

Załącznik 2

Autoreferat

Dr Anna Krasowska

Wrocław 2013

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych Artystycznych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	5
• Dane ogólne.....	5
a) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....	5
b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
4.1 Przeciwutleniająca aktywność związków syntetycznych o charakterze amfifilowym: z ugrupowaniem fenolowym oraz amin N-tlenkowych.....	6
4.1.1 Wstęp.....	6
4.2 Założone cele.....	9
4.3 Przygotowanie materiałów i metod.....	10
4.3.1 Przeciwutleniacze fenolowe.....	10
4.3.2 Przeciwutleniacze N-tlenkowe.....	11
4.3.3 Mutanty <i>Saccharomyces cerevisiae</i> z delecjami genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe.....	13
4.4 Wyniki.....	14
4.4.1 Wpływ badanych związków amfifilowych na wzrost <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – szczepu wyjściowego i mutantów drożdżowych z delecjami genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe.....	14
4.4.2 Ochrona komórek <i>S. cerevisiae</i> przez badane antyoksydanty przed działaniem hydrofilowych i amfifilowych utleniaczy.....	15
4.4.3 Dobudowywanie się testowanych związków do błon liposomowych.....	16
4.4.4 Aktywność przeciwutleniająca badanych związków mierzona <i>in vitro</i>	17
4.5 Podsumowanie osiągniętych wyników.....	18
4.6 Ewentualne zastosowanie.....	19
4.7 Wykaz literatury cytowanej w punkcie 4 autoreferatu.....	19

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych).....	23
5.1 Zwalczanie oporności na terapię u mikroorganizmów.....	23
5.1.1 Aktywność transporterów ABC u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23 i 25
5.1.2 Izolacja, charakterystyka właściwości przeciwgrzybiczych oraz oznaczenie struktury czynnika wydzielanego przez <i>Saccharomyces boulardii</i> ..	23 i 26
5.1.3 Izolacja, oznaczenie struktury i właściwości przeciwdrobnoustrojowe biosurfaktantu wydzielanego przez <i>Pseudomonas fluorescens</i> BD1.....	23 i 29
5.1.4 Surfaktanty lizosomotropowe oraz wybrane, komercyjne związki powierzchniowo czynne jako związki przeciwdrobnoustrojowe.....	24 i 30
5.2 Wpływ różnych czynników stresogennych na mikroorganizmy.....	32
5.3 Inne zrealizowane zadania badawcze.....	34
5.4 Udział w projektach badawczych.....	36
5.4.1. Projekty z funkcją kierownika projektu.....	36
5.4.2. Projekty z funkcją głównego wykonawcy i wykonawcy projektu.....	37
5.4.3. Projekty współfinansowane przez Unię Europejską.....	37
5.5. Udział w konferencjach.....	37

1. Imię i Nazwisko

Anna Krasowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- a. Dyplom Uniwersytetu Wrocławskiego nr 3060/3028 z roku 1999. Studia doktoranckie 1995-1998 na Wydziale Nauk Przyrodniczych. Tytuł doktora nauk biologicznych w dziedzinie biologii – Wrocław, 21.05.1998. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ wybranych aminoestrów na fizjologię drożdży piekarniczych Saccharomyces cerevisiae*”
- b. Dyplom Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z roku 2010. Trzysemestralne studia podyplomowe 2009-2010, „Żywnienie człowieka w profilaktyce zdrowotnej”. Tytuł pracy dyplomowej: „*Wpływ kwasów tłuszczowych na rozwój grzybów pleśniowych*”.
- c. Dyplom Uniwersytetu Wrocławskiego nr 8867 z roku 1993. Studia magisterskie 1988-1993, na kierunku biologia w zakresie mikrobiologii. Tytuł magistra biologii - Wrocław, 28.06.1993. Tytuł pracy magisterskiej: „*Klonowanie genu Cyklu Krebsa*”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

Aktualnie: adiunkt w Zakładzie Biotransformacji, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego – miejsce pracy podstawowej.

2009-2011 adiunkt w Zakładzie Chemii i Technologii Paliw, Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej – miejsce pracy dodatkowej.

