



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
KATEDRA I ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ

Załącznik 3

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH W JĘZYKU POLSKIM**

KATARZYNA SUŁKOWSKA-ZIAJA

Kraków 2019

Spis treści

1. Informacje osobowe	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. 2016 r. Poz. 882 ze zm. W dz. U. Z 2016 r. Poz. 1311.)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	5
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	8
4.3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą	9
4.3.2. Omówienie wyników badań stanowiących podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego	17
4.3.3. Podsumowanie przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego	32
4.3.4. Piśmiennictwo	34
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	39
5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych	39
5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych	43
6. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych	49

1. Informacje osobowe

Imię i nazwisko: **KATARZYNA SUŁKOWSKA-ZIAJA**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

9.07.2010 **doktor nauk farmaceutycznych**, specjalność: **botanika farmaceutyczna**

rozprawa doktorska: „*Analiza chemiczna owocników i grzybni z kultur in vitro Sarcodon imbricatus (L.) P. Karst. oraz aktywność biologiczna frakcji polisacharydowych*”

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Promotor – Prof. dr hab. Halina Ekiert

24.06.1994 **magister biologii**, specjalność: **biologia ogólna**

praca magisterska: „*Model rozrodczy kobiet we wsi Chyszówki*”

Zakład Antropologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Uniwersytet Jagielloński
Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Kaczanowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Miejsce zatrudnienia

**Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30–688 Kraków**

Przebieg zatrudnienia

1.10.2011–obecnie	etat naukowo–dydaktyczny: adiunkt
1.10.2010–31.09.2011	etat naukowo–dydaktyczny: asystent z tytułem doktora
1.10.2008–31.09.2010	etat dydaktyczny: wykładowca
1.10.1997–31.09.2008	etat naukowo–dydaktyczny: asystent
1.03.1995–31.09.1997	etat naukowo–techniczny: specjalista biolog

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

**BADANIA MYKOCHEMICZNE I POTENCJAŁ BIOLOGICZNY
EKSTRAKTÓW Z OWOCNIKÓW I KULTUR MYCELIALNYCH
NADREWNOWYCH GRZYBÓW LECZNICZYCH**

- Podstawę osiągnięcia naukowego stanowi powiązany tematycznie cykl sześciu publikacji oryginalnych **1(H)–6(H)** oraz dwie publikacje poglądowe **7(H), 8(H)** powstałe w latach 2012–2018.
- W 5 pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.
- Mój średni udział procentowy w zgłoszonym cyklu wynosi **63,125%**.
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego wynosi **IF = 8,994** i odpowiada punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego **MNiSW = 155**.
- Współczynnik oddziaływania Impact Factor oraz punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego publikacji naukowych podano zgodnie z rokiem opublikowania prac.
- Żadna z prac nie stanowiła przedmiotu innego postępowania habilitacyjnego.
- Wyniki badań uzyskałam przy finansowym wsparciu funduszy programów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: Dotacja na utrzymanie potencjału badawczego Wydziałów UJ CM, (działalność statutowa): K/ZDS/003314 (2012–2014); K/ZDS/005615 (2015–2017); K/ZDS/007859 (2018–2019).

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Prace oryginalne

- 1(H) Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B, Motyl P, Paśko P, Ekiert H. 2012.**
Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland.
International Journal of Medicinal Mushrooms, 14(4): 385–393. (Begell House)
IF = 0,838; MNiSW = 15 pkt
- 2(H) Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B, Szewczyk A. 2015.**
Antioxidant components of selected indigenous edible mushrooms of the obsolete order Aphyllophorales.
Revista Iberoamericana de Micologia, 32(2): 99–102. (Elsevier)
IF = 1,444; MNiSW = 20 pkt
- 3(H) Kryczyk A, Piotrowska J, Sito M, Sulowska-Ziaja K, Dobosz K, Opoka W, Muszyńska B. 2017.**
Remediation capacity of Cd and Pb ions by mycelia of *Imleria badia*, *Laetiporus sulphureus*, and *Agaricus bisporus* in vitro cultures.
Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 52(9): 617–622. (Taylor&Francis)
IF = 1,273; MNiSW = 20 pkt
- 4(H) Sulowska-Ziaja K, Maślanka A, Szewczyk A, Muszyńska B. 2017.**
Physiologically active compounds in four species of *Phellinus*.
Natural Product Communications, 12(3): 363–366. (Natural Product Inc.)
IF = 0,809; MNiSW = 20 pkt
- 5(H) Kała K, Krakowska A, Sulowska-Ziaja K, Szewczyk A, Reczyński W, Opoka W, Muszyńska B. 2017.**
Kinetics of extracted bioactive components from mushrooms in artificial digestive juices.
International Journal of Food Properties, 20(8): 1796–1817. (Taylor&Francis)
IF = 1,845; MNiSW = 25 pkt
- 6(H) Sulowska-Ziaja K, Szewczyk A, Galanty A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B. 2018.**
Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*.
Molecular Biology Reports, 45(6): 2535–2544. (Springer)
IF = 1,889; MNiSW = 15 pkt

Prace poglądowe

7(H) Piska K, **Sulowska-Ziaja K**, Muszyńska B. **2017.**

Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) – its dietary significance and biological activity.

Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 16(1): 151–161. (Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie)

IF = 0,448; MNiSW = 20 pkt

8(H) **Sulowska-Ziaja K**, Muszyńska B, Gawalska A, Sałaciak K. **2018.**

Laetiporus sulphureus – chemical composition and medicinal value.

Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 17(1): 89–98. (Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie)

IF = 0,448; MNiSW = 20 pkt

Wyniki badań wchodzące w skład ww. cyklu zaprezentowałam również na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych, w formie wystąpień ustnych oraz prezentacji posterowych:

Konferencje międzynarodowe

Firlej A, Hałaszuk P, **Sulowska-Ziaja K**, Muszyńska B. Analysis of the secondary metabolites in the *in vitro* cultures of *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. **International Medical Students Conference**, Kraków, 10–12.04.2014.

Sulowska-Ziaja K, Firlej A, Muszyńska B, Gdula-Argasińska J, Apola A. Accumulation of antioxidant and anticancer activity compounds in the mycelial cultures of *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. **19th International Medical Esperanto Congress 1st Central European Biomedical Congress: Chronic Diseases as Challenge for Contemporary Societies in the 21st Century**, Budapeszt, Węgry, 16–20.07.2014.

Gawalska A, Sałaciak K, **Sulowska-Ziaja K**, Muszyńska B. Analysis of bioactive compounds in biomass from *in vitro* cultures of *Laetiporus sulphureus*. **International Medical Students Conference**, Kraków, 16–18.04.2015.

Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B, Szewczyk A, Galanty A. Analysis of betulin and betulinic acid and cytotoxic activity of extracts from mycelial cultures of *Piptoporus betulinus*. **8th Polish – German Symposium on Pharmaceutical Sciences: Retrospects, Insights and Prospects**, Kilonia, Niemcy, 29–30.05.2015.

Sulowska-Ziaja K, Gdula-Argasińska J, Żuchowski G, Muszyńska B. Analysis of betulin and anti-inflammatory activity of extracts from mycelial cultures of *Piptoporus betulinus*. **9th Polish – German Symposium on Pharmaceutical Science: Towards novel concepts in pharmaceutical science**, Kraków, 26–27.05.2017.

Konferencje krajowe

Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B. Analiza aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych w ekstraktach z owocników krajowych gatunków grzybów poliporoidalnych. **Warsztaty Polskiego Towarzystwa Mykologicznego**, Łódź-Spała, 24-28.09.2014. (wystąpienie ustne)

Sulowska-Ziaja K, Szewczyk A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B. Mycelial cultures of *Piptoporus betulinus* (*Fomitopsidaceae*, Basidiomycota) as a potential source of metabolites with multidirectional therapeutic effects. **X Ogólnopolska Konferencja: Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin**, Kraków, 7-9.12.2016.

Sulowska-Ziaja K, Nowotny K, Apola A, Grabowska K, Muszyńska B. Kultury *in vitro* wybranych gatunków grzybów nadrewnowych – analiza chemiczna i aktywność biologiczna związków o znaczeniu w kosmetologii. **XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego: Farmacja w Polsce perspektywy nauki i zawodu**, Kraków, 19-22.09.2017. (wystąpienie ustne)

Sulowska-Ziaja K. Kultury mycelialne grzybów nadrewnowych jako potencjalne źródło związków o znaczeniu leczniczym i kosmetologicznym. **Konferencja z cyklu: Wspieranie zdrowia. Grzyby przyszłością medycyny?** Białystok/Hajnówka, 15-16.02.2018. (wystąpienie ustne)

Ponadto z tematyką osiągnięcia naukowego związane są prace opublikowane w czasopismach z listy B MNiSW:

Sulowska-Ziaja K, Motyl P, Muszyńska B, Firlej A. **2015**, *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. bogate źródło związków aktywnych biologicznie. **Postępy Fitoterapii**, 16(2): 89–95.
MNiSW = 7 pkt

Zięba P, Kała K, Smoleń Z, Lazor J, **Sulowska-Ziaja K**, Sękara A, Muszyńska B. **2018**, Działanie biologiczne grzybów nadrewnowych: *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina* i *Trametes versicolor*. **Medicina Internacia Revuo**, 28(111): 62–77.
MNiSW = 8 pkt

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

Celem badań składających się na przedstawione osiągnięcie naukowe było poznanie potencjału biosyntetycznego owocników wybranych gatunków nadrewnowych grzybów leczniczych oraz określenie zdolności endogennej akumulacji wybranych związków bioaktywnych o potencjale terapeutycznym w biomasie z kultur mycelialnych. Ponadto, zbadano wpływ ekstraktów z owocników i z uzyskanego mycelium na wybrane kierunki aktywności biologicznej.

Uzyskane wyniki ilościowe zawartości metabolitów obecnych w owocnikach skłoniły do zaprojektowania badań stopnia uwalniania tych związków do sztucznych soków trawiennych. W przypadku owocników jadalnych gatunków badania uwalniania i biodostępności związków bioaktywnych są szczególnie istotne ze względu na ich potencjał prozdrowotny.

W ramach prowadzonych eksperymentów zdecydowano również zbadać zdolności remediacji zanieczyszczeń przez biomasę z kultur mycelialnych wybranych gatunków. Zwiększone skażenie środowiska (w tym gleby), prowadzi do wzrostu poziomu toksycznych związków w łańcuchach pokarmowych, stanowiąc bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. W przypadku szczególnie toksycznych, trwałych i trudno biodegradowalnych zanieczyszczeń wykazano dużą skuteczność mykoremediacji.

Gatunki objęte badaniami wraz z ich pozycją systematyczną wymieniono szczegółowo w pkt. 4.3.1.

Realizując główny cel badań skoncentrowałam się na następujących zagadnieniach szczegółowych:

- I.** Inicjacja kultur mycelialnych (izolacja i inokulacja eksplantatu) **3(H), 6(H)**
- II.** Oznaczenia jakościowe i ilościowe wybranych metabolitów pierwotnych i wtórnych w ekstraktach z owocników i z biomasy z kultur mycelialnych nadrewnowych grzybów leczniczych:
 - analiza zawartości kwasów fenolowych **1(H), 2(H), 4(H)–6(H)**
 - analiza zawartości niehalucynogennych związków pochodnych indolu **2(H), 4(H)–6(H)**
 - analiza zawartości steroli **2(H), 6(H)**
 - analiza zawartości triterpenoidów **6(H)**
 - analiza zawartości kwasów tłuszczowych **6(H)**
- III.** Izolacja i ustalenie tożsamości wybranych metabolitów wtórnych z owocników i biomasy otrzymanej z kultur mycelialnych **1(H), 6(H)**

- IV.** Ocena aktywności biologicznej ekstraktów z owocników i z biomasy z kultur mycelialnych nadrewnowych grzybów leczniczych:
- ocena aktywności antyoksydacyjnej **1(H)**
 - ocena aktywności cytotoksycznej wobec wybranych linii ludzkich komórek nowotworowych **6(H)**
 - ocena aktywności przeciwzapalnej **6(H)**
- V.** Ocena zdolności uwalniania do sztucznych soków trawiennych związków aktywnych biologicznie (kwasy fenolowe, związki indolowe) oraz biopierwiastków z ekstraktów z owocników wybranych nadrewnowych gatunków jadalnych **5(H)**
- VI.** Ocena zdolności remediacji metali ciężkich przez biomasę z kultur mycelialnych nadrewnowych gatunków jadalnych **3(H)**
- VII.** Poszerzenie oraz wzbogacenie wiedzy na temat właściwości leczniczych, prozdrowotnych i kosmetycznych oraz badań z zakresu biotechnologii oraz upraw wybranych gatunków nadrewnowych grzybów leczniczych **7(H), 8(H)**

4.3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą

Grzyby nadrewnowe, jako surowiec leczniczy

Spośród opisanych w piśmiennictwie naukowym ponad 130 tysięcy gatunków grzybów liczne taksony wytwarzające owocniki posiadają zdolność biosyntezy związków o wielokierunkowym działaniu terapeutycznym [1, 2]. Gatunki te określane są, jako **grzyby lecznicze** (ang. medicinal mushrooms). Problematyce obecności i terapeutycznego działania związków biologicznie czynnych produkowanych przez grzyby wielkoowocnikowe*, poświęcone jest renomowane czasopismo o zasięgu międzynarodowym – **International Journal of Medicinal Mushrooms** wydawane od roku 1991 przez wydawnictwo Begell House.

Wśród grzybów leczniczych, liczne przykłady to gatunki nadrewnowe, rosnące i rozwijające się na żywym bądź martwym drewnie osłabionych lub obumierających osobników drzew i krzewów. W ich obecności dochodzi do rozkładu związków budujących drewno (tzw. zgnilizny), a w konsekwencji do jego rozpadu [3].

*Według umownie przyjętego podziału, królestwo GRZYBY można podzielić na organizmy mikroskopijne tzw. *Micromycetes* i *Macromycetes* – grzyby wielkoowocnikowe, których owocniki mają od 2 mm. W niniejszym opracowaniu przyjęto termin grzyby wielkoowocnikowe w kontekście gatunków nadrewnowych.

Grzyby nadrewnowe stanowią złożoną grupę, zarówno pod względem morfologicznym, jak również ekologicznym i taksonomicznym. Większość wielkoowocnikowych grzybów nadrewnowych to przedstawiciele grzybów podstawkowych (Basidiomycota). Wiele gatunków wytwarza twarde, zdrewniałe owocniki, określane jako hubowate, natomiast część z nich wykształca cienkie, skórzaste lub delikatne owocniki rozpostarte albo rozpostarto–odgięte, lub mięsiste, nietrwale owocniki kapeluszowate (agarykoidalne, pleurotoidalne). Rosną pojedynczo lub w skupieniach. Są zróżnicowane pod względem wielkości, trwałości, kształtu, struktury powierzchni, konsystencji i budowy hymenoforu [4].

Grzyby te charakteryzuje mniejsza lub większa specjalizacja, związane są z określonym substratem (drewno drzew liściastych lub iglastych, rzadziej drewno konkretnego gatunku drzewa), jeszcze rzadziej nie mają one określonych wymagań siedliskowych.

Przynależność systematyczna gatunków badanych w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego przedstawia się następująco (wg "Index Fungorum") [5]:

Królestwo	Fungi – grzyby
Typ	Basidiomycota – podstawczaki
Podtyp	Agaricomycotina
Klasa	Agaricomycetes – pieczarniaki

Podklasa Agaricomycetidae – podstawczaki pieczarkopodobne

Rząd Agaricales – pieczarkowce

Rodzina *Pleurotaceae* – bocznikowate

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. – bocznik ostrygowaty; ang. tree oyster mushroom

Podklasa *Incertae sedis*

Rząd Polyporales – żagwiowce

Rodzina *Fomitopsidaceae* – pniarkowate

Fomitopsis pinicola (Sw.) P. Karst. – pniarek obrzeżony; ang. red belt conk.

