosił odporność kleju na procesy starzenia oraz działanie zewnętrznych czynników środowiskowych w stosunku do kleju niemodyfikowanego. Uzyskane wyniki stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego oraz przygotowanych do publikacji prac badawczych. Nawiązana współpraca z jednostkami Politechniki Lubelskiej stwarza realną szansę na kontynuację tego kierunku badań.

Wyniki prac prowadzonych przeze mnie po obronie doktoratu zostały opublikowane w następujących artykułach naukowych nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Matuszewska A.**, Rogalski J. (2005) Electrochemical analysis of properties of laccase mediators against lignin model compounds. *Acta Biochim. Polon.* 52, Suppl. 1/2005, 181. IF = 1,863, punkty MNiSW = 3
2. **Matuszewska A.**, Rogalski J., Szwarc M. (2007) Optimization of culture medium for laccase production by *Trametes versicolor*. *Acta Biochim. Polon.* 54, 4/2007, 188. IF = 1,261, punkty MNiSW = 0
3. **Matuszewska A.**, Rogalski J., Matuszewski Ł., Mazurkiewicz T. (2008) Determination of bisphosphonates: pamidronate and zoledronate by HPLC method. *Acta Biochim. Polon.* 54, 3/2008. IF = 1,448, punkty MNiSW = 0
4. **Matuszewska A.**, Kiszka P., Rogalski J., (2010) Electrochemical studies of a laccase produced in *Cerena unicolor* and *Trametes versicolor*. *Acta Biochim. Polon.* Vol. 57 suppl. 4/2010, p 14.35.
5. Matuszewski Ł., **Matuszewska A.**, Mazurkiewicz T., Rogalski J., Cho N-S., Ohga S. (2011) Determination of bisphosphonates by ion-pair HPLC. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 56 (2), 213-216. IF = 0,272, punkty MNiSW = 20
6. Grzywnowicz K., Jaszek M., **Matuszewska A.** (2011) *Biotechnologia naturalnych inhibitorów proteaz – perspektywa grzybowa.*, ISBN: 978-83-62653-12-6, 28-34. IF = 0, punkty MNiSW = 0
7. Matuszewski Ł., **Matuszewska A.**, Polkowska I., Jaszek M., Grąż 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
8. 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
9. Matuszewski L., Olchowik G., Mazurkiewicz T., Kowalczyk B., Zdrojewska A., **Matuszewska A.**, Ciszewski A., Gospodarek M., Morawik I. (2013) Biomechanical parameters of the BP-enriched bone cement. *European Journal of Orthopaedic Surgery*



- and Traumatology, 1-7. DOI. 10.1007/s00590-013-1230-1. IF = 0,181, punkty MNiSW = 15
10. Matuszewski L., Turzańska K., **Matuszewska A.**, Jabłoński M., Polkowska I., Mazurkiewicz T. (2013) Effect of implanted bisphosphonate-enriched cement on the trabecular microarchitecture of bone in a rat model using micro-computed tomography. *International Orthopaedics*. 37 (6), 1187-93. IF = 2,019, punkty MNiSW = 30
11. 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
12. 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
13. Mazurkiewicz T., Matuszewski L., **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
14. Jaszek M., Kos K., **Matuszewska A.**, Grąż M., Stefaniuk D., Osińska-Jaroszuk M., Predecka M., Józwik E., Grzywnowicz K. (2014) Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: *Phellinus pini* by menadione-mediated oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174, 644-656. IF=1,735, punkty MNiSW = 20
15. 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
16. Rudawska A., Warda T., Haniecka I., Jaszek M., **Matuszewska A.**, Stefaniuk D. Sposób wytwarzania modyfikowanego kleju epoksydowego oraz jego zastosowanie: 2015 (P.411264). IF = 0, punkty MNiSW = 2

