

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum



Załącznik 3: Autoreferat

dr n. farm. Agnieszka Galanty

Katedra i Zakład Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny

Kraków 2021

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO	3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.	3
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.	3
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).	3
Tytuł osiągnięcia naukowego	3
Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
Cel badań	6
Wprowadzenie w tematykę badawczą	6
Omówienie osiągniętych wyników	14
Podsumowanie i perspektywy	27
Piśmiennictwo	28
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.	33
6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ	38
7. INNE INFORMACJE	42

1. IMIĘ I NAZWISKO.

Agnieszka Galanty

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

- 1998: dyplom magistra biologii, w zakresie biologii molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; tytuł pracy magisterskiej „*Wpływ związków metaloorganicznych na ruch i chemotaksję komórek Dictyostelium discoideum*”, promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda
- 2011: dyplom doktora nauk farmaceutycznych, z wyróżnieniem, w zakresie farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie; tytuł rozprawy „*Analiza fitochemiczna oraz aktywność cytotoksyczna wybranych metabolitów wtórnych w porostach rodzaju Cladonia*”, promotor: prof. dr hab. Zbigniew Janeczko

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.

- 1998 – 2002: starszy referent inżynierijno-techniczny, Katedra Farmakognozji UJ CM
- 2002 – 2014: asystent, Katedra Farmakognozji UJ CM
- 2014 – nadal: adiunkt, Katedra Farmakognozji UJ CM

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Porosty z rodzaju *Cladonia* jako źródło biologicznie aktywnych enancjomerów kwasu usninowego

Podstawę osiągnięcia naukowego stanowi powiązany tematycznie cykl sześciu publikacji eksperymentalnych [H1-H2, H4-H7] oraz jednej publikacji przeglądowej [H3]. W sześciu pracach jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, natomiast w jednej pracy jestem drugim autorem.

Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

H1. Galanty A., Paško P., Podolak I., Zagrodzki P.: Optimization of usnic acid extraction conditions using fractional factorial design. **Lichenologist**, 2020, 52, 5, 397-401 **IF 1,514 MNiSW 70 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu całego eksperymentu i dokonaniu przeglądu literaturowego, zebraniu i oznaczeniu materiału porostowego do badań, wykonaniu procesów ekstrakcji w różnych warunkach, przygotowaniu próbek do oznaczeń ilościowych i wykonaniu analizy ilościowej HPLC. Ponadto analizowałam i interpretowałam otrzymane wyniki, odpowiadałam za napisanie całego manuskryptu wraz z korektą oraz procesem recenzji. Byłam również autorem korespondencyjnym.

H2. Galanty A., Węgrzyn M., Wietrzyk-Pełka P., Fołta M., Krośniak M., Podolak I., Zagrodzki P.: Quantitative variations of usnic acid and selected elements in terricolous lichen *Cladonia mitis* Sandst., with respect to different environmental factors – a chemometric approach. **Phytochemistry**, 2021, 192, 112948 **IF 4,072 MNiSW 100 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu całego eksperymentu i dokonaniu przeglądu literaturowego, koordynowaniu prac zespołu, wykonaniu procesu ekstrakcji do analizy ilościowej i przeprowadzeniu tej analizy metodą HPLC, przygotowaniu próbek do oznaczeń pierwiastkowych, analizowaniu i interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu całego manuskryptu wraz z dyskusją, korektą pracy oraz procesem recenzji. Byłam również autorem korespondencyjnym.

H3. Galanty A., Paško P., Podolak I.: Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives. **Phytochemistry Reviews**, 2019, 18, 2, 527-548 **IF 4,298 MNiSW 100 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, dokonaniu przeglądu literaturowego, napisaniu całego manuskryptu, wraz z korektą i procesem recenzji. Byłam również autorem korespondencyjnym.

H4. Piska K., Galanty A., Koczurkiewicz P., Żmudzki P., Potaczek J., Podolak I., Pękała E.: Usnic acid reactive metabolites formation in human, rat, and mice microsomes. Implication for hepatotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, 2018, 120, 112-118 **IF 3,775 MNiSW 40 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, dokonaniu przeglądu literaturowego, koordynowaniu prac zespołu, wyizolowaniu i potwierdzeniu struktury kwasu (-)-usninowego, napisaniu części omówienia i dyskusji wyników, korekcie pracy oraz uczestniczeniu w procesie odpowiedzi na recenzje.

H5. Galanty A.; Popiół J.; Paczkowska-Walendowska M.; Studzińska-Sroka E.; Paśko P.; Cielecka-Piontek J.; Pękala E.; Podolak I. (+)-Usnic acid as a promising candidate for a safe and stable topical photoprotective agent. **Molecules**, 2021, 26, 5224 **IF 4,411** **MNiSW 100 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu całego eksperymentu i dokonaniu przeglądu literaturowego, koordynowaniu prac zespołu, dostarczeniu próbek enancjomerów kwasu usninowego do badań, uczestniczeniu w wykonaniu testu przenikalności PAMPA-skin, przeprowadzeniu analizy cytotoksyczności, analizowaniu i interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu całego manuskryptu wraz z dyskusją, korektą pracy oraz procesem recenzji. Byłam również autorem korespondencyjnym.

H6. Galanty A., Zagrodzki P., Gdula-Argasińska J., Grabowska K., Koczurkiewicz-Adamczyk P., Wróbel-Biedrawa D., Podolak I., Pękala E., Paśko P.: A comparative survey of anti-melanoma and anti-inflammatory potential of usnic acid enantiomers — a comprehensive *in vitro* approach. **Pharmaceuticals**, 2021, 14, 945 **IF 5,863** **MNiSW 100 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu całego eksperymentu i dokonaniu przeglądu literaturowego, dostarczeniu próbek enancjomerów kwasu usninowego do badań, koordynowaniu pracy zespołu, przeprowadzeniu analizy aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej, przeprowadzeniu doświadczeń komórkowych do analizy izobolograficznej, uczestniczeniu w badaniu migracji komórek, przeprowadzeniu analizy aktywności przeciwzapalnej z użyciem tlenku azotu, przygotowaniu próbek do badania aktywności przeciwzapalnej metodą ELISA, uczestniczeniu w przygotowaniu próbek do badań aktywności przeciwzapalnej metodą Western blot, analizowaniu i interpretowaniu wszystkich otrzymanych wyników, napisaniu całego manuskryptu wraz z dyskusją, korektą pracy oraz procesem recenzji. Byłam również autorem korespondencyjnym.

H7. Galanty A., Danel T., Węgrzyn M., Podolak I., Podolak I.: Deep convolutional neural network for preliminary in-field classification of lichen species. **Biosystems Engineering**, 2021, 204, 15-25 **IF 4,123** **MNiSW 100 pkt**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, dokonaniu przeglądu literaturowego, koordynowaniu prac zespołu, napisaniu wstępu do pracy i części dyskusji wyników, korekcie pracy oraz uczestniczeniu w procesie odpowiedzi na recenzje. Byłam również autorem korespondencyjnym.

Punktacja MNiSW osiągnięcia wynosi **610** punktów, a punktacja IF wynosi **28,056**.

Analiza bibliometryczna potwierdzająca punktację IF oraz MNiSW, sporządzona przez Bibliotekę Główną UJ CM, stanowi **załącznik nr 5**.

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac stanowią **załącznik nr 6**.

Cel badań

Celem moich badań naukowych, których efektem jest cykl publikacji składający się na niniejszą rozprawę habilitacyjną, było znalezienie nowych, bogatych, łatwo dostępnych źródeł kwasu usninowego w naturze, jak również porównawcza ocena bezpieczeństwa i efektywności stosowania jego enancjomerów na komórki skóry w modelu *in vitro*, wraz z preselekcją lepszego ze związków do dalszych badań.

Realizując główny cel badań skoncentrowałam się na następujących aspektach szczegółowych:

- optymalizacja warunków ekstrakcji kwasu usninowego z matrycy porostowej i jego izolacja, z uwzględnieniem pozyskania obu enancjomerów
- prześledzenie zmian w profilu ilościowym kwasu usninowego pod wpływem różnych czynników geoklimatycznych
- stworzenie narzędzia informatycznego, ułatwiającego wstępne rozpoznawanie gatunków z rodzaju *Cladonia* w warunkach terenowych
- ocena hepatotoksyczności enancjomerów kwasu usninowego w modelu *in vitro*
- ocena enancjomerów kwasu usninowego pod kątem ich potencjału fotoprotekcyjnego, przenikania przez barierę skórną oraz bezpieczeństwa wobec prawidłowych komórek skóry w modelu *in vitro*
- określenie wpływu enancjomerów kwasu usninowego na różne aspekty funkcjonowania nowotworowych komórek skóry w modelu *in vitro*
- ocena wpływu enancjomerów kwasu usninowego na procesy towarzyszące progresji nowotworów skóry, takich jak stan zapalny czy aktywność tyrozynazy

Wprowadzenie w tematykę badawczą

Porosty są grupą niezwykle ciekawych i mało zbadanych organizmów. Zarówno ich wyjątkowa budowa, jak i zdolność do zasiedlania środowisk o trudnych warunkach glebowo-klimatycznych sprawia, że wytwarzają one szereg charakterystycznych, często niespotykanych w innych organizmach, metabolitów wtórnych, określanych dawniej mianem kwasów porostowych. Porosty są zbudowane z dwóch komponentów, określanych jako fotobiont i mykobiont. Zgodnie z tradycyjną definicją, porosty powstają w wyniku symbiotycznego współistnienia glonów i/lub sinic (fotobiont) i grzybów (mykobiont), jednak ostatnie doniesienia wskazują, że w symbiozie mogą brać udział także drożdżopodobne podstawczaki oraz bakterie

(Grube et al., 2009; Spribille et al., 2016; Schneider et al., 2016). Tak szerokie spektrum organizmów sprawia, że porosty są wyjątkowe pod względem złożoności chemicznej i produkcji specyficznych metabolitów.

Jednym z ciekawych przedstawicieli porostów jest rodzaj *Cladonia* P. Browne (chrobotek), obejmujący około 400 gatunków (Stenroos et al., 2002). Różnorodność i oryginalność wyglądu tych gatunków, uwzględniająca podział na porosty o budowie krzaczkowatej i kielichowatej (Ryc. 1), sprawia, że są one często wykorzystywane jako elementy dekoracyjne. Jednocześnie, duże podobieństwo wyglądu w obrębie przedstawicieli obu wspomnianych podgrup morfotycznych stanowi również wyzwanie i utrudnienie, jeśli chodzi o prawidłową identyfikację zbieranego w terenie materiału do badań. Tradycyjne stosowanie klucza do rozpoznawania porostów, połączone z metodami mikrochemicznymi, wymaga wprawy i doświadczenia. Opisywane w literaturze coraz częstsze wykorzystanie sztucznych sieci neuronowych do identyfikacji roślin naczyniowych zainspirowało mnie zatem do zaprojektowania narzędzia informatycznego w postaci aplikacji na telefon komórkowy, znacznie ułatwiającego wstępną klasyfikację gatunków z rodzaju *Cladonia*, co zostało opisane w publikacji H7.



Cladonia chlorophea



Cladonia furcata

Rycina 1. Przykłady różnej budowy porostów z rodzaju *Cladonia* (fot. własna)

Z ekologicznego punktu widzenia, gatunki rodzaju *Cladonia* są wskaźnikami niektórych naturalnych zbiorowisk roślinnych, takich jak bór chrobotkowy *Cladonio-Pinetum* (Węgrzyn et al., 2020) czy wydmy szare *Cladonio-Koelerietalia* (Provoost et al., 2004). Gatunki z rodzaju *Cladonia* są także ważnym źródłem związków aktywnych farmakologicznie, takich jak kwas usninowy, będący przedmiotem moich badań. Jest

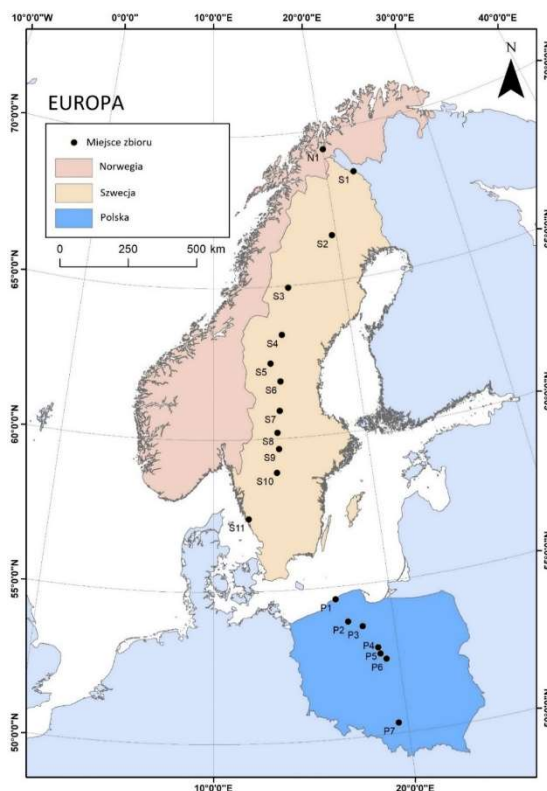
to związek występujący w dwóch formach enancjomerycznych, szeroko badany zwłaszcza pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej czy cytotoksycznej. Mimo, iż synteza kwasu usninowego została opisana już dawno (Barton et al., 1956), porosty wciąż pozostają podstawowym źródłem do jego pozyskiwania do badań naukowych czy dla celów przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Stąd też potrzeba poszukiwania nowych, bogatych i łatwo dostępnych źródeł kwasu usninowego. Atutem, przemawiającym na korzyść poszukiwania nowych źródeł kwasu usninowego wśród przedstawicieli rodzaju *Cladonia* jest fakt, że większość z nich nie jest objęta ochroną gatunkową. Wśród rodzaju *Cladonia* zawartość kwasu usninowego jest znacząca, nawet do około 5% suchej masy (s.m.), co powoduje, że gatunki te skupiają na sobie zainteresowanie badaczy. Warto jednak podkreślić, że bardzo niewiele doniesień opisuje zawartość kwasu usninowego w polskich gatunkach z rodzaju *Cladonia* i są to w większości moje wcześniejsze badania, prowadzone we współpracy z Katedrą Farmakognozji w Poznaniu (Gertig, 1960; Studzińska-Sroka et al., 2015; Studzińska-Sroka et al., 2019). Wstępne badania nad zawartością kwasu usninowego w polskich przedstawicielach rodzaju *Cladonia*, które prowadziłam także w ramach pracy doktorskiej, wskazały na gatunki *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. i *C. uncialis* (L.) Weber ex F.H. Wigg jako potencjalne bogate źródła kwasu usninowego, zawierające odpowiednio prawo- i lewokrętny enancjomer tego związku. Przeprowadzony przy tej okazji przegląd literatury wskazał natomiast, że gatunkiem szeroko rozpowszechnionym na półkuli północnej, ale bardzo słabo przebadanym pod kątem zawartości kwasu usninowego jest *Cladonia mitis* Sandst. (chrobotek łagodny, Ryc. 2), którym postanowiłam zająć się w moich badaniach.