Fomitopsis betulina (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai – białoporek brzożowy; ang. birch polypore [wcześniej *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst.]

Rodzina *Polyporaceae* – żagwiowate

Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt. – gmatwica chropowata; ang. thin walled maze polypore

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill – żółciak siarkowy; ang. chicken-of-the-woods

Rodzina *Sparassidaceae* – siedzuniowate

Sparassis crispa (Wulfen) Fr. – siedzuń sosnowy; ang. cauliflower fungus

Rząd Gloeophyllales – niszczycowce

Rodzina *Gloeophyllaceae* – niszczycowate

Gloeophyllum sepiarium (Wulfen) P. Karst. – niszczycza płotowa; ang. rusty gilled polypore

Rząd Hymenochaetales – szczeciniakowce

Rodzina *Hymenochaetaceae* – szczeciniakowate

Phellinus igniarius (L.) Quél. – czyreń ogniowy; ang. willow bracket

Phellinus pini (Brot.) Pilát – czyreń sosnowy; ang. white speck

Phellinus pomaceus (Pers.) Maire – czyreń śliwowy; ang. cushion bracket

Phellinus robustus (P. Karst.) Bourdot & Galzin – czyreń dębowy; ang. robust bracket

Rząd Auriculariales – uszakowce

Rodzina *Auriculariaceae* – uszakowate

Auricularia polytricha (Mont.) Sacc. – uszak gęstowłosy; ang. cloud ear fungus

Grzyby wielkoowocnikowe – w tym gatunki nadrewnowe – od tysięcy lat towarzyszą człowiekowi, jako cenny surowiec leczniczy. Ich działanie znane z tradycyjnego zastosowania zostało potwierdzone licznymi badaniami naukowymi. Ponadto współcześnie przeprowadzane eksperymenty dokumentują nowe kierunki ich aktywności.

Prowadzone w ostatnich dekadach badania składu chemicznego grzybów wykazały, że są one wartościowym źródłem związków biologicznie aktywnych. Zidentyfikowane związki o właściwościach leczniczych, należą do grup o bardzo zróżnicowanej strukturze chemicznej.

Główne grupy biogenetyczne związków chemicznych występujące w grzybach wielkoowocnikowych można sklasyfikować następująco [6]:

1. związki wywodzące się z metabolizmu podstawowego cukrów (monosacharydy, disacharydy, polisacharydy, alkohole cukrowe),
2. związki powstałe w wyniku przemian aktywnego octanu (poliketydy, izoprenoidy, sterole),
3. związki powstałe z przemian kwasów tłuszczowych (poliacetyleny),
4. związki wywodzące się biogenetycznie z kwasu szikimowego (kwasy fenolowe),
5. związki powstałe w wyniku przemian aminokwasów (aminy, peptydy, związki indolowe),
6. związki powstałe z przemian aminokwasów aromatycznych (alkaloidy sporyszu).

Powyższy podział zbliżony jest do szlaków biogenezy związków występujących w świecie roślin.

W piśmiennictwie naukowym przyjęto również podział metabolitów grzybowych na związki azotowe i bezazotowe [7]. Przykładem metabolitów azotowych występujących w grzybach są aminokwasy, peptydy, białka, lektyny, aminy, alkaloidy, pochodne indolu, związki purynowe, pochodne izoksazolu, czy pochodne fenoksazyny.

Do związków bezazotowych występujących w owocnikach zaliczamy węglowodany, lipidy, poliacetyleny, poliketydy, izoprenoidy, sterole, kwasy organiczne, a także związki fenolowe [8].

Grzyby wielkoowocnikowe jako surowiec leczniczy uznane są przede wszystkim w krajach Dalekiego Wschodu, gdzie od wieków stosowane są m.in. w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej (TCM). Posiadają one potwierdzoną w badaniach eksperymentalnych aktywność przeciwnowotworową, immunomodulującą, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową oraz przeciwzapalną [2, 9]. Ponadto wykazują działanie antycholinergiczne, hipotensyjne, hepatoprotekcyjne, antyoksydacyjne [10].

Pomimo tak znaczącego potencjału biosyntetycznego istnieją tylko cztery zarejestrowane leki o działaniu immunostymulującym, bazujące na β -glukanach izolowanych z owocników czy mycelium [11–14]:

Lentinan – frakcja polisacharydowa wyizolowana z *Lentinula edodes*

Schizofylan – frakcja polisacharydowa wyizolowana z *Schizophyllum commune*

Grifolan – frakcja polisacharydowa wyizolowana z *Grifola frondosa*

Krestin (PSK) – polisacharyd wyizolowany z *Trametes versicolor*

Mechanizm przeciwnowotworowego działania polisacharydów polega na stymulacji określonych części składowych układu odpornościowego, głównie limfocytów T i B, makrofagów i komórek NK, do wydzielania interleukin. Ponieważ polisacharydy nie wykazują aktywności cytotoksycznej lub cytostatycznej w testach *in vitro* w stosunku do komórek nowotworowych, przyjęto hipotezę, że związki te mogą działać pośrednio, aktywując układ immunologiczny, nie niszcząc bezpośrednio komórki zmienionej nowotworowo. Działając immunostymulująco, powodują zwiększenie naturalnej, nieswoistej odpowiedzi odpornościowej [2, 15].

Coraz powszechniej natomiast, stosowane są suplementy diety o działaniu poprawiającym pracę układu odpornościowego, zawierające ekstrakty z owocników i grzybni uzyskiwanej metodami biotechnologicznymi. Rynek tych preparatów dynamicznie się rozwija i wg FDA oceniany był w 2014 roku na 18,0 mld USD [16].

Właściwościami biologicznymi grzybów nadrewnowych zainteresował się również przemysł kosmetyczny, wprowadzając ekstrakty z owocników oraz z biomasy z kultur mycelialnych do produkcji preparatów kosmetycznych [17]. Cenne w kosmetologii właściwości grzybów leczniczych *Ganoderma lucidum* – lakownica lśniąca (reishi) czy *Lentinula edodes* – twardziak jadalny (shiitake) to przede wszystkim działanie tzw. przeciwstarzeniowe związane z aktywnością antyoksydacyjną, przeciwzapalną, promieniochronną. Za wymienione kierunki aktywności odpowiedzialne są głównie β -glukany. Z kolei działanie wybielające ekstraktów pochodzenia grzybowego związane z występowaniem związków będących inhibitorami tyrozynazy [18].

W Polsce występuje w stanie naturalnym kilkadziesiąt gatunków grzybów nadrewnowych. Obiecujące wyniki badań gatunków pochodzących z innych kontynentów (przede wszystkim z Azji), stanowiły przesłankę do podjęcia analiz mykochemicznych i potencjału biologicznego ekstraktów z owocników i kultur mycelialnych gatunków będących powszechnym składnikiem rodzimej mykoflory.

W przedstawionym cyklu prac skoncentrowałam się na badaniach wybranych grup związków bioaktywnych o wielokierunkowym działaniu leczniczym m. in. kwasów fenolowych, związków indolowych, steroli, terpenoidów.

Kwasy fenolowe – zarówno liczne pochodne kwasu cynamonowego, jak i benzoowego, oraz depsydy, to atrakcyjna farmakologicznie grupa, ze względu na liczne, cenne właściwości lecznicze m.in., przeciwnowotworowe, immunostymulujące, przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Ponadto wykazują działanie żółciopędne, rozkurczowe, hipolipemiczne, przeciwzakrzepowe [19]. Związki te pełnią istotną rolę w przypadku gatunków nadrewnowych. Podczas procesów rozkładu drewna, na którym bytują grzyby, katalizowanych przez szereg enzymów, tj. ligninazy, hemicelulazy, celulazy, oksydazy i peroksydazy (peroksydaza ligniny – LIP, peroksydaza manganozależna – MnP) dochodzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych, które indukują proces autooksydacji kwasów tłuszczowych. Prawdopodobnie w celu uniknięcia uszkodzeń oksydacyjnych, grzyby nadrewnowe w procesie ewolucji wykształciły zdolność do syntezy antyoksydantów, których głównymi przedstawicielami są kwasy fenolowe [20].

Kolejną badaną grupę stanowiły niehalucynogenne związki indolowe, których biogenetycznym prekursorem jest tryptofan. Pochodne tryptaminy, takie jak serotonina i melatonina pełnią w organizmie człowieka rolę neuroprzekaźników, wpływają na regulację cyklu dobowego u ludzi i biorą udział w kaskadzie krzepnięcia krwi [21]. Wykazują działanie przeciwnowotworowe, przeciwstarzeniowe i przeciwzapalne [22]. Przypisuje się im również właściwości antyoksydacyjne [23]. Badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej UJ CM potwierdziły występowanie tej grupy związków u licznych przedstawicieli Basidiomycota, w tym w gatunkach jadalnych i leczniczych.

Mykosterole, spośród których na szczególną uwagę zasługuje ergosterol oraz jego nadtlenek, są obecne w owocnikach większości przedstawicieli Basidiomycota. Ergosterol jest głównym składnikiem błon komórkowych grzybów, silnie związanym z cytoplazmą [24], a jego zawartość jest zależna m.in. od stopnia rozwoju organizmu grzybowego [25]. Wykazuje on wiele prozdrowotnych właściwości jak aktywność przeciwzapalna, przeciwutleniająca czy przeciwdziałająca hiperlipidemii. Ponadto może być zaangażowany w aktywację ekspresji określonych genów obronnych [26]. Cennym związkiem przyczyniającym się do prozdrowotnych właściwości grzybów jest nadtlenek ergosterolu,

który wykazuje m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, czy przeciwdrobnoustrojowe [27, 28].

Terpenoidy również występują powszechnie w królestwie grzybów [29]. W gatunkach nadrewnowych rozpowszechnione są przede wszystkim triterpeny typu lanostanu i ergostanu. Ich szerokie spektrum aktywności biologicznej obejmuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, hepatoprotekcyjne, przeciwcukrzycowe oraz przeciwwirusowe [8, 30].

Większość badań o charakterze mykochemicznym dotyczy analizy zawartości oraz identyfikacji struktur chemicznych związków bioaktywnych oraz zawartości biopierwiastków w owocnikach [31]. Cechą wyróżniającą grzyby spośród organizmów żywych jest zdolność do pobierania i akumulacji związków organicznych i nieorganicznych (a szczególnie metali) ze środowiska – za akumulację pierwiastków odpowiedzialne są obecne w owocnikach enzymy z grupy metalotionein. Interesującym, nierozpatrywanym szerzej zagadnieniem jest zjawisko stopnia uwalniania związków czynnych z materiału grzybowego, co jest szczególnie istotne w przypadku gatunków jadalnych. W ramach przeprowadzonych badań zaplanowano i przeprowadzono eksperymenty mające na celu przeniesienie i dostosowanie metodologii ekstrakcji materiału grzybowego w sztucznych sokach trawiennych w warunkach naśladujących te, które panują w przewodzie pokarmowym człowieka. Następnie oznaczono zawartości wybranych prozdrowotnych związków oraz biopierwiastków uwolnionych z grzybów jadalnych do soków trawiennych. Badanie uwalniania i biodostępności związków bioaktywnych, zawartych w owocnikach gatunków jadalnych może mieć istotne znaczenie w profilaktyce zdrowotnej człowieka.

Kultury mycelialne, jako model do badań nad akumulacją związków leczniczych

Mykotechnologia jest obecnie prężnie rozwijającym się kierunkiem szeroko pojętej biotechnologii, której nadrzędnym zadaniem jest jak najlepsze wykorzystanie potencjału biochemicznego grzybów [32]. Wśród klasycznych technik znajdujących zastosowanie w produkcji substancji czynnych na skalę przemysłową przez grzyby, najważniejsze miejsce zajmują procesy fermentacyjne prowadzone na dużą skalę w bioreaktorach, przy precyzyjnym doborze optymalnych warunków. W ten sposób wykorzystywany jest przede wszystkim potencjał grzybów strzępkowych. Związki biosyntetyzowane przez grzyby wielkoowocnikowe – w tym gatunki nadrewnowe – mogą być pozyskiwane z wykorzystaniem tzw. kultur mycelialnych [33].

Kulturą mycelialną nazywamy hodowlę grzybni, prowadzoną na sztucznym podłożu (stałym lub płynnym) w warunkach sterylnych. Podstawowymi składnikami podłoża do prawidłowego rozwoju mycelium są źródła węgla (np. w postaci glukozy) oraz źródło azotu (np. aminokwasy) [34]. Najpowszechniejszym sposobem zakładania kultury mycelialnej jest izolacja fragmentu owocnika

z trzonu lub warstwy hymenialnej, innym sposobem inicjacji kultur mycelialnych jest wykiełkowanie wysterylizowanych zarodników (spor), które otrzymuje się przez wysyp z warstwy hymenialnej.

Na fot. 1 i 2 przykładowe kultury mycelialne na podłożu płynnym – *Laetiporus sulphureus* i *Fomitopsis betulina* – gatunków będących obiektem przeprowadzonych badań.



Ryc. 1. Kultury mycelialne hodowane na podłożu płynnym wg Oddoux.
a. *Laetiporus sulphureus*, b. *Fomitopsis betulina*

Przeniesienie grzybni ze środowiska naturalnego do laboratorium i możliwość sztucznej hodowli stały się znaczącym krokiem do pozyskania cennego materiału badawczego. Już w latach 60. ubiegłego wieku w szybko rozwijającej się biotechnologii grzybów zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania grzybni otrzymanej w warunkach *in vitro*, jako modelu do badań nad akumulacją związków o znaczeniu terapeutycznym [35].

Za początki współczesnej biotechnologii grzybów wielkoowocnikowych uważa się rok 1966, kiedy to F. J. Gregory przebadał aktywność przeciwnowotworową związków obecnych w pożywkach pochodzących z hodowli płynnej kilkudziesięciu gatunków grzybów wielkoowocnikowych [36].

Kultury mycelialne, podobnie jak owocniki są źródłem wielu cennych związków. Ekstrakty oraz pojedyncze wyizolowane związki posiadają udowodnione właściwości przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, detoksykacyjne, obniżające poziom cukru i cholesterolu we krwi [37, 38].

W kulturach mycelialnych otrzymywane są na ogół te same produkty metabolizmu wtórnego, które produkowane są w owocnikach grzybów. Czasem pod wpływem zmienionych warunków prowadzenia kultur mycelia mogą syntezować nowe związki, niespotykane w owocnikach, o interesujących właściwościach biologicznych. Z tego względu należy porównywać skład chemiczny grzybni wyhodowanej *in vitro* ze składem owocników zebranych ze stanu naturalnego. Badania porównawcze należy również przeprowadzać pomiędzy grzybnią a pożywką, w której też mogą gromadzić się wytworzone przez mycelium metabolity pierwotne i wtórne [39].

Z przeglądu dotychczasowych badań wynika, że najszerzej badano w kulturach mycelialnych grzybów wielkoowocnikowych – w tym gatunków nadrewnowych – możliwość akumulacji polisacharydów, związków o silnym działaniu immunostymulującym. Kultury mycelialne mogą być również źródłem związków o aktywności cytostatycznej takich jak kwas ganodermy – triterpenoid otrzymany z kultur *Ganoderma lucidum* [40] czy pochodne ergosterolu wyodrębnione z kultur *Trametes versicolor* [41]. Kultury mycelialne mogą być również źródłem związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, w tym kwasów fenolowych. Znanych jest wiele gatunków charakteryzujących się wysoką zawartością tych związków. Na szczególną uwagę zasługują typowe przykłady leczniczych gatunków nadrewnowych *Inonotus xeranticus*, *Phellinus linteus*, czy *Antrodia camphorata* charakteryzujące się znaczącą aktywnością antyoksydacyjną i zdolnością zmiatania wolnych rodników [38, 42].