2003-2006 adiunkt w Samodzielnej Pracowni Biotransformacji Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

1998-2003 adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

1993-1995 asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Instytutu Mikrobiologii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z np. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

- **Dane ogólne:** Współautorka 39 publikacji w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych (w tym 36 po doktoracie), 8 rozdziałów w języku angielskim w monografiach, 10 publikacji w polskich czasopismach. Współautorka patentu i dwóch zgłoszeń patentowych.

Licząc z lat ukazania się publikacji, łączny imact factor wynosi: **43,4**

Licząc z bazy danych z 2011 roku, łączny impact factor wynosi **52,8**

Współczynnik Hirscha: 8

Liczba cytowań (z uwzględnieniem nazwiska panińskiego): z bazy danych Web of Sciences – **184**

Liczba cytowań publikacji ogółem (WOS, Google Scholar): **235**

Ilość punktów ministerialnych: 728

a. (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Krasowska A., Sigler K.,** *Comparison of cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic amine N-oxides and phenolic antioxidants*, (2007), Folia Microbiol. **52**, 585-592

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji pracy; przygotowaniu tabel, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

2. **Krasowska A., Piasecki A., Murzyn A., Sigler K.,** *Assaying the antioxidant and radical scavenging properties of aliphatic mono- and di-N-oxides in SOD-deficient yeast and in a chemiluminescence test*, (2007), Folia Microbiol. **52**, 45-52

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu przeciwutleniającej aktywności alifatycznych mono- i di- N-tlenków na mutantach delecyjnych *Sachcaromyces cerevisiae* z usuniętymi dysmutazami nadadtlenkowymi, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

3. **Krasowska A., Piasecki A., Polinceusz A., Prescha A., Sigler K.,** *Amphiphilic amine-N-oxides with aliphatic alkyl chain act as efficient SOD mimics, antioxidants and lipid peroxidation blockers in yeast*, (2006), Folia Microbiol. **51**, 99-108

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu aminowych N-tlenków jako przeciwutleniaczy na mutantach delecyjnych *Sachcaromyces cerevisiae* z usuniętymi dysmutazami nadadtlenkowymi, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

4. **Krasowska A.**, Dziadkowiec D., Łukaszewicz M., Wojtowicz K., Sigler K., *Effect of antioxidants on Saccharomyces cerevisiae mutants deficient in superoxide dismutases*, (2003), Folia Microbiol. **48**, 754-760

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu aktywności wybranych przeciwutleniaczy syntetycznych i naturalnego pochodzenia na mutantach delecyjnych *Sachcaromyces cerevisiae* z usuniętymi dysmutazami ponadtlenkowymi, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

5. **Krasowska A.**, Chmielewska L., Gapa D., Prescha A., Vachova L., Sigler K., , *Viability and formation of coniugated dienes in plasma membrane lipids of S. cerevisiae, S. pombe, R. gutinis and C. albicans exposed to hydrophilic, amphiphilic and hydrophobic pro-oxidants*, (2002), Folia Microbiol. **47**, 145-151

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu hydrofilowych, amfifilowych oraz hydrofobowych przeciwutleniaczy na izolowanych z błon lipidach szczepów *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *R. gutinis* and *C. albicans*, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

6. **Krasowska A.**, Stasiuk M., Oświęcimska M., Kozubek A., Bień M., Witek S., Sigler K., , *Suppression of radical-induced lipid peroxidation in a model system by alkyl esters of cinnamate quaternary ammonium salts*, (2001), Z. Naturforsch. C **56c**, 878-885

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomysł i koncepcja badań i pracy; udział w testowaniu aktywności przeciwutleniaczy z ugrupowaniem fenolowym na oliwie z oliwek w obecności utleniaczy AAPH, ACHN, TBHP i Fe^{2+} , napisanie pracy, udział w dyskusji.