Rycina 2. Cladonia mitis Sandst. (fot własna)

Jak dotąd zostały opublikowane dwa doniesienia o zawartości kwasu usninowego w *Cladonia mitis*. Jedno z nich dotyczy próbek zebranych z okolic Lublina, gdzie zawartość badanego związku wynosiła 0.18 ± 0.01 - 0.23 ± 0.01 mg/g s.m. (Hawrył et al., 2020), druga praca to moje wcześniejsze badania próbek tego gatunku, zebranych na Svalbardzie, gdzie średnia zawartość kwasu usninowego wynosiła 12.75 ± 2.86 mg/g s.m. (Węgrzyn et al., 2019). Stąd też chęć uzupełnienia tych danych i rozważenia *Cladonia mitis* jako ewentualnego nowego źródła do pozyskiwania kwasu usninowego.

Aby określić optymalne warunki zbioru materiału porostowego do moich badań, postanowiłam bliżej przyjrzeć się problemowi wpływu czynników glebowo-klimatycznych na zawartość kwasu usninowego. O ile w przypadku roślin naczyniowych te zależności są szeroko opisane, o tyle dla porostów i kwasu usninowego nie ma zbyt wielu informacji dokumentujących te zależności. Większość opublikowanych do tej pory badań stwierdziła związek między ekspozycją na światło słoneczne a zawartością kwasu usninowego w kilku gatunkach porostów, co wiąże się z jego właściwościami fotoochronnymi (Gauslaa i Solhaug, 2004; Millot et al., 2012). Jako że poziom ekspozycji na światło słoneczne zależy od szerokości geograficznej i wysokości nad poziomem morza, można się spodziewać korelacji między ilością kwasu usninowego w porostach a tymi czynnikami. Niemniej jednak opublikowane dotychczas, nieliczne dane naukowe nie udzieliły jednoznacznej odpowiedzi na ten temat. Smeds i Kytöviita (2010) nie wykazali zależności między zawartością kwasu usninowego a szerokością geograficzną dla próbek *Cladonia stellaris*, zebranych w 13 lokalizacjach w Finlandii, podczas gdy wyniki innego badania wskazały na pozytywną korelację ($r=0,4$; $p<0,01$) zawartości kwasu usninowego w gatunku *Flavocetraria cucullata*, zebranego w zachodniej Syberii, i szerokości geograficznej miejsca zbioru (Prokopiev et al., 2018). Podobnie niejasne wnioski płyną z badań nad wpływem wysokości nad poziomem morza na zawartość kwasu usninowego w porostach. Rahman et al. (2015) nie stwierdzili korelacji pomiędzy zawartością kwasu usninowego w próbkach *Cladonia stellaris*, zebranych w Norwegii na wysokościach 250–650 m n.p.m. Z drugiej strony, ujemną korelację dla kwasu usninowego i wysokości odnotowano dla gatunków z rodzaju *Parmelia*, zebranych w Himalajach na wysokości 814–2250 m n.p.m. (Neupane et al., 2017). Tak przeciwstawne dane, dotyczące wpływu różnych czynników geograficzno-klimatycznych na zawartość kwasu usninowego w porostach, stanowiły dla mnie impuls do podjęcia badań w tym zakresie, w oparciu o próbki *Cladonia mitis*, zebrane w transekcie od północnej Skandynawii do południa Polski (Ryc. 3), co opisałam w publikacji **H2**.

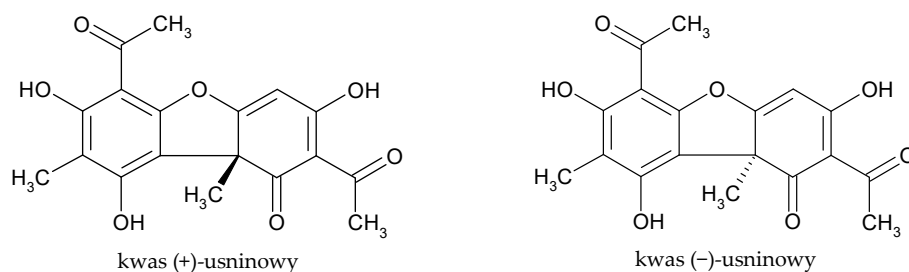


Rycina 3. Miejsca zbioru próbek Cladonia mitis, opisane w publikacji H2

Porosty łatwo akumulują metale ciężkie w swoich plechach, w wyniku braku warstwy zewnętrznej, która blokowałaby ich wchłanianie (Conti i Cecchetti, 2001). Dzięki temu są dobrymi bioindykatorami czystości powietrza i gleby. W toku ewolucji wykształciły jednak pewne systemy ochrony przed nadmiarem zanieczyszczeń. Niektórzy autorzy wskazują, że metabolity porostów, takie jak kwas usninowy, mogą działać jako chelatory kationów, w tym metali ciężkich (Purvis et al., 1987), a tym samym chronić plechę porostu przed ich toksycznym działaniem (Conti i Cecchetti, 2001). Jednak inne badania nie wykazały zmian poziomu kwasu usninowego w plechach *Cladonia pleurota* rosnących na glebach bogatych w Fe, Cu, Al, Ni, w porównaniu z próbkami pobranymi z lokalizacji niezanieczyszczonych (Bačkor i Fahsel, 2004). Sugeruje to, że efekt ochronny zależy tylko od zdolności chelatowania i nie wymaga zwiększonej syntezy kwasu usninowego. Nieścisłości w tych doniesieniach stanowiły zatem przesłankę do podjęcia dalszych badań nad wzajemnymi relacjami między zawartością kwasu usninowego a wybranymi pierwiastkami w próbkach *Cladonia mitis*, co opisałam w publikacji H2.

Kwas usninowy (2,6-diacetylo-7,9-dihydroksy-8,9b-dimetylo-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandion) to żółty, lipofilowy związek, produkowany wyłącznie przez porosty, występujący w dwóch formach enancjomerycznych (Ryc. 4), w zależności od pozycji grupy metylowej przy chiralnym atomie 9b, z czego forma prawoskrętna jest zdecydowanie częściej spotykana w naturze. Od wielu lat związek ten cieszy się

dużym zainteresowaniem, ze względu na szerokie spektrum jego działania biologicznego i farmakologicznego, w połączeniu z wysoką dostępnością ze źródeł naturalnych (zawartość do 10%) i stosunkowo łatwym procesem izolacji z matrycy porostowej.



Rycina 4. Enancjomery kwasu usninowego

Pomimo istnienia wielu doniesień literaturowych, opisujących ekstrakcję kwasu usninowego z porostów za pomocą różnych metod, trudno jest na ich podstawie ustalić najbardziej efektywne warunki tego procesu. Wyniki tych badań są trudne do porównania, ponieważ warunki analityczne różnią się znacznie, podając tym samym niedokładne informacje na temat rzeczywistych zawartości kwasu usninowego w gatunkach porostów. Metody stosowane dotychczas przez różnych autorów do ekstrakcji kwasu usninowego to głównie techniki konwencjonalne, takie jak ekstrakcja na gorąco pod chłodnicą zwrotną (König i Wright, 1999; Węgrzyn et al., 2019), ekstrakcja w aparacie Soxhleta (Einarsdottir et al., 2010; Honda et al., 2010) lub wytrząsanie (Yilmaz et al., 2004; Roach et al., 2006), natomiast podejście tzw. zielonej technologii było reprezentowane przez ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (Burlando et al., 2009; Brovko et al., 2017) lub z użyciem solwentów w stanie nadkrytycznym (Brovko et al., 2017). Opisywane metody różniły się też co do czasu trwania, od kilkunastu minut do godzin, jak również stosowanych rozpuszczalników. Heksan, chloroform, aceton czy metanol były używane najczęściej (Yilmaz et al., 2004; Bomfim et al., 2009; Behera et al., 2012), przy czym stosowanie tego ostatniego nie jest do końca zasadne, z racji lipofilnej natury kwasu usninowego (Podterob, 2008). Ta rozbieżność i niekompletność danych dotyczących parametrów ekstrakcji kwasu usninowego zmotywowała mnie do bardziej szczegółowego zbadania tej kwestii, co opisałam w publikacji **H1**.

Kwas usninowy wykazuje znaczące działanie przeciwdrobnoustrojowe, cytotoksyczne i przeciwzapalne, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Szczegółowy profil aktywności kwasu usninowego przedstawiłam w publikacji przeglądowej **H3**. Pomimo znacznej ilości badań, opisujących szeroki zakres właściwości farmakologicznych kwasu usninowego, ich wyniki nadal nie dają

jednoznacznej odpowiedzi o enancjospicyficzności tego działania. Większość opublikowanych danych dotyczy kwasu (+)-usninowego, co może wynikać z jego częstszego występowania w źródłach naturalnych, natomiast dane o aktywności jego lewoskrętnego enancjomeru są bardzo nieliczne. Jak wiadomo, enancjomery nie różnią się zasadniczo pod względem właściwości fizycznych, takich jak rozpuszczalność, temperatura topnienia czy charakterystyka spektroskopowa (Özek et al., 2010), ale mogą ujawniać różnice w swojej aktywności farmakologicznej (Nguyen et al., 2006). W przypadku kwasu usninowego, niejasne wnioski, płynące z doniesień literaturowych, co do przewagi w działaniu któregoś z enancjomerów, stanowiły dla mnie punkt wyjścia do przeprowadzenia bezpośredniego porównania aktywności obu związków i stwierdzenia potencjalnych podobieństw lub różnic w ich działaniu. Biorąc pod uwagę doniesienia o działaniu hepatotoksycznym kwasu usninowego, swoje badania ukierunkowałam na ewentualne wykorzystanie tego związku do aplikacji na skórę. Informacje dotyczące działania hepatotoksycznego kwasu usninowego oraz jego wykorzystania topikalnego przedstawię poniżej.

Jak wspomniałam, kwas usninowy cechuje się ciekawym profilem aktywności farmakologicznej. Niektóre badania wskazują jednak na jego toksyczny wpływ na czynność wątroby, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W Stanach Zjednoczonych opisano kilkanaście przypadków ciężkiego uszkodzenia wątroby po stosowaniu suplementów diety wspomagających odchudzanie, zawierających duże dawki (500-1000 mg/dzień) kwasu usninowego (Guo et al., 2008; Araujo et al., 2015). Wyniki badań na zwierzętach wskazują na podwyższony poziom enzymów wątrobowych w surowicy zwierząt traktowanych kwasem usninowym (Abo-Khatwa et al., 2005; Lu et al., 2011), choć z drugiej strony, w niższych dawkach, związek ten nie powodował uszkodzeń hepatocytów (da Silva Santos et al., 2006). Sugerowany mechanizm działania hepatotoksycznego kwasu usninowego może być związany z jego wpływem na utratę integralności błony komórkowej hepatocytów i rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach (Pramyothin et al., 2004; Abo-Khatwa et al., 2005). Co warto podkreślić, mechanizm ten nie jest do końca poznany, a przedstawione wyniki dotyczyły wyłącznie kwasu (+)-usninowego. Te przesłanki zainspirowały mnie do podjęcia próby doprecyzowania wpływu kwasu usninowego na wątrobę, w modelu *in vitro*, jak również porównania działania obydwu jego enancjomerów, co opisałam w publikacji **H4**.