Liczne przykłady izolacji z mycelium metabolitów biologicznie aktywnych dowodzą, że kultury *in vitro* grzybów wielkoowocnikowych są ważnym źródłem substancji leczniczych, a ich produkcja metodami biotechnologicznymi na dużą skalę może stać się korzystnym rozwiązaniem dla przemysłu farmaceutycznego. Przykładem jest preparat Lentinan produkowany przez japoński koncern Ajinomoto (Ajinomoto Group Corporate) [43].

Mykotechnologia, może też być wykorzystywana, jako narzędzie w procesach oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń, które bezpośrednio przyczyniają się do pogorszenia stanu zdrowia człowieka oraz do rozwoju chorób cywilizacyjnych. Jedną z coraz powszechniej stosowanych metod jest mykoremediacja, polegająca na wykorzystaniu grzybów do usuwania zanieczyszczeń [44]. Zaletą stosowania grzybów jest nie tylko ich zdolność do wydzielania enzymów zewnątrzkomórkowych, ale także do wytwarzania strzępek, które łatwo penetrują w głąb gleby i rozprzestrzeniają się w środowisku, co ułatwia im dostęp do zanieczyszczeń. Ponadto grzyby mają zdolność do przeżywania w warunkach stresu, jakim może być niski odczyn pH czy ograniczona zawartość substancji odżywczych. W procesie oczyszczania gleby z metali ciężkich stosuje się m.in. bioaugmentację – metodę polegającą na wykorzystaniu biomasy otrzymanej w wyniku prowadzenia kultur mycelialnych i ich potencjału biodegradacyjnego [45]. W ramach przeprowadzonych badań analizowano zdolności do remediacji wybranych metali ciężkich (kadmu i ołowiu) przez biomasę z kultur mycelialnych wybranych gatunków grzybów.

4.3.2. Omówienie wyników badań stanowiących podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego

1(H) Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B, Motyl P, Paško P, Ekiert H. 2012, Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. International Journal of Medicinal Mushrooms, 14(4): 385-393.

Z uwagi na wzrastające na całym świecie zainteresowanie składem chemicznym owocników grzybów oraz wynikającymi z tego faktu aplikacjami terapeutycznymi, podjęto badania mające na celu analizę zawartości związków fenolowych oraz określenie potencjału antyoksydacyjnego wybranych gatunków grzybów nadrewnowych powszechnie występujących na terenie Polski.

Materiał do badań stanowiły ekstrakty z owocników pięciu gatunków grzybów nadrewnowych: *Daedaleopsis confragosa* – gmatwica chropowata, *Fomitopsis pinicola* – pniarek obrzeżony, *Gloeophyllum sepiarium* – niszczyca płotowa, *Laetiporus sulphureus* – żółciak siarkowy, *Piptoporus betulinus* – białoporek brzozy. Owocniki zebrano w 2010 roku w lasach mieszanych Polski Południowej (województwo małopolskie).

W ramach badań przeprowadzono analizę jakościową i ilościową kwasów fenolowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej faz odwróconych z detekcją UV-VIS, do rozdziału związków zastosowano elucję gradientową [46]. Podjęto próbę izolacji kwasów fenolowych, oraz ustalenie ich tożsamości z zastosowaniem spektroskopii ^1H NMR.

We współpracy z dr hab. Pawłem Paško z Zakładu Bromatologii UJ CM określono całkowitą zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu'a oraz oznaczano aktywność antyoksydacyjną ekstraktów metodą FRAP.

Badane gatunki (z wyjątkiem *L. sulphureus*) nie były dotychczas przedmiotem analiz zawartości kwasów fenolowych. To właśnie z ich silnym działaniem przeciwutleniającym i zdolnością do ochrony przed uszkodzeniem oksydacyjnym ważnych życiowo struktur, tj. DNA chromosomalnego, białek strukturalnych, enzymów, LDL i lipidów błon komórkowych związane jest ich szerokie spektrum aktywności biologicznej [47].

W ekstraktach potwierdzono obecność kwasu *p*-hydroksybenzenowego, kwasu protokatechowego i kwasu wanilinowego. Zawartości poszczególnych związków były zróżnicowane i mieściły się w zakresie od 1,08 do 9,00 mg/100 g suchej masy (s.m.). Dominującym ilościowo kwasem fenolowym był kwas protokatechowy, którego zawartość mieściła się w zakresie od 1,77 mg/100 g s.m. (w *L. sulphureus*) do 9,00 mg/100 g s.m. (w *F. pinicola*). W mniejszej ilości występowały kwas *p*-hydroksybenzoesowy od 1,08 mg/100 g s.m. (w *F. pinicola*) do 3,00 mg/100 g s.m. (w *G. sepiarium*) i kwas wanilinowy od 1,20 mg/100 g s.m. w (*D. confragosa*) do 1,41mg/ 100 g s.m. w (*F. pinicola*).

Gatunkiem o największej całkowitej zawartości kwasów fenolowych był *F. pinicola* (11,49 mg/100 g s.m.). Podobną zawartością charakteryzował się ekstrakt z *D. confragosa* (9,71 mg/100 g s.m.). W owocnikach *G. sepiarium* stwierdzono prawie 2-krotnie mniejszą zawartość kwasów fenolowych (5,54 mg/100 g s.m.). Najmniejszą ilość kwasów fenolowych wykazano w owocnikach *L. sulphureus* (1,77 mg/100 g s.m.).

W przypadku *Daedaleopsis confragosa* i *Fomitopsis pinicola* podjęto próbę izolacji i ustalenia tożsamości związków fenolowych na podstawie porównania ich widm ^1H NMR z widmami wzorcowych kwasów fenolowych, a także na podstawie porównania widm z danymi z piśmiennictwa [48, 49] i widmami dostępnymi w bazach: SDBS (Spectral Database for Organic Compound) (SDBS) i HMDB (Human Metabolome Database Version 2.5) (HMDB). Na podstawie danych potwierdzono tożsamość kwasu protokatechowego w owocnikach *Daedaleopsis confragosa* i *Fomitopsis pinicola*.

W ekstraktach z owocników badanych grzybów całkowita zawartość polifenoli oznaczona metodą Folina-Ciocalteu'a wynosiła od 6,80 mg/g s.m. (dla *D. confragosa*), do 21,88 mg/g s.m. (dla *F. pinicola*). Wysoką zawartość polifenoli stwierdzono także w owocnikach *G. sepiarium* (19,88 mg/g s.m.) i *P. betulinus* (13,84 mg/g s.m.). W owocnikach *L. sulphureus* oznaczona zawartość polifenoli wynosiła 10,40 mg/g s.m.

Najwyższą aktywność antyoksydacyjną oznaczoną metodą FRAP wykazały ekstrakty metanolowo-acetonowe z owocników *G. sepiarium* (188,21 mmol Fe^{2+} /kg s.m.) i *F. pinicola* (111,30 mmol Fe^{2+} /kg s.m.). Słabszą aktywność przeciwutleniającą posiadały ekstrakty z owocników *P. betulinus* (49,42 mmol Fe^{2+} /kg s.m.), *D. confragosa* (14,93 mmol Fe^{2+} /kg s.m.) i *L. sulphureus* (8,60 mmol Fe^{2+} /kg s.m.). Zbadano również zależność aktywności antyoksydacyjnej, od całkowitej zawartości związków fenolowych w ekstraktach metanolowo-acetonowych, nie stwierdzono istotnej korelacji między badanymi zmiennymi w przypadku wszystkich badanych gatunków.

Z przeglądu piśmiennictwa naukowego wynika, że obserwuje się wysoką dodatnią korelację między aktywnością antyoksydacyjną roślin, a stężeniem obecnych w nich związków fenolowych [47, 52]. Podobną zależność obserwuje się również dla grzybów jadalnych [53]. Jednak w przypadku grzybów nadrewnowych rzadziej występuje podobna korelacja.

Pomimo powszechności tezy, iż kwasy fenolowe, a także inne pochodne fenolowe są dominującą ilościowo grupą związków odpowiedzialnych za aktywność przeciwutleniającą grzybów nadrewnowych, brak dobrej korelacji między tymi parametrami wskazuje na obecność związków o innej strukturze, odgrywających kluczową rolę w aktywności antyoksydacyjnej grzybów.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że stosunkowo wysoka zawartość związków fenolowych (w tym kwasów fenolowych) i znaczna aktywność antyoksydacyjna owocników grzybów *F. pinicola* i *G. sepiarium*, świadczą o możliwości potencjalnego ich wykorzystania, jako źródła naturalnych antyoksydantów. Brak wyraźnej zależności pomiędzy

zawartością kwasów fenolowych i całkowitą zawartością związków fenolowych, a aktywnością antyoksydacyjną badanych ekstraktów wskazuje na konieczność dalszych analiz w celu określenia związków odpowiedzialnych za tę aktywność.

2(H) Sulowska-Ziája K, Muszyńska B, Szewczyk A. 2015, Antioxidant components of selected indigenous edible mushrooms of the obsolete order *Aphyllphorales*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 32(2): 99-102.

Kontynuując tematykę związaną z poszukiwaniem związków o aktywności antyoksydacyjnej w owocnikach grzybów nadrewnowych, w kolejnej pracy poszerzyłam badania o dodatkowe grupy związków wykazujących wymieniony efekt biologiczny.

Związki występujące w owocnikach grzybów o właściwościach zapobiegających chorobom wywołanym przez wolne rodniki, można uszeregować w następujący sposób, według malejącej aktywności antyoksydacyjnej: związki fenolowe > kwas askorbinowy > sterole (tokoferole) > karotenoidy > związki indolowe [54].

Obiektem badań były owocniki grzybów sklasyfikowane, jako aphyllforoidalne (sztucznie wyodrębniona jednostka na podstawie specyficznych cech morfologicznych w warstwie hymenialnej owocnika): *Hydnum repandum* – kolczak obłączasty z rodziny *Hydnaceae* (kolczakowate) oraz przedstawiciel grzybów nadrewnowych z rodziny *Sparassidaceae* (siedzuniowate) – *Sparassis crispa* – siedziun sosnowy (szmaciak gałęzisty), bytujący na żywych oraz martwych korzeniach drzew iglastych.

Celem pracy była analiza zawartości, kwasów fenolowych, niehalucynogennych związków pochodnych indolu w ekstraktach metanolowych oraz steroli w ekstraktach metanolowo-dichlorometanowych. Do oznaczeń wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej faz odwróconych RP-HPLC z detekcją UV-VIS. W rozdzielaniu kwasów fenolowych [46] oraz steroli zastosowano elucję gradientową [55], w przypadku rozdzielania związków indolowych elucję izokratyczną.

Spośród analizowanych kwasów fenolowych w ekstraktach z owocników *Sparassis crispa* wykazano obecność kwasu galusowego, gentyzynowego, *p*-hydroksybenzoesowego, kawowego, *o*-kumarowego, protokatechowego oraz kwasu syryngowego. Całkowita zawartość kwasów fenolowych wynosiła 85,65 mg/100 g s.m. Zawartość poszczególnych kwasów fenolowych mieściła się w zakresie od 0,1 mg/100 g s.m. (kwas gentyzynowy i kawowy) do 43,92 mg/100 g s.m. (kwas protokatechowy).

Spośród analizowanych związków o strukturze indolu w owocnikach *Sparassis crispa* wykazano obecność indolu, melatoniny oraz tryptaminy. Całkowita zawartość pochodnych indolu wynosiła 2,39 mg/100 g s.m. Dominującym ilościowo metabolitem był indol 1,7 mg/100 g s.m.

W ramach pracy analizowano jakościowy i ilościowy skład związków o strukturze steroli. W ekstraktach z owocników *Sparassis crispa* wykazano wysoką zawartość ergosterolu w ilości 150,37 mg/100 g s.m. Dla porównania w jednym z najbardziej uznanych, z uwagi na wysoki potencjał biologiczny, nadrewnowych grzybów leczniczych – *Lentiula edodes* (shiitake) ergosterol występuje w ilości 85 mg/100 g s.m.

Właściwości prozdrowotne oznaczonych kwasów fenolowych są związane przede wszystkim z ich właściwościami przeciwutleniającymi, posiadają zdolność blokowania związków kancerogennych powstających na drodze metabolicznych przemian niektórych substancji rakotwórczych, np. 4-nitrochinolino-1-tlenków [56]. Również oznaczone związki indolowe charakteryzuje działanie antyoksydacyjne. W badaniach *in vitro* wykazano, że nie tylko melatonina, ale również pochodne indolu (N-acetyloserotonina, 6-metoksytryptamina) zmniejszają peroksydację lipidów w sposób zależny od dawki [57]. Liczne prace dowodzą antyoksydacyjnych właściwości ergosterolu [58].

Badania składu chemicznego *Sparassis crispa* skupiały się głównie na analizie polisacharydów obecnych w owocnikach [59].

W ramach pracy po raz pierwszy oznaczono skład jakościowy i ilościowy związków indolowych oraz ergosterolu w ekstraktach z owocników. Na podstawie uzyskanych wyników *Sparassis crispa* można uznać za bogate źródło ergosterolu.

3(H) Kryczyk A, Piotrowska J, Sito M, Sulowska-Ziaja K, Dobosz K, Opoka W, Muszyńska B. 2017, Remediation capacity of Cd and Pb ions by mycelia of *Imleria badia*, *Laetiporus sulphureus*, and *Agaricus bisporus* in vitro cultures. Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 52(9): 617-622.

Rozwój cywilizacyjny powoduje zwiększone zanieczyszczenie środowiska (w tym gleby) metalami ciężkimi, co z kolei prowadzi do wzrostu poziomu toksycznych pierwiastków w łańcuchach pokarmowych, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia ludzkiego [60].

Jedną z metod rekultywacji jest mykoremediacja, która jest skutecznym narzędziem biologicznym wykorzystującym zdolność grzybów do wiązania metali ciężkich obecnych w glebie [61].

Celem pracy było określenie zdolności remediacji metali ciężkich przez biomasę z kultur mycelialnych nadrewnowego gatunku grzyba leczniczego *Laetiporus sulphureus*, poprzez określenie stopnia nagromadzenia Cd(II) i Pb(II) w pożywce oraz w mycelium otrzymanym w warunkach *in vitro*.

Kultury inicjalne wyprowadzono z fragmentu młodego owocnika, zebranego ze stanu naturalnego (lasy nadleśnictwa Krynica, woj. małopolskie) i prowadzono na podłożu zestalonym agarem, następnie założono kultury eksperymentalne (wytrąsane) – na podłożu płynnym wg Oddoux [62]. Kultury eksperymentalne suplementowano Cd(II) lub Pb(II) w stężeniu 5×10^{-5} M. Kontrolę stanowiły kultury prowadzone bez dodatku pierwiastków. Analizie elementarnej poddano również owocniki zebrane ze stanu naturalnego. Obiektem badań ujętych w pracy były również kultury mycelialne jadalnych gatunków grzybów *Imleria badia* – podgrzybek brunatny i *Agaricus bisporus* – pieczarka dwuzarodnikowa.

We współpracy dr Agatą Kryczyk z zespołu Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej pod kierownictwem Prof. dr hab. Włodzimierza Opoki oznaczono zawartość Cd(II) i Pb(II) w zmineralizowanym materiale. W pomiarach zastosowano technikę absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA).

Wykazano, że dodatek kadmu i ołowiu w zastosowanym stężeniu wpływa znacząco na przyrost grzybni *Laetiporus sulphureus* (stwierdzono 3-trzykrotny wzrost biomasy w stosunku do wyjściowego inokulum).

Otrzymane wyniki wskazują na wysokie zdolności mykoremediacji metali ciężkich przez mycelium *Laetiporus sulphureus* otrzymanym w warunkach *in vitro* – w tym przypadku oznaczono najwyższe (wśród gatunków objętych badaniami) stężenie jonów w mycelium w przeliczeniu na suchą masę – odpowiednio dla Cd(II) – $140,86 \pm 3,61$, dla Pb(II) – $308,39 \pm 13,60$ $\mu\text{g/g}$ s.m. W owocnikach oraz w pożywce tego gatunku zawartość kadmu i ołowiu była poniżej poziomu oznaczalności. Pozostała badane gatunki charakteryzowała umiarkowana zdolność remediacji ołowiu i kadmu.