17. Bancerz R., Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M, Sulej J., Wiater A., **Matuszewska A.**, Rogalski J. (2018) Fungal polysaccharides as a water-adsorbing material in esters production with the use of lipase from *Rhizomucor variabilis*. International Journal of Biological Macromolecules, 118(A), 957-964. IF = 3.909, punkty MNiSW = 35
18. Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M., Starosielec M., Sulej J., **Matuszewska A.**, Janczarek M., Bancerz R., Wydrych J., Wiater A., Jarosz-Wilkołazka A. (2018) Bacterial exopolysaccharides as a modern biotechnological tool for modification of fungal laccase properties and metal ion binding. Bioprocess and Biosystems Engineering, 41(7), 973-989. IF = 2.113, punkty MNiSW = 30

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

1. Otrzymywanie i charakterystyka naturalnych grzybowych inhibitorów proteaz.
2. Wykazanie możliwości proteolitycznej modyfikacji lakazy z *C. unicolor*, oraz zależności regulacyjnych pomiędzy lakazą, a enzymami proteolitycznymi poprzez zastosowanie komercyjnych proteaz, celem polepszenia parametrów katalitycznych lakazy.
3. Wykazanie możliwości stabilizacji aktywności enzymów lipolitycznych przy użyciu polisacharydów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego.
4. Określenie właściwości cementu kostnego wzbogaconego pamidronianem, oraz zmian poziomu markerów obrotu kostnego po implantacji tego cementu do kości zwierząt laboratoryjnych, jak również prześledzenie zmian w mikroarchitekturze tkanki kostnej, po miejscowym wprowadzeniu cementu kostnego wzbogaconego pamidronianem.
5. Wykorzystanie wybranych preparatów grzybowych do modyfikacji składu klejów epoksydowych w celu poprawy odporności tych klejów na procesy starzenia oraz działanie zewnętrznych czynników środowiskowych.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) moich prac, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (z wyłączeniem prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł: **19,731**

Suma punktów MNiSW uzyskanych przeze mnie za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (z wyłączeniem prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym) zgodnie z rokiem opublikowania: **253 pkt.**

Podsumowanie całego dorobku (z wyłączeniem prac złożonych do oceny w postępowaniu habilitacyjnym): IF = **24,486** (punkty MNiSW = **334**)

## VI) PLANY NAUKOWE

Moje przyszłe plany naukowe są w zasadzie kontynuacją obecnie realizowanych nurtów badawczych.

1. Otrzymywanie, charakterystyka i badania potencjału biomedycznego nowych, naturalnych, grzybowych inhibitorów proteaz o działaniu modulującym procesy hemostazy w organizmie człowieka. Zakres badań będzie obejmował analizę wpływu nowych czynników na proces aktywacji płytek krwi, oraz analizę właściwości fibrynolitycznych i trombolitycznych wybranych preparatów. Wprowadzenie do praktyki biochemicznej i klinicznej związków grzybowych o działaniu pro- lub antykoagulacyjnym pozwoli na tworzenie nowych modeli doświadczalnych opierających się na bioaktywnych związkach pochodzenia naturalnego i badanie mechanizmów ich działania. W przyszłości zaś być może stworzy szansę na zaoferowanie pacjentom badanych substancji grzybowych w postaci suplementów lub składników nowych leków.
2. Kontynuacja badań związanych z działaniem lakazy z *C. unicolor* na komórki raka szyjki macicy. Badania będą związane z poznaniem mechanizmów działania tego enzymu. Biorąc pod uwagę wysoki potencjał utleniania lakazy wydaje się być uzasadniona analiza podstawowych markerów stresu oksydacyjnego, który jest jednym z mechanizmów indukcji apoptozy i autofagii, tj. procesów, które mogą prowadzić do śmierci komórek nowotworowych. Badanie zmian w mitochondrialnym potencjale transbłonowym lub wybranych szlakach sygnałowych i zaangażowanych białkach w regulacji apoptozy i autofagii określi rodzaj śmierci komórki i mechanizmy jego aktywacji w komórkach narażonych na nietoksyczne stężenia

