

AUTOREFERAT

MARTA KINGA LEMIESZEK

Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki w Lublinie

**Tytuł osiągnięcia naukowego: Ocena chemoprewencyjnych
i neuroprotektoryjnych właściwości polisacharydów i kwasów nukleinowych
izolowanych z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny; kurka)
oraz możliwości ich wykorzystania w terapii nowotworów
i chorób neurodegeneracyjnych - badania w modelach *in vitro***

SPIS TREŚCI	Strona
1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
3. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
3.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	4
3.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	6
3.4 Piśmiennictwo	27
4. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	32
5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę	44
5.1. Działalność dydaktyczna	44
5.2. Działalność organizacyjna	45
6. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	45
6.1. Nagrody	45
6.2. Stypendia	46
6.3. Najważniejsze dane bibliometryczne	47

1. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 11.12.2014** **doktor nauk o zdrowiu**
Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy”
- 15.12.2011** **menedżer projektów badawczych**
Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie
Tytuł pracy podyplomowej: „Automatyzacja i nowoczesne metody wyznacznikiem ekspansji rynkowej firmy Cell-Lab”
- 10.06.2008** **magister biotechnologii**
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Tytuł pracy magisterskiej: „Ocena aktywności biologicznej wodnych ekstraktów izolowanych z *Piptoporus betulinus* i *Inonotus obliquus*”

2. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 01.09.2010 - obecnie** Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie
Stanowisko:
adiunkt (01.02.2016 - obecnie)
asystent (01.11.2012 - 31.01.2016)
pracownik inżynierijsko-techniczny (01.09.2010-31.10.2012)
- 01.07.2008 - 20.04.2015** Samodzielna Pracownia Chorób Fibroproliferacyjnych, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie
Stanowisko:
asystent (01.11.2012 - 20.04.2015)
pracownik inżynierijsko-techniczny (01.07.2008-31.10.2012)
- 01.07.2007 - 30.09.2007** Department of Microbiology, Molecular Biology and Biochemistry, University of Idaho, Moscow, USA
Stanowisko: short term scholar

3. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Ocena chemoprewencyjnych i neuroprotekcyjnych właściwości polisacharydów i kwasów nukleinowych izolowanych z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny; kurka) oraz możliwości ich wykorzystania w terapii nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych - badania w modelach *in vitro*

3.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Cykl 4 publikacji w czasopismach z Listy Filadelfijskiej [IF: 17,310; MNiSW: 340]

We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

1. Lemieszek MK, Nunes FM, Cardoso C, Marques G, Rzeski W: Neuroprotective properties of *Cantharellus cibarius* polysaccharide fractions in different *in vitro* models of neurodegeneration. Carbohydrate Polymers 2018, 197, 598-607. [IF: 6,044; MNiSW: 40]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań; opracowaniu i wdrożeniu protokołu pozyskiwania neuronów w drodze różnicowanie ludzkich komórek neuroblastoma; uzyskaniu finansowania badań *in vitro*; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na określeniu neuroprotekcyjnych właściwości frakcji polisacharydowych izolowanych z *C. cibarius* w różnych modelach neurodegeneracji; opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników badań; przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 80%

2. Lemieszek MK, Marques PS, Ribeiro M, Ferreira D, Marques G, Chaves R, Pożarowski P, Nunes FM, Rzeski W: Mushroom small RNAs as potential anticancer agents: a closer look at *Cantharellus cibarius* proapoptotic and antiproliferative effects in colon cancer cells. Food & Function 2019, 10(5), 2739-2751. [IF: 3,241; MNiSW: 100]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań; uzyskaniu finansowania badań *in vitro*; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na ocenie chemoprewencyjnych właściwości frakcji zawierających sRNA izolowanych z wybranych grzybów podstawkowych z gromady *Basidiomycota* w komórkowym modelu raka okrężnicy celem selekcji frakcji o największym potencjale terapeutycznym; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na określeniu mechanizmów przeciwnowotworowego działania izolowanej z *Cantharellus cibarius* frakcji zawierającej sRNA ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na przebieg cyklu

komórkowego oraz zdolność indukcji apoptozy w komórkach raka okrężnicy; opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników badań; przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 65%

3. Lemieszek MK, Nunes FM, Marques G, Rzeski W: *Cantharellus cibarius* branched mannans inhibits colon cancer cells growth by interfering with signals transduction in NF-κB pathway. International Journal of Biological Macromolecules 2019, 134, 770-780. [IF: 4,784; MNiSW: 100]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań; uzyskaniu finansowania badań *in vitro*; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na ocenie chemoprewencyjnych właściwości frakcji polisacharydowych izolowanej z *Cantharellus cibarius* w komórkowym modelu raka okrężnicy oraz na określeniu molekularnego mechanizmu działania frakcji o największym potencjale terapeutycznym ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na przekazywanie sygnałów w szlaku NF-κB w tym ekspresję podległych mu genów oraz przebieg nadzorowanych przez niego procesów tj. apoptozę, cykl komórkowy, przerzutowanie; opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników badań; przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 85%

4. Lemieszek MK, Nunes FM, Rzeski W: Branched mannans from the mushroom *Cantharellus cibarius* enhance the anticancer activity of natural killer cells against human cancers of lung and colon. Food & Function 2019, 10(5), 5816-5826. [IF: 3,241; MNiSW: 100]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań; uzyskaniu finansowania badań *in vitro*; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na analizie wpływu frakcji polisacharydowych izolowanej z *Cantharellus cibarius* na żywotność i proliferację komórek NK oraz określeniu molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw immunomodulacyjnych właściwości frakcji o największym potencjale terapeutycznym; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na ocenie wpływu wybranej frakcji polisacharydowej na zdolność komórek NK do rozróżniania komórek prawidłowych (nabłonka dróg oddechowych i nabłonka jelita) od nowotworowych (rak płuca i raka okrężnicy) oraz eliminacji komórek nowotworowych; opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników badań; przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 90%

Wydruki publikacji wchodzących w skład omawianego osiągnięcia wraz z oświadczeniami współautorów wskazującymi na ich wkład merytoryczny w powstanie tych prac zamieszczono w Załączniku Nr 5

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

Pomimo postępu, jaki w ostatnich latach dokonał się w neurologii i onkologii, odsetek osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne oraz choroby nowotworowe stale się zwiększa. Problem ten jest szczególnie widoczny w starzejących się społeczeństwach krajów wysoko rozwiniętych, w których pomimo coraz większych nakładów finansowych na diagnostykę i leczenie wspomnianych chorób prognozy na najbliższe lata wskazują na systematyczny wzrost zachorowalności, niepełnosprawności oraz śmiertelności z powodu nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych [Licher i wsp. 2019, GBD 2015, Stewart and Wild 2014]. Z uwagi na niezadowalającą skuteczność dostępnych strategii terapeutycznych, duże nadzieje pokładane są w prewencji wspomnianych chorób a w szczególności neuroprotekcji oraz chemoprewencji [Brown i wsp. 2005, Vajda 2002, Sporn i Suh 2000]. Neuroprotekcja polega na przeciwdziałaniu destrukcji tkanki nerwowej wywołanej różnymi czynnikami uszkodzającymi przez zastosowanie substancji zdolnych zapobiec lub zahamować śmierć neuronów, które to zjawisko leży u podłoża większości chorób neurodegeneracyjnych [Brown i wsp. 2005, Vajda 2002]. Natomiast chemoprewencja jest metodą zapobiegania nowotworom poprzez przyjmowanie substancji, które mogą zatrzymać lub spowolnić przebieg karcynogenezy, czy też wpłynąć na regresję już powstałych zmian [Sporn i wsp. 2000]. Z uwagi na podstawowy wymóg obu strategii terapeutycznych dotyczący wykorzystania nietoksycznych substancji na wczesnych etapach rozwoju choroby lub długo przed wystąpieniem pierwszych jej objawów uzasadnionym wydaje się poszukiwanie neuroprotektantów czy chemioterapeutyków wśród składników codziennej diety. Koncepcja ta jest odzwierciedleniem idei sformułowanej przez Hipokratesa około IV w. p.n.e. „*Niech żywność będzie Twoim lekarstwem, a lekarstwo żywnością*”, jest ona również zgodna ze współczesnymi trendami obowiązującymi w naukach o zdrowiu, które w oparciu o wyniki badań klinicznych i populacyjnych wskazują na racjonalne, prawidłowe żywienie jako jeden z głównych czynników prewencji chorób niezakaźnych w tym nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych [Lillicrop i Burdge 2012, Joseph 2009, Donaldson 2004]. Dostrzeżenie oraz zrozumienie zależności między stanem zdrowia człowieka a spożywanym pożywieniem, jego wartością odżywczą oraz jakością zdrowotną znalazło odzwierciedlenie w terminie żywność funkcjonalna rozumianym jako żywności o udokumentowanym badaniami naukowymi korzystnym wpływie na zdrowie ponad ten, który wynika z obecności w nich

składników odżywczych tradycyjnie uznanych za niezbędne. Z pojęciem żywność funkcjonalna ściśle związany jest termin nutraceutyki definiowany jako środek spożywczy (często nie będący składnikiem odżywczym) o udokumentowanych korzyściach medycznych lub zdrowotnych, w tym zdolności do zapobiegania i leczenia chorób. Nutraceutyki stosowane są w celu wzbogacenia diety o korzystne dla zdrowia substancje pochodzenia naturalnego, które występują w żywności, ale w niewielkich ilościach. Należy podkreślić, że termin nutraceutyki jest pojęciem szerszym niż żywność funkcjonalna i poza nią mieszczą się w nim również pojedyncze substancje bioaktywne naturalnego pochodzenia jak również suplementy diety. W odróżnieniu od leków nutraceutyki zawierają niższe dawki substancji bioaktywnych, ale dzięki temu charakteryzują się wyższym bezpieczeństwem długotrwałego stosowania, a ich pierwotnym przeznaczeniem jest szeroko rozumiana poprawa ogólnego stanu zdrowia oraz prewencja chorób [Dudeja i Grupta 2017, Hardy 2000]. Jednoznaczne i wiarygodne potwierdzenie prozdrowotnych właściwości preparatów spożywczych wymaga przeprowadzenia zakrojonych na szeroką skalę wieloletnich badań populacyjnych. Z uwagi na czasochłonność oraz kosztochłonność takich badań, podobnie jak w przypadku leków, wstępną ocenę prozdrowotnych właściwości nutraceutyków z reguły przeprowadza się w modelach *in vitro*.

Interesującym źródłem nutraceutyków wydają się być grzyby wyższe z gromady *Basidiomycota* (grzyby podstawkowe), które od tysiącleci cenione są zarówno za właściwości odżywcze jak i korzyści zdrowotne. W starożytnej Grecji były one uznawane za pokarm bogów, a w Egipcie ich spożycie było przywilejem faraonów. Wprawdzie właściwości lecznicze grzybów po raz pierwszy opisał Hipokrates około IV w. p.n.e., to podstawy mykoterapii zawdzięczamy Medycynie Dalekiego Wschodu, gdzie od ponad 2000 lat stosuje się produkty z grzybów podstawkowych w prewencji oraz leczeniu chorób [Chang i Buswell 1996]. Spośród szerokiej gamy związków biologicznie czynnych występujących w taksonie *Basidiomycota* najlepiej poznane i opisane zostały polisacharydy o właściwościach przeciwnowotworowych [Muszyńska i wsp. 2010, Wasser 2002, Reshetnikov i wsp. 2001, Mizuno 1999, Wasser i Weis 1999a, Wasser i Weis 1999b, Mizuno 1996] a wśród nich stosowane w onkologii od ponad 50 lat: lentinan, krestin (PSK) i schizophyllan [Lemieszek i Rzeski 2012, Mizuno 1996].

Lentinan jest wysoce oczyszczoną frakcją polisacharydową izolowaną z *Lentinus edodes* (Shiitake, twardnik japoński). Pod względem struktury chemicznej jest to β -glukan, w którym łańcuch główny utworzony jest z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 3) glikozydowymi, zaś odgałęzienia boczne stanowią cząsteczki glukozy połączone z łańcuchem głównym wiązaniami β -(1 \rightarrow 6) glikozydowymi [Mizuno 1999]. Lentinan jest powszechnie stosowany w Japonii jako lek przeciwnowotworowy. Podawany jest łącznie z innymi

farmaceutykami w terapii nowotworów wątroby, żołądka, jelita, płuca i jajnika. Udowodniono, że lentinan zwiększa skuteczność konwencjonalnej terapii a tym samym wydłuża przeżycie pacjentów [Mahajna i wsp. 2007]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że podawanie lentinanu zapobiega onkogenezie indukowanej chemicznie lub przez wirusy, jak również zapobiega procesom przerzutowania [Hobbs 2000, Hobbs 1995].

Krestin (PSK) izolowany jest z *Trametes versicolor* (wrośniak różnobarwny). Poza częścią cukrową którą stanowi β -glukan, w skład cząsteczki PSK wchodzi również peptyd. Część cukrową stanowi łańcuch główny utworzony przez cząsteczki glukozy połączone wiązaniami β -(1 \rightarrow 3) oraz β -(1 \rightarrow 4) glikozydowymi a w odgałęzieniach bocznych występują wiązania β -(1 \rightarrow 6) glikozydowe [Mizuno 1999]. Podobnie jak lentinan, krestin jest bardzo popularnym lekiem stosowanym w Japonii. Badania kliniczne wykazały, że jego podawanie zwiększa skuteczność chemioterapii u pacjentów cierpiących na nowotwory piersi, wątroby, prostaty, żołądka, płuca i okrężnicy. Samodzielnie stosowany jest w weterynarii w leczeniu raka płuca, raka jelita grubego, mięsaka i czerniaka [Mahajna i wsp. 2007].

Schizophyllan pozyskiwany jest z *Schizophyllum commune* (rozszczepka pospolita). Pod względem składu cukrów oraz sposobu ich połączenia, przypomina lentinan. Ten β -glukan stosowany jest w terapii raka żołądka i szyi [Hobbs 1995]. Dodatkowo, jest podawany w trakcie radioterapii ze względu na zdolność regeneracji uszkodzonych promieniowaniem gamma komórek szpiku kostnego [Herre i wsp. 2004, Brown i Siamon 2001].

Warto zwrócić uwagę, że zakrojone na szeroką skalę badania uczonych głównie z Chin i Japonii sugerują, że większość, jeśli nie wszystkie, grzyby podstawkowe zawierają polisacharydy o właściwościach przeciwnowotworowych [Muszyńska i wsp. 2010, Wasser 2002, Reshetnikov i wsp. 2001, Mizuno 1999, Wasser i Weis 1999a, Wasser i Weis 1999b, Mizuno 1996].

Badania ostatnich lat wskazują również na inne niż onkologiczne możliwości wykorzystania polisacharydów izolowanych z grzybów podstawkowych [Friedman 2016]. Z punktu widzenia potrzeb zdrowia publicznego, u podstaw którego leżą działania zapobiegawcze mające na celu ograniczenie zachorowań oraz działania służące przywracaniu zdrowia, szczególnie cenne wydają się doniesienia o neuroprotektoryjnych właściwościach tej grupy związków chemicznych. Wprawdzie większość wyników uzyskano w hodowlach komórek nerwowych linii PC12, ale dostępne są również pierwsze wyniki z badań na zwierzętach [Wong i wsp. 2017]. Do tej pory wykazano neuroprotektoryjne właściwości polisacharydów izolowanych z *Ganoderma lucidum* (lakownica żółtawa) w szczurzych modelach: niedokrwiennego uszkodzenia mózgu [Zhou i wsp. 2010], urazowego uszkodzenia rdzenia kręgowego [Gokce i wsp. 2015], oraz w modelu drgawek indukowanych kwasem kainowym [Tello i wsp. 2013]. Korzystny wpływ polisacharydów izolowanych z *Agaricus bisporus*

(pieczarka dwuzarodnikowa) na funkcje poznawcze wykazano w modelu neurodegeneracji wywołanej trimetylocyną w układzie limbicznym szczurów [Amal i wsp. 2015]. Podobne protekcyjne działanie w zakresie funkcji sensorycznych zaobserwowano po podaniu szczurom z uszkodzonym mechanicznie nerwem strzałkowym polisacharydów z *Hericium erinaceus* (soplówka jeżowata) [Wong i wsp. 2015]. Niestety brakuje wiarygodnych danych o wykorzystaniu polisacharydów pozyskiwanych z *Basidiomycota* w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych u ludzi.