Zastosowane kultury mycelialne *Laetiporus sulphureus*, pozwoliły na zapewnienie powtarzalnych warunków eksperymentalnych, w których możliwe było monitorowanie stopnia akumulacji metali i określenie skuteczności mykoremediacji [63]. Kultury te można zaproponować jak model do badań unieszkodliwiania zanieczyszczeń. Zaletą ich jest zdolność grzybni do wykorzystania w charakterze substratu pokarmowego substratów lignocelulozowych. Mykoremediacja jest zatem metodą nie tylko tania, lecz także przyjazną środowisku.

4(H) Sulowska-Ziaja K, Maślanka A, Szewczyk A, Muszyńska B. 2017, Physiologically active compounds in four species of *Phellinus*. *Natural Product Communications*, 12(3): 363-366.

Obiecujące wyniki badań nad składem chemicznym owocników grzybów nadrewnowych z rodzaju *Phellinus* (czyreń) – rodzina *Hymenochaetaceae* (szczeciniakowate) przeprowadzone przez badaczy z ośrodków naukowych z Azji (Chiny, Korea) stały się impulsem do podjęcia analiz gatunków wymienionego rodzaju będących powszechnym składnikiem mykoflory polskiej.

Obiektem badań były owocniki czterech gatunków z rodzaju *Phellinus*: *Phellinus igniarius* – czyreń ogniowy, *Phellinus pini* – czyreń sosnowy, *Phellinus pomaceus* – czyreń sliwkowy, oraz *Phellinus robustus* – czyreń dębowy.

Przegląd piśmiennictwa wskazuje na wysoki potencjał leczniczy wymienionych gatunków. Ekstrakty z owocników *P. igniarius* wykazują działanie cytotoksyczne, immunostymulujące i przeciwzapalne, wynikające z obecności związków terpenoidowych o strukturze lanostanu oraz frakcji polisacharydowych PISP1 [64, 65]. Dowiedziono również, że *P. igniarius* posiada działanie antyoksydacyjne związane z obecnością makrocyklicznego związku o nazwie phelligridimer A [66].

Owocniki *P. pini* są potencjalnym źródłem związków przeciwzapalnych o strukturze steroidowej m.in. ergosta-4,6,8(14)22-tetraen-3-onu. Polisacharydy o strukturze β -1,3-glukanu wyizolowane z owocników tego gatunku charakteryzują się działaniem przeciwwirusowym [67]. Z owocników *P. pomaceus* wyizolowano hispidynę, związek o aktywności cytotoksycznej oraz hamującej integrazę [68]. Melaniny obecne w *P. robustus* wykazują silną aktywność antyoksydacyjną. Potwierdzono również ich właściwości genoprotekcyjne [69].

Celem pracy było opracowanie metody rozdziału i analizy ilościowej niehalucynogennych związków pochodnych indolu i kwasów fenolowych w ekstraktach otrzymanych z owocników.

Związki indolowe analizowano metodą RP-HPLC z detekcją UV-VIS. Z kolei kwasy fenolowe oznaczono metodą RP-HPLC z detekcją DAD. Z uwagi na trudności w rozdzielach chromatograficznych związków indolowych (zbliżone czasy retencji związków) dodatkowo zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) połączoną z detekcją densytometryczną – we współpracy z dr Anną Maślanką z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej przeprowadzono optymalizację warunków oznaczeń metodą chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną w zakresie UV, która pozwoliła na identyfikację i jednoczesne oznaczenie ilościowe 3 metabolitów o charakterze niehalucynogennych związków indolu: L-tryptofanu, tryptaminy i serotoniny w analizowanym materiale (uzyskano znaczące różnice w wartości współczynników retencji R_f , co umożliwiło identyfikację poszczególnych związków). Wymienione metody analityczne zwalidowano.

Zawartości poszczególnych związków indolowych wynosiły od 1,7 mg/100 g s.m. (tryptamina w *P. robustus*) do 8,32 mg/100 g s.m. (L-tryptofan w *P. igniarius*). Gatunkiem o największej całkowitej zawartości związków indolowych był *P. igniarius* (18,33 mg/100 s.m.). Gatunki *P. pini* i *P. robustus* akumulowały pochodne indolu na podobnym poziomie (odpowiednio 11,15 i 11,16 mg/100 g s.m.). Związkiem dominującym ilościowo był L-tryptofan. Zarówno w wyniku analiz metodą TLC z detekcją densytometryczną w zakresie UV, jak i analiz metodą RP-HPLC wykazano obecność tych samych związków indolowych.

Spośród analizowanych kwasów fenolowych w badanych gatunkach stwierdzono obecność kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego, kwasu galusowego, kwasu protokatechowego i kwasu syringowego. Całkowita zawartość kwasów fenolowych wynosiła od 9,94 mg/100 g s.m. (*P. igniarius*) do 32,58 mg/100 g s.m. (*P. robustus*). Zawartość poszczególnych związków mieściła się w zakresie od 0,90 (kwas syringowy w *P. robustus*) do 26,68 mg/100 g s.m. (kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy w *P. robustus*). Jedynym metabolitem wspólnym dla wszystkich czterech badanych gatunków był kwas protokatechowy.

W dostępnym piśmiennictwie naukowym nie znaleziono danych dotyczących obecności niehalucynogennych związków indolowych w badanych gatunkach grzybów nadrewnowych. A zatem ich zawartość została potwierdzona po raz pierwszy. Oznaczona w ekstraktach z owocników serotonina jest ważnym neuroprzebieżnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym [21].

Akumulacja kwasów fenolowych przez gatunki rodzaju *Phellinus* również nie była do tej pory przedmiotem szerszych analiz. Dostępne dane dotyczą jedynie gatunku *P. igniarius*. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy potwierdziły obecności kwasu syringowego i protokatechowego, natomiast nie potwierdziła obecności kwasu kawowego oznaczonego jakościowo przez Mo i wsp. [70].

Oznaczone w ramach przeprowadzonych badań metabolity to związki o wielokierunkowym działaniu leczniczym. Kwas protokatechowy obecny we wszystkich badanych gatunkach charakteryzuje się silną aktywnością antyoksydacyjną. Wykazuje działanie przeciwbakteryjne (głównie na bakterie G(+)), przeciwgrzybicze oraz przeciwzapalne. Stymuluje produkcję przeciwciał klasy IgG. Działa żółciopędnie, żółciotwórczo oraz przeciwnowotworowo [71]. Kwas syringowy wykazuje działanie żółciopędne i żółciotwórcze przez bezpośrednie działanie spazmolityczne na mięśnie gładkie. Wykazuje skuteczność w leczeniu nowotworów piersi. Z kolei kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy jest skuteczny w leczeniu nowotworu piersi.

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczną zawartość związków o uznanej aktywności biologicznej. Rodzime gatunki można uznać za potencjalne źródło związków o wielokierunkowej aktywności terapeutycznej.

5 (H) Kała K, Krakowska A, Sulowska-Ziaja K, Szewczyk A, Reczyński W, Opoka W, Muszyńska B. 2017, Kinetics of extracted bioactive components from mushrooms in artificial digestive juices. International Journal of Food Properties, 20(8): 1796–1817.

Materiał do badań stanowiły owocniki grzybów jadalnych. Analizą objęto dwanaście gatunków, w tym dwa lecznicze gatunki nadrewnowe: *Pleurotus ostreatus* – boczniak ostrygowaty (uznane źródło lowastatyny, związku o właściwościach hipolipemicznych stosowanego w terapii schorzeń układu krwionośnego, serca i udarach mózgu) oraz *Auricularia polytricha* – uszak gęstowłosy, gatunek produkujący m.in. białko APP (*Auricularia polytricha* protein) o właściwościach wzmacniających odpowiedź immunologiczną organizmu człowieka [72]. Gatunki nadrewnowe do badań pozyskano ze stanu naturalnego (*P. ostreatus*) oraz z upraw komercyjnych (*A. polytricha*).

Koncepcją pracy było prześledzenie procesu uwalniania bioaktywnych metabolitów wtórnych (kwas fenolowy i niehalucynogenne pochodne indolu) oraz biopierwiastków (Mg, K, Na, Ca, Cu, Zn, Fe) z materiału grzybowego do sztucznych soków trawiennych, w układzie imitującym warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka. W tym celu skonstruowano aparat Gastroel-2014 [Patent P 417238] [73], mający za zadanie odtwarzać etapy procesu trawienia, poprzez imitację ruchów perystaltycznych jelit w warunkach temperatury ciała człowieka. W trakcie eksperymentu analizowano procesy trawienne w roztworze sztucznej śliny (w czasie 1 minuty), w roztworze sztucznego soku żołądkowego przy uwzględnieniu różnych czasów inkubacji odpowiadających naturalnemu czasowi przebywania treści pokarmowej w żołądku (15, 60 oraz 120 minut) oraz w roztworze sztucznego soku jelitowego (w czasie 150 minut) [74]. Zawartość biopierwiastków analizowano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano zależności występujące pomiędzy gatunkiem grzyba, długością czasu inkubacji w soku trawiennym, a stopniem uwalniania substancji do sztucznych soków trawiennych.

W wyniku badania stopnia uwalniania Mg do roztworu sztucznej śliny (1 min inkubacji), wykazano, że spośród wszystkich badanych gatunków, największa ilość tego pierwiastka uwalnia się z gatunku *P. ostreatus* – 55 mg/100 g s.m. Z kolei dla *A. polytricha* uzyskano wynik 27 mg/100 g s.m., który był zbliżony do wyników uzyskanych w przypadku pozostałych gatunków.

Rozpatrując zawartości Mg uwolnionego do sztucznego soku żołądkowego stwierdzono, że ilości te są zależne od czasu inkubacji materiału grzybowego. Zaobserwowano prawidłowość, że najlepszy efekt uwalniania Mg do sztucznego soku żołądkowego, w większości gatunków, uzyskano dla czasu inkubacji 60 min. W przypadku *P. ostreatus* ilość ta wynosiła 45,1 mg/100 g s.m., natomiast dla *A. polytricha* było to 36,5 mg/100 g s.m. Zawartości Mg uwolnione do sztucznego soku jelitowego na poziomie 11,28 oraz 7 mg/100 g s.m. stwierdzono odpowiednio dla *P. ostreatus* i *A. polytricha* (po 60 min uprzedniego wytrawiania w sztucznym soku żołądkowym).

Również w przypadku uwalniania K do roztworu sztucznej śliny najwyższą wartość oznaczono dla *P. ostreatus* – 8590 mg/100 g s.m. (dla *A. polytricha* było to odpowiednio 7707 mg/100 g s.m.). Optymalne rezultaty uwalniania K do sztucznego soku żołądkowego odpowiadały 120 min czasowi inkubacji – i wynosiły 4885 mg/100 g s.m. dla *P. ostreatus* i 2452 mg/100 g s.m. dla *A. polytricha*. Ilości K uwolnione następnie w sztucznym soku jelitowym wynosiły odpowiednio 1890 i 2203 mg/100 g s.m. dla wymienionych gatunków.

Uwalnianie Na do roztworu sztucznej śliny, podobnie jak w przypadku K, kształtowało się na wysokim poziomie ± 4000 mg/100g s.m. Najkorzystniejsze wyniki uwalniania Na do sztucznego soku żołądkowego odpowiadały czasowi inkubacji 15 min – i wynosiły 2902 mg/100 g s.m. (dla *P. ostreatus*) oraz 60 min dla *A. polytricha* – 2018 mg/100 g s.m. Najwyższe ilości Na oznaczone następnie w sztucznym soku jelitowym, to odpowiednio 3703 i 3546 mg/100 g s.m.

Interesujące rezultaty wykazano w przypadku analizy zawartości Ca uwolnionego do roztworu sztucznej śliny. Zawartości te kształtowały się na zbliżonym poziomie w przypadku 12 badanych gatunków, w tym 2 gatunków nadrewnowych (368 mg/100 g s.m. – *P. ostreatus* oraz 330 mg/100 g s.m. – *A. polytricha*), co sugeruje brak zależności pomiędzy gatunkiem grzyba, a stopniem uwalniania Ca do roztworu sztucznej śliny. Z kolei w badaniach uwalniania w sztucznym soku żołądkowym zaobserwowano prawidłowość, że najwyższe ilości tego pierwiastka zostały uwolnione po 60 min inkubacji (178 mg/100 g s.m. dla *P. ostreatus* i 83 mg/100 g s.m. dla *A. polytricha*). Zawartość Ca uwolnionego do sztucznego soku jelitowego, w żadnym z gatunków nadrewnowych, nie przekroczyła 60 mg/100 g s.m.

W wyniku analizy zawartości mikroelementów (Cu i Zn) uwolnionych do sztucznych soków trawiennych wykazano nieznaczne ilości tych pierwiastków. Świadczy o tym koncentracja Cu w sztucznej ślinie na poziomie 0,040 mg/100 g s.m. (*A. polytricha*) i 0,35 mg/100 g s.m. (*P. ostreatus*) oraz Zn – 0,249 mg/100 g s.m. (*A. polytricha*) i 1,12 mg/100 g s.m. (*P. ostreatus*).

Najkorzystniejszy czas inkubacji w sztucznym soku żołądkowym dla Cu i Zn to 60 minut, podobnie jak dla Mg i Ca. W przypadku gatunków nadrewnowych, do roztworu sztucznego soku żołądkowego Zn i Cu uwolniły się w ilości nieprzekraczającej 2,09 mg/100 g s.m. dla Zn i 0,302 mg/100 g s.m. dla Cu (*P. ostreatus*). Oznaczona zawartość Cu uwolniona z *A. polytricha* wyniosła natomiast 0,073 mg/100 g s.m., a zawartość Zn – 0,537 mg/100 g s.m. Ponadto zaobserwowano, że dla ustalonego optymalnego czasu 60 min inkubacji, zarówno w przypadku Cu jak i Zn, najmniej efektywne wyniki uwalniania do soku żołądkowego uzyskano dla gatunków grzybów nadrewnowych. W poddanych analizie sztucznych sokach jelitowych, otrzymanych po strawieniu *A. polytricha* i *P. ostreatus*, wykazano zawartości mikroelementów w zakresie: 0,021 – 0,057 mg/100 g s.m dla Cu i 0,114 – 1,228 mg/100 g s.m. dla Zn.

W pracy analizowano również zawartość Fe. W roztworze sztucznej śliny pierwiastek ten uwalnia się w ilości 2,5 mg/100 g s.m. (*P. ostreatus*) oraz 0,37 mg/100 g s.m. (*A. polytricha*). Najkorzystniejszym czasem wytrawiania materiału w sztucznym soku żołądkowym, w przypadku obu gatunków, okazało się również 60 minut.

W ekstraktach analizowano również zawartość związków indolowych (metodą RP-HPLC z detekcją UV-VIS) oraz kwasów fenolowych (metodą RP-HPLC z detekcją DAD).

Analiza zawartości uwolnionych do sztucznych soków trawiennych związków indolowych potwierdziła obecność siedmiu pochodnych indolu L-tryptofanu, 5-hydroksy-L-tryptofanu, 6-metylo-D,L-tryptofanu, tryptaminy, 5-metylotryptaminy, serotoniny oraz melatoniny. Związkiem oznaczonym we wszystkich gatunkach był 5-hydroksy-L-tryptofan, który również dominował ilościowo. Również w przypadku serotoniny uzyskane wyniki ilościowe kształtowały się na podobnym poziomie. Najkorzystniejszym czasem, w którym uzyskano najwyższe zawartości tych związków po ekstrakcji owocników do sztucznego soku żołądkowego, było odpowiednio 60 i 120 minut. Mniejsze ilości związków indolowych uwalniały się po 15 minutach inkubacji w sztucznym soku żołądkowym, co świadczy o tym, że materiał grzybowy nie zostaje po tak krótkim czasie odpowiednio wytrawiony.