Pojedyncze doniesienia mówią też o alergii kontaktowej, wywoływanej przez kwas usninowy, jednocześnie wskazując na kwas (-)-usninowy jako związek o większym potencjale uczuleniowym (Mitchell i Armitage, 1965; Mitchell i Shibata, 1969; Hausen et al., 1993), tym niemniej ekstrakty zawierające ten związek są powszechnie stosowane w antyperspirantach, perfumach czy pastach do zębów. Wydaje się zatem, że wykorzystanie kwasu usninowego do zastosowania

miejscowego na skórę jest bardziej obiecującym i potencjalnie bezpieczniejszym podejściem. Jak wcześniej wspomniałam, wiele badań wskazuje na wyraźną zależność między zawartością kwasu usninowego w porostach a natężeniem promieniowania słonecznego w miejscu ich występowania, co wynika z właściwości kwasu usninowego absorbujących promieniowanie UV. Fotoprotekcyjne działanie kwasu usninowego zostało zbadane w kilku eksperymentach *in vitro* na napromieniowanych komórkach skóry (Engel et al., 2007; Kohlhardt-Floehr et al., 2010; Varol et al., 2015), w jednym badaniu na zwierzętach (Fernandez et al., 1996), i w jednym z udziałem zdrowych ochotników (Rancan et al., 2002), a ich wyniki wskazały na efekt ochronny kwasu usninowego, porównywalny z referencyjnym filtrem UV, homosalatem. Biorąc pod uwagę narastający problem związany z ochroną skóry przed nadmiernym promieniowaniem słonecznym i związane z tym ryzyko rozwoju czerniaka, postanowiłam ustalić, czy enancjomery kwasu usninowego mogłyby być rozpatrywane jako potencjalni kandydaci na substancje o zastosowaniu topikalnym. Aby to ustalić, zaplanowałam kilkietapowy eksperyment, pozwalający na ocenę wpływu fotoprotekcyjnego tych związków, wraz z oceną toksyczności wobec prawidłowych komórek skóry oraz określenie ich potencjału przeciwczeraniakowego i przeciwzapalnego w modelach *in vitro*, z uwzględnieniem enancjoselektywności jego działania. Nieliczne badania podejmują temat wpływu kwasu usninowego na komórki skóry, zarówno te prawidłowe, jak i zmienione nowotworowo. Kilku autorów opisało niską toksyczność kwasu usninowego wobec keratynocytów (IC_{50} 185,7 μ M, około 64 μ g/ml) czy fibroblastów (IC_{50} >40 μ g/ml, IC_{50} >10 μ M, około 3,5 μ g/ml) (Nguyen et al., 2014; Galanty et al., 2017), podczas gdy melanocyty były bardziej podatne na ten związek (IC_{50} 6,9 μ M, około 2,4 μ g/ml) (Kwong et al., 2020). Z kolei, pomimo wielu badań nad cytotoxycznoscia kwasu usninowego, jego aktywnosc przeciwczeraniakowa zostala do tej pory opisana tylko w kilku badaniach, a uzyskane wyniki byly niejednoznaczne. Brandao et al. (2012) opisali slaby efekt cytotoxyczny kwasu usninowego wobec komorek zlosliwego czerniaka UACC-62 (IC_{50} 184 μ g/ml, 48 h), natomiast inni autorzy odnotowali wysoka aktywnosc kwasu usninowego wobec czerniaka FemX (IC_{50} 12,72 μ g/ml, 72 h), pochodzacego z wzela chlonnego jako miejsca przerzutu i czerniaka 518A2 (IC_{50} 5,4 μ M, około 2 μ g/ml, 72 h), pochodzacego z nieokreślonego miejsca przerzutu (Ranković et al., 2012; Draut et al., 2017). Co istotne, wspomniane badania byly przeprowadzone wyłacznie dla prawoskrętnego enancjomeru kwasu usninowego. Opisane wyniki stanowiły zatem przesłankę do zaplanowania badań nad wpływem obu enancjomerów kwasu usninowego na różne aspekty funkcjonowania komórek prawidłowych i nowotworowych skóry, co opisałam w publikacjach **H5** i **H6**.

Omówienie osiągniętych wyników

Na niniejszą rozprawę habilitacyjną składa się cykl publikacji, w którym, zgodnie ze sformułowanym celem, można wyróżnić dwa główne obszary badań:

- badania fitochemiczno-ekologiczne, obejmujące optymalizację procesu ekstrakcji kwasu usninowego, jego izolację oraz analizę ilościową, jak również stworzenie narzędzia informatycznego ułatwiającego rozpoznawanie gatunków z rodzaju *Cladonia* w terenie (publikacje **H1**, **H2**, **H7**)
- badania biologiczne, obejmujące przegląd danych literaturowych, ocenę hepatotoksyczności oraz bezpieczeństwa i efektywności stosowania kwasu usninowego na prawidłowe i nowotworowe komórki skóry w modelu *in vitro*, z uwzględnieniem enancjoselektywności działania (publikacje **H3** – **H6**)

Poniżej przedstawiono szczegółowe omówienie wyników badań z poszczególnych wątków badawczych.

H1. Galanty A., Paško P., Podolak I., Zagrodzki P.: Optimization of usnic acid extraction conditions using fractional factorial design. *Lichenologist*, 2020, 52, 5, 397-401 IF 1,514 MNiSW 70 pkt

W pracy wykonałam optymalizację warunków ekstrakcji kwasu usninowego z materiału porostowego (gatunek *Cladonia arbuscula*), opartą na matematycznym modelu planu frakcyjnego, opracowanym wraz z dr hab. Pawłem Zagrodzkim prof. UJ z Zakładu Bromatologii UJ CM. Zaproponowane narzędzie pozwala na jednoczesne określenie wpływu kilku czynników na planowany eksperyment, co znacznie skraca jego całkowity czas i umożliwia wskazanie najbardziej efektywnej procedury. W eksperymencie porównałam trzy metody ekstrakcji, najczęściej w literaturze stosowane do pozyskiwania kwasu usninowego: ekstrakcja na gorąco z użyciem chłodnicy zwrotnej, wytrząsanie w temperaturze pokojowej i ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami. Każdą z metod ekstrakcji optymalizowałam osobno, biorąc pod uwagę trzy parametry: czas trwania ekstrakcji, użyty rozpuszczalnik i liczba powtórzeń ekstrakcji. W przypadku czasu trwania, dla ekstrakcji na gorąco i wytrząsania zaplanowałam 15, 30 i 60 minutowe cykle ekstrahowania. Dla ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami zaplanowane cykle były krótsze (10, 20 i 30 minut), ze względu na specyfikę tego procesu i obawę o degradację struktury badanego związku. Do badań wytypowałam trzy rozpuszczalniki: chloroform, aceton i metanol, które najczęściej stosowano w badaniach innych autorów. Trzecim parametrem była liczba powtórzeń ekstrakcji – materiał porostowy ekstrahowałam jedną, dwiema lub trzema porcjami rozpuszczalnika. Do analizy ilościowej kwasu usninowego zastosowałam metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Uzyskane wyniki porównywałam statystycznie w obrębie każdej z badanych metod, określając wpływ

badanych parametrów na efektywność procesu ekstrakcji. Dwa najlepsze wyniki, uzyskane dla każdej z metod, były następnie porównywane w celu ostatecznego wytypowania najbardziej wydajnego procesu ekstrakcji kwasu usninowego. We wszystkich badanych ekstrakcjach aceton okazał się być najbardziej optymalnym rozpuszczalnikiem. W przypadku ekstrakcji na gorąco i wytrząsania najlepsze wyniki uzyskałam dla 60-minutowej ekstrakcji, przy czym wynik dla ekstrakcji na gorąco był czterokrotnie wyższy (odpowiednio $4,25 \pm 0,08$ i $0,97 \pm 0,08$ mg/g s.m.), co może sugerować istotny wpływ temperatury na wydajność tego procesu. W przypadku ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami najlepszy wynik uzyskałam dla schematu 2x20 minut, jednak różnica w odniesieniu do pojedynczej, 10-minutowej ekstrakcji nie była istotna statystycznie (odpowiednio $2,33 \pm 0,17$ i $2,27 \pm 0,13$ mg/g s.m.). Warto zauważyć, że ilość kwasu usninowego uzyskana przez ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami była około dwa razy niższa ($2,33 \pm 0,17$ mg/g s.m.) w porównaniu z ekstrakcją pod chłodnicą zwrotną ($p < 0,05$). Najwyższą ilość wyekstrahowanego kwasu usninowego zaobserwowałam dla schematów z pojedynczą ekstrakcją – próbki uzyskane przez różne liczby powtórzeń nie różniły się statystycznie. Jest to ważny, choć nieco zaskakujący wynik, ponieważ wielokrotne traktowanie materiału roślinnego czy porostowego kolejnymi porcjami rozpuszczalnika jest powszechną praktyką w wielu pracach eksperymentalnych. Takie podejście pozwoli zatem na skrócenie całkowitego czasu, jak również zmniejszenie kosztów ekstrakcji prowadzonych w kolejnych badaniach w przyszłości.

Elementy nowości:

- użycie rozbudowanego planu frakcyjnego do zaplanowania eksperymentu
- bezpośrednie ilościowe porównanie trzech rodzajów ekstrakcji i określenie wpływu poszczególnych czynników na efektywność każdej z metod ekstrakcji
- wykorzystanie zaawansowanych metod obliczeniowych do opracowania wydajnego, ekonomicznego modelu ekstrakcji kwasu usninowego z matrycy porostowej

H2. Galanty A., Węgrzyn M., Wietrzyk-Pełka P., Fołta M., Krośniak M., Podolak I., Zagrodzki P.: Quantitative variations of usnic acid and selected elements in terricolous lichen *Cladonia mitis* Sandst., with respect to different environmental factors – a chemometric approach. **Phytochemistry**, 2021, 192, 112948 **IF 4,072 MNiSW 100 pkt**

Po wytypowaniu optymalnych warunków ekstrakcji kwasu usninowego z materiału porostowego, w ramach poszukiwania nowych, bogatych źródeł tego związku, w kolejnym etapie badań postanowiłam określić jego zawartość w jednym z gatunków rodzaju *Cladonia*, a mianowicie *Cladonia mitis* Sandst. Jak wspominałam wcześniej, jest to gatunek mało zbadany pod kątem zawartości kwasu usninowego, natomiast jego zaletą jest powszechne występowanie na półkuli północnej oraz brak ochrony gatunkowej.

Celem tej pracy była identyfikacja zmienności ilościowej kwasu usninowego oraz wybranych pierwiastków w 19 próbkach *Cladonia mitis* Sandst., zebranych wzdłuż transektu wiodącego przez północną i środkową Europę, z uwzględnieniem różnych czynników geograficznych i środowiskowych. Próbki do badań otrzymałam od dr hab. Michała Węgrzyna i dr Pauliny Wietrzyk-Pełki z Pracowni Badań Polarnych Instytutu Botaniki UJ. Porównując ilość kwasu usninowego, z zawartością wybranych metali ciężkich, oznaczanych w tych samych próbkach porostów, chciałam również zweryfikować hipotezę o zdolności kwasu usninowego do chelatowania metali ciężkich i ocenić wpływ tych pierwiastków na syntezę tego kwasu. Badania zawartości pierwiastków w badanych próbkach przeprowadziłam we współpracy z dr hab. Mirosławem Krośniakiem i mgr inż. Marią Fołtą z Zakładu Bromatologii UJ CM. Wykorzystując zaawansowane metody chemometryczne określiłam wzajemne relacje pomiędzy zawartością kwasu usninowego i badanych pierwiastków a różnymi czynnikami, mogącymi wpływać na tę zawartość, takimi jak długość i szerokość geograficzna, wysokość nad poziomem morza, stopień ekspozycji na promieniowanie słoneczne, temperatura czy opad atmosferyczny. Badania te przeprowadziłam we współpracy z dr hab. Pawłem Zagrodzkim prof. UJ z Zakładu Bromatologii UJ CM.

Próbki porostów ekstrahowałam we wcześniej zoptymalizowanych warunkach (opisanych w publikacji **H1**). Uzyskane ekstrakty analizowałam ilościowo metodą HPLC. Zawartość kwasu usninowego wahała się od $4,52 \pm 0,54$ dla próbki P3 pobranej w Polsce północnej do $21,58 \pm 2,23$ mg/g s.m. dla próbki S11 ze szwedzkiego Kattegat. Próbki porostów zebrane na Półwyspie Skandynawskim były znacząco bogatsze w kwas usninowy ($8,24 \pm 0,35 - 21,58 \pm 2,23$ mg/g s.m.) niż te z Polski ($4,52 \pm 0,54 - 11,00 \pm 0,73$ mg/g s.m.), $p < 0,01$. Zaobserwowałam pozorną zależność między ilością kwasu usninowego w zebranych próbkach a szerokością geograficzną miejsca ich zbioru. Jednak analiza klastrowa wskazała na dwa zbiory punktów, grupujących miejsca zbioru w terenie odkrytym i zalesionym, w których zawartość kwasu usninowego

istotnie różniła się, na korzyść tych pierwszych ($p < 0,001$), natomiast w żadnej z tych grup nie zaobserwowałam związku z szerokością geograficzną. Na tej podstawie stwierdziłam, że zawartość kwasu usninowego w porostach jest raczej skorelowana ze stopniem zalesienia miejsc zbioru, a co za tym idzie stopniem ekspozycji na światło słoneczne, niż z ich szerokością geograficzną. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że kwas usninowy posiada właściwości fotoprotekcyjne, co chroni porosty przed nadmierną ekspozycją na promieniowanie słoneczne. Uzyskane wyniki wskazują natomiast na wyraźną pozytywną korelację między zawartością kwasu usninowego i wysokością miejsca zbioru, ale tylko w zakresie 50–500 m n.p.m. Zawartość pierwiastków w badanych próbkach nie różniła się istotnie pomiędzy próbkami skandynawskimi a polskimi, za wyjątkiem zawartości miedzi ($p=0,002$), kadmu ($p=0,041$) i magnezu ($p=0,0041$). Do oceny zależności między badanymi parametrami skonstruowano model regresji PLS (ang. *partial least squares*, cząstkowych najmniejszych kwadratów), wyjaśniający 75,4% wariancji w zestawie parametrów predykcyjnych (Ag, Ca, Cr, Cu, Mn, średnie opady i temperatura, szerokość geograficzna i rodzaj obszaru: otwarty lub leśny) oraz 81,95% wariancji w parametrach odpowiedzi (zawartość kwasu usninowego i ołowiu). Inne parametry (Cd, Mg, Ni, Zn, długość geograficzna, wysokość) zostały uznane za nieinformacyjne. Najistotniejszym rezultatem tej analizy jest pozytywna korelacja pomiędzy zawartością kwasu usninowego i ołowiu w badanych próbkach, co potwierdza hipotezę o chelatowaniu tego metalu ciężkiego przez kwas usninowy, jako jednym z elementów ochrony porostów przed zanieczyszczeniami powietrza. Podobną korelację zaobserwowałam dla chromu, jednak znaczenie tej obserwacji wymaga dalszych badań.