7. **Krasowska A.**, Rosiak D., Szkapiak K., Oświęcimska M., Witek S., Łukaszewicz M., *Antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA, PPA measured by chemiluminescence method*, (2001), Cell. Mol. Biol. Lett. **6**, 71-81

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu przeciwutleniaczy PYA i PPA z ugrupowaniem fenolowym w teście chemiluminescencyjnym, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

8. **Krasowska A.**, Oswiecimska M., Pasternak A., Chmielewska L., Witek S., Sigler K., *New phenolic antioxidants of PYA and PYE class increase the resistance S. cerevisiae strain SP4, its SOD- and catalase-deficient mutants to lipophilic oxidants*, (1999), Folia Microbiol. **44**, 657-662

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: pomyśle i koncepcji badań i pracy; udziale w testowaniu przeciwutleniaczy PYA i PPA z ugrupowaniem fenolowym na *Sachcaromyces cerevisiae* nie posiadających dysmutaz ponadtlenkowych, napisaniu pracy, udziale w dyskusji.

Wkład współautora publikacji – **dr Anny Krasowskiej** (procentowy i w postaci określenia słownego) podany jest w jego oświadczeniu w Załączniku 6: „Wykaz prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.1 Przeciwutleniająca aktywność związków syntetycznych o charakterze amfifilowym: z ugrupowaniem fenolowym oraz amin *N*-tlenkowych

4.1.1 Wstęp

Wolne rodniki, mimo iż mogą pełnić pozytywną rolę, na przykład w przekazywaniu sygnałów w komórkach, poprzez swoją dużą reaktywność mogą powodować uszkodzenia struktur komórkowych. Często prowadzi to do poważnych chorób, takich jak cukrzyca czy nowotwory [Rains i Jain 2011; Stanton 2011; Singh i Gupta 2011]. Jednym z niebezpiecznych procesów jest peroksydacja lipidów, powodująca destabilizację czy destrukcję błon, a także utlenianie tłuszczów spożywczych lub kosmetycznych, co jest przyczyną dużych strat gospodarczych.

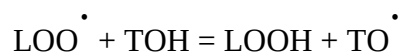
W komórkach funkcjonuje szereg naturalnych antyoksydantów, lecz w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego ich aktywność wydaje się niewystarczająca [Halliwell i Gutteridge 2007]. Dlatego ważne jest poszukiwanie nowych związków chemicznych o właściwościach antyoksydacyjnych, pochodzenia zarówno naturalnego jak i syntetycznego. Badając właściwości antyoksydantów, należy zwrócić uwagę na ich niską toksyczność, wysoką aktywność, często ważna jest również możliwość wbudowywania się w układy lipidowe, czyli właściwości hydrofobowe, a amfifilowość wydaje się być rozwiązaniem uniwersalnym, umożliwiającym aktywność przeciwutleniającą zarówno w środowisku lipidowym, jak i wodnym. Mimo niezaprzeczalnych zalet antyoksydantów niskocząsteczkowych, pochodzenia naturalnego, takich jak np. tokoferol czy β -karoten, synteza chemiczna związków daje duże możliwości manipulacji strukturą chemiczną, co pozwala na uzyskanie antyoksydantów o pożądanych właściwościach.

Wytwarzany podczas przepływu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym anionorodnik ponadtlenkowy, reagując z nadtlakiem wodoru, doprowadza do wytworzenia rodnika hydroksylowego w reakcji Haber-Weiss, katalizowanej przez jony metali, np. jony żelaza [Halliwell i Gutteridge 2007]. Rodnik hydroksylowy dzięki swojej dużej reaktywności może reagować z wieloma cząsteczkami czy strukturami komórkowymi, powodując ich utlenienie. Jednym z takich procesów jest peroksydacja lipidów w błonach komórkowych, przebiegająca w sposób lawinowy i w przypadku braku odpowiednich antyoksydantów, prowadząca do zniszczenia błon i śmierci komórki. Anionorodnik