Po inkubacji materiału w sztucznym soku żołądkowym oznaczono więcej związków indolowych, w porównaniu po inkubacji w sztucznym soku jelitowym. Porównawczo najmniejsze ilości 5-hydroksy-L-tryptofanu i serotoniny uwolniły się po 1 minucie inkubacji w roztworze sztucznej śliny. Spośród analizowanych 12 gatunków grzybów, najuboższy skład jakościowy związków indolowych charakteryzował gatunek *A. polytricha*, dla którego oznaczono 5-hydroksy-L-typtofan, serotoninę, 5-metylotryptaminę i melatoninę, przy czym do sztucznej śliny po 1 min został uwolniony wyłącznie 5-hydroksy-L-typtofan w ilości 10,5 mg/100 g s.m. Z kolei w przypadku *P. ostreatus* w sokach trawiennych oznaczono 5-hydroksy-L-tryptofan, serotoninę, tryptaminę, 5-metylotryptaminę oraz melatoninę.

W otrzymanych ekstraktach badanych 12 gatunków grzybów jadalnych stwierdzono obecność czterech kwasów fenolowych: protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, syringowego oraz kwasu galusowego. Jakościowo w badanych gatunkach nadrewnowych oznaczono trzy związki: w *P. ostreatus* kwas syringowy, a w *A. polytricha* kwas protokatechowy i galusowy. Najmniej korzystnym etapem uwalniania kwasów fenolowych była inkubacja w roztworze sztucznej śliny, prawdopodobnie ze względu na krótki czas inkubacji. Po inkubacji w sztucznym soku żołądkowym, w przypadku gatunku *A. polytricha* zaobserwowano wzrost uwalniania się kwasu protokatechowego wraz ze zwiększającym się czasem wytrawiania, i tak odpowiednio średnia zawartość kwasu protokatechowego wynosiła 1,0; 1,18; 2,3 mg/100g s.m. (po 15, 60 i 120 min). Po 150 min inkubacji w sztucznym soku jelitowym, średnia zawartość uwolnionego kwasu protokatechowego była znacznie

niższa i wynosiła 0,6 mg/100 g s.m. W przypadku gatunku *P. ostreatus* oznaczono tylko kwas syringowy (2,9 – 3,5 mg/100 g s.m.) po inkubacji w sztucznym soku jelitowym.

Ze względu na liczebność wyników, jak również rozrzut ich wielkości, jako element analizy statystycznej zastosowano narzędzia chemometryczne (Statgraphics Centurion XVI), pozwalające na określenie wzajemnych powiązań jakie występują pomiędzy obiektami (gatunkami grzybów), a zmierzonymi zmiennymi (zawartością biopierwiastków i związkami organicznymi). Zastosowano Cluster Analysis – CA oraz Principal Component Analysis – PCA.

Doświadczenie obejmujące badanie uwalniania substancji bioaktywnych z gatunków grzybów jadalnych zostało przeprowadzone po raz pierwszy i stanowi bogate źródło informacji na temat ich potencjału prozdrowotnego. W eksperymencie wykazano, że owocniki grzybów jadalnych są wartościowym źródłem związków indolowych, kwasów fenolowych, a także biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka [31]. Badania te mają charakter innowacyjny. Dowiedziono, że grzyby nie tylko syntezują i akumulują wymienione substancje i związki, ale także mogą być one z nich uwalniane w przewodzie pokarmowym człowieka.

6(H) Sulowska-Ziaja K, Szewczyk A, Galanty A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B. 2018.

Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*. *Molecular Biology Reports*, 45(6): 2535–2544.

Fomitopsis betulina – białoporek brzozy z rodziny *Fomitopsidaceae* (pniarkowate) jest powszechnie występującym grzybem nadrewnowym [75]. Owocniki stosowano w medycynie ludowej ze względu na właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przyspieszające gojenie ran, a także jako środek przeczyszczający i wspomagający w schorzeniach żołądka. Większość opisanych powyżej potencjalnych aplikacji terapeutycznych została potwierdzona badaniami naukowymi.

Celem pracy była analiza ekstraktów, pozyskanych z kultur mycelialnych oraz porównawczo z owocników pod względem występowania związków zapobiegających rozwojowi chorób cywilizacyjnych. W ramach badań oceniono aktywność cytotoksyczną i przeciwzapalną ekstraktów z kultur mycelialnych oraz z owocników.

Metodami zastosowanymi w badaniach były chromatografia RP-HPLC-DAD (kwasy fenolowe, sterole, pentacykliczne triterpeny), RP-HPLC-UV-VIS (pochodne indolu) oraz GC (kwasy tłuszczowe). We współpracy z dr Agnieszką Galanty z Katedry Farmakognozji UJ CM oznaczono cytotoksyczność ekstraktów wobec linii ludzkich komórek nowotworowych (raka prostaty DU145, oraz czerniaka WM795 i A375) z użyciem testu opartego na określeniu aktywności dehydrogenazy mleczanowej – LDH. Dodatkowo określono selektywność działania cytotoksycznego ekstraktów na prawidłowe komórki skóry (fibroblasty BJ) i prostaty (PNT2).

We współpracy z dr hab. Joanną Gdulą-Argasińską z Zakładu Radioligandów UJ CM oceniono wpływ ekstraktów na aktywność przeciwzapalną w komórkach nabłonkowych płuc A549 aktywowanych LPS. Poziom białka prozapalnego COX-2 oznaczono techniką Western blot.

Kultury mycelialne wyprowadzono z fragmentu młodego owocnika zebranego ze stanu naturalnego (lasy nadlesnictwa Krynica, woj. małopolskie), a następnie prowadzono na podłożu płynnym wg Oddoux [62]. Po 3-tygodniowym cyklu wzrostu, przyrosty biomasy wynosiły średnio 9,5 g suchej biomasy na litr podłoża.

Całkowita zawartość kwasów fenolowych w biomacie uzyskanej z kultur mycelialnych wyniosła 22,56 mg/100 s.m., a w owocnikach 37,08 mg/100 s.m. W mycelium i w owocnikach potwierdzono obecność kwasów: syringowego, galusowego, *p*-hydroksybenzoesowego oraz 3,4-dihydroksyfenylooctowego.

Zarówno w mycelium, jak i w owocnikach *F. betulina* zidentyfikowano 11 kwasów tłuszczowych, w tym 6 nasyconych, 4 jednonienasycone oraz 1 wielonienasycony kwas tłuszczowy. W największej ilości w ekstraktach z kultur *in vitro* występował kwas palmitynowy (35,8%), a w najmniejszej kwas palmitooleinowy (0,4%). W ekstraktach z owocników dominował ilościowo kwas stearynowy (41,6%), w najmniejszej ilości występował kwas *cis*-10-pentadekanowy (0,4%). Zawartość kwasu palmitynowego była 2,5-krotnie, a kwasu mirystooleinowego aż 9-krotnie większa w ekstraktach z kultur *in vitro* niż w ekstraktach z owocników. Stężenie kwasu linolowego było aż 23-krotnie większe w ekstraktach z kultur *in vitro* niż w ekstraktach z owocników.

Spośród oznaczanych steroli w kulturach mycelialnych, jak i w owocnikach oznaczono odpowiednio – ergosterol (41,29; 103,99 mg/100 s.m.), cholekalcyferol (0,31; 6,55 mg/100 g s.m.), nadtlenek ergosterolu (17,11; 11,88 mg/100 s.m.) oraz heksesterol (3,55; 4,01 mg/100 g s.m.).

W biomacie oznaczono niehalucynogenne związki indolowe L-tryptofan, 5-hydroksy-L-tryptofan i 5-metylotryptaminę. W największej ilości występowała 5-metylotryptamina (3,99 mg/100 s.m.), w najmniejszej L-tryptofan (1,34 mg/100 s.m.). Całkowita zawartość związków indolowych w biomacie wyniosła 8,07 mg/100 s.m. Całkowita zawartość związków indolowych w owocnikach wyniosła 10,33 mg/100 s.m.

Analiza chromatograficzna potwierdziła obecność betuliny oraz kwasu betulinowego. W owocnikach zawartość betuliny i kwasu betulinowego wynosiła 0,002 i 0,0008 mg/100g s.m., podczas gdy w kulturach mycelialnych 0,0006 i 0,0003 mg/100g.

Po namnożeniu biomasy z kultur mycelialnych *Fomitopsis betulina* podjęto próbę izolacji i ustalenia tożsamości związków triterpenowych. Porównując otrzymane widma ¹H NMR z widmami substancji wzorcowych oraz widmami dostępnymi w bazach: SDBS (Spectral Database for Organic Compound) (SDBS) i HMDB (Human Metabolome Database Version 2.5) potwierdzono tożsamość betuliny.

Wszystkie badane ekstrakty wykazały działanie cytotoksyczne wobec linii komórkowych zastosowanych w eksperymencie. Ekstrakt z kultur *in vitro* wykazywał znaczącą aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka prostaty DU145 ($27,28 \pm 0,98$ i $5,37 \pm 0,31\%$ żywych komórek przy stężeniach ekstraktu 20 i 50 $\mu\text{g/mL}$, odpowiednio) i umiarkowany wpływ na komórki czerniaka linii A375 ($21,39 \pm 1,4\%$ żywych komórek przy stężeniu ekstraktu 50 $\mu\text{g/mL}$), podczas gdy inna linia komórkowa czerniaka WM795 była mniej podatna ($74,21 \pm 1,29\%$ żywych komórek przy stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$). Ekstrakt z biomasy z kultur mycelialnych nie wykazywał działania cytotoksycznego na prawidłowe ludzkie fibroblasty i komórki nabłonkowe prostaty, co wskazuje na jego selektywność. Wyniki cytotoksycznego działania ekstraktów z owocników wykazały umiarkowany wpływ na żywotność komórek czerniaka A375 i raka prostaty DU145 (odpowiednio $52,12 \pm 1,45$ i $69,32 \pm 1,69\%$ żywych komórek przy stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$). Nie stwierdzono wpływu na komórki czerniaka WM795 ($96,22 \pm 1,63\%$ żywych komórek przy stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$). Ekstrakt nie miał wpływu na normalne ludzkie fibroblasty, natomiast wykazał działanie cytotoksyczne wobec prawidłowych komórek nabłonka prostaty ($5,21 \pm 0,43\%$ żywych komórek przy stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$) [76].

Wyniki uzyskane w ramach pracy po raz pierwszy wskazały na cytotoksyczny potencjał grzybni hodowanej *in vitro* wobec komórek raka prostaty oraz komórek czerniaka. Ponadto po raz pierwszy opisano cytotoksyczny wpływ ekstraktów z owocnika *F. betulina* na wymienione linie komórkowe.

Po inkubacji z ekstraktami z owocników i kultur *in vitro* nie stwierdzono apoptozy czy obniżonej żywotności komórek A549 aktywowanych LPS. Ekspresję COX-2 obserwowano w komórkach A549 aktywowanych LPS (w porównaniu do kontroli). Ekspresja cyklooksygenazy była niższa w próbkach inkubowanych z ekstraktami grzybni 10 μM i 25 μM aktywowanymi LPS w porównaniu z ekstraktami z owocników.

Kwasy tłuszczowe zawarte w grzybach mogą wspomagać procesy przeciwzapalne w organizmie człowieka, ze względu na duży udział nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są prekursorami eikozanoidów, cząsteczek sygnałowych niezbędnych dla prawidłowej regulacji procesów komórkowych w mięśniach, naczyniach krwionośnych, komórkach nerwowych oraz w układzie odpornościowym [76]. Eikozanoidy zapewniają równowagę między procesami zapalnymi i przeciwzapalnymi [77].

Liczne badania wykazały, że ergosterol oraz produkty jego peroksydacji (nadtlenek ergosterolu) wykazują efekt terapeutyczny w postaci zmniejszenia odczuwania bólu związanego ze stanem zapalnym, zmniejszenie częstości występowania chorób sercowo-naczyniowych choroby i hamują działanie enzymu cyklooksygenazy (COX) [78].

Betulina wykazuje szerokie spectrum aktywności biologicznej wobec wielu schorzeń, w tym aktywność przeciwnowotworową. Wchodzi w interakcje z białkami wiążącymi czynnik regulujący sterole (ang. Sterol Regulatory Element-Binding Proteins, SREBP), które pełnią ważną rolę

w aktywowaniu ekspresji genów zaangażowanych w syntezę cholesterolu, kwasów tłuszczowych i trójglicerydów [79].

Jest to pierwsza analiza wymienionych grup związków w biomacie z kultur *in vitro* *F. betulina*. Wielokierunkowa aktywność biologiczna ekstraktów z *F. betulina* do tej pory tłumaczona jest aktywnością polisacharydów oraz triterpenów. Oznaczone związki mogą mieć wpływ na aktywność biologiczną ekstraktów.

Otrzymane wyniki wskazują, że ekstrakty otrzymane z biomasy z kultur *in vitro* oraz z owocników *F. betulina* wykazują znaczący potencjał leczniczy – przeciwwzapalny i cytotoksyczny

7(H) Piska K, Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B. 2017. Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) – its dietary significance and biological activity. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(1): 151–161.

8(H) Sulowska-Ziaja K, Muszyńska B, Gawalska A, Sałaciak K. 2018. *Laetiporus sulphureus* – chemical composition and medicinal value. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 17(1): 89–98.

W przedłożonych pracach o charakterze pogładowym dokonano analizy najnowszego piśmiennictwa naukowego dotyczącego składu chemicznego i właściwości biologicznych ekstraktów oraz związków wyizolowanych z owocników i kultur mycelialnych dwóch nadrewnowych gatunków jadalnych: *Pleurotus ostreatus* – bocznik ostrygowaty oraz *Laetiporus sulphureus* – żółciak siarkowy.

Publikacje podsumowują i pogłębiają aktualną wiedzę na temat potencjalnych aplikacji terapeutycznych gatunków uznawanych za grzyby lecznicze głównie w odniesieniu do chorób cywilizacyjnych. W obu pracach zwrócono też uwagę na metodykę upraw, która może być źródłem wartościowego materiału nie tylko w aspekcie zastosowań kulinarnych.

Pleurotus ostreatus, to gatunek o szerokim zasięgu występowania na kuli ziemskiej. Jest ceniony ze względu na walory odżywcze. Jest bogatym źródłem witamin, gdyż sto gramów świeżych owocników dostarcza ok. 15% zalecanej dziennej dawki witaminy C, 40% witaminy B₁ (tiaminy), B₂ (ryboflawiny), B₃ (niacyny) oraz 0,5 mg witaminy B₁₂ (cyjanokobalaminy). Gatunek ten charakteryzuje się również znaczną zawartością kwasu oleinowego (40%), kwasu linolenowego (55%). W owocnikach stwierdzono obecność lowastatyny, związku o silnym działaniu hipolipemizującym [80] oraz pleuranu – polisacharydu o właściwościach immunomodulujących [81]. Ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej *P. ostreatus* jest uważany za grzyb leczniczy. Ekstrakty z owocników znalazły zastosowanie w leczeniu chorób cywilizacyjnych, dzięki właściwościom przeciwmiażdżycowym, hipoglikemicznym, antyoksydacyjnym,

przeciwnowotworowym i immunomodulacyjnym. *P. ostreatus* jest także potencjalnym źródłem aktywnych składników o zastosowaniu w preparatach kosmetycznych.

Kolejnym przykładem grzyba leczniczego jest *Laetiporus sulphureus* – gatunek od wieków stosowany w medycynie ludowej m.in. ze względu na działanie przeciwgorączkowe, przeciwkaszlowe i przeciwreumatyczne. Możliwość izolacji z jego owocników cennych metabolitów wtórnych, na przestrzeni ostatnich kilku dziesięcioleci stał się przedmiotem licznych prac badawczych na całym świecie [82, 83].