O ile prozdrowotne właściwości polisacharydów grzybowych od wielu lat są w kręgu zainteresowań naukowców z całego świata o tyle na drugim biegunie znajdują się badania nad potencjałem leczniczym grzybowych kwasów nukleinowych zwłaszcza krótkołańcuchowych cząsteczek RNA, które dzięki zdolności do interferencji mogą wpływać na ekspresję genów. Wśród tych związków najlepiej opisany został mechanizm działania pozyskiwanej z *Agaricus blazei* (pieczarka brazylijska) frakcji FA-2-b- β stanowiącej kompleks RNA-białko. Gao i wsp. wykazali, że FA-2-b- β zmniejszając aktywność telomerazy oraz stymulując ekspresję mRNA kaspazy 3 indukuje apoptozę w ludzkich komórkach białaczki linii HL-60 [Gao i wsp. 2007]. Identyczny mechanizm działania z tym, że w ludzkich komórkach raka żołądka linii MKN45 opisał Sun i wsp. [Sun i wsp. 2007]. Naszemu zespołowi również udało się zidentyfikować mechanizm przeciwnowotworowego działania sRNA z *Boletus edulis* (borowik szlachetny), która to cząsteczka powodowała w komórkach raka okrężnicy linii LS180 i HT-29 indukcję apoptozy odpowiednio zależną i niezależną od p53, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz S, jak również wyciszenie przekazywania sygnałów w szlaku MAPK/Erk [Lemieszek i wsp. 2017a, 2016, 2013]. Ponadto, wykazaliśmy także immunomodulacyjne właściwości sRNA borowika szlachetnego względem ludzkich komórek NK linii NK-92 [Lemieszek i wsp. 2017b].

W prezentowanym osiągnięciu skupiłam się na analizie prozdrowotnych właściwości polisacharydów oraz kwasów nukleinowych izolowanych z jednego z najpopularniejszych i najbardziej cenionych ze względu na walory smakowe grzybów jadalnych na świecie tj. *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny, kurka). Co ciekawe pomimo dużej popularności wiedza na temat wpływu spożycia *C. cibarius* na organizm człowieka jest ograniczona i o ile składniki odżywcze kurki są dobrze poznane i opisane [Brzezicha-Cirocka i wsp. 2019, Muszyńska i wsp. 2016, Falandysz i Drewnowska 2015, Kumari i wsp. 2011] o tyle związki bioaktywne występujące w pieprzniku jadalnym są słabo scharakteryzowane. Głównym założeniem prezentowanego osiągnięcia była ocena neuroprotekcyjnych i chemoprewencyjnych właściwości kwasów nukleinowych oraz polisacharydów izolowanych z *C. cibarius* celem poszerzenia wiedzy na temat substancji bioaktywnych obecnych w kurce

oraz stworzenie podstaw do opracowania nowej strategii prewencji/leczenia chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem raka okrężnicy. Ponadto, uzyskane wyniki badań miały stanowić punkt wyjścia do uznania owocników kurki za żywność funkcjonalną a izolowanych z nich i omówionych w osiągnięciu biopolimerów za nutraceutyki. Dodatkowo z uwagi na fakt, że pieprznik jadalny jest jednym z najczęściej konsumowanych grzybów na świecie, identyfikacja oraz charakterystyka biologiczna substancji w nim zawartych powinna znaleźć się w kręgu zainteresowań zdrowia publicznego oraz być rozpatrywana w kategoriach bezpieczeństwa żywności.

Wyniki zaprezentowane w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia są efektem mojej wieloletniej współpracy z zespołem naukowców pod kierunkiem Prof. Fernando Nunesa z University of Trás-os-Montes and Alto Douro w Portugalii (UTAD). Zespół Prof. Nunesa był odpowiedzialny za izolację, oczyszczenie oraz charakterystykę chemiczną wykorzystanych przeze mnie w badaniach *in vitro* rozpuszczalnych w wodzie biopolimerów *C. cibarius*. Zespół Prof. Nunesa uzyskał z owocników kurki cztery frakcje, wśród których ze względu na składnik dominujący wyodrębniono trzy frakcje polisacharydowe: CC1 - frakcja składająca się z 1,6 mannanu rozgałęzionego przy O-2 i O-3 (34%) i liniowego 2,3-glukanu (25%) oraz 1,4 mannanu rozgałęzionego przy O-2 i O-3 (8%); CC2a - frakcja składająca się z 1,6 mannanu rozgałęzionego przy O-2 i O-3 (54%) i liniowego 1,3-glukanu (28%), zawierająca również komponentę białkową; CC2b - frakcja składająca się z liniowego 1,3-glukanu (73%) z niewielką domieszką 1,6 mannanu rozgałęzionego przy O-2 i O-3 (8%), oraz frakcję CC3 zawierającą kwasy nukleinowe w postaci sRNA (CC3). Naturę chemiczną frakcji CC3 potwierdził zespół genetyków z UTAD pod kierunkiem Prof. Raquel Chaves.

1. Lemieszek MK, Nunes FM, Cardoso C, Marques G, Rzeski W: Neuroprotective properties of *Cantharellus cibarius* polysaccharide fractions in different *in vitro* models of neurodegeneration. Carbohydrate Polymers 2018, 197, 598-607

Choroby neurodegeneracyjne stanowią heterogenną grupę wrodzonych lub nabytych schorzeń układu nerwowego, których wspólną cechą jest postępujące zwyrodnienie komórek nerwowych prowadzące do ich obumierania, a w konsekwencji do trwałych i nieodwracalnych zmian w układzie nerwowym [Przedborski i wsp. 2003]. Degeneracja neuronów może być następstwem defektów genetycznych prowadzących z reguły do pojawienie się i akumulacji nieprawidłowych, opornych na działanie enzymów proteolitycznych białek o właściwościach neurotoksycznych np. β -amyloidu (choroba Alzheimera), α -synukleiny (choroba Parkinsona), huntingtyny (płasawica Huntingtona) [Kovacs 2019, Gorman 2008]. Śmierć neuronów może być również efektem niesprzyjających

lub wręcz toksycznych warunków środowiska np. niedoboru składników odżywczych (stres troficzny) [Skup 2018, Sheline i wsp. 2010], zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu (stres oksydacyjny) [Wang i wsp. 2017, Espinet i wsp. 2015], czy nadmiernej ilości aminokwasów pobudzających (ekscytotoksyczność) [Gorman 2008, Dible 1999]. Wymienione czynniki środowiskowe powiązane ze stwardnieniem zanikowym bocznym [Cluskey i Ramsden 2001], jak również ze wspomnianymi powyżej chorobą Alzheimerera, Parkinsona oraz Huntingtona, chociaż w ich przypadku spośród wymienionych induktorów za dominujący uznawana jest toksyczność z nadpobudzenia [Gorman 2008, Doble 1999]. O ile wywołanie w warunkach *in vitro* zaburzeń genetycznych leżących u podłoża neurodegeneracji nastęrcza pewnych trudności o tyle stworzenie środowiska promującego śmierć neuronów jest stosunkowo proste i w konsekwencji stanowi podstawę większości komórkowych modeli neurodegeneracyjnych w tym wykorzystanych w prezentowanych badaniach.

Głównym celem badań była ocena neuroprotektoryjnych właściwości polisacharydów oraz kwasów nukleinowych izolowanych z *Cantharellus cibarius* w modelach neurodegeneracji indukowanych: stresem troficznym, toksycznością z nadpobudzenia (ekscytotoksyczność) oraz stresem oksydacyjnym.

Kluczowym etapem badań było opracowanie skutecznej, alternatywnej do hodowli pierwotnych, metody pozyskiwania ludzkich neuronów. Pożądany efekt osiągnęłam przez inkubację ludzkich komórek neuroblastoma linii SH-SY5Y z 0,5 μ M kwasem retinowym w warunkach uniemożliwiających adhezję komórek do podłoża. Dzięki temu uzyskałam użyteczny model badawczy niezależny od hodowli pierwotnych wyprowadzanych z tkanki nerwowej, do której dostęp jest ograniczony.

Wpływ kwasów nukleinowych oraz polisacharydów izolowanych z *Cantharellus cibarius* na żywotność neuronów sprawdzono testem MTT oraz LDH (*In Vitro* Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based), natomiast wzrost neurytów w obecności badanych substancji zbadano przy użyciu Neurite Outgrowth Staining Kit. Badania przeprowadzono po 48 godzinach ekspozycji neuronów na badane substancje w stężeniach 10, 25, 50 i 100 μ g/ml. Spośród czterech analizowanych frakcji najkorzystniejszy wpływ na żywotność neuronów oraz wzrost neurytów wykazały frakcje o najwyższej oraz o najniższej zawartości polisacharydów tj. frakcja CC2a (69,2% polisacharydów) oraz frakcja CC3 (10,7% polisacharydów). Późniejsze analizy, których wyniki zaprezentowano w drugiej publikacji z cyklu ujawniły, że frakcja CC3 zawiera sRNA. Zarówno frakcja polisacharydowa jak i zawierająca sRNA w stężeniu 100 μ g/ml powodowały istotny statystycznie wzrost aktywności metabolicznej neuronów oraz stymulowały wzrost neurytów średnio o około 10% i 15% w porównaniu z kontrolą. Ponadto, w hodowli neuronów wystawionych na działanie CC2a (100 μ g/ml) oraz CC3 (50 i 100 μ g/ml) zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu

dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w podłożu zebranym z nad hodowli co sugeruje troficzne działanie badanych substancji. Natomiast frakcja CC1 (36,9% polisacharydów) już w najniższych badanych stężeniach 10 i 25 $\mu\text{g/ml}$ powodowała uszkodzenia błon neuronów, spadek ich żywotności oraz zahamowanie wzrostu neurytów. Z kolei frakcja CC2b (53,2% polisacharydów) w całym zakresie analizowanych stężeń nie powodowała żadnych zmian w komórkach nerwowych. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano dwie frakcje o największym potencjale terapeutycznym tj. frakcję CC2a oraz CC3, których neuroprotektoryjne właściwości oceniono w komórkowych modelach neurodegeneracji indukowanych stresem troficznym, toksycznością z nadpobudzenia oraz stresem oksydacyjnym.

Śmierć komórek nerwowych wywołana deprivacją troficzną ma istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego [Oppenheim 1991, Purves i wsp. 1988] z drugiej strony, w uformowanym układzie nerwowym prowadzi do neurodegeneracji [Sheline i wsp. 2010]. Stąd też tak duże nadzieje pokładane są w wykorzystaniu w terapii chorób neurodegeneracyjnych endogennych czynników neurotroficznych m.in. NGF (czynnik wzrostu nerwów), NT-3 (neurotrofina 3), GDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia glejowego), BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) [Connor i Dragunow 1998]. Powszechnie jest również poszukiwanie egzogennych substancji zdolnych zapobiec lub zmniejszyć śmierć komórek nerwowych lub też zwiększyć skuteczność działania endogennych neurotrofin. W celu określenia potencjału troficznego frakcji CC2a oraz CC3 sprawdzono ich wpływ na żywotność neuronów (test MTT) i wzrost neurytów (Neurite Outgrowth Staining Kit) w warunkach stresu troficznego wywołanego usunięciem z podłoża hodowlanego czynnika troficznego B27. Zabieg ten spowodował spadek żywotności neuronów oraz zahamowanie wzrostu neurytów odpowiednio o 24,4% oraz 25,5%. Przeprowadzone badania wykazały, że frakcja polisacharydowa CC2a nie wpływała na analizowane procesy. Natomiast zawierająca kwasy nukleinowe frakcja CC3 w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$ skutecznie niwelowała negatywne skutki deprivacji troficzej utrzymując aktywność metaboliczną neuronów i wzrost ich neurytów na poziomie obserwowanym w hodowli komórek nerwowych rosnących w podłożu zawierającym suplement czynnika troficznego B27.

Ekscytotoksyczność jest procesem patologicznym, w którym dochodzi do uszkodzenia i/lub śmierci komórek nerwowych w wyniku nadmiernej stymulacji receptorów glutaminianowych przez zwiększone stężenia ich agonistów lub ich długotrwałą aktywację przez umiarkowane stężenia aminokwasów pobudzających [Lucas i Newhouse 1957]. Głównym aminokwasem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym jest glutaminian, który działa poprzez dwie klasy receptorów: 1) glutaminianergiczne receptory jonotropowe (iGluR), do których zalicza się receptory kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), receptory kwasu α -amino-3-

hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) oraz kwasu kainowego; 2) glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR) [Sattler i Tymianski 2001]. Badania nad mechanizmami toksyczności z nadpobudzenia ujawniły, że będące jej następstwem uszkodzenie neuronów odbywa się głównie za pośrednictwem receptorów NMDA [Zhou i wsp. 2015] oraz w mniejszym stopniu w sposób pośredni przy udziale receptorów AMPA [Doble 1999]. Toksyczność z nadpobudzenia jest obserwowana w większości schorzeń neurologicznych [Gorman 2008, Dible 1999, Doble 1999] w konsekwencji analiza wpływu substancji na to zjawisko jest jednym z kluczowych punktów oceny neuroprotekcyjnych właściwości substancji. W omawianych badaniach ekscytotoksyczność wywołano ekspozycją neuronów na aktywatory układu glutaminianergicznego tj. glutaminian (1 mM), NMDA (0,5 mM) oraz AMPA (0,25 mM) zastosowane w stężeniach, które powodowały spadek żywotności neuronów o około 20-25%. Neuroprotekcjne właściwości frakcji CC2a oraz CC3 w warunkach indukowanej toksyczności z nadpobudzenia zbadano przy użyciu testów MTT, LDH oraz Neurite Outgrowth Staining Kit. Obie frakcje skutecznie neutralizowały negatywne skutki ekscytotoksyczności. Przeprowadzone badania wykazały istotny wzrost żywotności neuronów, zmniejszenie uszkodzeń ich błon komórkowych oraz wzrost neurytów po podaniu frakcji w stężeniach 50 i 100 µg/ml razem z analizowanymi agonistami. Najsilniejszy efekt neuroprotekcyny zaobserwowano w przypadku frakcji CC3 (sRNA), która w stężeniu 100 µg/ml całkowicie neutralizowała negatywny wpływ aktywatorów układu glutaminianergicznego na żywotność neuronów i wzrost neurytów.

Stres oksydacyjny to brak równowagi między potencjałem oksydacyjnym a antyoksydacyjnym. Jego przyczyną są reaktywne formy tlenu (RFT) powstające podczas wielu reakcji biochemicznych zachodzących w organizmie. Szkodliwość RFT wynika z ich wysokiej reaktywności. Z uwagi na budowę (niekorzystny stosunek powierzchni do objętości), nasilony metabolizm tlenowy, dużą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz niski poziom antyoksydantów neurony są szczególnie wrażliwymi na działanie RFT. W warunkach stresu oksydacyjnego neurony jako jedne z pierwszych ulegają uszkodzeniu a następnie unicestwieniu co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [Liu i wsp. 2017]. W świetle tych danych nie dziwi zainteresowanie substancjami antyoksydacyjnymi, które mogłyby przeciwdziałać degeneracji neuronów wywołanej RFT. Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC; total antioxidant capacity) frakcji CC2a i CC3 określono przy użyciu Antioxidant Assay Kit, który pozwala porównać TAC badanych substancji z TAC Troloksu (rozpuszczalny w wodzie analog witaminy E). Wykazano, że roztwory badanych frakcji o stężeniach 10 µg/ml posiadają aktywność przeciwutleniającą odpowiadającą 1,278 mM (CC2a) i 0,412 mM (CC3) Troloksu. W kolejnym etapie sprawdzono wpływ badanych frakcji na endogenne poziomy RFT w

hodowli neuronów jak również oceniono zdolność frakcji do usuwania RFT indukowanych w komórkach neuronowych przez podanie 50 μM TBHP (wodoronadtlenek tert-butylu). Oznaczenie wykonano przy użyciu DCFCA Cellular ROS Detection Assay Kit. Wykazano, że frakcje CC2a i CC3 w całym zakresie analizowanych stężeń (10-100 $\mu\text{g/ml}$) nie powodowały wzrostu poziomu RFT w hodowli komórek nerwowych. Jednocześnie badane frakcje powodowały obniżenie poziomu DCF (2,7-dichlorofluoresceina; marker stresu oksydacyjnego) podniesionego po podaniu TBHP o ponad 110%. Najskuteczniej wolne rodniki tlenowe usuwała frakcja CC2a, która zmniejszyła poziom DCF o 19% (10 $\mu\text{g/ml}$), 30% (25 $\mu\text{g/ml}$), 53% (50 $\mu\text{g/ml}$) i 69% (100 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu z komórkami wystawionymi na działanie 50 μM TBHP. W przypadku frakcji CC3, której potencjał antyoksydacyjny był ponad trzykrotnie niższy niż frakcji CC2a, istotne zmniejszenie poziomu DCF (o 15%) w hodowli neuronów zaobserwowano przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Wyższą aktywność antyoksydacyjną frakcji CC2a w porównaniu z CC3 wiązano z większą zawartością polisacharydów (69,2% vs. 10,7%).