ponadtlenkowy zaliczany jest do tzw. rodników pierwszego rzędu, czyli produktów metabolizmu energetycznego komórki, a rodniki peroksyłowe, jako rodniki drugiego rzędu, wytwarzane są w reakcjach wolnych rodników pierwszego rzędu z lipidami.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są modelowym przykładem komórki eukariotycznej, wykorzystywanym w wielu badaniach naukowych. Całkowite zsekwencjonowanie genomu *S. cerevisiae* pozwoliło na przykład na konstruowanie potrzebnych w badaniach mutantów delecyjnych. Delecje w genach kodujących enzymy antyoksydacyjne, np. dysmutazy ponadtlenkowe, pozwalają na stworzenie „systemu” złożonego z mutantów drożdżowych do testowania antyoksydantów i obserwowania zmian na przykład w poziomie przeżywalności pod wpływem stresu oksydacyjnego lub możliwości zastępowania enzymatycznych antyoksydantów przez naturalne lub syntetyczne, ale niskocząsteczkowe przeciwutleniacze.

Do jednej z najbardziej licznych grup antyoksydantów niskocząsteczkowych, pochodzenia naturalnego zaliczane są wytwarzane przez rośliny flawonoidy. Dzięki obecności między innymi grup fenolowych w cząsteczce, związki te wykazują właściwości przeciwutleniające. Innym przykładem fenolowego przeciwutleniacza jest witamina E, czyli tokoferol. Witamina ta przerywa reakcję utleniania lipidów, przyłączając atom wodoru do rodników peroksyłowych w reakcji:



Powstające w reakcji rodniki $\text{TO}^\bullet$ są zbyt słabe, żeby inicjować nowe reakcje peroksydacji a dodatkową zaletą jest to, że tokoferol ulega reaktywacji w reakcji z witaminą C [Packer i wsp. 1979, Hiramoto i wsp. 2002]. Tokoferol ma charakter hydrofobowy i nie reaguje, np. z anionorodnikiem ponadtlenkowym, który jest hydrofilowy.

Większą gamę wolnych rodników neutralizują nitroksydy – związki syntetyczne z grupą $\text{N}\Rightarrow\text{O}$. Jako przeciwutleniaczami zainteresowano się tą grupą związków na podstawie obserwacji właściwości tlenku azotu, który jest naturalnym przeciwutleniaczem. Nitroksydy wygaszają rodniki lipidowe: alkilowe, peroksyłowe i alkoksyłowe, ale także anionorodnik ponadtlenkowy [Stipa i wsp. 1997, Damiani i wsp. 1999, 2001].

Inną grupą związków, zawierających grupę $\text{N}\Rightarrow\text{O}$ są *N*-tlenki. Ich potencjalne właściwości przeciwutleniające do czasu rozpoczęcia przez nas badań nie były opisane.

Podjęto badania nad aktywnością przeciwutleniającą dwóch grup syntetycznych związków, zawierających w swoich strukturach różnej długości łańcuchy wodorowęglowe, co miało zapewnić możliwość dobudowywania się do błon na różnych głębokościach, a co za tym idzie, ochronę błon przed utlenieniem zarówno przed amfifilowymi utleniaczami, jak i tymi, działającymi z zewnątrz komórki, a także przed uszkodzeniami błon spowodowanymi nagromadzeniem się anionorodnika ponadtlenkowego, na skutek usunięcia pojedynczych lub obydwu dysmutaz ponadtlenkowych w komórce drożdżowej.

Częścią aktywną przeciwutleniająco w pierwszej grupie związków był podstawnik wodorotlenowy, umieszczony na pierścieniu aromatycznym, były to zatem związki fenolowe, których część hydrofilowa została zaprojektowana na podstawie struktury przeciwutleniacza stosowanego komercyjnie – (BHT). Po dołączeniu części hydrofobowych, czyli różnej długości łańcuchów węglowodorowych, otrzymano nieopisane dotąd struktury amfifilowych przeciwutleniaczy fenolowych [Rys. 1]. W drugiej grupie badanych związków częścią działającą przeciw wolnym rodnikom była jedna bądź dwie grupy *N*-tlenkowe ($N\Rightarrow O$). Również i w tym przypadku, uzyskano oryginalne struktury chemicznych połączeń z łańcuchami alkilowymi [Rys. 2].