Badania aktywności biologicznej surowych ekstraktów jak i pojedynczych związków wykazały działanie m. in. przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, immunostymulujące i przeciwdrobnoustrojowe. Analizy składu chemicznego udowodniły, że gatunek ten bogaty jest przede wszystkim w związki o strukturze polisacharydów. Z owocników i kultur mycelialnych wyizolowano również lektyny i triterpeniody m.in. z grupy lanostanu [84, 85].

Obecnie tylko kilka gatunków grzybów nadrewnowych ma praktyczne zastosowanie lecznicze. Wydaje się ważne, aby kontynuować badania nad skutecznością i bezpieczeństwem ekstraktów i związków pochodzenia grzybowego, w tym gatunków, których potencjał nie jest jeszcze w pełni doceniany.

4.3.3. Podsumowanie przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego

Podsumowując, w ramach badań, których wyniki zostały opublikowane w pracach przedłożonych do oceny:

- wykazałam, że ekstrakty z owocników i biomasy z kultur mycelialnych objętych analizą 12 nadrewnowych gatunków grzybów leczniczych są bogatym źródłem substancji o wielokierunkowym działaniu leczniczym **1(H)-6(H)**
- po raz pierwszy udowodniłam obecność kwasów fenolowych w owocnikach: *Daedaleopsis confragosa*, *Fomitopsis pinicola*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Fomitopsis betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, *Phellinus pomaceus* oraz *Phellinus robustus* **1(H); 4(H); 6(H)**
- po raz pierwszy udowodniłam obecność niehalucynogennych pochodnych indolu w owocnikach: *Fomitopsis betulina*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, *Phellinus pomaceus*, *Phellinus robustus*, *Sparassis crispa* **2(H); 4(H); 6(H)**
- po raz pierwszy stwierdziłam obecność ergosterolu w owocnikach *Sparassis crispa* **2(H)**
- po raz pierwszy oznaczyłam jakościowo i ilościowo w biomasie otrzymanej w warunkach *in vitro* *Fomitopsis betulina* kwasy tłuszczowe, kwasy fenolowe, związki indolowe, sterole oraz triterpeny pentacykliczne **6(H)**
- oznaczenie aktywności cytotoksycznej ekstraktów z owocników oraz biomasy otrzymanej w warunkach *in vitro* *Fomitopsis betulina* wobec komórek nowotworowych raka prostaty DU145 oraz prawidłowych komórek prostaty PNT-2 zostało przeprowadzone po raz pierwszy **6(H)**
- oznaczenie aktywności cytotoksycznej ekstraktów z owocników oraz biomasy otrzymanej w warunkach *in vitro* *Fomitopsis betulina* wobec komórek nowotworowych czerniaka WM795 i A375 (różniących się potencjałem przerzutowym) oraz prawidłowych komórek skóry przeprowadzono po raz pierwszy **6(H)**
- oznaczenie aktywności przeciwzapalnej ekstraktów z owocników oraz biomasy otrzymanej w warunkach *in vitro* *Fomitopsis betulina* w komórkach nabłonkowych płuc A549 aktywowanych LPS z zastosowaniem techniki Western blot (oznaczenie poziomu białka prozapalnego COX-2) zostało przeprowadzone po raz pierwszy **6(H)**

- po raz pierwszy wyizolowałam i zidentyfikowałam w ekstrakcie z owocników *D. confragosa* oraz *F. pinicola* związek o strukturze kwasu fenolowego – kwas protokatechowy **1(H)**
- po raz pierwszy wyizolowałam i zidentyfikowałam w ekstrakcie z biomasy otrzymanej w warunkach *in vitro* *Fomitopsis betulina* związek o strukturze triterpenoidu pentacyklicznego – betulinę **6(H)**
- w ramach badań opracowano optymalne warunki rozdzielania związków indolowych w ekstraktach z owocników metodą TLC połączoną z detekcją densytometryczną oraz przeprowadzono walidację metody **4(H)**
- w ramach badań przeprowadzono walidację metody oznaczeń kwasów fenolowych w ekstraktach z owocników metodą HPLC **4(H)**
- po raz pierwszy przeprowadzono badania stopnia uwalniania substancji bioaktywnych obecnych w owocnikach jadalnych gatunków nadrewnowych – *Pleurotus ostreatus* i *Auricularia polytricha* – (biopierwiastków, kwasów fenolowych oraz związków indolowych) do sztucznych soków trawiennych **5(H)**
- po raz pierwszy udowodniono zdolność mykoremediacji metali ciężkich (kadmu i ołowiu) przez grzybnię *Laetiporus sulphureus* otrzymaną w warunkach *in vitro* **3(H)**

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań z zakresu mykochemii oraz biotechnologii leczniczych gatunków grzybów nadrewnowych, których rezultatem jest osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego mają charakter nowatorski.

W ramach zrealizowanych zadań badawczych, poznany został skład chemiczny i aktywność biologiczna ekstraktów z owocników oraz z biomasy otrzymanej w warunkach *in vitro*, wybranych grzybów nadrewnowych. Uzyskane wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat prozdrowotnego potencjału gatunków będących powszechnym składnikiem rodzimej mykoflory. Ważnym aspektem badania terapeutycznego potencjału gatunków jadalnych było określenie stopnia uwalniania do sztucznych soków trawiennych związków bioaktywnych zawartych w materiale pochodzącym z gatunków jadalnych, oraz określenie zdolności mykoremediacji przez mycelium uzyskane w warunkach *in vitro*.

4.3.4. Piśmiennictwo

1. Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438.
2. Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274.
3. Kwaśna, H., Łakomy, P. (2015). *Atlas hub*. Wydawnictwo Multico. Warszawa.
4. Gumińska, B., Wojewoda, W. (1985). *Grzyby i ich oznaczanie*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
5. <http://www.indexfungorum.org/NAMES/NAMES.asp>; retrieved April 5, 2019.
6. Deacon, J. (2005). *Fungal Biology*. Blackwell Publishing Ltd. Malden, MA USA.
7. Jiang, M. Y., Feng, T., Liu, J. K. (2011). N-Containing compounds of macromycetes. *Natural Product Reports*, 28(4), 783–808.
8. Chen, H. P., Liu, J. K. (2017). Secondary Metabolites from Higher Fungi. *Progress In The Chemistry of Organic Natural Products* 106, 1–201.
9. Barneche, S., Jorcin, G., Cecchetto, G., Cerdeiras, M. P., Vázquez, A., Alborés, S. (2016). Screening for Antimicrobial Activity of Wood Rotting Higher Basidiomycetes Mushrooms from Uruguay against Phytopathogens. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(3), 261–267.
10. Zjawiony, J. K. (2004). Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67(2), 300–310.
11. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka, F. (1970). Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Research*, 30(11), 2776–2781.
12. Tsuzuki, A., Tateishi, T., Ohno, N., Adachi, Y., Yadomae, T. (1999). Increase of Hematopoietic Responses by Triple or Single Helical Conformer of an Antitumor (1→3)-β-D-Glucan Preparation, Sonifilan, in Cyclophosphamide-induced Leukopenic Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(1), 104–110.
13. Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T. (1994). Enhancement of Cytokine Production by Macrophages Stimulated with β-D-Glucan, Grifolan (GRN), Isolated from *Grifola frondosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(12), 1554–1560.
14. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K. (1984). Krestin (PSK). *Cancer Treatment Reviews*, 11(2), 131–155.
15. Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. (1969). Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *GANN – Japanese Journal of Cancer Research*, 60(2), 137–44.
16. <https://www.fda.gov/>; FDA – U S Food and Drug Administration Home Page; retrieved April 5, 2019.
17. Hyde, K. D., Bahkali, A. H., Moslem, M. A. (2010). Fungi – An unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity*, 43(1), 1–9.
18. Wu, Y., Choi, M. H., Li, J., Yang, H., Shin, H. J., Wu, Y., Shin, H. J. (2016). Mushroom Cosmetics: The Present and Future. *Cosmetics*, 3(3), 1–22.
19. Parus, A. (2012). Antioxidant and pharmacological properties of phenolic acids. *Postępy Fitoterapii*,

- 1/2013, 48–53.
20. Ferreira, I., Barros, L., Abreu, R. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560.
 21. Birdsall, T. C. (1998). 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review*, 3(4), 271–280.
 22. Esposito, E., Cuzzocrea, S. (2010). Antiinflammatory Activity of Melatonin in Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 8(3), 228–242.
 23. Keszthelyi, D., Troost, F. J., Masclee, A. A. (2009). Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology Motility*, 21(12), 1239–1249.
 24. Weete, J. D. (1973). Sterols of the fungi: Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*, 12(8), 1843–1864.
 25. Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Ramos, Á. (2012). Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 177–182.
 26. Lochman, J., Mikes, V. (2006). Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 62(1–2), 43–51.
 27. Merdivan, S., Lindequist, U. (2017). Ergosterol Peroxide: A Mushroom-Derived Compound with Promising Biological Activities. A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(2), 93–105.
 28. Ma, L., Chen, H., Dong, P., Lu, X. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139(1–4), 503–508.
 29. Demyttenaere, J., De Kimpe, N. (2001). Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4–6), 265–270.
 30. Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001.
 31. Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113(1), 9–16.
 32. Bennett, J. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66(2–3), 101–107.
 33. Turło, J. (2007). Kultury mycelialne *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – optymalizacja biosyntezy biologicznie czynnych produktów, akumulacja biopierwiastków, perspektywy aplikacyjne. Rozprawa habilitacyjna. Warszawski Uniwersytet Medyczny.
 34. Daza, A., Manjón, J. L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santamaría, C. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza*, 16(2), 133–136.
 35. De Araújo, Á. A., Roussos, S. (2002). A Technique for Mycelial Development of Ectomycorrhizal Fungi on Agar Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98–100(1–9), 311–318.
 36. Gregory, F. J., Healy, E. M., Agersborg, H. P. K., Warren, G. H. (1966). Studies on Antitumor Substances Produced by Basidiomycetes. *Micologia*, 58(1), 80–91.
 37. Zhang, B. B., Guan, Y. Y., Hu, P. F., Chen, L., Xu, G. R., Liu, L., Cheung, P. C. K. (2019). Production

- of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 1–14.
38. Jung, J. Y., Lee, I. K., Seok, S. J., Lee, H. J., Kim, Y. H., Yun, B. S. (2008). Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1824–1832.
 39. Turło, J. (2014). The biotechnology of higher fungi – current state and perspectives. *Folia Biologica et Oecologica*, 10(1), 49–65.
 40. Tang, Y. J., Zhong, J. J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1–2), 20–28.
 41. Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Shinmoto, H. (2007). Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 150(2), 209–219.
 42. Hseu, Y. C., Chen, S. C., Yech, Y. J., Wang, L., Yang, H. L. (2008). Antioxidant activity of *Antrodia camphorata* on free radical-induced endothelial cell damage. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 237–245.
 43. <https://www.ajinomoto.com/en/>; Ajinomoto Group Corporate Web Site; retrieved April 5, 2019.
 44. Kołwzan, B., Adamiak, W., Dziubek, A. M. (2018). Możliwości zastosowania grzybów w technologiach oczyszczania i remediacji wybranych elementów środowiska. *Ochrona Środowiska*, 40(1), 3–20.
 45. Przysaś, W., Zabłocka-Godlewska, E. (2016). Screening of basidiomycetes fungi possible to use in decolorization of RBBR dye. *Archives of Waste Management and Environmental Protection*, 18(4), 1–8.
 46. Ellnain-Wojtaszek, M., Zgórk, G. (1999). High-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of phenolic acids from *Ginkgo biloba* L. leaves collected within vegetative period. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 22(10), 1457–1471.
 47. Yeh, Y. H., Lee, Y. T., Hsieh, Y. L., Hwang, D. F. (2009). Dietary Caffeic Acid, Ferulic Acid and Coumaric Acid Supplements on Cholesterol Metabolism and Antioxidant Activity in Rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17, 123–132.
 48. An, L. J., Guan, S., Shi, G. F., Bao, Y. M., Duan, Y. L., Jiang, B. (2006). Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 436–443.
 49. Gutzeit, D., Wray, V., Winterhalter, P., Jerz, G. (2006). Preparative Isolation and Purification of Flavonoids and Protocatechuic Acid from Sea Buckthorn Juice Concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Chromatographia*, 65(1–2), 1–7.
 50. https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi; Spectral Database for Organic Compounds.
 51. <http://www.hmdb.ca/>; Human Metabolome Database.
 52. Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., Chung, I. M. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7265–7270.
 53. Dubost, N. J., Ou, B., Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727–735.
 54. Reis, F. S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2011). Biomolecule

- Profiles in Inedible Wild Mushrooms with Antioxidant Value. *Molecules*, 16(6), 4328–4338.
55. Yuan, J. P., Wang, J. H., Liu, X., Kuang, H. C., Huang, X. N. (2006). Determination of Ergosterol in *Ganoderma* Spore Lipid from the Germinating Spores of *Ganoderma lucidum* by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6172–6176.
 56. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine*, 20(7), 933–56.
 57. Fagali, N., Catalá, A. (2012). The antioxidant behaviour of melatonin and structural analogues during lipid peroxidation depends not only on their functional groups but also on the assay system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4), 873–877.
 58. Obodai, M., Narh Mensah, D., Fernandes, Â., Kortei, N., Dzomeku, M., Teegarden, M., Ferreira, I. (2017). Chemical Characterization and Antioxidant Potential of Wild *Ganoderma* Species from Ghana. *Molecules*, 22(2), 1–18.
 59. Kimura, T. (2013). Natural Products and Biological Activity of the Pharmacologically Active Cauliflower Mushroom *Sparassis crispa*. *BioMed Research International*, 2013, 1–9.
 60. Das, N. (2009). Heavy metals biosorption by mushrooms. *Natural Product Radiance*, 4(6), 454–459.
 61. Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, 4, 1–29.
 62. Oddoux, L. (1957). Recherches sur les myceliums secondaires des Homobasidie's en culture; morphologie, cytologie, exigences alimentaires. Trévoux: J. Patissier, Lyon, France.
 63. Vimala, R., Das, N. (2009). Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 376–382.
 64. Yang, Y., Ye, L., Zhang, J., Liu, Y., Tang, Q. (2009). Structural Analysis of a Bioactive Polysaccharide, PISP1, from the Medicinal Mushroom *Phellinus igniarius*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(1), 134–139.
 65. Chen, L., Pan, J., Li, X., Zhou, Y., Meng, Q., Wang, Q. (2011). Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited anti-tumor effect through enhancement of cell mediated immunity. *International Immunopharmacology*, 11(2), 255–259.
 66. Wang, Y., Wang, S. J., Mo, S. Y., Li, S., Yang, Y. C., Shi, J. G. (2005). Phelligidimer A, a Highly Oxygenated and Unsaturated 26-Membered Macrocyclic Metabolite with Antioxidant Activity from the Fungus *Phellinus igniarius*. *Organic Letters*, 7(21), 4733–4736.
 67. Lee, S. M., Kim, S. M., Lee, Y. H., Kim, W. J., Park, J. K., Park, Y. Il, Synytsya, A. (2010). Macromolecules isolated from *Phellinus pini* fruiting body: Chemical characterization and antiviral activity. *Macromolecular Research*, 18(6), 602–609.
 68. Klaar, M., Steglich, W. (1977). Pilzpigmente, XXVII. Isolierung von Hispidin und 3,14'-Bihispidinyl aus *Phellinus pomaceus* (Poriales). *Chemische Berichte*, 110(3), 1058–1062.
 69. Babitskaya, V. G., Bisko, N. A., Shcherba, V. V., Mitropolskaya, N. Y. (2007). Study of Melanin Complex from Medicinal Mushroom *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourd. et Galz. (Aphyllorphomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(2), 177–184.
 70. Mo, S., Yang, Y., Shi, J. (2003). Studies on chemical constituents of *Phellinus igniarius*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 28(4), 339–41.