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały korzystny wpływ izolowanych z *Cantharellus cibarius* frakcji polisacharydowej CC2a (1,6 mannan rozgałęziony przy O-2 i O-3 z domieszką liniowego 1,3 glukanu i komponentą białkową) oraz zawierającej kwasy nukleinowe frakcji CC3 (sRNA) na żywotność neuronów oraz wzrost neurytów zarówno w warunkach normalnych jak i stresowych. Wykazano znaczny potencjał antyoksydacyjny frakcji CC2a i CC3 oraz ich zdolność do niwelowania negatywnych zmian w komórkach nerwowych wywołanych przez aktywatory układu glutaminianergicznego (glutaminian, NMDA, AMPA). Ponadto, przeprowadzone badania ujawniły troficzne działanie zawierającej sRNA frakcji CC3. Zidentyfikowane neuroprotektoryjne właściwości badanych substancji sugerują możliwość ich wykorzystania w prewencji chorób neurodegeneracyjnych u podłoża których leżą stres oksydacyjny, stres troficzny czy ekscytotoksyczność w tym najpowszechniej występujących choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz stwardnienia zanikowego bocznego [Gorman 2008, Cluskey i Ramsden 2001, Doble 1999]. Niemniej jednak konieczne jest potwierdzenie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania opisanych biopolimerów kurki w badaniach na zwierzętach oraz z udziałem pacjentów.

2. Lemieszek MK, Marques PS, Ribeiro M, Ferreira D, Marques G, Chaves R, Pożarowski P, Nunes FM, Wojciech Rzeski W: Mushrooms small RNAs as natural potential anticancer agents: a closer look at the *Cantharellus cibarius* proapoptotic and antiproliferative effects in colon cancer cells. Food & Function 2019, 10(5), 2739-2751

Liczne badania wykazały, że pojawienie się oraz rozprzestrzenianie się nowotworów nie jest wyłącznie efektem nagromadzenia w komórkach zmian genetycznych w tym m.in.

utrąty/inhibicji genów supresorowych czy też nadekspresji onkogenów [Weber 2007]. Równie istotnym czynnikiem promującym karcynogenezę jest zmniejszenie wrażliwości transformowanych nowotworowo komórek (komórek ze zmienioną/uszkodzoną informacją genetyczną) na sygnały indukujące apoptozę - następstwem czego jest zwiększenie ich żywotności, a w ostateczności ich unieśmiertelnienie [Gerl i Vaux 2005]. Niezależnie lub równolegle ze spadkiem zdolności transformowanych komórek do ulegania apoptozie dochodzi do zaburzeń w przebiegu ich cyklu komórkowego prowadzących do ich niekontrolowanych podziałów, rozprzestrzeniania się w organizmie jak również do utrwalenia zaistniałych, niepożądanych mutacji czy innych modyfikacji genetycznych [Vermeulen i wsp. 2003]. Wiedzę o roli apoptozy oraz mechanizmów regulujących przebieg cyklu komórkowego w procesie karcynogenezy wykorzystano przy tworzeniu cytostatyków – będących najstarszą grupą leków przeciwnowotworowych. W tym kontekście zrozumiałym jest, że hamowanie niekontrolowanych podziałów komórek nowotworowych (działanie antyproliferacyjne) i/lub indukowanie programowanej śmierci komórek nowotworowych (aktywność proapoptotyczna) jest jedną z głównych i najlepiej udokumentowanych strategii chemoprewencji [Bonovas i wsp. 2008, Sporn i Suh 2000].

Głównym celem prezentowanych badań była ocena chemoprewencyjnych właściwości kwasów nukleinowych izolowanych z *Cantharellus cibarius* względem komórek raka okrężnicy obejmująca identyfikację mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wykryte właściwości przeciwnowotworowe analizowanych biopolimerów ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego oraz programowaną śmierć komórek.

Realizację głównego celu poprzedziły badania przesiewowe polisacharydów oraz cząsteczek sRNA izolowanych z owocników wybranych, jadalnych grzybów podstawkowych przeprowadzone pod kątem zdolności analizowanych biopolimerów do hamowania podziałów ludzkich komórek raka okrężnicy linii LS180 i HT-29 jak również ich wpływu na ludzkie komórki nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoTr. Wyniki testu MTT jednoznacznie wykazały wyższą aktywność antyproliferacyjną frakcji zawierających sRNA niż frakcji polisacharydowych otrzymanych z poszczególnych gatunków grzybów podstawkowych. Szczególnie skuteczną w hamowaniu podziałów komórek raka okrężnicy okazała się być zawierająca sRNA frakcja CC3 izolowana z *C. cibarius*. Wartości IC50 (stężenia powodujące zahamowanie proliferacji komórek o 50% w porównaniu z kontrolą) wyznaczone dla frakcji CC3 na podstawie wyników testu MTT wykonanych na komórkach raka okrężnicy linii LS180 i HT-29 wyniosły odpowiednio 2,6 µg/ml oraz 11,1 µg/ml. Przeprowadzona przy użyciu testu LDH ocena cytotoksyczności wykazała, że badane cząsteczki sRNA w całym zakresie analizowanych stężeń tj. od 1 do 250 µg/ml nie uszkadzały błon komórkowych

komórek nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoTr. Ujawnione korzystne właściwości frakcji CC3 zdecydowały o jej wyborze do dalszych analiz. Badania kontynuowano jedynie na komórkach raka okrężnicy linii LS180 z uwagi na stwierdzoną większą od komórek linii HT-29 wrażliwość na działanie analizowanych grzybowych sRNA, sugerującą jednocześnie związek przeciwnowotworowego działania badanych biopolimerów z obecnością funkcjonalnego białka p53. Analizie poddano kluczowe z punktu widzenia onkogenezy procesy tj. regulację i przebieg cyklu komórkowego oraz śmierć komórki.

W pierwszej kolejności zweryfikowano ujawnione w teście MTT antyproliferacyjne właściwości CC3 za pomocą bardziej specyficznych oznaczeń tj. testu BrdU oraz analizy cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej. Po 48 godz. inkubacji komórek LS180 z CC3 w stężeniach od 10 do 250 $\mu\text{g/ml}$ odnotowano zahamowanie syntezy DNA ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$), które korespondowało z akumulacją komórek w fazie G0/G1 cyklu komórkowego.

Wyniki testu BrdU oraz cytometrii przepływowej wskazały na punkt restrykcyjny G1/S jako kluczowy z perspektywy chemoprewencyjnych właściwości frakcji CC3. W celu pełniejszego zrozumienia mechanizmu leżącego u podstaw antyproliferacyjnych właściwości sRNA kurki zbadano jego wpływ na ekspresję białek regulujących przejście komórek z fazy G1 do S cyklu komórkowego. Warto w tym miejscu wspomnieć, że zaburzenia ekspresji wspomnianych białek są jedną z częstszych przyczyn nowotworzenia [Vermeulen i wsp. 2003, Izawa i wsp. 2002, McKay i wsp. 2002]. W fazie G1 istotne znaczenie ma interakcja Cykliny D1 z kinazami zależnymi od cyklin CDK4 i CDK6. Powstanie kompleksu Cyklina D1-CDK4/CDK6 odpowiedzialnego za fosforylację białka Rb jest niezbędne do zapoczątkowania replikacji DNA [Vermeulen i wsp. 2003]. Białko Rb w formie nieufosforylowanej jest negatywnym regulatorem przejścia z fazy G1 do S dzięki zdolności wiązania się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F. Fosforylacja Rb (Ser 807/811) powoduje jego dysocjację od E2F wzbudzając ekspresją podległych mu genów, których białkowe produkty umożliwiają replikację DNA. Jest to jednocześnie sygnał do przejścia komórki z fazy G1 do S cyklu [Ohtani 1999]. Istotną rolę w modulacji funkcjonowania kompleksu Cyklina D1-CDK4/CDK6 odgrywają CKI (inhibitory kinaz zależnych od cyklin). Białka te należą do dwóch rodzin INK4 (p15, p16, p18, p19) i CIP/KIP (p53, p27 i p21). INK4 wchodzi w interakcje tylko z CDK4 i CDK6, uniemożliwiając ich połączenie z Cykliną D i powstanie aktywnego kompleksu. Inhibitory z rodziny CIP/KIP nie są tak specyficzne i mogą tworzyć kompleksy ze wszystkimi typami CDK [Vermeulen i wsp. 2003, McKay i wsp. 2002].

Analizę ekspresji białek nadzorujących punkt restrykcyjny G1/S przeprowadzono techniką Western blotting w komórkach raka okrężnicy linii LS180 po 24, 36 i 48 godz. inkubacji z CC3 w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$. Zaobserwowano zależne od czasu ekspozycji oraz stężenia

sRNA zahamowanie ekspresji Cykliny D1 oraz CDK4 i CDK6 a tym samym zmniejszoną aktywność kompleksu odpowiedzialnego za fosforylację białka Rb. Dezaktywację kompleksu potwierdził spadek fosforylacji Rb w pozycji Ser 807/811. Wykazano również zależne od czasu ekspozycji oraz stężenia sRNA nasilenie ekspresji inhibitorów p21 oraz p53. Nie zaobserwowano natomiast wpływu frakcji CC3 na poziom ekspresji inhibitorów p16 oraz p27. Uzyskane wyniki potwierdziły rezultaty poprzednich analiz udowadniając zdolność frakcji CC3 do zatrzymania komórek linii LS180 w fazie G0/G1 cyklu komórkowego poprzez modulację poziomu: p21, p53, Cykliny D1, CDK4, CDK6 oraz p-Rb.

Obok analizy cyklu komórkowego zbadano również zdolność sRNA *C. cibarius* do indukcji apoptozy, która jest jednym z kluczowych mechanizmów obrony przed nowotworami ponieważ pozwala na usunięcie większości transformowanych komórek pojawiających się w organizmie [Gerl i Vaux 2005]. Barwienie z wykorzystaniem jodku propidyny oraz Hoechstu różnicujące komórki apoptotyczne od nekrotycznych wykazało, że po 48 godz. ekspozycji komórek linii LS180 na frakcję CC3 w stężeniach 50, 100 i 250 µg/ml dochodzi do indukcji programowanej śmierci komórek. Uzyskane wyniki potwierdzono za pomocą Cell Death Detection ELISA, która umożliwia pomiar ilości nukleosomów (produkty degradacji DNA, charakterystyczne dla komórek apoptotycznych). Przeprowadzone badania wykazały nasilenie fragmentacji DNA w komórkach LS180 wystawionych na działanie badanych biopolimerów. Ilość nukleosomów po podaniu frakcji CC3 w stężeniach 50, 100 i 250 µg/ml wzrosła odpowiednio o 24%, 44% oraz 63% w porównaniu z kontrolą. Z medycznego punktu widzenia korzystne jest by substancja stosowana w terapii nowotworów indukowała apoptozę nie zaś nekrozę, ponieważ podanie choremu leku wywołującego nekrozę niesie za sobą groźbę powikłań będących następstwem reakcji zapalnych towarzyszących martwicy. Dlatego też, zidentyfikowane proapoptotyczne właściwości zawierającej sRNA frakcji CC3 są niezwykle cenne z punktu widzenia chemoprewencji nowotworów.

Z uwagi na wykrytą zdolność CC3 do stymulacji ekspresji białek p21 oraz p53 odpowiedzialnych zarówno za przebieg cyklu komórkowego jak i apoptozę [Chen 2016, Karimian i wsp. 2016] zweryfikowano ich znaczenie dla chemoprewencyjnych właściwości analizowanego sRNA. W tym celu wykorzystując siRNA specyficzne dla omawianych białek wyciszono ich ekspresję w komórkach LS180 a następnie sprawdzono antyproliferacyjne (test BrdU) oraz proapoptotyczne (Cell Death Detection ELISA) właściwości frakcji CC3 zastosowanej w stężeniach 50 i 100 µg/ml. Test BrdU wykazał znaczny spadek aktywności antyproliferacyjnej CC3 w komórkach z wyciszoną ekspresją białek p53 oraz p21. Szczególnie silny wpływ na zdolność CC3 do hamowania syntezy DNA odnotowano w komórkach LS180 poddanych transfekcji p53 siRNA. W obu analizowanych stężeniach aktywność antyproliferacyjna CC3 zmniejszyła się o około 60%. W przypadku komórek

LS180 z wyciszonym p21 zahamowanie syntezy DNA pod wpływem CC3 spadło średnio o 45%. Należy przy tym zaznaczyć, że proces transfekcji pobudził podziały komórek LS180 o 7,5% (p21 siRNA) oraz 9,1% (p53 siRNA). Niemniej jednak przeprowadzone badania wykazały, że zdolność frakcji CC3 do modulacji ekspresji p21 oraz p53 ma kluczowe znaczenie dla jej antyproliferacyjnych właściwości. Analiza śmierci komórek ujawniła, że wyciszenie ekspresji p21 prowadzi do apoptozy komórek LS180 oznaką czego był wzrost ilości nukleosomów o 10,7% w porównaniu z kontrolą. Ponadto, odnotowano nasilenie fragmentacji DNA po podaniu CC3 w komórkach raka okrężnicy z wyciszonym p21 odpowiednio o 12,3% (50 µg/ml) oraz 13,0% (100 µg/ml) co sugeruje możliwość interakcji badanego sRNA z p21 siRNA oraz synergizm ich działań. Z drugiej strony wykazano, że transfekcja p53 siRNA uniemożliwia frakcji CC3 indukcję apoptozy w komórkach LS180. W konsekwencji potwierdzając kluczowe znaczenie p53 dla proapoptotycznych właściwości sRNA *C. cibarius*.

Podsumowując przeprowadzone badania wykazały chemoprewencyjne właściwości frakcji zawierających sRNA izolowanych z wybranych owocników grzybów jadalnych z gromady *Basidiomycota* w tym z gatunku *Cantharellus cibarius*. Frakcje sRNA skutecznie hamowały podziały ludzkich komórek raka okrężnicy linii LS180 i HT-29 nie powodując żadnych negatywnych zmian w ludzkich komórkach nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoTr. Należy podkreślić, że antyproliferacyjne działanie frakcji sRNA było wyższe niż frakcji polisacharydowych pozyskiwanych z tych samych gatunków grzybów. Z uwagi na wysoki potencjał terapeutyczny jak również na dużą popularność owocników *C. cibarius* dalsze badania skupiły się na identyfikacji mechanizmów przeciwnowotworowego działania izolowanej z kurki i zawierającej sRNA frakcji CC3. Wykazano, że za obserwowane w komórkach raka okrężnicy linii LS180 antyproliferacyjne właściwości CC3 odpowiada jej zdolność do zatrzymywania cyklu komórkowego w fazie G0/G1 poprzez modulację ekspresji Cykliny D1, CDK4, CDK6 a w szczególności p21 i p53. Ponadto, sRNA *C. cibarius* indukowało w komórkach raka okrężnicy apoptozę na drodze zależnej od p53. Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał chemoprewencyjny kwasów nukleinowych kurki (frakcja CC3) względem komórek raka okrężnicy u podłoża, którego leży zarówno plejotropowość (efekt antyproliferacyjny oraz proapoptotyczny) jak i wysoka selektywność działania (brak negatywnego wpływu na komórki prawidłowe nabłonka jelita grubego). Otrzymane wyniki sugerują możliwość wykorzystania sRNA *C. cibarius* w prewencji i leczeniu raka okrężnicy w szczególności na wczesnych etapach rozwoju choroby gdy nie doszło jeszcze do mutacji w genie kodującym p53. Oczywiście prezentowane wyniki wymagają weryfikacji w badaniach na zwierzętach oraz z udziałem pacjentów, niemniej jednak stanowią silną przesłankę do rozpoczęcia takich analiz.