Metody, które wybrano do przetestowania aktywności przeciwutleniającej związków, dobrane zostały w taki sposób, żeby móc porównać działanie związków zarówno w żywych układach – mutantach delecyjnych *S. cerevisiae* bez dysmutaz ponadtlenkowych i w szczepie wyjściowym dla mutantów, z pełnym zestawem przeciwutleniaczy enzymatycznych, jak i w układach *in vitro* – stosując metody spektrofotometrycznego pomiaru produktów utleniania izolowanych z błon drożdży lipidów oraz chemiluminescencyjnego pomiaru wygaszania rodników peroksydowych, pochodzących z utleniacza chemicznego.

Obecnie dostępne metody stosowane w pomiarach aktywności przeciwutleniającej lub pomiaru ilości reaktywnych form tlenu w żywych komórkach często nie odzwierciedlają prawdziwego stanu i procesów [Bartosz 2006]. Ponadto dość trudno jest porównywać procesy zachodzące w komórkach z tymi, przebiegającymi podczas reakcji chemicznych w probówkach, gdyż często są one nieadekwatne do siebie. Badając aktywność naturalnych przeciwutleniaczy, stwierdzono, że przy odpowiednio wysokim stężeniu β -karoten powoduje utlenienie lipidów [Łukaszewicz i wsp. 2004]. Prooksydacyjne działanie zauważono również w przypadku nitroksydu Tempo, uważanego za przeciwutleniacz [Balcerzyk i wsp. 2004]. Z tych powyższych powodów wydaje się ważne określenie aktywnego, lecz niewywołującego utlenienia, stężenia przeciwutleniacza, zarówno w układach z żywymi komórkami, jak i z np.

lipidami. Takie badania pozwalają na odpowiednie zastosowanie aplikacyjne przeciwutleniaczy np. w przemyśle spożywczym, czy kosmetycznym.