71. Masella, R., Santangelo, C., D'Archivio, M., Li Volti, G., Giovannini, C., Galvano, F. (2012). Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 19(18), 2901–17.
72. Sheu, F., Chien, P. J., Chien, A. L., Chen, Y. F., Chin, K. L. (2004). Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. *Food Chemistry*, 87(4), 593–600.
73. Opoka, W., Muszyńska, B., Rojowski, J., Rumian, J. (2016). Gastroel-2014 [Patent P 417238] Poland.
74. Neumann, M., Goderska, K., Grajek, K., Grajek, W. (2006). The *in vitro* models of gastrointestinal tract to study bioavailability of nutriments. *Żywność: Nauka - Technologia - Jakość* 1(46), 30–45.
75. Han, M. L., Chen, Y. Y., Shen, L. L., Song, J., Vlasák, J., Dai, Y. C., Cui, B. K. (2016). Taxonomy and phylogeny of the brown-rot fungi: *Fomitopsis* and its related genera. *Fungal Diversity*, 80(1), 343–373.
76. Kaczor, J., Klecha, I. M., Rzeski, W., Paduch, R., Zdzisińska, Barbara Pożarowski, P., Kandeferszyszeń, M. (2004). Extract from *Piptoporus Betulinus* Bull. Fr. suppress human tumor cell growth. *Postępy Fitoterapii*, 2, 62–66.
77. Dennis, E. A., Norris, P. C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 511–523.
78. Zhang, Y., Mills, G. L., Nair, M. G. (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 10(5), 386–390.
79. Tolstikov, G. A., Flekhter, O. B., Shultz, E. E., Baltina, L. A., Tolstikov, A. G. (2005). Betulin and Its Derivatives. Chemistry and Biological Activity. *Chemistry for Sustainable Development*, 13, 1–29.
80. Chen, S. Y., Ho, K. J., Hsieh, Y. J., Wang, L. T., Mau, J. L. (2012). Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT*, 47(2), 274–278.
81. Jesenak, M., Urbancek, S., Majtan, J., Banovcin, P., Hercogova, J. (2016). β -Glucan-based cream (containing pleuran isolated from *Pleurotus ostreatus*) in supportive treatment of mild-to-moderate atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*, 27(4), 351–354.
82. Hwang, H. S., Lee, S. H., Baek, Y. M., Kim, S. W., Jeong, Y. K., Yun, J. W. (2008). Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), 419–429.
83. He, J. B., Tao, J., Miao, X. S., Bu, W., Zhang, S., Dong, Z. J., Liu, J. K. (2015). Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Laetiporus sulphureus*. *Fitoterapia*, 102, 1–6.
84. Tateno, H., Goldstein, I. J. (2003). Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Novel Hemolytic Lectins from the Mushroom *Laetiporus sulphureus*, Which Show Homology to Bacterial Toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40455–40463.
85. León, F., Quintana, J., Rivera, A., Estévez, F., Bermejo, J. (2004). Lanostanoid Triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and Apoptosis Induction on HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2008–2011.
86. Sułkowska-Ziāja, K., Ekiert, H., Muszyńska, B. (2011). *In vitro* cultures of mushroom species from Basidiomycota a source of therapeutically active chemical compounds. *Farmacja Polska*, 67(7), 433–440.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych

Z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum związana jestem od 1995. Jako absolwentka jednolitych studiów magisterskich na kierunku biologia (specjalność: biologia ogólna/antropologia), na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego zostałam zatrudniona początkowo na etacie naukowo–technicznym, a od roku 1997 na etacie asystenta.

Pracując na etacie naukowo–technicznym zapoznałam się z metodyką zakładania i prowadzenia różnych typów kultur mycelialnych grzybów wielkoowocnikowych, przygotowywaniem podłoży hodowlanych oraz pracą w warunkach sterylnych.

1.10.1997 na wniosek ówczesnego kierownika Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Prof. dr hab. Stanisława Kohlmünzera awansowałam na etat naukowo–dydaktyczny – asystenta.

W latach 1998–2000, jako wykonawca, brałam udział w projekcie finansowanym przez Komitet Badań Naukowych (Grant KBN nr 501/G/140/98) kierowanym przez Prof. dr hab. Stanisława Kohlmünzera. Głównym celem projektu była **ocena zawartości związków pochodnych indolu o charakterze niehalucynogennym w owocnikach i kulturach mycelialnych gatunków grzybów wielkoowocnikowych**. W ramach projektu brałam udział w analizie łącznie kilkudziesięciu gatunków grzybów z typów Ascomycota i Basidiomycota. Na podstawie analiz ekstraktów metodami chromatograficznymi (TLC, PC, RP-HPLC) oraz spektralnymi (EI-MS, spektroskopia UV–VIS), dowiedziono, że zarówno owocniki, jak i biomasa z kultur mycelialnych grzybów posiadają zdolność akumulowania niehalucynogennych związków indolowych o charakterze neuroprzebieżników, czy antyoksydantów (*Załącznik 4/II/A: publikacja 38-O*).

Równolegle z analizą związków indolowych prowadziłam inne badania z zakresu biotechnologii grzybów wyższych. Dotyczyły one m.in. optymalizacji warunków prowadzenia kultur mycelialnych w celu uzyskania maksymalnych przyrostów biomasy (modyfikacje składu podłoża hodowlanego, badanie wpływu warunków fizycznych i chemicznych) oraz możliwości pozyskania aktywnych biologicznie metabolitów (m.in. kwasów tłuszczowych, kwasów fenolowych, steroli) z grzybowych kultur *in vitro* na drodze endogennej biosyntezy. Przedmiotem badań były owocniki i kultury mycelialne takich gatunków jak *Russula emetica* – gołąbek wymiotny, *Mycena pura* – grzybówka fioletowawa, *Gymnopilus spectabilis* – łysak wspaniały, *Cortinarius varius* – zasłonak ceglastożółty i inne.

Efektom nabytej wiedzy oraz doświadczeń była interdyscyplinarna praca doktorska zrealizowana pod kierunkiem Promotora – Prof. dr hab. Haliny Ekiert, łącząca aspekt

biotechnologiczny z metodami badawczymi stosowanymi w chemii analitycznej, biochemii, mikrobiologii oraz biologii molekularnej pt. „**Analiza chemiczna owocników grzybni z kultur *in vitro* *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst. oraz aktywność biologiczna frakcji polisacharydowych**”. Badanym gatunkiem był *Sarcodon imbricatus* – sarniak dachówkowaty, z rodziny *Bankeraceae* – kolcownicowate (typ Basidiomycota), podlegający wówczas ścisłej ochronie na terenie Polski (uzyskano zgodę Ministra Środowiska na zbiór owocników do badań). Z warstwy hymenialnej owocnika zainicjowałam kultury mycelialne. Na podstawie analizy DNA otrzymanego mycelium metodą PCR-RFLP, potwierdziłam jego tożsamość genetyczną z macierzystym owocnikiem.

Przeprowadzone przeze mnie badania przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat związków bioaktywnych występujących w owocnikach *S. imbricatus* oraz określenia zdolności biosyntetycznych mycelium uzyskanego w warunkach *in vitro*. Ustaliłam, że kultury mycelialne zachowują zdolność syntezy szeregu metabolitów występujących w owocnikach. Przykładami mogą być ergosterol, związki indolowe, kwasy fenolowe. Z drugiej strony wykazałam, że kultury mycelialne mają zdolność do wytwarzania związków niewystępujących w owocnikach. Przykładem był inny jakościowo skład kwasów tłuszczowych w owocnikach i w mycelium z kultur *in vitro*.

Badania aktywności biologicznej frakcji polisacharydowych wyizolowanych zarówno z owocników, jak i z kultur mycelialnych wykazały aktywność przeciwbakteryjną wobec licznych szczepów bakteryjnych G(+) i G(-), oraz zdolność hamowania replikacji wirusa HPV-1. Ponadto w przeprowadzonych testach *in vitro*, badane frakcje polisacharydowe wykazały aktywność cytotoksyczną w stosunku do linii komórek nowotworowych – zwierzęcych (melanoma B16, sarcoma XC) oraz ludzkiej (komórek raka sutka).

Wyniki mojej pracy doktorskiej udowodniły, że kultury mycelialne *S. imbricatus* mogą stanowić potencjalne, niezależne od pór roku, warunków klimatycznych etc., alternatywne wobec owocników ze stanu naturalnego, źródło pozyskiwania biologicznie aktywnych metabolitów, w szczególności wykazujących działanie biologiczne frakcji polisacharydowych. Wyniki pracy miały charakter nie tylko poznawczy, ale również aplikacyjny. Na tym etapie, wyniki prac na bieżąco prezentowane były na konferencjach krajowych oraz o zasięgu międzynarodowym (**Załącznik 4/III/D: 37-Z; 39-Z; 42-Z; 25- 31-K; 32-K; 34-K; 36-K; 40-K**).

Równocześnie z tematyką pracy doktorskiej we współpracy z dr hab. Bożeną Muszyńską, prof. UJ, kontynuowałam badania zawartości niehalucynogennych pochodnych indolu w gatunkach grzybów zaliczanych do jadalnych. Badania ekstraktów z owocników gatunku *Lactarius deterrimus* – mleczaj świerkowy, metodą TLC sprzężoną z detekcją densytometryczną (współpraca z dr A. Maślanką z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej), wykazały obecność

szeregu związków o strukturze indolowej: (L-tryptofanu, tryptaminy, melatoniny, indolu oraz kwasu β -indoliloctowego) (**Załącznik 4/II/A: publikacja 37-O**).

W ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (badania własne) "Badania mykochemiczne owocników i kultur *in vitro* gatunku grzyba wielkoowocnikowego *Tricholoma equestre* (L. ex Fr.)" realizowanego w latach 2005–2007 skupiłam się na jadalnym gatunku powszechnie występującym na terenie Polski – *Tricholoma equestre* (gąska zielonka). Kultury mycelialne wyprowadziłam z warstwy hymenialnej owocników zebranych w lasach Wielkopolski. W ramach badań testowałam podłoża sprzyjające zainicjowaniu kultur oraz największym przyrostom biomasy (podłoża wzrostowe). Zastosowałam 4 rodzaje podłoży hodowlanych (wg Oddoux, wg Pachlewskiego, PDA i MNM), których doboru dokonałam na podstawie danych z piśmiennictwa naukowego, a także własnych doświadczeń z prowadzenia kultur mycelialnych. Do zainicjowania kultur najkorzystniejsze okazało się podłoże wg Oddoux, natomiast największe przyrosty biomasy uzyskałam na podłożu płynnym PDA [86].

Następnie we współpracy z dr hab. Bożeną Muszyńską, prof. UJ w ekstraktach metanolowych z uzyskanej biomasy oznaczyłam zawartość związków o charakterze indolowym. W biomacie uzyskanej z kultur rosnących na pożywce wg Oddoux potwierdziłam obecność L-tryptofanu, 5-hydroksy-L-tryptofanu, tryptaminy oraz jej pochodnych serotoniny i melatoniny. Wykazałam dużą przydatność metod TLC i RP-HPLC w rozdzielaniu i ilościowym oznaczeniu metabolitów indolowych w mycelium otrzymanym w warunkach *in vitro*. Równoległe prowadziłam analizę związków indolowych w owocnikach, a uzyskane wyniki wykazały podobny skład jakościowy związków indolowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane (**Załącznik 4/II/A: publikacja 36-O**) oraz przedstawione na konferencjach naukowych w formie posterów i referatów (**Załącznik 4/III/D: 44-Z; 48-Z; 49-Z; 25- 30-K**).

Ze względu na zainteresowanie aktywnością biologiczną związków występujących w grzybach wielkoowocnikowych, napisałam publikację o charakterze pogładowym dotyczącą aktywnych substancji pochodzenia grzybowego o znaczeniu przeciwnowotworowym, pozyskiwanych z owocników oraz z biomasy z kultur mycelialnych. W pracy opisałam m.in. mechanizm działania przeciwnowotworowego polisacharydów, scharakteryzowałam ich budowę chemiczną oraz dokonałam przeglądu najważniejszych polisacharydów stosowanych w terapii onkologicznej. Ponadto zwróciłam uwagę na inne grupy związków o aktywności immunomodulacyjnej występujące powszechnie w grzybach, takie jak terpenoidy (**Załącznik 4/II/A: publikacja 22-P**). Inna praca o charakterze pogładowym dotyczyła charakterystyki głównych grup związków i pierwiastków o udowodnionej aktywności biologicznej w wybranych gatunkach grzybów z typu Basidiomycota (**Załącznik 4/II/A: publikacja 21-P**).

Od początku pracy naukowej aktywnie uczestniczyłam w konferencjach naukowych zarówno krajowych (**21** doniesień konferencyjnych), jak i międzynarodowych, w kraju oraz za granicą (**16** doniesień konferencyjnych), prezentując wyniki realizowanych przeze mnie badań w formie posterów oraz wystąpień ustnych.

W roku 2006 reprezentowałam Wydział Farmaceutyczny UJ CM na II Międzynarodowej Konferencji Naukowej „**Bioplanta 2006**” odbywającej się w Sfaxie (Tunezja). Celem sympozjum była wymiana doświadczeń naukowców z ośrodków naukowych z Tunezji, Francji, Polski, Algierii, Palestyny, Iranu i Niemiec na temat substancji naturalnych w aspekcie terapeutycznym, żywieniowym oraz ekologicznym. W trakcie sympozjum wygłosiłam wykład plenarny „Phenolic compounds and indole derivatives in plant *in vitro* cultures, mycelial cultures and fruit bodies of macromycetes” oraz na zaproszenie organizatorów przewodniczyłam sesji plenarnej poświęconej substancjom naturalnym, jako nowoczesnym terapeutom.

W czasie przed uzyskaniem tytułu doktora byłam opiekunem pięciu realizowanych w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej prac magisterskich z zakresu mykochemii i biotechnologii grzybów wyższych.

Przeprowadzone w tym czasie badania realizowałam w ramach czterech projektów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na utrzymanie potencjału badawczego, w dwóch projektach, jako kierownik – badania własne oraz w dwóch projektach, jako wykonawca – badania statutowe.

Swoje kwalifikacje naukowe rozwijałam w czasie licznych staży odbywanych w krajowych jednostkach naukowych, szkoleń, seminariów i warsztatów (**Załącznik 4/III/L,Q**).

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, mój dorobek naukowy z wyłączeniem prac stanowiących osiągnięcie naukowe obejmuje **59** artykułów oryginalnych i poglądowych, z których **29** to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, których współczynnik oddziaływania **IF = 47,035**, a wartość punktów **MNiSW = 848**. Ponadto jestem współautorką **8** monografii, w tym **4** w języku angielskim, oraz autorką **55** komunikatów zajazdowych, z czego **34** dotyczy konferencji międzynarodowych, a **21** konferencji krajowych.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w postaci czterech publikacji oryginalnych (*Załącznik 4/III/A: publikacje 14-O; 25-O; 28-O; 35-O*), a także zaprezentowałam je na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych (*Załącznik 4/III/B: 34-Z; 38-Z; 41-Z; 15-K; 19-K*).

W tym czasie szczególną uwagę poświęciłam gatunkom wielkoowocnikowych grzybów nadrewnowych o potencjale leczniczym. Głównym aspektem mojej działalności naukowej stała się jakościowa i ilościowa analiza związków bioaktywnych występujących w owocnikach oraz akumulowanych w biomasie otrzymanej w warunkach *in vitro*.