3. Lemieszek MK, Nunes FM, Marques G, Rzeski W: *Cantharellus cibarius* branched mannans inhibits colon cancer cells growth by interfering with signals transduction in NF- κ B pathway. International Journal of Biological Macromolecules 2019, 134, 770-780

Badania ostatnich lat wykazały, że zachodzące w komórkach nowotworowych zmiany genetyczne, epigenetyczne i funkcjonalne nie są jedynymi procesami zachodzącymi w trakcie karcynogenezy. Udowodniono, że nowotwory wykorzystują do swojego rozwoju i rozprzestrzeniania się naturalne procesy zachodzące w organizmie, a w szczególności stan zapalny [Coussens i Werb 2002]. Za zdolność nowotworów do wytwarzania stanu zapalnego i wykorzystywania zjawisk mu towarzyszących do swojej progresji odpowiedzialny jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B [Terzić i wsp. 2010, Karin 2006, Greten i Karin 2004]. Poza prozapalnym działaniem NF- κ B wspiera również transformację nowotworową poprzez stymulację proliferacji komórek, hamowanie apoptozy oraz zwiększanie inwazyjności komórek nowotworowych [Naugler i Karin 2008, Karin 2006]. Wykazano również, że NF- κ B jest odpowiedzialny za oporność komórek nowotworowych na chemioterapię i radioterapię [Wang i wsp. 1996]. W tym kontekście jak również biorąc pod uwagę dietozależny charakter nowotworów jelita grubego [Thanikachalam i Khan 2019] obiecującą strategią terapeutyczną wydaje się być ich prewencja polegająca na spożywaniu produktów/składników o właściwościach przeciwzapalnych (naturalne inhibitory NF- κ B).

Głównym celem prezentowanych badań była ocena chemoprewencyjnych właściwości polisacharydów izolowanych z *Cantharellus cibarius* w komórkowym modelu raka okrężnicy ze szczególnym uwzględnieniem wpływu badanych substancji na przekazywanie sygnałów w szlaku NF- κ B jak również na procesy nadzorowane przez analizowany czynnik transkrypcyjny tj. apoptozę, cykl komórkowy oraz migrację.

Chemoprewencyjne właściwości trzech frakcji polisacharydowych (CC1, CC2a, CC2b) izolowanych z pieprznika jadalnego oceniono w hodowli ludzkich komórek nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoN oraz względem ludzkich komórek raka okrężnicy linii LS180. Cytotoksyczność substancji oraz ich wpływ na proliferację komórek zbadano testami LDH i BrdU odpowiednio po 24 i 48 godz. ekspozycji komórek na badane substancje w stężeniach od 10 do 250 μ g/ml. Wyniki testu LDH ujawniły wysoką cytotoksyczność frakcji CC1 względem komórki nabłonka jelita grubego przy jednoczesnym braku wpływu na komórki raka okrężnicy. Z drugiej strony pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wykazał wysoką selektywność działania frakcji CC2a oraz CC2b, które w stężeniach 100 i 250 μ g/ml wyraźnie zmniejszały poziom LDH w podłożu hodowlanym zebrany z komórek nabłonka (efekt troficzny) jednocześnie działając cytotoksycznie na komórki raka okrężnicy. Wartość CC50 (tj. stężenia powodującego 50% efekt cytotoksyczny w porównaniu z kontrolą) dla frakcji CC2a i CC2b wyniosła odpowiednio 1957 i 6110 μ g/ml. Test BrdU

wykazał zahamowanie proliferacji zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych po podaniu frakcji CC2b w stężeniach 50, 100 i 250 $\mu\text{g/ml}$, niemniej jednak bardziej wrażliwe na działanie badanej substancji były komórki raka okrężnicy ($\text{IC}_{50\text{CCD841CoN}} = 1098 \mu\text{g/ml}$; $\text{IC}_{50\text{LS180}} = 560 \mu\text{g/ml}$). Odmienny efekt zaobserwowano w przypadku frakcji CC1, która w stężeniach 100 i 250 $\mu\text{g/ml}$ stymulowała proliferację komórek nabłonka jelita grubego nie wpływając na syntezę DNA w komórkach raka okrężnicy. Najkorzystniejszy efekt z terapeutycznego punktu widzenia zaobserwowano w przypadku frakcji CC2a, która w całym zakresie analizowanych stężeń skutecznie hamowała proliferację komórek raka okrężnicy ($\text{IC}_{50\text{LS180}} = 206 \mu\text{g/ml}$) nie wpływając na podziały komórek nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoN. Korzystne właściwości frakcji CC2a oraz jej wysoką selektywność działania potwierdzono w analizie mikroskopowej preparatów uzyskanych po wybarwieniu metodą May-Grünwalda-Giemsy komórek CCD841 CoN oraz LS180 inkubowanych przez 48 godz. z CC2a w stężeniach 100 i 250 $\mu\text{g/ml}$. Przeprowadzone badania wykazały, że największy potencjał chemoprewencyjny posiada frakcja CC2a, która najskuteczniej eliminowała komórki raka okrężnicy powodując zarówno uszkodzenie ich błon komórkowych, jak i zahamowanie ich podziałów przy jednoczesnym braku negatywnego oddziaływania na komórki prawidłowe nabłonka jelita grubego.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu frakcji polisacharydowej CC2a na przekazywanie sygnałów w szlaku NF- κ B i w konsekwencji na procesy przez niego nadzorowane tj. na wzrost, podziały, przeżycie oraz migrację komórek raka okrężnicy. U ssaków rodzinę białek NF- κ B tworzy pięć czynników transkrypcyjnych: p65/RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) i NF- κ B2 (p52). W warunkach fizjologicznych NF- κ B występuje w cytoplazmie komórek w postaci nieaktywnego kompleksu składającego się z trzech podjednostek: p50, p65 oraz cząsteczki inhibitora I κ B α (najpopularniejsza kombinacja). W wyniku aktywacji na drodze klasycznej (najistotniejsza z punktu widzenia transformacji nowotworowej), I κ B α ulega fosforylacji w pozycjach Ser32 i Ser36, która znakuje cząsteczkę inhibitora do degradacji w proteasomie jednocześnie prowadząc do uwolnienia kompleksu p50-p65. Uwolniony czynnik transkrypcyjny NF- κ B po uprzedniej fosforylacji w pozycji Ser536 przemieszcza się do jądra komórkowego gdzie wiąże się promotorami podległych mu genów. Za wspomnianą fosforylację I κ B α odpowiedzialne są kinazy inhibitorów κ B tj. IKK, które tworzą dwie podjednostki enzymatyczne IKK α i IKK β , oraz podjednostkę regulatorową IKK γ . Chociaż IKK α and IKK β współpracują przy fosforylacji I κ B α , kluczową rolę w klasycznej drodze aktywacji NF- κ B odgrywa IKK β , którego aktywność katalityczna wymaga fosforylacji seryn w pozycjach 177 i 181 [Christian i wsp. 2016, Sakamoto i wsp. 2009, Moynagh 2005]. Wpływ polisacharydów kurki na przekazywanie sygnałów w szlaku NF- κ B zbadano po 6 i 24 godz. inkubacji komórek LS180 z frakcją CC2a w stężeniach 50 i 100

$\mu\text{g/ml}$ za pomocą techniki Western blotting. Przeprowadzone analizy wykazały, że frakcja polisacharydowa CC2a nie wpływała na poziom ekspresji IKK β , z drugiej jednak strony stymuluje jego fosforylację w pozycji Ser177 (wzrost odpowiednio o 30% oraz 71% po 6 i 24 godz. inkubacji komórek z 100 $\mu\text{g/ml}$ CC2a). Obserwowany efekt korespondował z wywołanym przez CC2a zwiększeniem poziomu fosforylacji I κ B α w pozycji Ser32 (wzrost odpowiednio o 58% oraz 40% po 6 i 24 godz. inkubacji komórek z 100 $\mu\text{g/ml}$ CC2a). Pomimo odnotowanej stymulacji fosforylacji I κ B α , nie odnotowano zmian w poziomie tego białka, co sugeruje zaburzenie przez badaną frakcję procesu degradacji inhibitora. Przeprowadzone badania wykazały również akumulację NF- κ B w cytoplazmie komórek LS180 po 24 godz. ekspozycji na badaną frakcję (wzrost o 28% przy 50 $\mu\text{g/ml}$ CC2a oraz o 30% przy 100 $\mu\text{g/ml}$ CC2a), co mogło być efektem wspomnianych zaburzeń degradacji inhibitora I κ B α . Niemniej jednak, obserwowany w komórkach traktowanych CC2a spadek poziomu fosforylacji NF- κ B w pozycji Ser536, który to proces jest odpowiedzialny za translokację NF- κ B do jądra komórkowego mógł także przyczynić się do akumulacji czynnika transkrypcyjnego w cytoplazmie, wyjaśnia również zmniejszenie poziomu NF- κ B w jądrze komórek LS180 (spadek translokacji odpowiednio o 31% i 34% po 24 godz. inkubacji komórek z CC2a w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$). Wywołane przez frakcję CC2a zaburzenie fosforylacji NF- κ B w pozycji Ser536, z uwagi na jej znaczenie, wydaje się być jednym z kluczowych mechanizmów działania badanych polisacharydów. Upośledzenie przekazywania sygnałów w szlaku NF- κ B w komórkach LS180 po ekspozycji na frakcję CC2a zweryfikowano metodą immunofluorescencji. Przeprowadzone oznaczenie potwierdziło wzrost poziomu P-IKK β (Ser177) i P-I κ B α (Ser32) oraz spadek poziomu P-NF- κ B (Ser536) jak również zahamowanie translokacji NF- κ B do jądra w komórkach linii LS180 inkubowanych przez 24 godz. z frakcją CC2a w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$.

Znaczenie czynnika NF- κ B wynika z jego wpływu na ekspresję genów odpowiedzialnych m.in. za niekontrolowane podziały komórek nowotworowych i ich nieśmiertelność, oporność na leki, jak również za indukcję stanu zapalnego czy angiogenezy, które to procesy promują rozwój nowotworów [Naugler i Karin 2008, Karin 2006]. Ponieważ w komórkach raka okrężnicy po ekspozycji na rozgałęzione glukomannany *C. cibarius* zaobserwowano silne zahamowanie fosforylacji NF- κ B i będący jego następstwem spadek translokacji czynnika z cytoplazmy do jądra komórkowego, sprawdzono wpływ frakcji CC2a na ekspresję genów podległych NF- κ B jak również poziom ich produktów. Badania przeprowadzono przy użyciu odpowiednio techniki RealTime PCR oraz Western blotting. Analizie poddano molekuly zaangażowane w proliferację komórek (Cyklina D1, c-Myc), apoptozę (Bax, surwiwina, Bcl-2) oraz przerzutowanie (MMP-9) [Naugler i Karin 2008, Karin 2006]. Badania wykazały znaczne zahamowanie ekspresji wszystkich badanych genów i prawie wszystkich

analizowanych białek (z wyjątkiem Bax) w komórkach raka okrężnicy po 24 godz. ekspozycji na frakcję CC2a w stężeniach 50 i 100 µg/ml. Spośród genów najbardziej wrażliwe na działanie frakcji CC2a okazały się być geny odpowiedzialne za proliferację komórek (*CCND1* i *MYC*), których ekspresja pod wpływem 100 µg/ml CC2a zmniejszyła się o około 40%. Najmniej podatnym na działanie badanych polisacharydów okazał się być gen *BAX*, którego ekspresja zmniejszyła się o 7% i 15% w odpowiedzi na 50 i 100 µg/ml CC2a. Podobnie jak w przypadku analizy ekspresji genów frakcja CC2a najsilniej hamowała ekspresję Cykliny D1 (produkt translacji genu *CCND1*) zmniejszając jej poziom odpowiednio o 42% (50 µg/ml CC2a) i 51% (100 µg/ml CC2a). Znaczne obniżenie ekspresji po podaniu analizowanych polisacharydów zaobserwowano również w przypadku cMyc i Bcl2 (produkty translacji genów *MYC* i *BCL2*), których poziom po podaniu 50 i 100 µg/ml CC2a wyniósł odpowiednio 73% i 75% oraz 64% i 58%. Nie zaobserwowano natomiast wpływu badanej frakcji na ekspresję proapoptotycznego białka Bax.

Obserwowane w komórkach LS180 po ekspozycji na CC2a znaczne zmniejszenie poziomu ekspresji kontrolowanych przez NF-κB białek Cykliny D1 oraz cMyc korespondowało z wynikami testu BrdU i potwierdziło antyproliferacyjne właściwości badanej substancji. Niemniej jednak dla pełnego obrazu sytuacji zbadano w komórkach raka okrężnicy po 24 godz. inkubacji z frakcją CC2a w stężeniach 50 i 100 µg/ml przebieg cyklu komórkowego. Analiza przy użyciu cytometru przepływowego wykazała zależną od dawki akumulację komórek LS180 w fazie G0/G1 oraz S cyklu komórkowego jak również istotne zmniejszenie ilości komórek w fazie G2/M. W komórkach wystawionych na działanie 100 µg/ml CC2a odnotowano zwiększenie ilości komórek w fazie G0/G1 oraz S odpowiednio o 11,3% i 4,8% w porównaniu z kontrolą oraz spadek ilości komórek w fazie G2/M z poziomu 33,8% (kontrola) do 14,3%. Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły antyproliferacyjne właściwości frakcji polisacharydowej CC2a.

Ponieważ frakcja CC2a silnie hamowała kontrolowaną przez NF-κB ekspresję MMP9 (metaloproteinaza wiązana ze zdolnością nowotworów do przerzutowania) [Naugler i Karin 2008, Karin 2006] sprawdzono wpływ badanych polisacharydów na migrację komórek raka okrężnicy w teście rysy (wound assay). Po 24 godz. inkubacji komórek LS180 z frakcją CC2a w stężeniach 50 i 100 µg/ml zaobserwowano zmniejszenie ilości komórek migrujących na obszar rysy odpowiednio o 65,3% i 72,3%. Uzyskane wyniki sugerują związek między obserwowaną aktywnością antymigracyjną CC2a a zdolnością badanej frakcji do hamowania przekazywania sygnałów w szlaku NF-κB.

Zarejestrowane w komórkach LS180 traktowanych CC2a zahamowanie ekspresji sprzyjających przeżyciu komórek nowotworowych białek: Bcl-2 oraz Surwiwiny przy braku zmian w poziomie proapoptotycznego białka Bax skłoniło mnie do rozszerzenia analizy o

bezpośrednią ocenę zdolności omawianych polisacharydów do indukcji apoptozy. Za pomocą Cell Death Detection ELISA wykazano, że w komórkach raka okrężnicy inkubowanych przez 24 godz. z frakcją CC2a dochodzi do indukcji programowanej śmierci komórek oznaką czego było zwiększenie ilości nukleosomów o 21% (50 µg/ml) oraz 32% (100 µg/ml) w porównaniu z kontrolą. Wykryte proapoptotyczne właściwości CC2a również można powiązać z wywoływaniem przez badaną frakcję zmianami w szlaku NF-κB.