Elementy nowości:

- dostarczenie porównawczych danych ilościowych o zawartości kwasu usninowego w próbkach *C. mitis* z różnych lokalizacji w Skandynawii i Polsce
- wykazanie pozytywnej korelacji między akumulacją kwasu usninowego i ołowiu w próbkach terenowych, co potwierdza hipotezę o roli tego związku w procesach ochrony porostów przed zanieczyszczeniami metalami ciężkimi
- wykazanie korelacji pomiędzy nasłonecznieniem a zawartością kwasu usninowego, potwierdzającej zaangażowanie tego związku w procesy ochrony porostów przed nadmierną ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe

Punktem wyjścia do prawidłowego zaplanowania kierunków badań biologicznych był przeprowadzony przeze mnie gruntowny przegląd literatury, dotyczącej enancjoselektywnej aktywności kwasu usninowego.

H3. Galanty A., Paško P., Podolak I.: Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 2019, 18, 2, 527-548. IF 4,298 MNiSW 100 pkt

W pracy tej zestawiałam i porównałam aktywność biologiczną i farmakologiczną enancjomerów kwasu usninowego, na podstawie doniesień literaturowych opublikowanych w latach 1948 – 2019. W pracy przedstawiłam również informacje dotyczące dystrybucji enancjomerów tego związku w różnych gatunkach porostów. Praca zawiera rozdział opisujący badania, w których porównywano aktywność obydwu enancjomerów, jak również rozdziały dotyczące badań, w których określano aktywność tylko jednego z enancjomerów kwasu usninowego, bądź ich mieszaniny. Warto podkreślić, że doniesienia porównujące aktywność obydwu enancjomerów, w tych samych warunkach eksperymentalnych, są nieliczne, w odniesieniu do tych opisujących aktywność pojedynczych enancjomerów, a tylko takie badania stanowią źródło wiarygodnych informacji o ewentualnej przewadze jednego enancjomeru nad drugim. Istotną podkreślenia jest także zdecydowana przewaga ilości prac opisujących aktywność kwasu (+)-usninowego nad pracami dotyczącymi aktywności drugiego z enancjomerów. Co ciekawe, dane o aktywności mieszaniny obu enancjomerów, bądź to racemicznej, bądź skalemicznej, pojawiają się w literaturze niezwykle rzadko (jak dotąd trzy prace). W pracy ujęłam również zestawienie aspektów toksycznych obydwu enancjomerów, jak również wskazałam na ograniczenia opisywanych badań, a także kierunki i sugestie do dalszych badań nad enancjomerami kwasu usninowego.

Elementy nowości:

- kompleksowe porównanie enancjoselektywnego działania kwasu usninowego
- wytypowanie kierunków dalszych badań nad enancjomerami kwasu usninowego

Biorąc pod uwagę niejasne wnioski dotyczące przewagi w aktywności któregoś z enancjomerów kwasu usninowego, badania biologiczne postanowiłam przeprowadzić dla obu tych związków, celem ich bezpośredniego porównania. Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że kwas usninowy, oprócz szerokiego spektrum interesujących własności farmakologicznych, ma też niekorzystny, toksyczny wpływ na wątrobę. Była to więc przesłanka do ukierunkowania badań biologicznych na ewentualne zastosowanie topikalne enancjomerów kwasu usninowego, jak również na doprecyzowanie ich losów w wątrobie, celem przewidzenia produktów reaktywnych powstających w wyniku ich biotransformacji. Badania biologiczne zaplanowałam w oparciu o autorską koncepcję modeli *in vitro*, zgodnie z regułą 3R, obejmujących badania na odpowiednio dobranych liniach

komórkowych, uzupełnione o badania aktywności powiązanej z danym kierunkiem działania (przeciwzapalna, fotoprotekcyjna, hamująca tyrozinazę i in.). Uzyskane w ten sposób wyniki pozwolą na ograniczenie liczby zwierząt laboratoryjnych w planowanych w przyszłości badaniach *in vivo*.

H4. Piska K., Galanty A., Koczurkiewicz P., Żmudzki P., Potaczek J., Podolak I., Pękała E.: Usnic acid reactive metabolites formation in human, rat, and mice microsomes. Implication for hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 120, 112-118 IF 3,775 MNiSW 40 pkt

W pracy opisałam biotransformację enancjomerów kwasu usninowego, w modelu *in vitro*, z użyciem mikrosomów wątroby człowieka, szczura i myszy, oraz testu pułapkowania z glutationem. Badania te przeprowadziłam we współpracy z mgr Kamilem Piską z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM. Identyfikacja uzyskanych metabolitów była prowadzona metodą UPLC MS/MS, we współpracy z dr Pawłem Żmudzkim z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM, połączoną z predykcją alertów strukturalnych metodą *in silico*. W badaniach użyto komercyjnego kwasu (+)-usninowego, natomiast kwas (-)-usninowy został przeze mnie wyizolowany z gatunku *Cladonia uncialis*. Oznaczenie skręcalności optycznej uzyskanego enancjomeru przeprowadziłam we współpracy z dr Joanną Potaczek z Katedry Chemii Organicznej UJ CM.

W wyniku inkubacji enancjomerów kwasu usninowego z badanymi mikrosomami bez dodatku glutationu, zaobserwowałam powstanie odwodornionych i hydroksylowanych metabolitów. Analiza UPLC-MS/MS mieszaniny inkubacyjnej z dodatkiem glutationu wykazała obecność adduktów metabolitów kwasu usninowego z glutationem, określonych jako M1 – M4, co wskazuje na jak dotąd nieopisany mechanizm hepatotoksyczności kwasu usninowego, poprzez wytwarzanie reaktywnych metabolitów. Ze względu na brak standardów analitycznych uzyskanych metabolitów, nie udało się przeprowadzić ich analizy ilościowej, jednak wnioski dotyczące różnic metabolicznych profilów między rodzajami użytych mikrosomów i enancjomerami określiłam szacując pola powierzchni pod pikami uzyskanych adduktów. W ludzkich mikrosomach dominowały metabolity M1 i M3, podczas gdy w mysich i szczurzych mikrosomach metabolity M2 i M4. Zaobserwowałam także różnice między adduktami powstałymi w wyniku biotransformacji obu enancjomerów kwasu usninowego. W ludzkich mikrosomach kwas (-)-usninowy bardziej preferencyjnie przekształcał się w metabolit M3, w porównaniu z kwasem (+)-usninowym, który ulegał metabolizmowi do M1 i M2, podczas gdy w mikrosomach szczurzych i mysich różnice te były prawie niezauważalne. Na tej podstawie można wnioskować o spodziewanych różnicach w

toksyczności między obydwoma enancjomerami, oraz odmiennych efektach toksycznych w zależności od gatunku, jednak wymaga to dalszych badań. Warto też podkreślić, że uzyskane wyniki różnego metabolizowania enancjomerów kwasu usninowego w ludzkich i zwierzęcych mikrosomach wskazują na niską przydatność tych ostatnich jako modelu do określania toksyczności i ekstrapolowania efektów na organizm ludzki. Analiza *in silico* z wykorzystaniem bazy ToxAlert wygenerowała alerty strukturalne uzyskanych metabolitów, sugerujące obecność grupy ortoalkilofenolowej, prawdopodobnie odpowiedzialnej za hepatotoksyczność metabolitów kwasu usninowego. Wynik ten sugeruje, aby w przyszłości unikać tego ugrupowania w modyfikacjach struktury kwasu usninowego.

Elementy nowości:

- po raz pierwszy opisałam transformacje enancjomerów kwasu usninowego w mikrosomach wątroby, zwierzęcych oraz ludzkich
- po raz pierwszy wykazałam różnice w biotransformacji i hepatotoksyczności pomiędzy enancjomerami kwasu usninowego
- wskazałam nowe implikacje dotyczące zależności między strukturą chemiczną a potencjałem hepatotoksycznym enancjomerów kwasu usninowego
- wskazałam alerty strukturalne, których wykorzystanie w syntezie związków hybrydowych lub innych pochodnych kwasu usninowego mogłoby nasilać jego hepatotoksyczność

Do dalszych badań biologicznych wykorzystałam kwas (-)-usninowy, wyizolowany w publikacji H4 z *Cladonia uncialis*, oraz kwas (+)-usninowy, otrzymany z *Cladonia arbuscula*, którego izolację przeprowadziłam w ramach wcześniejszych badań (publikacja E19). Obydwa enancjomery miały wysoką czystość (powyżej 95%).

H5. Galanty A., Popiół J., Paczkowska-Walendowska M., Studzińska-Sroka E., Paśko P., Cielecka-Piontek J., Pękala E., Podolak I. (+)-Usnic acid as a promising candidate for a safe and stable topical photoprotective agent. *Molecules*, 2021, 26, 5224 IF 4,411 MNiSW 100 pkt

Biorąc pod uwagę pozytywną korelację pomiędzy ilością kwasu usninowego w porostach a ich ekspozycją na słońce, wskazującą na jego efekt fotoochronny (publikacja **H2**), jak również ryzyko działania hepatotoksycznego kwasu usninowego przy podaniu wewnętrznym (publikacja **H4**), dalsze badania biologiczne badanych związków postanowiłam ukierunkować na ich ewentualne zastosowanie topikalne. Stąd też, kolejnym etapem moich badań nad enancjomerami kwasu usninowego było określenie i porównanie ich bezpieczeństwa wobec komórek skóry, określenie ich zdolności do przenikania przez barierę skórą oraz ocena działania fotoprotekcyjnego w opracowanym modelu *in vitro*. Miało to na celu wytypowanie bezpiecznego i skutecznego kandydata na filtr UV spośród enancjomerów kwasu usninowego. Badanie przenikania przez skórę wykonano, we współpracy z dr Magdaleną Paczkowską-Walendowską i dr Elżbietą Studzińską-Sroka z Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, z użyciem testu PAMPA-skin (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), połączonego ze zwalidowaną metodą detekcji spektrofotometrycznej.

Oba enancjomery wykazały porównywalne, dobre właściwości penetrujące skórę, a wartości uzyskanych współczynników przenikalności P_{app} dla obu związków nie różniły się istotnie ($p > 0,05$). Do określenia bezpieczeństwa obydwu enancjomerów zaprojektowałam specjalny model *in vitro* prawidłowych komórek skóry, reprezentujących różne jej warstwy: keratynocytów HaCaT, melanocytów HEM i fibroblastów HDF. Toksyczność obu badanych enancjomerów wobec komórek skóry była niska, obserwowana wyłącznie w najwyższym badanym stężeniu (100 $\mu\text{g/ml}$) i przy wydłużonej ekspozycji na badane substancje (48 i 72 h). Kwas (-)-usninowy był bardziej toksyczny dla keratynocytów (IC_{50} 80,82 i 40,12 $\mu\text{g/ml}$, odpowiednio po 48 i 72 h) niż kwas (+)-usninowy ($IC_{50} > 100$ $\mu\text{g/ml}$ zarówno po 48 jak i 72 h), $p < 0,01$. Dlatego też do dalszych badań fotoprotekcji i fotostabilności wytypowałam kwas (+)-usninowy, jako bardziej bezpieczny. Właściwości te porównywałam do oktokrylenu, komercyjnego filtra UV. Ten etap badań wykonałam we współpracy z mgr Justyną Popiół z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM. Profile absorpcji kwasu (+)-usninowego i oktokrylenu w regionach UVB i UVA były porównywalne, dalsze etapy badań postanowiłam zatem przeprowadzić na przygotowanych 1% formuacjach kosmetycznych, zawierających pojedyncze badane substancje lub ich kombinację. Kwas (+)-usninowy i oktokrylen wykazały porównywalną aktywność, z nieznacznie wyższym współczynnikiem $SPF_{in vitro}$ ($p < 0,01$) i UVA PF ($p < 0,05$) dla komercyjnego filtru. Po dodaniu kwasu (+)-usninowego do formuacji zawierającej oktokrylen,

wartości współczynników SPF_{in vitro} i UVA PF wzrosły odpowiednio o 25 i 13,25%, w porównaniu do formułacji z samym oktokrylenem ($p < 0,001$), co sugeruje wzmocnienie działania fotoprotekcyjnego oktokrylenu przez kwas (+)-usninowy. Co ważne, formułacja zawierająca oba badane związki charakteryzowała się wysoką fotostabilnością po napromieniowaniu symulatorem światła słonecznego (dawka 500 W/m²), w porównaniu do formułacji z pojedynczymi związkami. Dla formułacji zawierających kwas (+)-usninowy lub oktokrylen zaobserwowałam zmniejszenie wartości SPF_{in vitro} odpowiednio o 8,4 i 7,4%, natomiast dla formułacji z kombinacją obu związków spadek SPF_{in vitro} wyniósł tylko 2,4% ($p < 0,001$). Prawoskrętny kwas usninowy okazał się zatem obiecującym kandydatem na filtr UV do stosowania miejscowego, pod względem zdolności przenikania bariery skórnej, bezpieczeństwa dla komórek skóry, własności fotoprotekcyjnych i fotostabilności.