4.2 Założone cele:

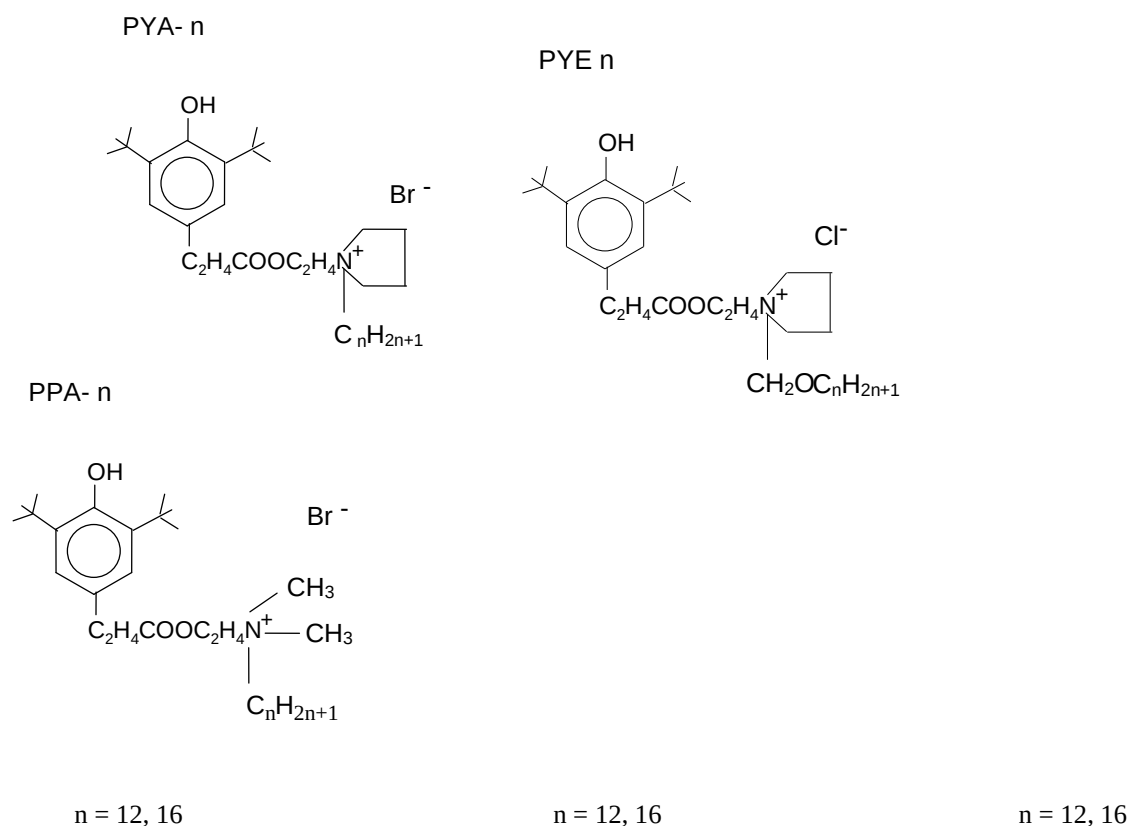
1. Synteza związków przeciwutleniających typu N-tlenków i fenolowych
[Krasowska A., i wsp., 1999, Folia Microbiol., Krasowska A. i wsp., 2006, Folia Microbiol. 51]
2. Konstrukcja mutantów delecyjnych *Saccharomyces cerevisiae* z delecjami w genach kodujących dysmutazy ponadtlenkowe i katalazę
[Krasowska A. i wsp., 2003, Folia Microbiol. 48]
3. Przebadanie wpływu zsyntetyzowanych przeciwutleniaczy na przeżywalność mutantów *S. cerevisiae*
[Krasowska A. i wsp., 1999, Folia Microbiol. 44; Krasowska A. i wsp., 2003, Folia Microbiol. 48; Krasowska A. i wsp., 2006, Folia Microbiol. 51; Krasowska A. i wsp., 2007, Folia Microbiol. 52; Krasowska A. i Sigler K., 2007, Folia Microbiol. 52]
4. Określenie stopnia ochrony komórek *S. cerevisiae* przez badane przeciwutleniacze przed działaniem hydrofilowych i amfifilowych utleniaczy
[Krasowska A. i wsp., 1999, Folia Microbiol. 44; Krasowska A. i wsp., 2003, Folia Microbiol. 48; Krasowska A. i wsp., 2006, Folia Microbiol. 51; Krasowska A. i wsp., 2007, Folia Microbiol. 52; Krasowska A. and Sigler K., 2007, Folia Microbiol. 52]
5. Oznaczenie stopnia dobudowywania się testowanych związków do błon liposomowych
[Krasowska A. i wsp., 2001, Z. Naturforsch. C 56c, Krasowska A. i Sigler K., 2007, Folia Microbiol. 52]
6. Zbadanie aktywności przeciwutleniającej badanych związków mierzona w testach prowadzonych na lipidach wyizolowanych z plazmalemy drożdży i metodą chemiluminescencyjną na rodnikach peroksydowych
[Krasowska A. i wsp., 2001, Cell. Mol. Biol. Lett. 6; Krasowska A. i wsp., 2001, Z. Naturforsch. C 56c; Krasowska A. i wsp., 2002, Folia Microbiol. 47; Krasowska A. i wsp., 2007, Folia Microbiol. 52; Krasowska A. i Sigler K., 2007, Folia Microbiol. 52]

4.3 Przygotowanie materiałów i metod

4.3.1 Przeciwutleniacze fenolowe

Fenolowe antyoksydanty, oznaczone symbolami PYA-n, PYE-n oraz PPA-n (gdzie n oznacza liczbę atomów węgla w łańcuchu alkilowym) zostały zsyntetyzowane poprzez

czwartorzędowanie pirolidynoetylowych estrów kwasu 3-(3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksyfenylo)propionowego 1-bromoalkanami (PYA-n), lub eterami alkilochlorometylowymi (PYE-n). Związki oznaczone jako PPA-n zsyntetyzowano przez czwartorzędowanie estrów 2-(dimetyloamino)etylowych kwasu 3-(3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksyfenylo)propionowego 1-bromoalkanami [Rys. 1].



Rys. 1. Struktury fenolowych przeciwutleniaczy PYA-n, PYE-n oraz PPA-n

Do syntezy powyższych struktur przeciwutleniaczy zostały użyte łatwo dostępne i tanie półprodukty, co ma znaczenie w razie zastosowania aplikacyjnego i ich wytwarzania na skalę przemysłową.