Podsumowując przeprowadzone badania wykazały chemoprewencyjne działania izolowanych z *C. cibarius* polisacharydów (frakcja CC2a; 1,6 mannan rozgałęziony przy O-2 i O-3 z domieszką liniowego 1,3 glukanu i komponentą białkową). Frakcja CC2a skutecznie hamowała podziały komórek raka okrężnicy linii LS180 zatrzymując je w fazie G0/G1 oraz S cyklu komórkowego, wyraźnie ograniczała ich migrację oraz indukowała ich śmierć zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy. Jednocześnie nie zaobserwowano żadnych negatywnych zmian w żywotności, podziałach czy morfologii komórek nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoN wystawionych na działanie badanych polisacharydów. U podłoża przeciwnowotworowych właściwości frakcji polisacharydowej CC2a leżało wyciszenie przekazywania sygnałów w szlaku NF-κB a w szczególności hamowanie degradacji inhibitora IκBα, osłabienie fosforylacji aktywującej czynnik transkrypcyjny NF-κB i będące następstwem tego zmniejszenie translokacji NF-κB do jądra komórkowego oraz zmniejszenie ekspresji podległych NF-κB genów *BAX*, *BCL2*, *CCND1*, *MMP9*, *MYC*, *BIRC5* oraz ich białkowych produktów (z wyjątkiem proapoptotycznego białka Bax). Uzyskane wyniki potwierdziły chemoprewencyjne właściwości izolowanych z kurki rozgałęzionych glukomannanów wskazując na możliwość ich przyszłego wykorzystania w prewencji/leczeniu nowotworów jelita grubego jak również innych schorzeń, w których rozwoju kluczową rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny NF-κB a w szczególności tych chorób w których induktorem i promotorem jest stan zapalny [Lawrence 2009].

4. Lemieszek MK, Nunes FM, Rzeski W: Branched mannans from the mushroom *Cantharellus cibarius* enhance the anticancer activity of natural killer cells against human cancers of lung and colon. Food & Function 2019, 10(5), 5816-5826

Jedną z najnowszych strategii leczenia nowotworów jest immunoterapia, której istotą jest stymulacja układu odpornościowego chorego celem usprawnienia oraz wzmocnienia jego naturalnych mechanizmów obronnych zwłaszcza zdolności rozpoznawania oraz eliminowania komórek transformowanych nowotworowo [Velcheti i Schalper 2016]. Z uwagi na specyficzne właściwości szczególnie użyteczne z punktu widzenia immunoterapii nowotworów wydają się być komórki NK (natural killer). Pierwotnie zostały one opisane jako limfocyty cytotoksyczne o istotnym znaczeniu dla mechanizmów odporności wrodzonej.

Stanowią one bowiem pierwszą linię obrony organizmu przed nowotworami oraz infekcjami [Vivier i wsp. 2011]. Unikatowość limfocytów NK wynika z ich zdolności do spontanicznego (bez uprzedniej immunizacji) zabijania komórek docelowych (zainfekowanych lub transformowanych nowotworowo) [Miller 2002]. Liczne badania potwierdziły kluczową rolę komórek NK w zapobieganiu rozwojowi nowotworów jak również w hamowaniu przerzutów już istniejących zmian [Kim i wsp. 2019, Albertsson i wsp. 2003, Imai i wsp. 2000]. Ponadto, wielu badaczy wskazuje na związek pomiędzy mniejszą aktywnością komórek NK a większym ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej [Villegas i wsp. 2002, Ishigami i wsp. 2000]. Informacje te sugerują możliwość wykorzystania procesu aktywacji komórek NK do zapobiegania rozwojowi nowotworów. By to urzeczywistnić konieczne jest znalezienie selektywnych stymulatorów, które w odróżnieniu od egzogennych stymulin (IL-2 czy IL-12) po podaniu nie zaburzałyby homeostazy organizmu.

Głównym celem badania było określenie immunomodulacyjnych właściwości frakcji polisacharydowych izolowanej z *Cantharellus cibarius* poprzez zbadanie ich wpływu na żywotność i proliferację komórek NK oraz ich zdolność do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych raka płuca i raka okrężnicy.

Bezpośredni wpływ trzech frakcji polisacharydowych z *C. cibarius* (CC1, CC2a, CC2b) na żywotność, aktywność metaboliczną oraz proliferację komórek NK zbadano w hodowli ludzkich komórek linii NK92 przy użyciu odpowiednio testów LDH, MTT i BrdU po 24 lub 48 godz. ekspozycji na badane substancje w stężeniach od 10 do 250 $\mu\text{g/ml}$. Test LDH z jednej strony wykazał zależną od dawki cytotoksyczność frakcji CC1 oraz frakcji CC2b, z drugiej zaś ujawnił korzystny wpływ frakcji CC2a na integralność błon komórkowych limfocytów NK92. Podobnie oznaczenie MTT wykazało znaczne zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek NK92 po inkubacji z CC1 i CC2b, analizowane frakcje w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ powodowały spadek żywotności komórek odpowiednio o 100% oraz 36%. Natomiast frakcja CC2a w sposób zależny od dawki zwiększała żywotność komórek NK92 powodując wzrost ich ilości od 15% (CC2a 10 $\mu\text{g/ml}$) do 51% (CC2a 250 $\mu\text{g/ml}$). Przeprowadzona przy użyciu testu BrdU ocena wpływu frakcji polisacharydowych na proliferację komórek wykazała zahamowanie syntezy DNA w komórkach NK92 po inkubacji z CC1, jednocześnie ujawniała istotną statystycznie stymulację podziałów limfocytów po ekspozycji na frakcję CC2a w stężeniach 100 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 28%) i 250 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 35%). Nie zaobserwowano natomiast wpływu frakcji CC2b na podziały komórek NK92. Wyniki testów LDH, MTT i BrdU jednoznacznie wykazały, że spośród trzech frakcji polisacharydowych korzystny wpływ na komórki NK w całym zakresie analizowanych stężeń wywiera frakcja CC2a zawierająca rozgałęzione glukomannany. W konsekwencji dalszym analizom została poddana jedynie frakcja CC2a.

By zrozumieć korzystny wpływ polisacharydów kurki na żywotność i podziały komórek NK92, zbadano wpływ frakcji CC2a na ekspresję kluczowych komponent szlaków odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów z receptora dla IL-2, która to cytokina ma istotne znaczenie dla proliferacji oraz aktywności cytotoksycznej badanych limfocytów [Romee i wsp. 2014]. Analizę ekspresji genów oraz ich białkowych produktów (gen/białko: *AKT1*/Akt, *CREB1*/CREB, *MAPK3*/Erk1, *MAPK14*/p38) przeprowadzono po 24 godz. inkubacji komórek NK92 z frakcją CC2a w stężeniach 50 i 100 µg/ml przy użyciu odpowiednio techniki RealTime PCR oraz Western blotting. RealTime PCR wykazał zależne od dawki nasilenie ekspresji genów *AKT1*, *CREB1*, *MAPK3*, *MAPK14* po ekspozycji komórek NK92 na CC2a. Najbardziej wrażliwym na działanie CC2a okazał się być gen *MAPK14*, którego poziom mRNA po podaniu badanej frakcji w stężeniach 50 i 100 µg/ml wzrósł odpowiednio 1,62-raza oraz 2,15-raza. Wyraźne zwiększenie ekspresji w odpowiedzi na badane polisacharydy zaobserwowano również w przypadku genu *MAPK3*, którego poziom wzrósł o 19% (CC2a 50 µg/ml) oraz 49% (CC2a 100 µg/ml). Najmniej podatnym na działanie badanej frakcji okazał się być gen *AKT1*, którego ekspresja zwiększyła się o 16% jedynie w komórkach NK92 traktowanych 100 µg/ml CC2a. Wyniki RealTime PCR korespondowały z analizą ekspresji białek przeprowadzoną metodą Western blotting, która wykazała zależne od dawki zwiększenie poziomu CREB, Erk1/2 i p38 w komórkach inkubowanych z CC2a, przy jednoczesnym stałym poziomie ekspresji Akt. Podobnie jak w przypadku genów, najsilniejsze zmiany zaobserwowano w przypadku białek p38 oraz Erk1/2, których ekspresja wzrosła odpowiednio 1,9-raza i 1,81-raza w odpowiedzi na 50 µg/ml CC2a oraz 2,08-raza i 1,94-raza w odpowiedzi na 100 µg/ml CC2a.

By sprawdzić czy obserwowane w komórkach NK92 inkubowanych z frakcją CC2a nasilenie ekspresji Erk1/2 i p38 jest odpowiedzialne za immunomodulacyjne właściwości analizowanych polisacharydów, sprawdzono wpływ badanej frakcji na żywotność i proliferację komórek NK w obecności specyficznych inhibitorów analizowanych kinaz. Badanie przeprowadzono po 48 godz. inkubacji komórek linii NK92 z CC2a w stężeniach od 10 do 250 µg/ml podanych z lub bez inhibitorów: SL372 (inhibitor Erk), SB202190 (inhibitor p38). Inhibitory zostały użyte w stężeniu 10 µM powodującym zmniejszenie żywotności oraz proliferacji komórek NK92 średnio o 15%. Wyniki testów MTT i BrdU wykazały znaczne osłabienie korzystnych właściwości analizowanych polisacharydów przez inhibitory kinaz. Zdolność frakcji CC2a do stymulacji wzrostu i podziałów komórek NK w obecności SL372 zmniejszyła się średnio o 25% (test MTT) i 13% (test BrdU) a w obecności SB202190 odpowiednio o 33% (test MTT) i 16% (test BrdU). Uzyskane wyniki wykazały istotne znaczenie kinazy Erk1/2 oraz p38 dla immunomodulacyjnych właściwości analizowanych polisacharydów.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu polisacharydów *C. cibarius* na aktywność cytotoksyczną komórek NK względem ludzkich komórek raka okrężnicy (LS180), raka płuca (A549), nabłonka jelita grubego (CCD841 CoN) oraz nabłonka oskrzeli (NL20). Badania zostały przeprowadzone po 24 i 48 godz. inkubacji komórek z frakcją CC2a w stężeniach od 10 do 250 $\mu\text{g/ml}$ przy użyciu odpowiednio testów LDH i MTT. Równoległe z analizą w kokulturach tj. komórki NK92 + komórki docelowe (nowotworowe lub prawidłowe), zbadano wpływ frakcji CC2a na integralność błon komórkowych oraz aktywność metaboliczną samych komórek docelowych. Przeprowadzone badania wykazały wysoką selektywność działania analizowanych polisacharydów, które w całym zakresie analizowanych stężeń nie były cytotoksyczne jak również nie zmniejszały żywotności komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego oraz nabłonka oskrzeli, z drugiej zaś strony wyraźnie zmniejszały żywotność komórek raka okrężnicy oraz raka płuca, odpowiednio o 36,2% oraz 22,8% po podaniu CC2a w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$. Dalsze badania wykazały także wysoką selektywność działania samych komórek NK92, które nie powodowały żadnych zmian w komórkach nabłonka jednocześnie zmniejszając żywotności komórek A549 o 10,4% a LS180 o 29,7% oraz zwiększając wydzielania dehydrogenazy mleczanowej w hodowlach ww. komórek nowotworowych odpowiednio o 15,0% i 11,7%. Oznaczenia LDH i MTT przeprowadzone w kokulturach ujawniły, że frakcja CC2a zwiększa aktywność przeciwnowotworową komórek NK92 względem komórek raka okrężnicy linii LS180 oraz raka płuca linii A549 jednocześnie nie wpływając na komórki nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoN i nabłonka oskrzeli linii NL20. Zwiększenie zdolności komórek NK92 do hamowania aktywności metabolicznej komórek A549 i LS180 zaobserwowano w obecności CC2a w stężeniach 50 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 17,4% i 16,8%), 100 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 24,9% i 19,3%) i 250 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 29,1% i 21,9%) a nasilenie efektu cytotoksycznego odnotowano po inkubacji z badaną frakcją w stężeniach 100 $\mu\text{g/ml}$ (wzrost o 13,6% i 14,7%) i 250 $\mu\text{g/ml}$ (21,0% i 20,7%)

Podsumowując przeprowadzone badania wykazały immunomodulacyjne właściwości polisacharydów izolowanych z *C. cibarius* (frakcja CC2a; 1,6 mannan rozgałęziony przy O-2 i O-3 z domieszką liniowego 1,3 glukanu i komponentą białkową), które zwiększały żywotność i proliferację komórek NK92 jak również nasilały ich aktywność przeciwnowotworową względem ludzkich komórek raka okrężnicy linii LS180 oraz raka płuca linii A549, jednocześnie nie powodując żadnych negatywnych zmian w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli linii NL20 oraz nabłonka jelita grubego linii CCD841 CoN. Korzystny wpływ frakcji CC2a na komórki NK92 powiązано z jej zdolnością do stymulacji ekspresji kinaz Erk1/2 oraz p38, uczestniczących w przekazywaniu sygnałów z receptora dla IL-2 będącej kluczowym stymulatorem proliferacji analizowanych limfocytów. Ponadto, przeprowadzone badania wykazały również bezpośrednią zdolność frakcji polisacharydowej

CC2a do zabijania komórek nowotworowych raka okrężnicy oraz raka płuca przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na żywotność komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego i oskrzeli. Wysoka selektywność działania frakcji polisacharydowej CC2a i jej zdolności do efektywnej eliminacji komórek nowotworowych zarówno w sposób bezpośredni jak również poprzez aktywację komórek NK wskazują na jej duży potencjał chemoprewencyjny, który wymaga jednak potwierdzenia w badaniach na zwierzętach oraz w próbach klinicznych. Niemniej jednak biorąc pod uwagę fakt, że komórki NK są już z powodzeniem wykorzystywane w terapii nowotworów [Hu i wsp. 2019, Koehl i wsp. 2005, Imai i wsp. 2000], wykazane w prezentowanych badaniach immunostymulacyjne właściwości rozgałęzionych glukomannanów kurki wskazują na możliwość ich wykorzystania jako adiuwantów we wspomnianych strategiach terapeutycznych.

3.4. Piśmiennictwo

- [1] Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ: NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK cell function and anti-tumour activity. *Trends in Immunology* 2003, 24, 603-609.
- [2] Amal IH, Mona AMG, Rasha YMI: Therapeutic role of glucogalactanpolysaccharide extracted from *Agaricus bisporus* on trimethyltin chloride induced neuropathy in rats. *African Journal of Biotechnology* 2015, 14(24), 2052-2065.
- [3] Bonovas S, Tsantes A, Drosos T, Sitaras NM: Cancer chemoprevention, A summary of the current evidence. *Anticancer Research* 2008, 28, 1857-1866.
- [4] Brown G, Siamon G: Immune recognition, A new receptor for β -glucans. *Nature* 2001, 413, 36-37.
- [5] Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR: Neurodegenerative diseases: An overview of environmental risk factors. *Environmental Health Perspectives* 2005, 113(9), 1250-1256.
- [6] Brzezicha-Cirocka J, Grembecka M, Grochowska I, Falandysz J, Szefer P: Elemental composition of selected species of mushrooms based on a chemometric evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019, 173, 353-365.
- [7] Chang ST, Buswell JA: Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1996, 12, 473-476.
- [8] Chen J: The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2016, 6(3), a026104.
- [9] Christian F, Smith EL, Carmody RJ: The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. *Cells* 2016, 5, 12.
- [10] Cluskey S, Ramsden DB: Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Pathology* 2001, 54(6), 386-392.
- [11] Connor B, Dragunow M: The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Brain Research Reviews* 1998, 27(1), 1-39.
- [12] Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420(6917), 860-867.
- [13] Dible A: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 1999, 81(3), 163-221.
- [14] Doble A: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 1999, 18, 163-221.