Elementy nowości:

- po raz pierwszy określiłam zdolność do przenikania przez barierę skóry za pomocą testu PAMPA-skin połączonego z detekcją spektrofotometryczną, co może być interesującą alternatywą dla innych testów tego typu
- wykazałam i bezpośrednio porównałam bezpieczeństwo obydwu enancjomerów na komórki różnych warstw skóry
- po raz pierwszy określiłam wpływ kwasu (-)-usninowego na prawidłowe komórki skóry
- po raz pierwszy połączyłam kwas usninowy z jakimkolwiek innym filtrem UV w formułacji i zaobserwowałam synergizm działania

H6. Galanty A., Zagrodzki P., Gdula-Argasińska J., Grabowska K., Koczurkiewicz-Adamczyk P., Wróbel-Biedrawa D., Podolak I., Pękala E., Paśko P.: A comparative survey of anti-melanoma and anti-inflammatory potential of usnic acid enantiomers – a comprehensive *in vitro* approach. **Pharmaceuticals**, 2021, 14, 945 IF 5,863 MNiSW
100 pkt

W poprzedniej publikacji **H5** wykazałam wysokie bezpieczeństwo obu enancjomerów kwasu usninowego wobec prawidłowych komórek skóry, a także ich dobrą przenikalność przez barierę skórną, co jest istotne dla skuteczności przy stosowaniu miejscowym. Wyniki te skłoniły mnie do poszerzenia badań o określenie potencjalnego wykorzystania obu związków w nowotworach skóry. Zatem celem niniejszej pracy było porównanie przeciwczerśniakowego działania kwasu (+)- i (-)-usninowego w modelu *in vitro*, poprzez zbadanie nie tylko ich bezpośredniego wpływu na komórki, ale także wpływu na procesy związane z progresją raka. Aby to osiągnąć, zbadalam wpływ obu enancjomerów na żywotność, proliferację i potencjał inwazyjny (we współpracy z dr Pauliną Koczurkiewicz-Adamczyk z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM) trzech linii komórkowych czerniaka (HTB140, A375, WM793), różniących się pochodzeniem i potencjałem przerzutowym, co miało odzwierciedlić fenotypową heterogeniczność guza. Wykorzystując analizę izobolograficzną, we współpracy z dr hab. Pawłem Zagrodzkim prof. UJ z Zakładu Bromatologii UJ CM, określiłam rodzaj interakcji kwasu (+)- i (-)-usninowego z cytostatykiem dokсорubicyną. Mając na uwadze kompleksowe podejście do terapii przeciwczerśniakowej, oraz fakt, że progresji czerniaka często towarzyszy stan zapalny, określiłam również właściwości przeciwzapalne enancjomerów kwasu usninowego, we współpracy z dr hab. Joanną Gdulą-Argasińską z Zakładu Radioligandów UJ CM, dr Karoliną Grabowską z Katedry Farmakognozji UJ CM oraz dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM. Aby dopełnić ocenę potencjału przeciwczerśniakowego enancjomerów kwasu usninowego, zbadalam, we współpracy z dr Dagmarą Wróbel-Biedrawą z Katedry Farmakognozji UJ CM, ich wpływ na hamowanie aktywności tyrozynazy, kluczowego enzymu w syntezie melaniny zaangażowanej w progresję czerniaka.

Oba związki istotnie wpływały na żywotność badanych linii czerniaka, w sposób zależny od dawki i czasu, przy czym kwas (+)-usninowy wykazywał silniejsze działanie cytotoksyczne ($p < 0,001$) niż jego lewoskrętny odpowiednik. Spośród testowanych linii, czerniak złośliwy A375 był najbardziej podatny na kwas (+)-usninowy, odpowiednio z IC_{50} 11,84 $\mu\text{g/ml}$ po 48 godzinach, podczas gdy w przypadku wysoce przerzutujących komórek HTB140 obserwowany efekt był mniej wyraźny (IC_{50} 14,72 $\mu\text{g/ml}$). Co ciekawe, oba związki wpłynęły na żywotność czerniaka pochodzącego z ogniska pierwotnego, WM793, który nie był podatny na dokсорubicynę ($IC_{50} > 100$ $\mu\text{g/ml}$), jednak efekt był umiarkowany (IC_{50} 30,05 i 52,09

$\mu\text{g/ml}$, odpowiednio dla prawo- i lewoskrętnego kwasu usninowego po 48 h). Interesujące wyniki uzyskałam łącząc badane związki z doksorubicyną. Wobec komórek A375 zaobserwowałam synergizm działania cytostatyku i obu enancjomerów kwasu usninowego, a wyraźniejszy efekt wykazywała kombinacja z kwasem (-)-usninowym, zwłaszcza po 24 godzinach inkubacji. Dla komórek HTB140 zaobserwowałam silny antagonizm dla kwasu (+)-usninowego w połączeniu z doksorubicyną, z tendencją do zmiany w addytywny po dłuższym czasie inkubacji, podczas gdy efekt dla kwasu (-)-usninowego zmienił się z synergistycznego (24 h) na addytywny (48 godz.). Najciekawszą obserwację odnotowałam dla komórek WM793, niewrażliwych na doksorubicynę. Tutaj silny efekt synergistyczny z kwasem (-)-usninowym zaobserwowałam w wyższych dawkach (CI 0,003 – 0,15) po 24 h, natomiast dla kwasu (+)-usninowego obserwowany synergizm przy wyższych dawkach (CI 0,75) ostatecznie przekształcił się w antagonizm przy mniejszych dawkach (CI 1,37 - 1,85). Zaobserwowałam także, zależne od dawki i czasu, działanie cytostatyczne badanych związków, przy czym kwas (+)-usninowy był bardziej skuteczny. Największe zahamowanie proliferacji odnotowałam dla wysoce przerzutujących komórek HTB140, a efekt był szczególnie widoczny po 72 h inkubacji (IC_{50} 19,9 i 31,1 $\mu\text{g/ml}$, odpowiednio dla kwasu (+)- i (-)-usninowego). Oba związki hamowały nieco słabiej proliferację komórek WM793 (IC_{50} 28,6 i 50,2 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla kwasu (+)- i (-)-usninowego po 72 h), natomiast komórki A375, które były najbardziej podatne na działanie cytotoksyczne obu związków, były jednocześnie najbardziej odporne pod względem hamowania proliferacji (IC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$, dla wszystkich badanych warunków). Co więcej, oba enancjomery kwasu usninowego silnie hamowały migrację badanych komórek czerniaka w subcytotoksycznej dawce zaledwie 10 $\mu\text{g/ml}$, w porównaniu z komórkami kontrolnymi ($p < 0,001$). Kwas (+)-usninowy był bardziej efektywny niż jego lewoskrętny enancjomer jako inhibitor migracji komórek HTB140 ($p < 0,05$) i A375 ($p < 0,01$), podczas gdy w przypadku komórek WM793 różnica nie była istotna statystycznie. Badane związki wykazały słabą aktywność hamującą tyrozynazę, w najwyższej badanej dawce kwas (+)-usninowy wykazał 5,22 i 9,1% inhibicji tyrozynazy, kwas (-)-usninowy 1,4 i 4,09 %, natomiast wartości IC_{50} dla kontrolnego kwasu kojowego wynosiły 1,1 i 44,9 $\mu\text{g/ml}$, odpowiednio dla aktywności mono- i difenolazy. W teście enzymatycznym na aktywność hialuronidazy, oba enancjomery wykazały wysoki i porównywalny efekt hamujący. Dominującą aktywność kwasu (+)-usninowego zaobserwowałam tylko w dawce 250 ($p < 0,05$) i 1000 ($p < 0,001$) $\mu\text{g/ml}$, a aktywność ta była porównywalna z kontrolną kwercetyną, z wyjątkiem dawki 750 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$).

W ostatnim etapie pracy określiłam aktywność przeciwzapalną badanych związków, w szerokim panelu mediatorów stanu zapalnego, w modelu mysich makrofagów RAW 267.4, stymulowanych lipopolisacharydem (LPS). Do badań

wybrałam subcytotoksyczne dawki obu związków (10 i 25 µg/ml). Zaobserwowałam znaczące zahamowanie syntezy NO pod wpływem obu badanych związków, w porównaniu z komórkami stymulowanymi LPS ($p < 0,001$), jednak efekt nie był zależny od dawki, a różnice między enancjomerami kwasu usninowego nie były istotne statystycznie. Z wykorzystaniem metody ELISA zaobserwowałam słabe zahamowanie uwalniania TNF- α w makrofagach stymulowanych LPS i traktowanych enancjomerami kwasu usninowego, ale efekt nie był znaczący w porównaniu z komórkami stymulowanymi LPS i nie zależał od dawki. W przypadku IL-6 jedynie kwas (+)-usninowy w dawce 25 µg/ml istotnie zmniejszał jej uwalnianie w porównaniu z komórkami stymulowanymi LPS ($p < 0,05$). Stosując metodę Western blot zaobserwowałam, że zarówno kwas (+)-, jak i (-)-usninowy w stężeniu 25 µg/ml zmniejszał syntezę receptora toll-podobnego (TLR4), którego aktywacja może wyzwać procesy zapalne i prowadzić do progresji nowotworów, w porównaniu z makrofagami traktowanymi LPS (odpowiednio $p < 0,01$ i $p < 0,05$), ale różnice między obydwoma enancjomerami nie były istotne. Oba związki znacząco zmniejszyły syntezę cytozolowej fosfolipazy A2 (cPLA2), w porównaniu z makrofagami stymulowanymi LPS. W stężeniu 10 µg/ml kwas (+)-usninowy był silniejszym inhibitorem syntezy cPLA2 niż jego lewoskrętny enancjomer ($p < 0,01$), a efekt ten był zależny od dawki ($p < 0,01$) dla obu enancjomerów. Prawoskrętny kwas usninowy zależnie od dawki obniżał syntezę cyklooksygenazy COX-1 ($p < 0,001$), ale tylko przy wyższej dawce efekt różnił się od komórek kontrolnych, stymulowanych LPS ($p < 0,001$). W przypadku kwasu (-)-usninowego efekt hamujący był istotny w obu dawkach w odniesieniu do makrofagów stymulowanych LPS ($p < 0,001$). Oba enancjomery kwasu usninowego istotnie obniżały poziom cyklooksygenazy COX-2 w porównaniu z makrofagami stymulowanymi LPS ($p < 0,001$). W przypadku kwasu (-)-usninowego efekt nie był zależny od dawki, podczas gdy kwas (+)-usninowy w wyższej dawce nieznacznie stymulował syntezę COX-2.

Obydwa enancjomery kwasu usninowego wykazały znaczący wpływ na różne aspekty funkcjonowania komórek czerniaka. Tak kompleksowe działanie przeciwczerniakowe ma szczególne znaczenie, biorąc pod uwagę niejednorodność guza nowotworowego i obecność w nim komórek różniących się wskaźnikiem proliferacji i stopniem inwazyjności. Spośród badanych enancjomerów, kwas (+)-usninowy wykazywał silniejsze właściwości cytotoksyczne, cytostatyczne oraz hamujące migrację różnych linii komórek czerniaka. Obiecujące jest również jego działanie przeciwzapalne, o zróżnicowanym wpływie na różne mediatory prozapalne. Te cechy sprawiają, że kwas (+)-usninowy jest dobrym kandydatem na substancję o zastosowaniu topikalnym, wspomagającą terapię przeciwczerniakową, jednak uzyskane wyniki wymagają dalszych badań.

Elementy nowości:

- po raz pierwszy opisałam interakcję enancjomerów kwasu usninowego z doksorubicyną i określiłam rodzaj tego współdziałania
- po raz pierwszy opisałam wpływ enancjomerów kwasu usninowego na migrację komórek czerniaka, jak również wpływ kwasu (-)-usninowego na aktywność migracyjną jakichkolwiek komórek
- po raz pierwszy opisałam wpływ enancjomerów kwasu usninowego na regulację poziomu TLR4, cPLA i COX-1

Elementem uzupełniającym badania o charakterze fitochemiczno-ekologicznym jest praca opisująca narzędzie informatyczne w postaci aplikacji do rozpoznawania wybranych gatunków porostów.