Badania toksykologiczne wobec szczurów i królików, wykazały niską toksyczność wybranego przeciwutleniacza (PPA, 16): LD₅₀ dla związku podawanego doustnie szczurom wynosiło 1722 mg/kg ciała, a aplikowane podskórnie około 2000 mg/kg [Raport Toksykologiczny 2000].

4.3.2 Przeciwutleniacze N-tlenkowe

Druga grupa przeciwutleniaczy, obejmowała *N*-tlenki amin trzeciorzędowych z grupy mono- i diamidoamin, zawierających jeden łańcuch węglowodorowy oraz jedną lub dwie polarne grupy *N*-tlenkowe. Ogólne struktury chemiczne *N*-tlenków przedstawione zostały na Rys. 2. Związki oznaczono symbolami EDA-*n*(O), PDA-*n*(O) dla mono-*N*-tlenków oraz MEDA-*n*(O) i MPDA-*n*(O) dla di-*N*-tlenków.

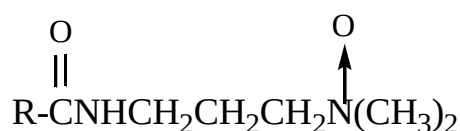
N-tlenki otrzymano w wyniku reakcji utleniania odpowiednich mono- i diamidoamin. Do wytwarzania w skali laboratoryjnej indywidualnych związków typu mono- i diamidoamin zastosowano ogólnie dostępne pochodne kwasów tłuszczowych (zwłaszcza chlorki kwasowe), 1-chlorowcoalkany, diester etylowy kwasu malonowego i diaminy: *N,N*-dimetyloetylenodiaminę oraz *N,N*-dimetylo-1,3-propanodiaminę.

N-tlenki amidoamin z jednym łańcuchem węglowodorowym i jednym ugrupowaniem *N*-tlenkowym (EDA-*n*(O) oraz PDA-*n*(O)), otrzymywano w reakcji chlorku kwasowego z diaminą $H_2N(CH_2)_nN(CH_3)_2$ ($n=2$ lub 3), a powstałe amidoaminy utleniano do odpowiednich *N*-tlenków powszechnie stosowanym czynnikiem utleniającym – wodnym roztworem nadtlenu wodoru.

Synteza diamidoamin, zawierających dwa ugrupowania *N*-tlenkowe polegała na reakcji odpowiednich 1-bromoalkanów z diestrem etylowym kwasu malonowego do diestrów etylowych kwasu 2-alkylomalonowego, a następnie reakcji diestrów odpowiednią diaminą. Produkty były następnie utleniane nadtlakiem wodoru do odpowiednich di-*N*-tlenków oznaczonych symbolami MEDA-*n*(O) oraz MPDA-*n*(O).

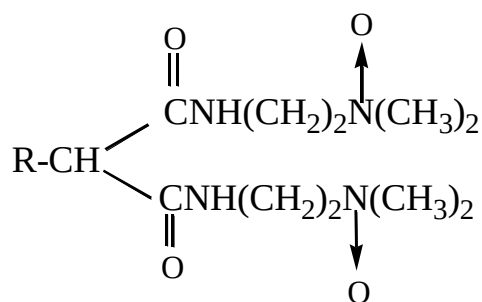


EDA-*n* (O)

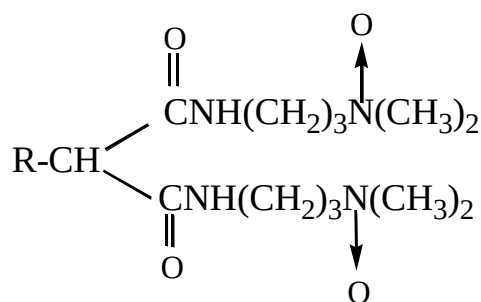


PDA-*n* (O)

$$\text{R} = \text{C}_m\text{H}_{2m+1}, m = 11, 13, n = m + 1$$



MEDA-*n* (O)



MPDA-*n* (O)

$$R = C_nH_{2n+1}, n = 12, 14$$

Rys. 2. Struktury chemiczne *N*-tlenkowych przeciwutleniaczy, monoamidoamin EDA-*n*(O), PDA-*n*(O) oraz diamidoamin MEDA-*n*(O) i MPDA-*n*(O).