- [15] Donaldson MS: Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal* 2004, 3, 19.
- [16] Dudeja P, Gupta RK: Nutraceuticals. In: Gupta RK, Dudeja P, Minhas AS (Eds.), *Food Safety in the 21st Century Public Health Perspective*. Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, United States 2017, pp. 491-496
- [17] Espinet C, Gonzalo H, Fleitas C, Menal MJ, Egea J: Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a neurotrophic approach. *Current Drug Targets* 2015, 16(1), 20-30.
- [18] Falandysz J, Drewnowska M: Macro and trace elements in Common Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom from the European background areas in Poland: Composition, accumulation, dietary exposure and data review for species. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 2015, 50(5), 374-387.
- [19] Friedman M: Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods* 2016, 5(4), E80.
- [20] Gao L, Sun Y, Chen C, Xi Y, Wang J, Wang Z: Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction FA-2-b-ss prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007, 40(11), 1545-1555.
- [21] GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group: Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurology* 2017, 16(11), 877-897.
- [22] Gerl R, Vaux DL: Apoptosis in the development and treatment cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26, 263-270.
- [23] Gokce EC, Kahveci R, Atanur OM, Güreş B, Aksoy N, Gokce A, Sargon MF, Cemil B, Erdogan B, Kahveci O: Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against traumatic spinal cord injury in rats. *Injury* 2015, 46(11), 2146-2155.
- [24] Gorman AM: Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008, 12(6A), 2263-2280.
- [25] Greten FR, Karin M: The IKK/NF-kappa B activation pathway - a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Letters* 2004, 206, 193-199.
- [26] Hardy G: Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition* 2000, 16(7-8), 688-689.
- [27] Herre J, Gordon S, Brown GD: Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology* 2004, 40, 869-876.
- [28] Hobbs C: *Medicinal mushrooms. An exploration of tradition, healing and culture*. Botanica Press, Williams, OR, USA 1995.
- [29] Hobbs C: Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A literature review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2000, 2, 287-302
- [30] Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y: Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities. *Frontiers in Immunology* 2019, 10, 1205.
- [31] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000, 356(9244), 1795-1799.
- [32] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokit S, Aikou T: Prognostic value of intratumoural natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000, 88(3), 577-583.

- [33] Izawa H, Yamamoto H, Ikeda M, Fukunaga H, Yasui M, Ikenaga M, Sekimoto M, Monden T, Matsuura N, Monden M: Analysis of Cyclin D1 and CDK expression in colonic polyps containing neoplastic foci: a study of proteins extracted from paraffin sections. *Oncology Reports* 2002, 9, 1313-1318.
- [34] Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D: (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* 2009, 29, 12795-801 3.
- [35] Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B: Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2016, 42, 63-71.
- [36] Karin M: Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006, 441, 431-436.
- [37] Kim N, Lee HH, Lee HJ, Choi WS, Lee J, Kim HS: Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy. *Archives of Pharmacal Research* 2019, 42(7), 591-606.
- [38] Koehl U, Esser R, Zimmerman S, Tonn T, Kotchetkov R, Bartling T, Sorensen J, Gruttner HP, Bader P, Seifried E, Martin H, Lang P, Passweg JR, Klingebiel T, Schwabe D: Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klinische Pädiatrie* 2005, 217, 345-350.
- [39] Kovacs GG: Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *Journal of Clinical Pathology* 2019, 72(11), 725-735.
- [40] Kumari D, Reddy MS, Upadhyay RC: Nutritional composition and antioxidant activities of 18 different wild *Cantharellus* mushrooms of northwestern Himalayas. *Food Science and Technology International* 2011, 17(6), 557-567.
- [41] Lemieszek M, Rzeski W: Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemporary Oncology* 2012, 16(4), 285-289.
- [42] Lemieszek MK, Cardoso C, Nunes FHF, Barros AIRNA, Marques G, Pożarowski P, Rzeski W: *Boletus edulis* biological active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food and Function* 2013, 4(4), 575-585.
- [43] Lemieszek MK, Nunes FHF, Sawa-Wejksza K, Rzeski W: A King Bolete, *Boletus edulis* (Agaricomycetes), RNA fraction stimulates proliferation and cytotoxicity of natural killer cells against myelogenous leukemia cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2017, 19(4), 347-353.
- [44] Lemieszek MK, Ribeiro M, Alves HG, Marques G, Nunes FM, Rzeski W: *Boletus edulis* ribonucleic acid – a potent apoptosis inducer in human colon adenocarcinoma cells. *Food and Function* 2016, 7(7), 3163-3175.
- [45] Lemieszek MK, Ribeiro M, Marques G, Nunes FM, Pożarowski P, Rzeski W: New insights into the molecular mechanism of *Boletus edulis* ribonucleic acid fraction (BE3) concerning antiproliferative activity on human colon cancer cells. *Food and Function* 2017, 8, 1830-1839.
- [46] Licher S, Heshmatollah A, van der Willik KD, Stricker BHC, Ruiters R, de Roos EW, Lahousse L, Koudstaal PJ, Hofman A, Fani L, Brusselle GGO, Bos D, Arshi B, Kavousi M, Leening MJG, Ikram MK, Ikram MA: Lifetime risk and multimorbidity of non-communicable diseases and disease-free life expectancy in the general population: A population-based cohort study. *PLoS Medicine* 2019, 16(2), e1002741.
- [47] Lillycrop KA, Burdge GC: Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology Metabolism* 2012, 26, 667-676.

- [48] Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L: Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 2017, 2525967.
- [49] Lucas DR, Newhouse JP: The toxic activity of sodium-lglutamate on the inner layers of the retina. *Archives of Ophthalmology* 1957, 58, 193-201.
- [50] Lawrence T: The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009, 1(6), a001651.
- [51] Mahajna JA, Yassin M, Wasser SP: Mushrooms extracts having anticancer activity. USA Patent US 7,258,862 B2, Date of Patent 21.08.2007
- [52] McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI: Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *Journal of Pathology* 2002, 196, 386-393.
- [53] Miller JS: Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Investigation* 2002, 20(3), 405-419.
- [54] Mizuno T: Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International* 1995, 11, 7-21.
- [55] Mizuno T: Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods and Food Ingredient Journal of Japan* 1996, 167, 69-85.
- [56] Mizuno T: The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1999, 1, 9-29.
- [57] Moynagh PN: The NFkB pathway. *Journal of Cell Sciences* 2005, 118, 4389-4392.
- [58] Muszyńska B, Kała K, Firlej A, Sułkowska-Ziaja K: *Cantharellus cibarius* – culinary-medicinal mushroom content and biological activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2016, 73(3), 589-598.
- [59] Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K, Ekiert H: Główne grupy związków i pierwiastki z aktywnością biologiczną w wybranych gatunkach grzybów z taksonu Basidiomycota. *Farmakologia Polska* 2010, 66(11), 804-814.
- [60] Naugler WE, Karin M: NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics and Development* 2008, 18, 19-26.
- [61] Ohtani K: Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Frontiers in Bioscience* 1999, 4, 793-804.
- [62] Oppenheim RW: Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 1991, 14, 453-501.
- [63] Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V: Series Introduction: Neurodegeneration: what is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation* 2003, 111(1), 3-10.
- [64] Purves D, Snide, WD, Voyvodic JT: Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 1988, 336, 123-128.
- [65] Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK: Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2001, 3, 361-394.
- [66] Romee R, Leong JW, Fehniger TA: Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica*, 2014, 2014, 205796.
- [67] Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Shibata W, Yanai A, Ogura K, Omata M: Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical Cancer Research* 2009, 15, 2248-2258.

- [68] Sattler R, Tymianski M: Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular Neurobiology* 2001, 24(1-3), 107-129.
- [69] Sheline CT, Cai AL, Zhu J, Shi C: Serum or target deprivation-induced neuronal death causes oxidative neuronal accumulation of Zn²⁺ and loss of NAD⁺⁺. *European Journal of Neuroscience* 2010, 32(6), 894-904.
- [70] Skup M: Neurotrophins: evolution of concepts on rational therapeutic approaches. *Postępy Biochemii* 2018, 64(3), 231-241.
- [71] Sporn MB, Suh N: Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 2000, 21, 525-530.
- [72] Stewart BW, Wild CP: World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, 2014.
- [73] Sun YQ, Guo TK, Xi YM, Chen C, Wang J, Wang ZR: Effects of AZT and RNA-protein complex (FA-2-b-beta) extracted from Liang Jin mushroom on apoptosis of gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 2007, 13(31), 4185-4191.
- [74] Tello I, Campos-Pena V, Montiel E, Rodriguez V, Aguirre-Moreno A, Leon-Rivera I, Del Rio-Portilla F, Herrera-Ruiz M, Villeda-Hernandez J: Anticonvulsant and neuroprotective effects of oligosaccharides from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2013; 15(6), 555-568.
- [75] Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M: Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010, 138, 2101-2114.
- [76] Thanikachalam K, Khan G: Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 2019, 11(1), E164.
- [77] Vajda FJ: Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 2002, 9(1), 4-8.
- [78] Velcheti V, Schalper K: Basic Overview of current immunotherapy approaches in cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2016, 35, 298-308.
- [79] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: The cell cycle, a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 2003, 36, 131-149.
- [80] Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L: Prognostic significance of tumour infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002, 35(1), 23-28.
- [81] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S: Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 2011, 331, 44-49.
- [82] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr: TNF and cancer therapy-induced apoptosis, potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996, 274, 784-787.
- [83] Wang H, Dharmalingam P, Vasquez V, Mitra J, Boldogh I, Rao KS, Kent TA, Mitra S, Hegde ML: Chronic oxidative damage together with genome repair deficiency in the neurons is a double whammy for neurodegeneration: Is damage response signaling a potential therapeutic target? *Mechanisms of Ageing and Development* 2017, 161(Pt A), 163-176.
- [84] Wasser SP, Weis AL: Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycota. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1999a, 1, 31-62.
- [85] Wasser SP, Weis AL: Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycota mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* 1999b, 19, 65-96.

- [86] Wasser SP: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, 60, 258-274.
- [87] Weber GF: *Molecular mechanisms of cancer*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007.
- [88] Wong KH, Kanagasabapathy G, Bakar R, Phan CW, Sabaratnam V: Restoration of sensory dysfunction following peripheral nerve injury by the polysaccharide from culinary and medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. through its neuroregenerative action. *Food Science and Technology* 2015, 35(4), 712-721.
- [89] Wong KH, Ng CC, Kanagasabapathy G, Yow YY, Sabaratnam V: An overview of culinary and medicinal mushrooms in neurodegeneration and neurotrauma research. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2017, 19(3), 191-202.
- [90] Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H: Extrasynaptic NMDA receptor in excitotoxicity: Function revisited. *Neuroscientist* 2015, 21(4), 337-344.
- [91] Zhou ZY, Tang YP, Xiang J, Wua P, Jin HM, Wang Z, Mori M, Cai DF: Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 13, 154-164.

4. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Działalność naukową rozpoczęłam od stażu w Department of Microbiology, Molecular Biology and Biochemistry, University of Idaho, Moscow, USA. Moim zadaniem było określenie roli białka Ydj1 (białko drożdżowe zaliczane do białka szoku cieplnego z rodziny Hsp40) w akumulacji i aktywacji kinazy Ste11 (drożdżowy odpowiednik onkogenu Raf) oraz zidentyfikowanie rejonu Ydj1 odpowiedzialnego za interakcję ze Ste11. Uzyskane przeze mnie wyniki zostały zaprezentowane w pracy:

Flom GA, Lemieszek M, Fortunato EA, Johnson JL: Farnesylation of Ydj1 is required for *in vivo* interaction with Hsp90 client proteins. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19, 5249–5258

Pomimo, że od momentu uzyskania tytułu zawodowego magistra jestem wyłącznie pracownikiem Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie od samego początku moja aktywność naukowa była związana z kilkoma uczelniami oraz instytucjami naukowymi w kraju i na świecie. a w szczególności z Uniwersytetem Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Uniwersytetem Medycznym w Lublinie, Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro w Vila Real w Portugalii oraz Medical University of Vienna w Austrii.

Pracę w Instytucie Medycyny Wsi w Lublinie rozpoczęłam od realizacji międzynarodowego projektu badawczego pt.: "Resolve chronic inflammation and achieve healthy ageing by understanding non-regenerative repair" finansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach 7 Programu Ramowego. Byłam bezpośrednio odpowiedzialna za realizację jednego z dwóch nadzorowanych przez stronę polską zadań tj. Task 1.4 „Pulmonary fibrosis after environmental exposure to organic dust”. Powierzone mi badania realizowałam w ścisłej współpracy z następującymi podmiotami:

- Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- Department of Internal Medicine II, Clinical Division of Pulmonary Medicine, Medical University of Vienna, Vienna (Austria);
- Department of Pathology and Diagnostic, Section of Pathological Anatomy, University of Verona, Verona (Włochy);
- Austrian Institute of Technology GmbH, Vienna (Austria);
- Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), Institute of Experimental and Clinical Research (IREC), Université Catholique de Louvain, Brussels (Belgia);
- The Shraga Segal Department of Microbiology, Immunology and Genetics, Center for Multidisciplinary Research on Aging, Ben-Gurion University of the Negev, Beer Sheva (Izrael);
- BioTalentum Ltd, Gödöllő (Węgry);
- Molecular Animal Breeding Laboratory, Szent Istvan University, Gödöllő (Węgry).

Efektem tej współpracy było odtworzenie w warunkach laboratoryjnych sytuacji narażenia organizmu na alergeny środowiskowe odpowiedzialne za rozwój AZPP (alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych) i w efekcie stworzenie nowego zwierzęcego modelu AZPP. Dzięki przewlekłej ekspozycji myszy na antygen *Pantoea agglomerans* (bakteria Gram-ujemna) nie tylko udało się wywołać włóknienie płuc, ale również poprzez modulację czasu ekspozycji odtworzyć wcześniejsze etapy rozwoju choroby, w których obserwuje się silną odpowiedź zapalną. Szczegółowe analizy histologiczne, biochemiczne oraz genetyczne wykazały zgodność zmian indukowanych u zwierząt z obrazem klinicznym AZPP i w konsekwencji potwierdziły użyteczność naszego modelu w kontekście badań nad AZPP i włóknieniem płuc. Wyniki tej współpracy były przedmiotem 4 publikacji naukowych:

- 1) Golec M, Wielscher M, Lemieszek MK, Vierlinger K, Skórska C, Huetter S, Sitkowska J, Mackiewicz B, Góra-Florek A, Ziesche R, Yanai H, Fraifeld VE, Milanowski J, Dutkiewicz J: Middle age enhances expression of innate immunity genes in a female mouse model of pulmonary fibrosis. *Biogerontology* 2017, 18(2), 253-262

2) Lemieszek MK, Dutkiewicz J, Golec M, Chilosi M, Skórska C, Huaux F, Pastena C, Pedica F, Sitkowska J, Lisowska W, Cholewa G, Zwoliński J, Mackiewicz B, Góra-Florek A, Ziesche R, Milanowski J: Age influence on mice lung tissue response to *Aspergillus fumigatus* chronic exposure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2015, 22(1), 69-75

3) Lemieszek MK, Chilosi M, Golec M, Skórska C, Dinnyes A, Mashayekhi K, Vierlinger K, Huaux F, Wielscher M, Hofner M, Yakoub Y, Pastena C, Daniele I, Cholewa G, Sitkowska J, Lisowska W, Zwoliński J, Milanowski J, Mackiewicz B, Góra-Florek A, Ziesche R, Dutkiewicz J: Age influence on hypersensitivity pneumonitis induced in mice by exposure to *Pantoea agglomerans*. *Inhalation Toxicology*, 2013, 25(11), 640-650

4) Lemieszek M, Chilosi M, Golec M, Skórska C, Huaux F, Yakoub Y, Pastena C, Daniele I, Cholewa G, Sitkowska J, Lisowska W, Zwoliński J, Milanowski J, Mackiewicz B, Góra A, Dutkiewicz J: Mouse model of hypersensitivity pneumonitis after inhalation exposure to different microbial antigens associated with organic dusts. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2011, 18, 71-80

oraz 5 prezentacji na konferencjach międzynarodowych:

1) Lemieszek M, Wielscher M, Golec M, Vierlinger K, Skórska C, Mackiewicz B, Góra A, Ziesche R, Dutkiewicz J, Milanowski J: Cell adhesion molecules and cathelicidin in mice model of hypersensitivity pneumonitis. *ERS Annual Congress 2013*. 7-11.09.2013 Barcelona

2) Lemieszek MK, Pastena C, Lo Re S, Wielscher M, Vierlinger K, Dinnyes A, Fraifeld VE, Dutkiewicz J, Ziesche R, Chilosi M, Huaux F: Ageing exacerbates lung inflammation and fibrosis: lessons from the mouse models. *The 8th European Congress of Biogerontology*. 10-13.03.2013 Beer Sheva oraz Dead Sea

3) Lemieszek MK, Chilosi M, Golec M, Skórska C, Dinnyes A, Mashayekhi K, Vierlinger K, Huaux F, Wielscher M, Hofner M, Yakoub Y, Pastena C, Daniele I, Cholewa G, Sitkowska J, Lisowska W, Zwoliński J, Milanowski J, Mackiewicz B, Góra A, Ziesche R, Dutkiewicz J: Impact of age on hypersensitivity pneumonitis induced in mice by exposure to *Pantoea agglomerans*. *The 8th European Congress of Biogerontology (ECB)*. 10-13.03.2013 Beer Sheva i Dead Sea