H7. Galanty A., Danel T., Węgrzyn M., Podolak I., Podolak I.: Deep convolutional neural network for preliminary in-field classification of lichen species. *Biosystems Engineering*, 2021, 204, 15-25 IF 4,123 MNiSW 100 pkt

Jak wspomniałam wcześniej, porosty z rodzaju *Cladonia* są dobrym źródłem do pozyskiwania kwasu usninowego, wykorzystywanego w badaniach. Jednak znaczne podobieństwo morfologiczne między gatunkami porostów z rodzaju *Cladonia* utrudnia ich prawidłową identyfikację, zwłaszcza w warunkach terenowych, a tym samym zbiór materiału badawczego. Dlatego istnieje potrzeba szybkiej i nowoczesnej metody, która może ułatwić wstępną klasyfikację wybranych gatunków porostów. Stąd też mój pomysł na stworzenie aplikacji na telefon komórkowy, służącej do rozpoznawania porostów na podstawie ich zdjęć wykonanych w terenie. We współpracy z dr hab. Igorem Podolakiem i mgr Tomaszem Danelem z Instytutu Informatyki UJ powstało narzędzie, ułatwiające rozpoznawanie wybranych gatunków porostów z rodzaju *Cladonia*, w oparciu o głębokie konwolucyjne sieci neuronowe (CNN). Praca opisuje założenia, tworzenie i testowanie takiego modelu. Sieć została przeszkolona i przetestowana na dwunastu gatunkach porostów z rodzaju *Cladonia*, zawierających kwas usninowy, przy użyciu łącznie 1164 obrazów, pobranych z różnych stron internetowych. Wykorzystanym modelem CNN był SqueezeNet, z niewielkimi modyfikacjami. Sieć została przeszkolona z optymalizatorem Adama, z szybkością uczenia się 0,001 dla 350 epoki, i zoptymalizowana przy użyciu stochastycznego spadku gradientu, z wykładniczo malejącym wskaźnikiem uczenia się. Najwyższy wskaźnik błędów (9) w opracowanej macierzy błędów odnotowano dla gatunków *Cladonia uncialis* i *Cladonia gracilis*. Kolejne dwa gatunki porostów, często mylone ze sobą to *Cladonia uncialis* i *Cladonia subulata*, jednak w tym wypadku

wskaźnik błędów wyniósł tylko 4. Te trzy gatunki porostów są dość podobne, a najważniejsze różnice to rodzaj rozgałęzienia na końcu pędów. Co ciekawe, inny gatunek zbliżony wyglądem do trzech wcześniej wspomnianych, *Cladonia furcata*, nie był z nimi mylony w opracowanym modelu. Zaproponowany model osiągnął zadowalające wyniki, z dokładnością prawie 61% i może być przydatny do wstępnej identyfikacji wybranych gatunków rodzaju *Cladonia* w terenie. Model został pomyślnie wdrożony na telefonie komórkowym z systemem operacyjnym Android.

Elementy nowości:

- pierwsza próba wykorzystania sieci neuronowych i nauczania maszynowego do rozpoznawania porostów
- stworzenie łatwej w użyciu aplikacji, przydatnej nie tylko dla specjalistów z zakresu lichenologii i naukowców badających metabolity porostowe, ale i miłośników porostów
- stworzenie innowacyjnego narzędzia informatycznego, ułatwiającego identyfikację gatunków z rodzaju *Cladonia* i stanowiącego przykład wykorzystania nauki opartej o technologię IT w życiu codziennym

Podsumowanie i perspektywy

Przeprowadzone przez mnie badania, opisane szczegółowo powyżej, stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy w zakresie nowych naturalnych źródeł kwasu usninowego oraz jego wielokierunkowego działania, z uwzględnieniem enancjoselektywności. Wyniki moich badań pozwoliły na usystematyzowanie i znaczące rozszerzenie istniejących dotąd informacji na temat zawartości kwasu usninowego w gatunku *Cladonia mitis*, z uwzględnieniem miejsc zbioru o określonych parametrach, zapewniających surowiec o wysokiej zawartości tego związku.

Realnym efektem wykorzystania wyników moich badań może być ułatwienie prawidłowej identyfikacji gatunków z rodzaju *Cladonia*, z wykorzystaniem zaproponowanej aplikacji na telefon komórkowy, jak również oszczędność czasu i kosztów prowadzenia procesu ekstrakcji tego związku z matrycy porostowej, dzięki wykorzystaniu planu frakcyjnego. Zaprojektowane przeze mnie podejście badawcze stanowi kompleksowe narzędzie do oceny potencjalnego zastosowania topikalnego kwasu usninowego, które może być wykorzystane w przyszłości dla innych substancji w badaniach przedklinicznych zgodnych z zasadą 3R.

W wyniku przeprowadzonych badań udało mi się także wytypować kwas (+)-usninowy jako bardziej efektywny i bezpieczniejszy w zastosowaniu topikalnym, w

porównaniu do drugiego enancjomeru, choć ostateczne potwierdzenie tego faktu wymaga dalszych badań *in vivo*.

Do przeprowadzenia całości zaprojektowanych badań udało mi się zbudować interdyscyplinarny zespół badawczy, integrujący badania fitochemiczne z badaniami biologicznymi, przy równoczesnym wsparciu zaawansowanych metod matematyczno-statystycznych. Daje to szansę na kontynuowanie tej współpracy, co przełoży się na zwiększenie jakości proponowanych badań, możliwość publikacji wyników w prestiżowych czasopismach międzynarodowych oraz ułatwienie finansowania badań ze źródeł zewnętrznych.

W dalszej perspektywie zamierzam kontynuować badania nad porostami z rodzaju *Cladonia* i enancjomerami kwasu usninowego. Planuję zająć się problemem dystrybucji enancjomerów kwasu usninowego w różnych gatunkach porostów, w związku z coraz częściej pojawiającymi się doniesieniami o obecności więcej niż jednego enancjomeru w danym gatunku. Zamierzam także kontynuować badania nad wykorzystaniem enancjomerów kwasu usninowego w zastosowaniu topikalnym, biorąc pod uwagę między innymi aspekty mechanizmu działania. Nowym kierunkiem planowanych przeze mnie badań będzie próba tworzenia związków hybrydowych na bazie enancjomerów kwasu usninowego, pod kątem poprawy efektywności działania oraz zmniejszenia działań niepożądanych. Uzyskane związki będą preselekcjonowane za pomocą opracowanego modelu *in vitro* do dalszych badań na zwierzętach.

Piśmiennictwo

Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, Al-Jawhari, DA (2005) The uncoupling of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria *in vivo* by usnic acid. *Science*, 17(1).

Araújo AAS, De Melo MGD, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Quintans-Junior LJ and Gelain DP (2015) Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural Product Research* 29, 2167–2180

Bačkor M, Fahselt D (2004) Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada). *Environmental and Experimental Botany* 52, 149–159

Barton DHR, Deflorin AM, Edwards OE (1956) The synthesis of usnic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 108, 530-534.

Behera BC, Mahadik N, Morey M (2012) Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharmaceutical Biology* 50, 968–979

- Bomfim RR, Araújo AAS, Cuadros-Orellana S, Melo MGD, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH (2009) Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 580–584
- Brandão LFG, Alcantara GB, de Fátima Cepa Matos M, Bogo D, dos Santos Freitas D, Oyama NM, Honda NK (2012) Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 61, 176–183.
- Brovko OS, Ivakhnov AD, Palamarchuk IA, Boitsova TA (2017) Supercritical fluid extraction of usnic acid from lichen of *Cladonia* genus. *Russian Journal of Physical Chemistry B* 11, 1306–1311.
- Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L (2009) Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocytes wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica* 75, 607–613.
- Conti ME, Cecchetti G (2001) Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment—a review. *Environmental pollution* 114(3), 471–492.
- da Silva Santos NP, Nascimento SC, Wanderley MSO, Pontes-Filho NT, da Silva JF, de Castro CMMB, Pereira EC, da Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS (2006) Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 154–160.
- Draut H, Rehm T, Begemann G, Schobert R (2017) Antiangiogenic and toxic effects of genistein, usnic acid, and their copper complexes in zebrafish embryos at different developmental stages. *Chemistry & Biodiversity* 14, e1600302.
- Einarsdottir E, Groeneweg J, Björnsdottir GG, Harðardottir G, Omarsdottir S, Ingólfssdottir K, Ögmundsdottir HM (2010) Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Medica* 76, 1–6.
- Engel K, Schmidt U, Reuter J, Weckesser S, Simon-Haarhaus B, Schempp CM (2007) *Usnea barbata* extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 89, 9–14.
- Fernández E, Quilhot W, González I, Hidalgo ME, Molina X (1996) Lichen metabolites as UVB filters: Lichen metabolites show photoprotector capacity. *Cosmetics and Toiletries* 111, 69–74.
- Galanty A, Koczurkiewicz P, Wnuk D, Paw M, Karnas E, Podolak I, Węgrzyn M, Borusiewicz M, Madeja Z, Czyż J, Michalik M (2017) Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicology in vitro* 40, 161–169.
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2004) Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *The Lichenologist* 36(2), 133–143.
- Gertig H (1960) Oznaczanie zawartości kwasu usninowego w porostach. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 17, 35–43

- Grube M, Cardinale M, de Castro Vieira, Jr J et al (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME Journal* 3, 1105–1115
- Guo L, Shi Q, Fang JL, Mei N, Ali AA, Lewis SM, Leakey JEA, Frankos VH (2008) Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26(4), 317-338.
- Hausen BM, Emde L, Marks V (1993) An investigation of the allergenic constituents of *Cladonia stellaris* (Opiz) Pous & Vežda ('silver moss', 'reindeer moss' or 'reindeer lichen'). *Contact dermatitis*, 28(2), 70-76.
- Hawrył A, Hawrył M, Hajnos-Stolarz A, Abramek J, Bogucka-Kocka A, Komsta Ł (2020) HPLC fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations. *Molecules* 25(18), 4301.
- Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, de Andrade Leite SR, Micheletti AC, Lopes TIB, Misutsu MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQF (2010) Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*, 17(5), 328-332.
- Kohlhardt-Floehr C, Boehm F, Troppens S, Lademann J, Truscott TG (2010) Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation—studies on human cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 101, 97–102.
- König GM, Wright AD (1999) ¹H and ¹³C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochemical Analysis* 10, 279–284
- Kwong SP, Wang H, Shi L, Huang Z, Lu B, Cheng X, Chou G, Ji L, Wang C (2020) Identification of photodegraded derivatives of usnic acid with improved toxicity profile and UVA/UVB protection in normal human L02 hepatocytes and epidermal melanocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 205, 111814.
- Lu X, Zhao Q, Tian Y, Xiao S, Jin T, Fan X (2011) A metabonomic characterization of (+)-usnic acid-induced liver injury by gas chromatography–mass spectrometry-based metabolic profiling of the plasma and liver in rat. *International Journal of Toxicology*, 30(5), 478-491.
- Millot M, Di Meo F, Tomasi S, Boustie J, Trouillas P (2012) Photoprotective capacities of lichen metabolites: a joint theoretical and experimental study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 111, 17-26.
- Mitchell JC, Armitage JS (1965) Dermatitis venenata from lichens: biology of lichens related to criteria for diagnosis of occupational dermatitis and to industrial exposure risk. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 11(5), 701-709.
- Mitchell JC, Shibata S (1969) Immunologic activity of some substances derived from lichenized fungi. *Journal of Investigative Dermatology*, 52(6), 517-520.
- Neupane BP, Malla KP, Gautam A, Chaudhary D, Paudel S, Timsina S, Jamarkattel, N (2017) Elevational trends in usnic acid concentration of lichen *Parmelia flexilis* in relation to temperature and precipitation. *Climate* 5(2), 40.