W ramach prac o charakterze biotechnologicznym opracowałam strategię mającą na celu efektywną produkcję bioaktywnych metabolitów w kulturach mycelialnych *Ganoderma appalnatum* – lakownica spłaszczona. Przetestowałam różne stężenia oraz różny czas suplementacji podłoża hodowlanego elicytorem jasmonianem metylu (MeJa) – w celu zwiększenia produkcji triterpenów pentacyklicznych (m.in. kwasu ganodermowego A) oraz dodatek prekursorów szlaków biogenetycznych – fenyloalaniny oraz kwasu antranilowego, w celu zwiększenia akumulacji odpowiednio kwasów fenolowych i związków indolowych w kulturach mycelialnych. Wynikiem elicytacji był 2-krotny wzrost zawartości triterpenów (po dodatku MeJa w stężeniu 150 μ M, w 6 dniu hodowli). Również dodatek prekursorów spowodował przyrosty produkcji kwasów fenolowych i związków indolowych. Następny etap badań stanowić będzie izolacja i identyfikacja związków triterpenowych z kultur mycelialnych. Wyniki prac są na bieżąco prezentowane na konferencjach naukowych, nie zostały jeszcze opublikowane (*Załącznik 4/III/B: 5-Z; 14-Z*).

Równolegle do badań stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego, kierunkami badawczymi realizowanymi we współpracy z dr hab. Bożeną Muszyńską, prof. UJ z macierzystej jednostki były:

Związki indolowe w owocnikach i kulturach mycelialnych jadalnych gatunków grzybów

Celem badań była jakościowa i ilościowa analiza zawartości niehalucynogennych związków pochodnych indolu w owocnikach i biomasie z kultur mycelialnych gatunków jadalnych (Basidiomycota). W ekstraktach metanolowych z *Agaricus bisporus* – pieczarka dwuzarodnikowa, *Armillaria mellea* – opieńka miodowa, *Boletus badius* (obecnie *Imleria badia*) – podgrzybek brunatny, *Boletus edulis* – borowik szlachetny, *Calocera viscosa* – pieknoróg lepki, *Cantharellus cibarius* – pieprznik jadalny, *Lactarius deliciosus* – mleczaj rydz, *Suillus luteus* – maślak zwyczajny, stosując rozdział chromatograficzny metodą RP-HPLC z detekcją UV-VIS potwierdzono obecność licznych, fizjologicznie aktywnych pochodnych indolu, w tym L-tryptofanu, 5-hydroksy-L-tryptofanu, serotoniny, melatoniny, tryptaminy oraz produktów degradacji tryptofanu: siarczanu kynureniny i kwasu kynureninowego (**Załącznik 4/II/A: publikacje 17-O; 23-O; 24-O; 26-O; 32-O; 34-O**).

Związki indolowe w owocnikach jadalnych gatunków grzybów poddanych obróbce termicznej

Kolejne badania zawartości związków pochodnych indolu dotyczyły wykazania wpływu materiału poddanego obróbce termicznej (naśladującej sposób przygotowywania potraw). Badaniom poddano owocniki jadalnych gatunków: *Boletus badius* – podgrzybek brunatny, *Cantharellus cibarius* – pieprznik jadalny, *Lactarius deliciosus* – mleczaj rydz, *Macrolepiota procera* – czubajka kania, *Pleurotus ostreatus* – bocznik ostrygowaty i *Suillus bovinus* – maślak zwyczajny. Uzyskane wyniki wskazały, że obróbka termiczna powoduje nieznaczne obniżenie zawartości związków indolowych, w stosunku do materiału niepoddanego gotowaniu. Analiza jakościowa potwierdziła obecność L-tryptofanu i 5-hydroksy-L-tryptofanu, będących prekursorami takich związków indolowych o aktywności biologicznej jak serotonina czy melatonina. Badania miały charakter innowacyjny, i zostały przeprowadzone po raz pierwszy (**Załącznik 4/ II/A: publikacje 18-O; 21-O**).

Analiza zawartości kwasów fenolowych w owocnikach jadalnych gatunków grzybów

W gatunkach jadalnych (*A. mellea*, *B. badius*, *B. edulis*, *C. cibarius*, *L. deliciosus* i *P. ostreatus*) analizowano zawartość kwasów fenolowych oraz kwasu cynamonowego. Stwierdzono obecność kwasu protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, *p*-kumarowego, ferulowego, synapinowego i wanilinowego oraz kwasu cynamonowego. Całkowita zawartość kwasów fenolowych w badanych gatunkach mieściła się w zakresie od 6,00 mg/kg s.m. (*A. mellea*) do 48,25 mg/kg s.m. (*B. badius*). Dominującymi ilościowo związkami były kwasy: protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy,

synapinowy oraz kwas cynamonowy. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunki jadalne akumulują znaczne ilości kwasów fenolowych o wielokierunkowym działaniu prozdrowotnym (**Załącznik 4/II/A: publikacje 13-O; 19-O; 20-O**).

Analiza zawartości związków biologicznie czynnych i biopierwiastków w wybranych gatunkach roślin leczniczych oraz w roślinnych kulturach in vitro

Analiza zawartości związków indolowych w cebulach *Allium sativum* – czosnku zwyczajnego, pochodzącego z upraw w różnych regionach świata, a także w czosnku granulowanym, wykazała obecność L-tryptofanu, 5-hydroksy-L-tryptofanu, melatoniny i 5-metylotryptaminy. We wszystkich analizowanych ekstraktach oznaczono L-tryptofan, którego zawartość wynosiła średnio 38,05 mg/100 g s.m. oraz serotoninę, której zawartość wynosiła średnio 82,54 mg/100 g s.m. Najmniejsza ilość tego związku znajdowała się w czosnku pochodzącym z Polski i Hiszpanii (64,18 mg/100 g s.m. oraz 64,25 mg/100 g s.m.), a największa w cebulach pochodzących z Gruzji i Meksyku (98,95 mg/100 g s.m. oraz 98,69 mg/100 g s.m.). W badanych próbkach (z wyjątkiem czosnku granulowanego) potwierdzono niewielką zawartość melatoniny (0,01 mg/100 g s.m. w przypadku czosnku z Meksyku, 0,2 mg/100 g s.m. w cebulach z Hiszpanii) (**Załącznik 4/II/A: publikacja 31-O**).

Inne badania wykonane we współpracy z dr. hab. J. Gdulą-Argasińską z Zakładu Radioligandów UJ CM oraz dr. hab. P. Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM, dotyczyły oznaczeń kwasów fenolowych oraz pochodnych indolu w kiełkach czosnku, dla których określono również działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Wykazano związek między składem chemicznym i aktywnością biologiczną w zależności od warunków świetlnych, jakie towarzyszyły procesowi kiełkowania (**Załącznik 4/II/A: publikacja 7-O**).

Brałam również udział w badaniach suplementacji podłoża hodowlanego roślinnych kultur *in vitro* *Bacopa monnieri* – bakopa drobnolistna z rodziny *Plantaginaceae* – babkowate, polegającej na dodaniu do podstawowego składu pożywki wg Murashige i Skooga: siarczanu(VI) magnezu, wodorooasparagianu cynku, L-tryptofanu, seryny i kwasu antranilowego (w różnych stężeniach). Metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA) (we współpracy z Zespołem Katedry Chemii Analitycznej, Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie) oznaczono zawartość biopierwiastków (Mg, Zn, Cu, Fe, K, Na, Ca) w uzyskanej biomasie. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zależność między stopniem akumulacji biopierwiastków w biomasie *B. monnieri*, a rodzajem suplementowanego związku (**Załącznik 4/II/A: publikacja 15-O**).

Analiza chemiczna metabolitów akumulowanych w biomasie z kultur pędowych *Bacopa monnieri* dotyczyła oznaczeń kwasów fenolowych i związków indolowych. Badania te zostały przeprowadzone po raz pierwszy, w dużym stopniu przyczyniając się do poszerzenia wiedzy na temat

jednej z kluczowych roślin systemu Ajurweda, której aktywność biologiczna do tej pory tłumaczona była obecnością saponin steroidowych – bakozydów (**Załącznik 4/II/A: publikacja 10-O**).

Analiza zawartości metabolitów wtórnych w wybranych gatunkach alg

Kolejnym kierunkiem badawczym były analizy chemiczne wybranych gatunków mikroalg: *Chlorella vulgaris* – chlorella zwyczajna oraz *Spirulina sp.* Eksperymenty były przeprowadzone z wykorzystaniem suplementów diety, zawierających wymienione gatunki alg, które poddano analizie na zawartość związków deklarowanych przez producenta (m.in. luteina) i skuteczności zastosowanej formułacji (m. in. tabletki, kapsułki) (**Załącznik 4/II/A: 2-O; 4-O**).

Badanie aktywności biologicznej owocników grzybów jadalnych w kontekście ich bezpieczeństwa dla człowieka

W ramach współpracy z Zakładem Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Belgradzie – nawiązanej przez dr hab. B. Muszyńską w 2015 roku, brałam udział w badaniach, których celem było ustalenie, bezpieczeństwa spożywania owocników grzyba zaliczanego do gatunków jadalnych *Tricholoma equestre* – gąska zielonka. Owocniki spożywane w małych ilościach są źródłem składników odżywczych m.in. kwasów tłuszczowych, steroli oraz biopierwiastków, natomiast spożywane w nadmiarze mogą być powodem radbomiolizy (zespół objawów chorobowych wywołanych masywnym rozpadem tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej). W przeprowadzonych badaniach analizowano zawartości związków bioaktywnych, biopierwiastków oraz określono aktywność antyoksydacyjną, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciwzapalną ekstraktów otrzymanych z owocników. Aktywność przeciwutleniająca, przeciwdrobnoustrojowa, całkowita zawartość związków fenolowych oraz zawartość pierwiastków wykazywała niższe wartości w porównaniu z innymi gatunkami jadalnymi, natomiast przeprowadzone oznaczenia potwierdziły właściwości prozapalne tego gatunku, co może mieć związek z pojawiającymi się przypadkami radbomiolizy. Efektem współpracy międzynarodowej jest publikacja oraz komunikaty zjazdowe międzynarodowe oraz krajowe (**Załącznik 4/II/A: publikacja 3-O**), (**Załącznik 4/III/B: 8-Z; 5-K**).

Tematyka prac poglądowych

Związki chemiczne i biopierwiastki występujące w owocnikach i biomasie z kultur *in vitro* oraz charakterystyka ich aktywności biologicznej była tematem licznych prac poglądowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i krajowym. W kolejnych pracach opisano związki bezazotowe, mykosterole, karotenoidy oraz triterpeny. W innej pracy zebrano informacje na temat właściwości leczniczych i dietetycznych wybranych jadalnych grzybów wielkoowocnikowych. Surowce naturalne pochodzenia roślinnego i grzybowego były również

przedmiotem opracowania podsumowującego ich rolę w profilaktyce i wspomaganiu leczenia depresji (**Załącznik 4/II/A: publikacje 2-P; 7-P; 8-P; 9-P; 15-P; 17-P; 18-P; 20-P**).

Tematykę biotechnologii grzybów wielkoowocnikowych podjęłam w pracy podsumowującej ówczesny stan wiedzy o kulturach mycelialnych oraz opisałam wybrane wyniki własne z zakresu biotechnologii grzybów wielkoowocnikowych prowadzone w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej UJ CM (**Załącznik 4/II/A: publikacja 19-P**).

Byłam również autorką prac podsumowujących aktualny stan wiedzy na temat właściwości dietetycznych, terapeutycznych, kosmetycznych oraz kierunki aktywności biologicznej określonych gatunków grzybów wielkoowocnikowych takich jak: *Armillaria mellea* – opieńka miodowa, *Auricularia auricularia judae* – uszak bżowy, *Cantharellus cibarius* – pieprznik jadalny, *Fomitopsis betulina* – białoporek brzożowy, *Lentinula edodes* – twardnik japoński, *Trametes versicolor* – wrośniak różnobarwny, *Saccharomyces cerevisiae* – drożdże piekarnicze (**Załącznik 4/II/A: publikacje 1-P; 3-P; 4-P; 5-P; 10-P; 11-P; 12-P; 14-P; 34-P**).

Efektom mojej pracy był również współudział w opracowaniu ośmiu monografii (**Załącznik 4/II/D: 1-M; 2-M; 3-M; 4-M; 5-M; 6-M; 7-M; 8-M**), w tym czterech w języku angielskim.

Aktualnie realizowany przeze mnie projekt badawczy, którego jestem kierownikiem (K/ZDS/007859) dotyczy analizy związków pochodzenia grzybowego o potencjalnym zastosowaniu w lecznictwie i kosmetyce. Coraz częściej w składzie preparatów o charakterze zarówno kosmeceutyków, jak i nutraceutyków wykorzystywanych w pielęgnacji oraz profilaktyce chorób skóry, możemy znaleźć ekstrakty z owocników oraz z biomasy z kultur mycelialnych grzybów leczniczych.

Cenne w kosmetyce właściwości ekstraktów z grzybów polegające na działaniu wybielającym, związane są z występowaniem inhibitorów tyrozynazy. Należą do nich m.in. kwas kojowy, hydrochinon czy 3,4-dihydroksybenzaldehyd. Przeprowadziłam ocenę wpływu ekstraktów otrzymanych z grzybów nadrewnowych na aktywność tyrozynazy w warunkach *in vitro*. Badania mają charakter pilotażowy i realizowane są we współpracy z dr Anną Apolą z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UJ CM.

Z kolei we współpracy z dr Karoliną Grabowską z Katedry Farmakognozji UJ CM określony został stopień inhibicji aktywności hialuronidazy przez ekstrakty z biomasy z kultur *in vitro*. Część otrzymanych wyników została przedstawiona na konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie posterów oraz wystąpień ustnych (**Załącznik 4/III/B: 3-Z; 1-K; 2-K**).

Związki chemiczne grzybów i ich zastosowanie w kosmetyce były tematem obszernej pracy pogładowej, w której podsumowałam aktualny stan wiedzy na temat aplikacji kosmetycznych

ekstraktów z grzybów wielkoowocnikowych. W pierwszej części pracy dokonałam przeglądu gatunków z typów Basidiomycota i Acomycota wykorzystywanych w produkcji preparatów kosmetycznych. Następnie scharakteryzowałam najważniejsze substancje pochodzenia grzybowego mające zastosowanie w kosmetyce (m.in. polisacharydy, karotenoidy, kwasy tłuszczowe, trehalozę, ergotioneinę, dysmutazę nadtlenkową, inhibitory tyrozynazy) (**Załącznik 4/II/A: publikacja 5-P**).

Moje osiągnięcia naukowe zostały pięciokrotnie wyróżnione nagrodą dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w latach 2011-2015.

Wykaz wszystkich opublikowanych prac naukowych (publikacje naukowe, komunikaty zjazdowe) oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej, odbytych stażach, działalności organizacyjnej oraz działalności popularyzującej naukę, szczegółowo opisałam w załączniku nr 4.

6. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Mój dorobek naukowo-badawczy (na dzień 18.02.2019) obejmuje:

Łączna liczba publikacji – **73**

w tym, w **20** pracach jestem pierwszym autorem, oraz w **19** autorem korespondencyjnym

Publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports – **39**

- Publikacje oryginalne – **34**
- Publikacje poglądowe – **5**

Publikacje bez Impact factor – **30**

- Publikacje oryginalne – **10**
- Publikacje poglądowe – **20**

Pozostałe publikacje, w tym popularnonaukowe – **4**

Liczba monografii książkowych – **8**

Łączny współczynnik Impact Factor IF = **56,02**

Łączna liczba punktów MNiSW = **1003**

Liczba cytowań według bazy Web of Science – **365**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science – **12**

Liczba projektów badawczych – **10**, w tym:

Kierownik projektu – **6**

Projekty statutowe w ramach dotacji MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego – **3**

Projekty indywidualne przyznawane w ramach dotacji MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego – **3**

Wykonawca: **4**

Grant Komitetu Badań Naukowych – **1**

Projekty statutowe w ramach dotacji MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego – **3**

Łączna ilość streszczeń ze zjazdów – **92**

- międzynarodowych – **50**
- krajowych – **42**

Łączna ilość wykonanych recenzji – **21**

Katarzyna Sułkowska - Ziąja