4) Lemieszek M, Chilosi M, Golec M, Skórska C, Huaux F, Yakoub Y, Pastena C, Daniele I, Cholewa G, Sitkowska J, Lisowska W, Zwoliński J, Milanowski J, Mackiewicz B, Góra A, Dutkiewicz J: Mouse model of hypersensitivity pneumonitis induced by exposure to different microbial antigens associated with organic dusts. *Tissue Remodeling in Ageing and Disease - Emerging Insights into a Complex Pathology*. 27-28.03.2012 Wiedeń

5) Vierlinger K, Hofner M, Wielscher M, Huaux F, Lemieszek M, Grubinger M, Mikulits W, Noehamnen C, Ziesche R: Gene expression analysis in murine models of fibrotic repair. Tissue Remodeling in Ageing and Disease - Emerging Insights into a Complex Pathology. 27-28.03.2012 Wiedeń

Równoległe z pracą w projekcie Resolve uczestniczyłam w badaniach nad rolą i znaczeniem peptydu odpornościowego LL37 (katalicydyna) w chorobach płuc ze szczególnym uwzględnieniem POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc). W badania poza Instytutem Medycyny Wsi w Lublinie były zaangażowane: Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Department of Internal Medicine II, Clinical Division of Pulmonary Medicine, Medical University of Vienna. Ponadto, część analiz zostało wykonanych we współpracy z Instytutem Dermatologii w Krakowie oraz Austrian Institute of Technology - Seibersdorf Laboratories. Nasze badania przede wszystkim wykazały możliwości stosowania endogennej katalicydyny jako markera rozwoju POChP. Wyniki badań zostały zaprezentowane w 5 publikacjach naukowych:

- 1) Golec M, Lemieszek M, Skórska C, Sitkowska J, Zwoliński J, Mackiewicz B, Góra-Florek A, Milanowski J, Dutkiewicz J: Cathelicidin related antimicrobial peptide, laminin, Toll-like receptors and chemokines levels in experimental hypersensitivity pneumonitis in mice. *Pathologie Biologie* 2015, 63(3), 130-135
- 2) Golec M, Reichel C, Lemieszek M, Buczkowski J, Mackiewicz B, Skórska C, Dutkiewicz J, Góra A, Ziesche R, Milanowski J: Cathelicidin LL-37 in bronchoalveolar lavage and epithelial lining fluids from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2014, 28(1), 73-79
- 3) Golec M, Skórska C, Mackiewicz B, Dutkiewicz J, Góra A, Lemieszek M, Milanowski J: Relationship between COPD and lower socioeconomic status in farmers from south-eastern Poland (Lublin region). *Rural and Remote Health* 2014, 14, 2531
- 4) Golec M, Reichel C, Lemieszek M, Mackiewicz B, Buczkowski J, Sitkowska J, Skórska C, Dutkiewicz J, Milanowski J, Ziesche R: Cathelicidin LL-37 in bronchoalveolar lavage and epithelial lining fluids from COPD patients and healthy individuals. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2012, 4, 617-625
- 5) Golec M, Reichel C, Mackiewicz B, Skórska C, Curzytek K, Lemieszek M, Dutkiewicz J, Góra A, Ziesche R, Bołtuć J, Sodolska K, Milanowski J, Śpiewak R: Cathelicidin LL-37, granzymes, TGF- β and cytokines levels in induced sputum from farmers with and without COPD. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2009; 16, 289–297

oraz w 4 doniesieniach zjazdowych:

- 1) Lemieszek M, Golec M, Reichel C, Buczkowski J, Mackiewicz B, Skórska C, Góra A, Dutkiewicz J, Ziesche R, Milanowski J: Levels of antimicrobial peptide LL-37 in BALF and ELF from patients with pulmonary fibrosis. ERS Annual Congress 2013, 7-11.09.2013 Barcelona
- 2) Lemieszek M, Golec M, Reichel C, Mackiewicz B, Skórska C, Góra A, Boltuc J, Sodolska K, Milanowski J, Dutkiewicz J: Peptide LL-37 levels in sputum in COPD farmers after exposure to organic dust. ERS Annual Congress 2009. 12-16.09.2009 Wiedeń
- 3) Golec M, Góra A, Curzytek K, Skórska C, Mackiewicz B, Krawczyk P, Jankowska O, Siwiec J, Zaborowski T, Lemieszek M, Ziesche R, Milanowski J, Dutkiewicz J, Śpiewak R: Levels of adhesion molecule E-cadherin and antimicrobial peptide LL-37 in induced sputum after occupational exposure to organic dust. XXVIII Congress EAACI, 6-10.06.2009 Warszawa
- 4) Śpiewak R, Góra A, Curzytek K, Skórska C, Mackiewicz B, Krawczyk P, Jankowska O, Siwiec J, Zaborowski T, Lemieszek M, Ziesche R, Milanowski J, Dutkiewicz J, Golec M: E-cadherin and LL-37 levels in induced sputum after occupational exposure to organic dust: Methodological work-up and first results. 7th EAACI-GALEN-Winter School; Basic Immunology on Allergy and Clinical Immunology. 5-8.02.2009 Davos

Wiedzę i doświadczenie zdobyte w projekcie Resolve oraz w badaniach nad peptydem odpornościowym LL-37 wykorzystałam w realizowanym obecnie we współpracy z Kliniką Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie grantie NCN SONATA pt.: „Ocena właściwości prewencyjnych i leczniczych katelicydyny we włóknieniu płuc. Badania *in vivo* i molekularne w mysim modelu alergicznego zewnątrzpochodnego zapalenia pęcherzyków płucnych (AZPP)”, którego jestem kierownikiem. Wykazaliśmy zdolność katelicydyny do redukcji odpowiedzi zapalnej oraz rozwoju włóknienia płuc u myszy w następstwie przewlekłej ekspozycji na znany czynnik etiologiczny AZPP tj. antygen *Pantoea agglomerans*. Uzyskane wyniki były przedmiotem 3 doniesień zjazdowych:

- 1) Lemieszek MK, Golec M, Dutkiewicz J, Zwoliński J, Milanowski J: Cathelicidin treatment reduces negative changes in the expression of genes involved in pulmonary fibrosis in mice model of hypersensitivity pneumonitis. EAACI Congress, 1-5.06.2019, Lizbona
Supplement: 106 Special Issue: SI Meeting Abstract: LBTP1867
- 2) Lemieszek MK, Sawa-Wejksza K, Golec M, Dutkiewicz J, Zwoliński J, Milanowski J: Beneficial effect of cathelicidin on treatment of hypersensitivity pneumonitis induced by *Pantoea agglomerans* – *in vivo* studies. XV Congress of the Italian Federation of Life Sciences, 18-21.09.2018 Rzym

- 3) Lemieszek MK, Rzeski W, Golec M, Dutkiewicz J, Milanowski J: *Pantoea agglomerans* induces epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells and mice lungs. EAACI Allergy School on Aerobiology and Pollution: The air that you breathe and allergies, 15-17.03.2018 Dubrownik

Obok współpracy z lekarzami z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz z naukowcami z konsorcjum Resolve od wielu lat prowadzę wspólne badania z naukowcami z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z Zakładu Wirusologii i Immunologii oraz z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej. Moja współpraca z tymi Zakładami była następstwem kontynuacji rozpoczętych w czasie studiów magisterskich badań nad aktywnością biologiczną (głównie przeciwnowotworową) ekstraktów wodnych i etanolowych z hub brzozowych tj. *Inonotus obliquus* (włóknośzek ukośny) oraz *Piptoporus betulinus* (porek brzozowy), które to gatunki grzybów od wieków były wykorzystywane w medycynie ludowej. Efektem tej współpracy było 5 publikacji naukowych:

- 1) Pleszczyńska M, Lemieszek MK, Siwulski M, Wiater A, Rzeski W, Szczodrak J: *Fomitopsis betulina* (formerly *Piptoporus betulinus*): the Iceman's polypore fungus with modern biotechnological potential. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2017, 33(5), 83
- 2) Pleszczyńska M, Wiater A, Siwulski M, Lemieszek MK, Kunaszewska J, Kaczor J, Rzeski W, Janusz G, Szczodrak J: Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2016, 32, 151
- 3) Lemieszek M, Langner E, Kaczor J, Kandefler-Szerszen M, Sanecka B, Mazurkiewicz W, Rzeski W: Anticancer effects of fraction isolated from fruiting bodies of chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetidae): *in vitro* studies. International Journal of Medicinal Mushrooms 2011, 13(2), 131-143
- 4) Mazurkiewicz W, Rydel K, Pogocki D, Lemieszek MK, Langner E, Rzeski W: Separation of an aqueous extract *Inonotus obliquus* (Chaga). A novel look At the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 2010; 67(4), 397-406
- 5) Lemieszek M, Langner E, Kaczor J, Kandefler-Szerszen M, Sanecka B, Mazurkiewicz W, Rzeski W: Anticancer effect of fraction isolated from medicinal birch polypore mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae): *in vitro* studies. International Journal of Medicinal Mushrooms 2009; 11(4), 351-364

oraz 2 doniesienia zjazdowe:

- 1) Kaczor J, Czerwonka A, Wawruszak A, Lemieszek MK, Rzeski W: Comparison of anticancer properties of water, ethanol and ether extracts from *Piptoporus betulinus*

collected in Poland and USA. IX Congres Latinoamericano di Micologia 22-25.08.2017

Peru

2) Kaczor J, Kunaszewska J, Lemieszek MK, Kandefer-Szerszeń M, Rzeski W: Comparison of anticancer properties of water and ethanol extracts isolated from *Piptoporus betulinus* natural and artificial culture in colon carcinoma cell culture model.

The 8th International Medicinal Mushroom Conferences 24-27.08.2015 Manizales

Ponadto, jako promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Adamczyk kontynuuję współpracę z Zakładem Mikrobiologii Przemysłowej, UMCS w zakresie oceny chemoprewencyjnych i immunomodulacyjnych właściwości oligosacharydów izolowanych z *Laetiporus sulphureus* (żółciak siarkowy). Pierwsze wyniki naszych badań zostały zaprezentowane na konferencji międzynarodowej:

Adamczyk P, Lemieszek MK, Rzeski W, Pleszczyńska M, Prochniak K, Tomczyk M, Wiater A: Assessment of antiproliferative activity of oligosaccharides obtained as acidhydrolysis products of (1-3)- α -D-glucan from *Laetiporus sulphureus*. GA2018 The 66th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research S-TCM 2018 The 11 Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine 26-29.08.2018 Shanghai

W latach 2011-2013 byłem inicjatorem i głównym wykonawcą realizowanego w Zakładzie Wirusologii i Immunologii UMCS grantu NCN Harmonia 2011/01/M/NZ7/02691 pt.: "Właściwości chemoprewencyjne polisacharydów izolowanych z borowika szlachetnego (*Boletus edulis*). Badania *in vitro* i molekularne w komórkowym modelu raka okrężnicy". Projekt realizowałam w ścisłej współpracy z zespołem chemików kierowanym przez Prof. Fernando Nunesa z Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro w Vila Real w Portugalii (UTAD). Wyniki, które uzyskałam były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt.: „Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy” jak również 5 publikacji naukowych:

1) Lemieszek MK, Nunes FHF, Sawa-Wejksza K, Rzeski W: A King Bolete, *Boletus edulis* (Agaricomycetes), RNA fraction stimulates proliferation and cytotoxicity of natural killer cells against myelogenous leukemia cells. International Journal of Medicinal Mushrooms 2017, 19(4), 347-353

2) Lemieszek MK, Ribeiro M, Marques G, Nunes FM, Pożarowski P, Rzeski W: New insights into the molecular mechanism of *Boletus edulis* ribonucleic acid fraction (BE3) concerning antiproliferative activity on human colon cancer cells. Food and Function 2017, 8, 1830-1839

- 3) Lemieszek MK, Ribeiro M, Alves HG, Marques G, Nunes FM, Rzeski W: *Boletus edulis* ribonucleic acid – a potent apoptosis inducer in human colon adenocarcinoma cells. *Food and Function* 2016, 7(7), 3163-3175
- 4) Lemieszek MK, Cardoso C, Nunes FHF, Barros AIRNA, Marques G, Pożarowski P, Rzeski W: *Boletus edulis* biological active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food and Function* 2013, 4(4), 575-585
- 5) Lemieszek M, Rzeski W: Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemporary Oncology* 2012, 16(4), 285-289

oraz 6 doniesień zjazdowych:

- 1) Lemieszek MK, Nunes FH, Rzeski W: Nieznane oblicze borowika szlachetnego i pieprznika jadalnego - możliwości wykorzystania polisacharydów grzybowych w prewencji nowotworów jelita grubego. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Naturoterapii 02.06.2017 Lublin
- 2) Lemieszek MK, Nunes F, Sawa-Wejksza K, Kaczor J, Rzeski W: Effect of *Boletus edulis* biological active biopolymers on proliferative and cytotoxic activity of natural killer cell line NK92. The 8th International Medicinal Mushroom Conferences 24-27.08.2015 Manizales
- 3) Lemieszek MK, Nunes FHF, Rzeski W: Biopolymers isolated from *Boletus edulis* as an potent inhibitor of MAPK/ERK pathway in colon cancer cells. *Cancer and Metabolism* 24-25.06.2013 Amsterdam
- 4) Lemieszek MK, Cardoso C, Barros AIRNA, Nunes FHF, , Marques G, Pożarowski P, Rzeski W: *Boletus edulis* fraction exhibits antiproliferative and proapoptotic properties against colon cancer cell lines LS180 and HT-29. The 1st Symposium of the Cancer Research Center of Lyon 13-15.02.2013 Lyon
- 5) Lemieszek MK, Cardoso CP, Barros AIRNA, Nunes FHF, Marques G, Pożarowski P, W Rzeski W: *Boletus edulis* polysaccharides induce cell cycle arrest in human colon cancer cells. The 6th International Medicinal Mushroom Conferences 25-29.09.2011 Zagrzeb
- 6) Lemieszek MK, Cardoso CP, Barros AIRNA, Nunes FHF, Marques G, W Rzeski W: Isolation of edible mushrooms polysaccharides with antiproliferative activity. The 6th International Medicinal Mushroom Conferences 25-29.09.2011 Zagrzeb

Współpracę nawiązaną z zespołem Prof. Fernando Nunesa z UTAD kontynuowałam w ramach projektów własnych prowadzonych w latach 2013-2018 w Instytucie Medycyny Wsi w Lublinie:

- Temat dla młodych naukowców IMW Nr MN 18001 pt.: „Analiza wpływu frakcji polisacharydowej izolowanej z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny, kurka) na przekazywanie sygnałów w szlaku NFκB w ludzkich komórkach raku okrężnicy – ocena możliwości wykorzystania substancji pozyskiwanych z kurki w prewencji i leczeniu nowotworów jelita grubego”
- Temat dla młodych naukowców IMW Nr 14001 pt.: „Analiza właściwości neuroprotektoryjnych frakcji polisacharydowych izolowanych z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny; kurka) w warunkach stresu oksydacyjnego - badania *in vitro*”
- Temat Statutowy IMW Nr 14050 pt.: „Ocena neuroprotektoryjnych właściwości frakcji polisacharydowych pozyskiwanych z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny; kurka) względem hodowli ludzkich neuronów pozyskiwanych z linii SH-SY5Y”
- Temat Statutowy IMW Nr 13040 pt.: „Analiza chemoprewencyjnych właściwości frakcji polisacharydowych pozyskiwanych z *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny; kurka) względem komórek raka okrężnicy LS180”

Wyniki uzyskane w ramach realizacji ww. projektów stanowią podstawę prezentowanego osiągnięcia (cykl 4 publikacji wskazanych w rozdziale 3.). Dodatkowo uzyskane wyniki były przedmiotem 4 doniesień zjazdowych:

- 1) Lemieszek MK, Nunes FH, Rzeski W: Nieznane oblicze borowika szlachetnego i pieprznika jadalnego - możliwości wykorzystania polisacharydów grzybowych w prewencji nowotworów jelita grubego. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Naturoterapii 02.06.2017 Lublin
- 2) Lemieszek MK, Nunes FM, Pożarowski P, Rzeski W: *Cantharellus cibarius* polysaccharides induce cell cycle arrest in human colon cancer cells. „Frontiers in Cancer Prevention: Fulfilled Promises, Translational Challenges and Future Directions” 24-26.06.2015 Gdańsk
- 3) Lemieszek MK, Cardoso CP, Barros AIRNA, Nunes FHF, Marques G, W Rzeski W: Isolation of edible mushrooms polysaccharides with antiproliferative activity. The 6th International Medicinal Mushroom Conferences 25-29.09.2011 Zagrzeb
- 4) Cardoso C, Lemieszek MK, Langner E, Wojciech Rzeski W, Marques G, Barros A, Nunes F: Isolation, purification, chemical characterization and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cantharellus cibarius*. Glupor9/5th Iberian carbohydrate Meeting. 4-7.09.2011 Vila Real

Badania nad aktywnością biologiczną grzybów wyższych kontynuowałam we współpracy z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie wykazując chemoprewencyjne właściwości polisacharydów *C. cibarius* oraz peroksydazy

ergosterolu izolowanej z *Hygrophoropsis aurantiaca* (lisówka pomarańczowa) w komórkowym modelu raka okrężnicy. Uzyskane wyniki zaprezentowano w 2 publikacjach:

- 1) Nowacka-Jechalke N, Nowak R, Juda M, Malm A, Lemieszek M, Rzeski W, Kaczyński Z: New biological activity of the polysaccharide fraction from *Cantharellus cibarius* and its structural characterization. *Food Chemistry* 2018, 268, 355-361
- 2) Nowak R, Drozd M, Mendyk E, Lemieszek M, Krakowiak O, Kisiel W, Rzeski W, Szewczyk K: New method for the isolation of ergosterol and peroxyergosterol as active compounds of *Hygrophoropsis aurantiaca* and *in vitro* antiproliferative activity of isolated ergosterol peroxide. *Molecules* 2016, 21(7), 946

oraz w doniesieniu zjazdowym:

- 1) Nowak R, Lemieszek M, Krakowiak A, Kisiel W, Rzeski W, Szewczyk K: The antiproliferative abilities of ergosterol peroxide isolated from fruit bodies of *Hygrophoropsis aurantiaca* against human colon cancer cells LS180. 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products: The application of analytical methods for the development of natural products. 6-9.06.2016 Lublin.

Niezależnie od badań wymienionych powyżej w kręgu moich zainteresowań naukowych są również prozdrowotne właściwości ekstraktów oraz substancje pochodzenia roślinnego. W ramach współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii UMCS, jak również z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie uczestniczyłam w badaniach nad aktywnością przeciwnowotworową ekstraktów z młodego jęczmienia i spiruliny oraz związków fenolowych pozyskiwanych z jemioli. Efekty tej współpracy zostały zaprezentowane w 4 publikacjach naukowych:

- 1) Kawka K, Lemieszek MK, Rzeski W: Chemopreventive properties of young green barley extracts in *in vitro* model of colon cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2019, 26(1), 174–181
- 2) Czerwonka A, Kaławaj K, Sławińska-Brych A, Lemieszek MK, Bartnik M, Wojtanowski KK, Zdzisińska B, Rzeski W: Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina (Arthrospira platensis)* product on the human lung cancer A549 cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2018, 106, 292-302
- 3) Pietrzak W, Nowak R, Gawlik-Dziki U, Lemieszek MK, Rzeski W: LC-ESI-MS/MS Identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules* 2017, 22(4), E624
- 4) Czerwonka A, Kawka K, Cykier K, Lemieszek MK, Rzeski W: Evaluation of anticancer activity of water and juice extracts of young *Hordeum vulgare* in human

cancer cell lines HT-29 and A549. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2017, 24(2), 345-349

oraz w 3 doniesieniach zjazdowych:

- 1) Czerwonka A, Kawka K, Cykier K, Lemieszek MK, Rzeski W: Anticancer properties of young barley (*Hordeum vulgare*) water and juice extracts. In vitro study in colon and lung carcinoma cell culture model. Polish-Chinese Scientific Conference "Pharmacy – Biology – Chemistry – IT New Aspects And Innovations" 4-5.07.2017 Lublin
- 2) Lemieszek MK, Rzeski W: Neuroprotective properties of young barley water extract. In vitro study in different models of neurodegeneration. EUROBIOTECH 6th Central European Congress of Life Science, 11-14.09.2017 Kraków
- 3) Kawka K, Lemieszek MK, Rzeski W: Czy młody zielony jęczmień naprawdę działa? Ocena aktywności przeciwnowotworowej w komórkowym modelu raka jelita grubego. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Naturoterapii, 02.06.2017 Lublin

Ponadto, brałam czynny udział w ocenie aktywności przeciwnowotworowej w modelach *in vitro* raka płuca, raka okrężnicy oraz gliomy nowych pochodnych tiazyn i tiadiazoli zeszyntezowanych przez naukowców z Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie. Uzyskane wyniki były przedmiotem 5 publikacji naukowych:

- 1) Czerwonka A, Lemieszek MK, Karpińska M, Matysiak J, Niewiadomy A, Rzeski W: Evaluation of the effect of 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-4H-benzofuro[3,2-d][1,3]thiazin-4-one on colon cells and its anticancer potential. *Medicinal Chemistry Research* 2018, 27(9), 2150-2159
- 2) Juszczak M, Walczak K, Matysiak J, Lemieszek MK, Langner E, Karpińska MM, Pożarowski P, Niewiadomy A, Rzeski W: New derivative of 2-(2,4-dihydroxyphenyl)thieno-1,3-thiazin-4-one (BChTT) elicits antiproliferative effect via p38-mediated cell cycle arrest in cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2016, 24(6):1356-1361
- 3) Matysiak J, Juszczak M, Karpińska MM, Langner E, Walczak K, Lemieszek MK, Skrzypek A, Niewiadomy A, Rzeski W: Synthesis of 2-(2,4-dihydroxyphenyl)thieno-1,3-thiazin-4-ones, their lipophilicity and anticancer activity in vitro. *Molecular Diversity* 2015, 19(4), 725-736
- 4) Matysiak J, Juszczak M, Karpińska MM, Langner E, Walczak K, Lemieszek M, Skrzypek A, Rzeski W, Niewiadomy A: Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of novel azolo- and azinothiazinones containing 2,4-dihydroxyphenyl substituent as anticancer agents. *Monatshefte für Chemie* 2015, 146(8), 1315-1327

5) Raszewski G, Juszcak M, Lemieszek MK, Matysiak J, Niewiadomy, Rzeski W: A simple HPLC metod for determining 2-(3-chlorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole in brain and plasma of animals: Application to a pharmacokinetic study. *Acta Chromatographica* 2014, 26, 255-266

oraz 3 doniesień zjazdowych:

1) Matysiak J, Juszcak M, Karpińska M, Langner E, Lemieszek M, Walczak K, Rzeski W, Niewiadomy A, Skrzypek A: Synteza oraz właściwości antyproliferacyjne nowego analogu 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-4*H*-tieno[3,2-*d*][1,3]tiazyn-4-onu – badania *in vitro*, Konferencja naukowa "Nowoczesne techniki badawcze stosowane w analizie farmaceutycznej i biomedycznej". 10-12.09.2014 Bydgoszcz

2) Matysiak J, Juszcak M, Karpińska MM, Langner E, Walczak K, Lemieszek M, Rzeski W, Niewiadomy A: Synthesis of 2-(2,4-dihydroxyphenyl)thieno[1,3]thiazin-4-ones and their cytotoxic activity against cancer cell lines. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku 12-14.05.2014, Korytnica k/Szydłowa

3) Matysiak J, Juszcak M, Karpińska MM, Langner E, Lemieszek M, Walczak K, Rzeski W, Niewiadomy A: Synteza oraz aktywność antyproliferacyjna pirazolo [1.3] tiazynonów sfunkcjonalizowanych podstawnikiem 2,4-dihydroksyfenylowym. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. 18-21.09.2013 Białystok

W uznaniu dorobku naukowego na rzecz Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie zostałam uhonorowana nagrodą Rektora UMCS w latach 2016, 2017, 2018 i 2019

Spośród 51 publikacji naukowych, których jestem współautorem 5 zostało przygotowanych wyłącznie przez naukowców z jednej instytucji naukowej: 1) Flom GA, Lemieszek M, Fortunato EA, Johnson JL: Farnesylation of Ydj1 is required for *in vivo* interaction with Hsp90 client proteins. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19, 5249-5258; 2) Kawka K, Lemieszek MK: Prozdrowotne właściwości młodego jęczmienia. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 2017, 23(1), 7-12; 3) Raszewski G, Lemieszek MK, Łukawski K: Cytotoxicity induced by cypermethrin in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2016, 23(1), 106-110; 4) Golec M, Skórska C, Lemieszek M, Dutkiewicz J: A novel inhalation challenge to study animal model of allergic alveolitis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2009; 16, 173-175; 5) Lemieszek MK: „Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). *Badania in vitro i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy*” *Rozprawa doktorska 2014 Lublin*. Pozostałych 46 publikacji naukowych było efektem współpracy wielośrodkowej. W tabeli poniżej zaprezentowano wykaz uczelni i

jednostek badawczo-rozwojowych, z których pracownikami współpracowałam - efektem czego były wspólne publikacje naukowe.

Tabela 1. Udział badaczy z poszczególnych uczelni i instytucji naukowych w powstaniu publikacji, których jestem współautorem

Lp.	Nazwa uczelni/ instytucji naukowej	Ilość wspólnych publikacji	Udział procentowy we wszystkich publikacjach
<i>jednostki krajowe</i>			
1.	Instytut Medycyny Wsi w Lublinie	50	98
2.	Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie	31	61
3.	Uniwersytet Medyczny w Lublinie	27	53
4.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie	7	14
5.	Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie	4	8
6.	Politechnika Rzeszowska	3	6
7.	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznań	2	4
8.	Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie	1	2
9.	Instytutu Dermatologii w Krakowie	1	2
10.	Instytut Farmakologii PAN w Krakowie	1	2
11.	Uniwersytet Gdański	1	2
<i>jednostki zagraniczne</i>			
1.	University of Trás-os-Montes and Alto Douro (Portugalia)	8	16
2.	Medical University of Vienna (Austria)	6	12
3.	Austrian Institute of Technology (Austria)	5	10
4.	University of Verona (Włochy)	3	6
5.	Université Catholique de Louvain (Belgia)	3	6
6.	University of Lisbon (Portugalia)	1	2
7.	BioTalentum Ltd (Węgry)	1	2
8.	Szent István University (Węgry)	1	2
9.	University of Idaho (USA)	1	2
10.	Ben-Gurion University of the Negev (Israel);	1	2
11.	McMaster University (Kanada)	1	2
12.	University of Wisconsin-Madison (USA)	1	2

5. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

5.1. Działalność dydaktyczna

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Adamczyk pt.: „Ocena właściwości prebiotycznych hydrolizatu (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*)” Powołanie na promotora pomocniczego na podstawie

decyzji Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie Nr 6/d/19 z dnia 27.02.2019 w sprawie wszczęcia przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk biologicznych, dyscyplinie biotechnologia oraz powołania promotora rozprawy doktorskiej i promotora pomocniczego.

Opiekun bezpłatnych praktyk nie objętych programem studiów realizowanych przez studentów studiów II stopnia na kierunkach biologia, biotechnologia oraz mikrobiologia prowadzonych przez Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie oraz studentów kierunku lekarskiego prowadzonego przez Uniwersytet Medyczny w Lublinie

01.10.2019 - obecnie Weronika Rzeska
01.07.2019 - 12.07.2019 Lic. Anna Michalicha
03.09.2018 - 28.09.2018 Lic. Paulina Kwaśnik
03.09.2018 - 28.09.2018 Lic. Anna Michalicha
01.04.2011 - 29.04.2011 Lic. Iwona Filipiuk

Opiekun naukowy studentów studiów II i III stopnia na kierunkach biotechnologia oraz mikrobiologia prowadzonych przez Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

27.02.2018 - 25.06.2019 Lic. Paulina Kwaśnik
03.02.2017 - obecnie Mgr Paulina Adamczyk
27.05.2013 - 02.09.2014 Mgr Arkadiusz Czerwonka

Opiekun stażu z Urzędu Pracy w Zamościu

29.11.2016 - 28.02.2017 Mgr Katarzyna Kawka

5.2. Działalność organizacyjna

29.01.2016 - obecnie Pełnomocnik Dyrektora IMW ds. Przewodów Doktorskich
27.03.2015 - obecnie Sekretarz Komisji Doktorskiej IMW
od 2015 Członek European Respiratory Society
od 2014 Członek Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc
od 2009 Członek European Academy of Allergy and Clinical Immunology

6. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

6.1. Nagrody

- ❖ Nagroda zespołowa Rektora UMCS w uznaniu dorobku naukowego na rzecz Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane cyklem artykułów opublikowanych w roku akademickim 2018/2019 z zakresu aktywności naturalnych i syntetycznych substancji

o znaczeniu w ochronie zdrowia człowieka oraz roli niektórych komórek organizmu w przebiegu procesów biologicznych zachodzących w tkankach prawidłowych i nowotworowych. 23.10.2019 Lublin

- ❖ Nagroda zespołowa Rektora UMCS w uznaniu dorobku naukowego na rzecz Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane cyklem artykułów opublikowanych w roku akademickim 2017/2018 z zakresu badań nad naturalnymi i syntetycznymi pochodzenia endogennego i egzogennego i ich roli w procesach patologicznych. 23.10.2018 Lublin
- ❖ Nagroda zespołowa Rektora UMCS w uznaniu dorobku naukowego na rzecz Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane cyklem artykułów opublikowanych w roku akademickim 2016/2017 z zakresu naturalnych substancji pochodzenia endogennego i egzogennego oraz ich roli w procesach patologicznych. 23.10.2017 Lublin
- ❖ Nagroda zespołowa Rektora UMCS za osiągnięcie naukowe uzyskane w zespole pod kierownictwem prof. dr hab. Martynty Kandefery-Szerszeń a zawierającej cykl artykułów opublikowanych w roku akademickim 2015/2016 z zakresu mechanizmów oddziaływania nowotworu z organizmem gospodarza pt. „Nowotwór gospodarz. Mechanizmy wzajemnego oddziaływania” 23.10.2016 Lublin
- ❖ Nagroda im. Dr Anny Siedleckiej dla najlepszego absolwenta w roku 2008 na kierunku biotechnologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS za wybitne wyniki w nauce oraz działalność naukową i organizacyjną podczas studiów. 01.10.2008 Lublin

6.2. Stypendia

- ❖ Travel Grant: EAACI Allergy School on Aerobiology and Pollution: The air that you breathe and allergies, 15-17.03.2018 Dubrovnik, Croatia. Grant przyznany przez European Academy of Allergy and Clinical Immunology 14.02.2018
- ❖ Stypendium naukowe dla doktorantów II. Stypendium współfinansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa oraz Budżetu Województwa Lubelskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. 02.07.2012 Lublin
- ❖ Stypendium Konferencyjne dla Młodych Pracowników Naukowych na udział w "The 6th International Medicinal Mushroom Conferences", 25-29 wrzesień 2011 Zagrzeb, Chorwacja. Stypendium przyznane przez Towarzystwo Naukowe Warszawskie oraz Fundację na Rzecz Nauki Polskiej. 15.06.2011 Warszawa

6.3. Najważniejsze dane bibliometryczne

- Index Hirscha (według bazy *Web of Science Core Collection*): 12
- Całkowita liczba cytowani
(według bazy *Scopus*): 414 (bez autocytowań: 347)
(według bazy *Web of Science Core Collection*): 384 (bez autocytowań: 316)

	Liczba publikacji	Impact Factor	Punkty MNiSW
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	4	17,310	340
Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktor (z pominięciem publikacji tworzących osiągnięcie)	32	56,280	797
Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora	15	21,923	277
Łącznie wszystkie publikacje naukowe	51	95,513	1414

Marta Lemieszek

(podpis wnioskodawcy)