- Nguyen LA, He H, Pham-Huy Ch (2006) Chiral drugs: an overview. *International Journal of Biomedical Sciences* 2:85–100
- Nguyen TT, Yoon S, Yang Y, Lee HB, Oh S, Jeong MH, Yee ST, Crisan F, Moon C, Lee KY (2014) Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS ONE* 9, e111575.
- Özek T, Tabanca N, Demirci F, Wedge DE, Baser K (2010) Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Records of Natural Products* 4, 180-192
- Podterob AP (2008) Chemical composition of lichens and their medicinal applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 42, 582–588.
- Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukudom S, Ruangrunsi N (2004) Hepatotoxic effect of (+)-usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3), 381-387.
- Prokopiev IA, Poryadina LN, Konoreva LA, Chesnokov S, Shavarda AL (2018) Variation in the composition of secondary metabolites in *Flavocetraria* lichens from Western Siberia. *Russian Journal of Ecology* 49(5), 401-405.
- Provoost S, Ampe C, Bonte D, Cosyns E, Hoffmann M (2004) Ecology, management, and monitoring of grey dunes in Flanders. *Journal of Coastal Conservation* 10(1), 33e42.
- Purvis OW, Elix JA, Broomheadj JA, Jones GC (1987) The occurrence of copper – norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *The Lichenologist* 19, 193–203.
- Rahman M, Falck-Ytter AB, Antonsen ØG, Strætkevørn KO (2015) Reindeer lichen (*Cladonia stellaris*) from a Norwegian mountain region as a sustainable source of usnic acid. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 8 (3), 17-23
- Rancan F, Rosan S, Boehm K, Fernández E, Hidalgo ME, Quihot W, Rubio C, Boehm F, Piazena H, Oltmanns U (2002) Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 68, 133–139
- Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N (2012) Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *International Journal Molecular Sciences* 13, 14707–14722.
- Roach JA, Musser SM, Morehouse K, Woo JY (2006) Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 2484–2490.
- Schneider K, Resl P, Spribille T (2016) Escape from the cryptic species trap: lichen evolution on both sides of a cyanobacterial acquisition event. *Molecular Ecology* 25, 3453–3468

- Smeds AI, Kytöviita MM (2010) Determination of usnic and perlatolic acids and identification of olivetoric acids in Northern reindeer lichen (*Cladonia stellaris*) extracts. *The Lichenologist* 42(6), 739-749.
- Spribile T, Tuovinen V, Resl P et al (2016) Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353, 488–492
- Stenroos S, Hyvönen J, Myllys L, Thell A, Ahti T (2002) Phylogeny of the genus *Cladonia* s. lat. (*Cladoniaceae*, *Ascomycetes*) inferred from molecular, morphological, and chemical data. *Cladistics* 18(3), 237e278
- Studzińska-Sroka E, Hołderna-Kędzia E, Galanty A, Bylka W, Kacprzak K, Ćwiklińska K (2015) In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Natural Product Research*, 29(24), 2302-2307.
- Studzińska-Sroka E, Tomczak H, Malińska N, Wrońska M, Kleszcz R, Galanty A, Paluszczak J (2019). *Cladonia uncialis* as a valuable raw material of biosynthetic compounds against clinical strains of bacteria and fungi. *Acta Biochimica Polonica*, 66(4), 597-603.
- Varol M, Tay T, Candan M, Turk A, Koparal AT (2015) Evaluation of the sunscreen lichen substances usnic acid and atranorin. *Biocell* 39, 25–31.
- Węgrzyn MH, Kołodziejczyk J, Fałowska P, Wężyk P, Zięba- Kulawik K, Szostak M (2020) Influence of the environmental factors on the species composition of lichen Scots pine forests as a guide to maintain the community (Bory Tucholskie National Park, Poland). *Global Ecology and Conservation*, 22, e01017.
- Węgrzyn MH, Wietrzyk-Pełka P, Galanty A, Cykowska-Marzencka B, Sundset MA (2019) Incomplete degradation of lichen usnic acid and atranorin in Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Polar Research* 38, 3375
- Yilmaz M, Türk AÖ, Tay T, Kivanc M (2004) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (–)-usnic acid, atranorin and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c, 249–254.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

W okresie do uzyskania stopnia doktora mój dorobek naukowy obejmował 16 artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których 3 to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z impact factorem (IF), 3 prace anglojęzyczne w recenzowanych czasopismach bez IF oraz 10 artykułów w czasopismach polskojęzycznych. **Suma IF za ten okres to 3,218, zaś wartość punktów MNiSW 48,5, indeks Hirscha 2, liczba cytowań 407.** Dodatkowo byłam w tym okresie autorem 39 doniesień zjazdowych, w tym 32 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych, a 9 na konferencjach krajowych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora, oprócz badań prowadzonych w ramach realizacji projektu doktoratu, brałam udział w badaniach saponin steroidowych z gatunku *Allium ursinum* oraz saponin triterpenowych z rodzaju *Lysimachia*, prowadzonych w Katedrze Farmakognozji, wykonując analizy aktywności cytotoksycznej tych związków (publikacje E3 – E7). Badania aktywności saponin triterpenowych z rodzaju *Lysimachia* były finansowane z grantu MNiSW nr N N405297626, w którym byłam głównym wykonawcą. Wielokierunkowa analiza aktywności cytotoksycznej saponin zostało również przedstawione w formie pracy przeglądowej (publikacja P6). Określiłam wpływ preparatu Citrosept na przeżywalność komórek nowotworowych *in vitro*, na zlecenie producenta tego preparatu (publikacja E2). Ponadto byłam włączona w opracowanie serii przeglądowych artykułów dotyczących fitoterapii różnych schorzeń (publikacje P1 – P5).

po uzyskaniu stopnia doktora

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora mój dorobek naukowy z wyłączeniem artykułów stanowiących cykl habilitacyjny obejmuje 43 artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których 38 to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z impact factorem (IF) a 5 artykułów ukazało się w recenzowanych czasopismach polskojęzycznych. **Suma IF za ten okres to 115,485, wartość punktów MNiSW 2526,0, index Hirscha 12, liczba cytowań 302.** Dodatkowo byłam w tym okresie autorem 36 doniesień zjazdowych, w tym 13 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych, a 23 na konferencjach krajowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora, oprócz badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej, głównymi kierunkami moich zainteresowań są następujące tematy badawcze.

Wykonywane przeze mnie badania aktywności cytotoksycznej na szerokim panelu komórek nowotworowych i prawidłowych umożliwiają dostarczenie nowych informacji nie tylko o potencjale czy selektywności związków, ale także o zależności struktura-aktywność. Pozwala to na preselekcję najbardziej aktywnych związków, jak również na zaproponowanie dalszych modyfikacji tych struktur w celu spotęgowania efektu cytotoksycznego. Badania takie są bardzo istotne również w kontekście realizacji zasady 3R.

- saponiny triterpenowe i inne związki terpenowe

Badania nad saponinami triterpenowymi, ukierunkowane na poszukiwanie nowych źródeł tych związków oraz ich izolację z materiału roślinnego, stanowią główny kierunek badawczy w Katedrze Farmakognozji UJ CM. Określiłam aktywność cytotoksyczną saponin triterpenowych, wyizolowanych przez dr hab. Irmę Podolak prof. UJ, z różnych gatunków z rodzaju *Lysimachia* oraz dr Karolinę Grabowską z gatunków *Impatiens parviflora* i *Chenopodium hybridum*. Ponadto, w ramach współpracy z Zakładem Biologii Komórki UJ, dla najbardziej aktywnych związków przeprowadzone zostały badania opisujące ich mechanizm działania, w których opracowaniu i interpretacji brałam udział (publikacje E10–E14, E21, E49). Zainteresowanie aktywnością cytotoksyczną saponin zaowocowało także moim udziałem w dwóch opracowaniach poglądowych na ten temat, w których byłam współautorem rozdziałów opisujących mechanizmy wpływu tych związków na komórki nowotworowe *in vitro* (publikacje P12, P14).

Podobne badania wykonywałam w ramach współpracy z dr hab. Anną Stojakowską i dr hab. Klaudią Michalską z Zakładu Fitochemii PAN w Krakowie, określając profil aktywności cytotoksycznej związków di- i seskwiterpenowych, izolowanych z roślin z rodzaju *Telekia*, *Taraxacum* czy *Carpesium* (publikacje E26, E33, E47).

- benzochinony i glikolipidy

W ramach współpracy z dr Dagmarą Wróbel-Biedrawą i dr Karoliną Grabowską z Katedry Farmakognozji UJ CM określałam aktywność cytotoksyczną także innych związków, takich jak benzochinony (publikacja E41) czy glikolipidy (publikacja E15). Dodatkowo, dla tych związków przeprowadziłam także badania ich współdziałania z cytostatykiem doksorubicyną wobec komórek różnych linii ludzkiego czerniaka. W wyniku tych prac udało się wykazać synergistyczne działanie związków z obu grup i doksorubicyny (publikacje E38, E48). Badania nad określaniem potencjalnego synergizmu rozwijam we współpracy z dr hab. Pawłem Zagrodzkim prof. UJ z Zakładu Bromatologii UJ CM, wykorzystując analizę izobolograficzną.

- ekstrakty z roślin i grzybów

W ramach projektów badawczych prowadzonych w Katedrze Farmakognozji UJ CM określiłam aktywność cytotoksyczną ekstraktów z *Leonotis nepetifolia*, *Ardisia crenata*, dwóch gatunków roślin z rodzaju *Chenopodium* oraz inkraktu z *Eleutherococcus senticosus* (publikacje E8, E17, E18, E30, E46).

We współpracy z dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM oraz Uniwersytetem w Algarve (Portugalia) przebadalam także ekstrakty z liści *Olea europaea* pod kątem ich wpływu na komórki czerniaka i nowotworu prostaty (publikacja E20).

We współpracy z dr hab. Katarzyną Sułkowską-Ziają z Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM określiłam i porównałam aktywność cytotoksyczną ekstraktów z owocników i kultur mycelialnych grzyba *Fomitopsis betulina* (publikacja E24).

Badania nad porostami

Wykorzystując moje dotychczasowe doświadczenie w badaniach nad porostami i ich metabolitami, prowadzę także badania we współpracy z innymi jednostkami naukowymi.

- współpraca z grupą badawczą, kierowaną przez dr hab. Martę Michalik prof. UJ z Zakładu Biologii Komórki UJ, pozwoliła na rozszerzenie badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej, dotyczących aktywności cytotoksycznej atranoryny i kwasu usninowego, o określenie ich mechanizmu działania. W wyniku tych badań wykazany został zróżnicowany wpływ obydwu związków na różne aspekty funkcjonowania komórek nowotworowych i prawidłowych (publikacja E19). Wyniki te stały się inspiracją do kontynuowania moich badań nad aktywnością cytotoksyczną kwasu usninowego.
- we współpracy z dr Elżbietą Studzińską-Sroką z Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu brałam udział w badaniach nad ekstraktami o różnej polarności, otrzymanych z porostu *Cladonia uncialis*, i ich aktywnością mikrobiologiczną. Przeprowadziłam jakościową i ilościową analizę tych ekstraktów metodą HPLC, pod kątem zawartości dominujących związków (publikacje E16, E32). Współpraca ta zaowocowała także napisaniem wspólnej pracy przeglądowej dotyczącej aktywności biologicznej atranoryny, jednego z ważnych związków występujących w porostach (publikacja P11)
- we współpracy z dr hab. Michałem Węgrzynem z Pracowni Badań Polarnych Instytutu Botaniki UJ i prof. Monicą Sundset z The Arctic University of Norway brałam udział w projekcie, prowadzonym na Spitsbergenie,

dotyczącym losów metabolitów porostowych w organizmach reniferów. Z zastosowaniem metody HPLC określiłam zawartość atranoryny i kwasu usninowego w odchodach reniferów, jak i w próbkach porostów, wchodzących w skład ich diety. Wyniki wskazały na niekompletną degradację badanych związków w przewodzie pokarmowym reniferów (publikacja E34).

Badania etnofarmakologiczne

Moje zainteresowania badawcze skupiają się od wielu lat także na zagadnieniach etnofarmakologicznych. Impulsem do poszerzania tego kierunku był pobyt naukowo-badawczy w stacji etnofarmakologicznej w Belize i udział w warsztatach tam prowadzonych, dotyczących roślin medycyny indiańskiej.

- badania etnofarmakologiczne kontynuowałam podczas wyjazdu naukowo-badawczego nad jezioro Bajkał. Zebrane w trakcie wyjazdu owoce roślin jadalnych, głównie z rodziny *Rosaceae*, stosowanych w lecznictwie ludowym na Syberii, zostały przebadane pod kątem ich potencjału chemoprewencyjnego, we współpracy z dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM. Przeprowadzone przeze mnie badania aktywności cytotoksycznej ekstraktów tych owoców udowodniły zasadność ich stosowania w schorzeniach dróg moczowych i prostaty (publikacja E9).
- wspomniane powyżej badania były inspiracją do skupienia się na owocach rodzaju *Sorbus* i ich dalszych badaniach, we współpracy z dr Joanną Chłopicką z Zakładu Bromatologii UJ CM (publikacja E28). W ramach kontynuacji badań nad owocami rodzaju *Sorbus* został również wszczęty przewód doktorski mgr Agnieszki Sołtys w Katedrze Farmakognozji UJ CM, w którym jestem promotorem pomocniczym, powstało również przeglądowe opracowanie zawartości związków czynnych i aktywności biologicznej przedstawicieli tego rodzaju (publikacja P13) oraz publikacja opisująca akumulację triterpenów w powiązaniu z aktywnością cytotoksyczną ekstraktów z owoców *Sorbus intermedia* (E50).
- wskazania etnofarmakologiczne stosowania owoców z *Citrus hystrix* w schorzeniach skóry stały się podstawą do określenia wpływu olejku z owocni zewnętrznej tych owoców na komórki skóry w modelu *in vitro*. Badania te są przedstawione w formie dysertacji doktorskiej mgr Magdaleny Kulig, gdzie byłam promotorem pomocniczym, jak również są w trakcie przygotowania ich do publikacji

Analiza ilościowa związków polifenolowych

Moje zainteresowania badawcze są ukierunkowane także na określanie zawartości flawonoidów i fenolokwasów w ekstraktach roślinnych metodą HPLC. Szerokie i stale

poszerzane spektrum wykorzystywanych substancji wzorcowych pozwala na uzyskiwanie dokładnych profilów ilościowych badanych ekstraktów.

- od kilku lat jestem zaangażowana w wielośrodkowe (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie) badania nad wpływem biopreparatów na jakość surowców pozyskiwanych z gryki, prowadzone przez dr hab. Roberta Witkowicza prof. UR z Katedry Agroekologii i Produkcji Roślinnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Przeprowadzona przeze mnie analiza zawartości rutozydu umożliwiła wytypowanie optymalnej kombinacji biopreparatów stosowanych do nawożenia gryki, umożliwiającej uzyskanie najwyższej zawartości tego związku w badanych próbkach liści, nasion i kiełków gryki (publikacje E31, E40, E45).
- we współpracy z dr hab. Agnieszką Białek z Zakładu Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM określałam profil ilościowy flawonoidów i fenolokwasów w różnych rodzajach ekstraktów z *Momordica charantia*, podawanych szczurom w celu obniżenia poziomu lipidów (publikacje E35, E36).