lakazy. Ponadto wyniki badań nad zdolnością komórek nowotworowych do programowanej śmierci, a także wytwarzaniem autokrynych cytokin i czynników wzrostu wraz z wynikami dotyczącymi prowadzenia kokultury komórek raka szyjki macicy z różnymi subpopulacjami fibroblastów dostarczą informacji na temat potencjału przeciwnowotworowego lakazy i zdolności do modulowania mikrośrodowiska guza. Uzyskane wyniki mogą być pomocne przy projektowaniu nowych strategii chemoprewencyjnych i terapeutycznych, na przykład na podstawie działania zewnętrznego lakazy z *C. unicolor* stosowanej samodzielnie lub w połączeniu z tradycyjnymi lekami. Zastosowanie enzymów grzybowych, takich jak lakaza w medycynie, nadaje tym organizmom szczególne znaczenie w kontekście współczesnej biotechnologii.

3. Określenie struktury chemicznej i charakterystyka biochemiczna, oraz próby praktycznego zastosowania niskocząsteczkowych substancji grzybowych. Moje badania będą związane z charakterystyką związków niskocząsteczkowych oraz badaniem ich potencjału biomedycznego w kierunku takich nowotworów jak np. rak jelita grubego, który jest jednym z najczęstszych nowotworów na świecie i drugim najczęściej występującym nowotworem w krajach rozwiniętych. Chirurgia i chemioterapia są rutynowymi metodami leczenia pacjentów z rakiem okrężnicy. Jednak korzyści z chemioterapii są nadal przedmiotem dyskusji, ponieważ duża część pacjentów umiera z powodu nawrotu choroby. Dlatego też poszukiwanie nowych terapii ma tutaj szczególne znaczenie. W moich badaniach chciałabym się skupić na mechanizmach działania substancji grzybowych na komórki nowotworowe. W procesie nowotworzenia okrężnicy ważną rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) i ich inhibitory tkankowe. Jedną z metaloproteinaz o istotnym znaczeniu w rozwoju raka okrężnicy jest MMP-9. Moje badania będą więc dotyczyły m.in. wpływu substancji grzybowych na metaloproteinazy zaangażowane w proces rozrostu guza pierwotnego oraz w proces jego przerzutowania.
4. Z przeprowadzonych wcześniej badań wynika, że pamidronian uwalniany z cementu kostnego pozytywnie wpływa na układ OPG/RANKL/RANK i TNF- $\alpha$  wzmacniając procesy osteogenezy kosztem obniżenia tempa resorpcji tkanki kostnej, jak również pozytywnie wpływa na mikroarchitekturę kości. W dobie szerokiego stosowania biomateriałów w praktyce klinicznej zastosowanie cementu kostnego z pamidronianem wydaje się być uzasadnione. Dlatego też badania związane

z wpływem modyfikowanego cementu kostnego na organizm człowieka są nadal związane z moimi planami naukowymi. Badania te będą się skupiać na analizach poziomu markerów obrotu kostnego u pacjentów po implantacji cementu kostnego z bisfosfonianem poddanych aloplastyce stawów biodrowych lub kolanowych, oraz chorych, u których pojawiła się konieczność wypełnienia ubytków kostnych.

## VII. Podsumowanie aktywności naukowej

Dane bibliometryczne	IF <sup>a</sup>	Punkty MNiSW <sup>b</sup>
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - <b>6 publikacji</b> Patenty wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - <b>2 patenty</b>	<b>12,608</b>	<b>145</b> <b>60</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>2 publikacji</b>	<b>4,755</b>	<b>45</b>
B) po uzyskaniu stopnia doktora - <b>13 publikacji</b>	<b>19,731</b>	<b>240</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>36</b>
B) po uzyskaniu stopnia doktora - <b>5 publikacji</b>		<b>16</b>
Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:		
A) przed uzyskaniem stopnia doktora - <b>12</b>	–	–
B) po uzyskaniu stopnia doktora - <b>18</b>		
<b>Łączna liczba publikacji *</b>	<b>Razem: 48</b>	<b>37,094</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		