żywność funkcjonalna

Moje zainteresowania badawcze obejmują także zagadnienia związane z żywnością funkcjonalną, w trwającej wiele lat współpracy z dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJ CM. Dzięki temu zostałam włączona w prace wielośrodkowego, międzynarodowego zespołu (m.in. uczelnie z Izraela, Tajlandii, Francji), poszukującego nowych kandydatów na żywność funkcjonalną o spodziewanym działaniu chemoprewencyjnym.

- Kiełki warzyw kapustnych
w badaniach nad fortyfikacją kiełków związkami selenu oraz wpływem różnych warunków hodowli na ich skład określałam i porównywałam ilościowy profil flawonoidów i fenolokwasów w wyhodowanym materiale roślinnym metodą HPLC. Dodatkowo przeprowadzałam badania aktywności cytotoksycznej uzyskanych ekstraktów z kiełków wobec szerokiego panelu linii komórek nowotworowych i prawidłowych (publikacje E23, E25, E27, E29, E39, E44)
- owoce tropikalne
Poszukiwania kandydatów na żywność funkcjonalną obejmowały także owoce kaktusów z rodzaju *Hylocereus*. Prowadziłam analizę ilościową flawonoidów i fenolokwasów owoców kilku odmian tych gatunków, pochodzących z różnych lokalizacji geograficznych. Dodatkowo określiłam aktywność cytotoksyczną

ekstraktów wodnych i metanolowych z badanych próbek, wobec nowotworowych i prawidłowych komórek skóry, prostaty i przewodu pokarmowego (publikacje E42, E43).

Suplementy diety

Na bazie trwającej od kilku lat dyskusji o jakości suplementów diety podjęłam tematykę weryfikacji składów suplementów zawierających składniki pochodzenia naturalnego.

- metodami analizy ilościowej określiłam faktyczną zawartość takich składników jak diosmina, hesperydyna, rutozyd, resweratrol, kurkumina, cynaryna czy kofeina w kilkudziesięciu popularnych suplementach diety, stosowanych w schorzeniach układu krążenia, schorzeniach wątroby oraz wspomagających odchudzanie (E22, E37). Wyniki tych badań wskazują na zaniżoną lub zawyżoną zawartość związków badanych, w odniesieniu do deklaracji producentów, w prawie połowie przebadanych produktów. Badania te były także podstawą do powstania kilku prac magisterskich, których byłam promotorem.
- we współpracy z dr Elżbietą Studzińską-Sroką z Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu weryfikowałam zawartość związków polifenolowych w mieszankach ziołowych i surowcach stosowanych w leczeniu ludowym w profilaktyce i wspomaganiu leczenia cukrzycy. Wyniki tych badań wskazały na zależność pomiędzy aktywnością α -amylazy a zawartością wybranych polifenoli w badanych próbkach. Publikacja opisująca wyniki tych badań jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Journal of Functional Foods*.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.

osiągnięcia dydaktyczne

prowadzenie zajęć:

- dla studentów III i V roku studiów kierunku Farmacja z przedmiotów *Farmakognozja* (ćwiczenia, seminaria) i *Leki pochodzenia naturalnego* (seminaria); zajęć fakultatywnych dla studentów IV roku kierunku Farmacja z przedmiotu *Rośliny tradycyjnych systemów medycznych świata* (wykłady); zajęć fakultatywnych dla studentów Szkoły Doktorskiej z przedmiotu *Naturoterapia* (wykłady)

- dla studentów IV roku programu 6-letniego Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM z fakultetu *Herbal Medicine* (wykłady w języku angielskim)
- na studiach podyplomowych *Osoba wykwalifikowana*, w ramach przedmiotu *Farmakognozja* (wykłady), prowadzonych przez Studium Kształcenia Podyplomowego UJ CM
- w ramach specjalizacji *Analityka farmaceutyczna dla farmaceutów*; w ramach modułu VI: *Farmakopealne metody badania surowców farmaceutycznych i postaci leków* (ćwiczenia), prowadzonych przez Studium Kształcenia Podyplomowego UJ CM
- w ramach specjalizacji *Farmacja apteczna dla farmaceutów*; w ramach modułu I: *Postępy nauk farmaceutycznych* (wykłady), prowadzonych przez Studium Kształcenia Podyplomowego UJ CM
- na studiach podyplomowych *Uprawa i wykorzystanie roślin zielarskich i alternatywnych* (wykłady) na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie
- współudział w koncepcji i koordynacji zmian w trybie prowadzenia zajęć oraz weryfikacji efektów kształcenia (przygotowanie pytań do egzaminu) z przedmiotu *Farmakognozja*
- współudział w opracowaniu sylabusów do przedmiotu *Farmakognozja* oraz przedmiotów fakultatywnych *Rośliny tradycyjnych systemów medycznych świata*
- współudział w przygotowaniu sylabusu do modułu *Psychodietetyka*, prowadzonego w Instytucie Psychologii Stosowanej UJ
- opracowanie trzech rozdziałów skryptu *Ćwiczenia z fitochemii*; wydania I – IV, 2007 - 2016, Kraków, Ośrodek UMEA Shinoda-Kuracejo, ISBN 8391581187

opieka dydaktyczna i naukowa nad studentami:

- promotor 25 prac magisterskich studentów na kierunku farmacja
- recenzent prac magisterskich (22); członek komisji prac dyplomowych (27)
- promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim Magdaleny Borusiewicz (Kulig): *Ocena aktywności przeciwnowotworowej składników olejku eterycznego z *Citrus hystrix* D.C.*; 26.06.2017 – 08.05.2019, przewód zakończony
- promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim Agnieszki Sołtys: *Triterpeny w owocach jarzębu szwedzkiego – analiza jakościowo-ilościowa oraz profil aktywności biologicznej w modelach *in vitro*.*; 28.09.2020 przewód otwarty
- opieka nad studentem (Isa Tas) z Bolu Abant Izzet Baysal University w Turcji, przebywającym w Katedrze Farmakognozji w ramach programu Socrates/Erasmus; tytuł projektu: *Phytochemical analysis of the selected lichen metabolites*; marzec – czerwiec 2013
- opieka nad studentką z Farmacéutica de la Universidad de Barcelona w Hiszpanii (Maria de la Pau Massanet Miralles) przebywającą w Katedrze

Farmakognozji w ramach programu Socrates/Erasmus; tytuł projektu: *Quantitative analysis and isolation of usnic acid from the selected lichen species*; październik 2019 – styczeń 2020

- opieka nad studentami zagranicznymi przebywającymi w Katedrze Farmakognozji w ramach Student Exchange Programme (SEP): Sladjana Novaković i Rialda Catović z Serbii (lipiec 2016), Marina Antoniak z Francji i Katarina Riede ze Słowenii (lipiec 2017), Sahra Perseh z Iranu i Samantosa Yosri z Egiptu (lipiec 2019)
- organizacja i koordynacja wizyty studentów amerykańskich z Mylan School of Pharmacy, Duquesne University, Pittsburgh, USA, maj 2004
- opieka nad Studenckim Kołem Naukowym przy Katedrze Farmakognozji 2005 – nadal; uzyskanie 4 grantów Studenckiego Towarzystwa Naukowego, finansujących działalność Koła przez studentów będących pod moją opieką (lata 2005 - 2009)
- organizacja i opieka nad studentami Wydziału Farmaceutycznego w trakcie wyjazdu do Laboratorium Medycyny Naturalnej Bonimed w Żywcu; kwiecień 2016

osiągnięcia organizacyjne

- współorganizator wyjazdu naukowo-badawczego do stacji etnofarmakologicznej w Belize; 2002
- udział w przygotowaniu wizyty dziekana Mylan School of Pharmacy, Duquesne University, Pittsburgh (USA), prof. dr D. Brickera na Wydziale Farmaceutycznym; listopad 2002
- skład komputerowy kolejnych wydań (I - IV) skryptu *Ćwiczenia z fitochemii*; 2007 – 2016, Kraków, Ośrodek UMEA Shinoda-Kuracejo, ISBN 8391581187
- członek Rady Wydziału Farmaceutycznego – przedstawiciel nauczycieli akademickich; 2008 – 2012 i 2016 – 2020
- pomysłodawca i organizator akcji oddawania krwi na Wydziale Farmaceutycznym; marzec 2009, październik 2009
- główny koordynator i organizator wyjazdu naukowo-badawczego do stacji doświadczalnej nad jeziorem Bajkał; 2009
- współudział w przygotowaniu wystawy fotograficznej w holu Wydziału Farmaceutycznego, dokumentującej wyjazd naukowo-badawczy nad jezioro Bajkał; 2009
- koordynator z ramienia Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM przygotowań prezentacji jednostek Wydziału w Festiwalu Nauki i Sztuki; od 2013 – nadal
- uzyskanie zgody Ministerstwa Klimatu i Środowiska na prowadzenie zakładu inżynierii genetycznej w obrębie Katedry Farmakognozji UJ CM i

zamkniętego użycia organizmów genetycznie modyfikowanych (GMM) klasy II; 2020

- kierownik zakładu inżynierii genetycznej w obrębie Katedry Farmakognozji UJ CM i osoba odpowiedzialna za bezpieczeństwo prowadzonych tam badań; 2020 – nadal
- przewodniczący Komisji ds. Bezpieczeństwa Biologicznego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM; 2021 – nadal
- udział w przygotowaniu i prezentacji stanowiska Katedry Farmakognozji w Małopolskiej Nocy Naukowców; 2016 – 2019
- zastępowanie w obowiązkach organizacyjnych i dydaktycznych Kierownika Katedry Farmakognozji UJ CM (przebywającego na zwolnieniu lekarskim); październik 2016 – listopad 2017
- przygotowanie nalewek i współorganizacja spotkań w ramach cyklu „Wokół nalewki leczniczej” pod patronatem Dziekana Farmaceutycznego w Muzeum Farmacji UJ CM; 2019 – 2020

osiągnięcia popularyzujące naukę

- wykład popularyzujący wiedzę o ziołolecznictwie wśród seniorów – spotkanie w ramach projektu „Quality First” sponsorowanego przez Fundację „Pamięć Odpowiedzialność Przyszłość”- EVZ w Centrum Społeczności Żydowskiej JCC; Kraków 2016
- artykuł dla portalu Medycyna Praktyczna *Pokarmowe źródła błonnika pokarmowego*; <https://www.mp.pl/pacjent/dieta/zasady/176007,pokarmowe-zrodla-blonnika>; 2017 (data dostępu 30.09.2021)
- wykład o substancjach pochodzenia naturalnego w regulacji apetytu, dla Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji, w ramach konferencji *Zaburzenia odżywiania wyzwaniem współczesnej farmakoterapii*; Kraków 2017
- wykład o preparatach roślinnych wspomagających odchudzanie, dla Studenckiego Koła Naukowego Psychologii Stosowanej Sekcji Psychodietetycznej, na Wydziale Zarządzania i Komunikacji Społecznej UJ; 2017
- wykład *Surowce pochodzenia naturalnego jako źródła błonnika* na zaproszenie Polskiego Towarzystwa Dietetyki; Warszawa 2017
- wykład *Walory lecznicze prezentowanych nalewek*, w ramach spotkań z cyklu „Wokół nalewki leczniczej” pod patronatem Dziekana Farmaceutycznego w Muzeum Farmacji UJ CM; 2019 – 2020

7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

Współpraca z innymi jednostkami naukowymi

- Katedra Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
- Zakład Biologii Komórki Wydziału Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
- Pracownia Badań Polarnych Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego
- Zakład Fitochemii Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
- Instytut Informatyki i Matematyki Komputerowej Wydziału Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Jagiellońskiego
- Instytut Psychologii Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego
- Katedra Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Współpraca z jednostkami w obrębie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

- Zakład Bromatologii
- Zakład Biochemii Farmaceutycznej
- Katedra Botaniki Farmaceutycznej
- Zakład Radioligandów
- Katedra Chemii Organicznej
- Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

kursy i szkolenia

podnoszące kompetencje dydaktyczne

- warsztaty dydaktyczne *Ars Docendi, Podstawy dydaktyki akademickiej*; 2015/16
- warsztaty dydaktyczne *Ars Docendi Jak dobrze zaprojektować kursy*; 2017
- warsztaty dydaktyczne *Ars Docendi Emisja głosu*; 2018

podnoszące kompetencje naukowe

- szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzenie; Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Kraków 2015
- szkolenie *Nowe testy na bazie reporterów do mierzenia endogennego poziomu ekspresji oraz testy komórkowe do monitorowania w czasie rzeczywistym*; Promega Poland, Kraków 2015
- warsztaty European Research Council (ERC) Workshop; Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków 2015

- warsztaty statystyczne; Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków 2016
- szkolenie *Przepisy prawa i informacje praktyczne dla wnioskodawców i użytkowników GMM i GMO*; Fundacja Ochrony Środowiska Naturalnego Jastrzęb, 2021

nagrody i wyróżnienia

- nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe; 2014
- nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za zasługi organizacyjne; 2016
- nagroda Prorektora ds. Collegium Medicum za *Zaangażowanie i rzetelność w wypełnianiu obowiązków służbowych, które przyczyniają się dla dobra Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum*; 2018, 2020
- nagroda zespołowa Rektora UJ za działalność naukową (III stopnia); 2020
- srebrny medal za długoletnią służbę na rzecz Uniwersytetu Jagiellońskiego; 2019

Agnieszka Galanty.....

(podpis wnioskodawcy)