N-tlenki amin są powszechnie znane jako niskotoksyczne związki, które posiadają właściwości bakteriobójcze i dlatego znajdują zastosowanie w przemyśle kosmetycznym [Beilfuss i wsp. US Patent 2011]. Związki wybrane do niniejszych badań okazały się mało toksyczne dla *S. cerevisiae*, a wybrany di-*N*-tlenek MEDA-*n*(O) okazał się nisko- lub umiarkowanie toksyczny dla szczurów i królików. LD50 dla związku podawanego doustnie szczurom było na poziomie 1000 mg./kg masy ciała. Natomiast, kiedy związek podawano podskórnym, LD50 wynosiło 2000 mg./kg. Ponadto związek średnio drażnił lub nie drażnił skóry królików [Raport Toksykologiczny 2006].

4.3.3 Mutanty *Saccharomyces cerevisiae* z delecjami genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe

Mutanty delecyjne genów kodujących białka Sod1 i Sod2 charakteryzują różne fenotypy, co sugeruje nieco odmienne funkcje obu tych enzymów w komórkach drożdży. Charakterystyczne fenotypy dla mutantów $\Delta sod1$, wskazują na istotną rolę Sod1 w obronie komórek przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) [Kosman i wsp. 1992]. Mutanty $\Delta sod1$ są wrażliwe już na atmosferyczne stężenie tlenu (20% O₂), podczas gdy $\Delta sod2$ nie wykazują takiej cechy. Zarówno szczep $\Delta sod1$ jak i $\Delta sod2$ oraz szczep pozbawiony obu genów nie wykazują wzrostu podczas hodowli w warunkach hiperoksji (100% O₂) [Culotta i wsp. 2002]. Szczepy z delecjami genów SOD charakteryzują się również wrażliwością na parakwat oraz oksytetracyklinę, co potwierdza udział tych związków w tworzeniu wolnych rodników [Culotta i wsp. 2002]. Parakwat to herbicyd redukowany w komórkach przez enzymy zależne od NADH. Produkt tej reakcji – kationorodnik parakwatu (PQ⁺) reaguje z cząsteczkami tlenu, powodując wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego [Kosman i wsp. 1992]. Parakwat powoduje także uwalnianie żelaza z białek. Z kolei uwolnione jony żelaza katalizują wytwarzanie H₂O₂ i OH[•] W reakcjach Haber – Weiss i Fentona [Slekar i wsp. 1996]. Szczep pozbawiony dysmutazy jest bardziej odporny na działanie parakwatu podczas wzrostu na podłożu zawierającym 2% glukozę, natomiast cechuje się wysoką wrażliwością na ten związek w czasie wzrostu na podłożu zawierającym niefermentowalne źródło węgla, jakim jest: etanol czy glicerol [Culotta i wsp. 2002]. Delecja genu *SOD1* w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* prowadzi do zahamowania biosyntezy

lizyny i metioniny w warunkach tlenowych [Kosman i wsp. 1992]. Mutanty *Asod2* nie wykazują tego fenotypu.

Mutanty bez obydwu dysmutaz wykazują również znaczny spadek przeżywalności w fazie stacjonarnej cyklu komórkowego, zwłaszcza na podłożach minimalnych. Są bardzo wrażliwe na stres związany z zamrażaniem i odmrażaniem [Barker i wsp. 1999]. Z tego powodu praca z tymi szczepami jest bardzo trudna.

Mutanty delecyjne *S. cerevisiae* z delecjami genów kodujących dysmutazy ponadtlencowe, oznaczone jako szczepy JS-C50 (delecja genu *SOD1*), JS-C55 (delecja *SOD2*) oraz JS-C128 (delecja *SOD1* i *SOD2*) zostały otrzymane przez delecje genów kodujących dysmutazy przy zastosowaniu metody short flanking homology [Wach i wsp. 1998] przez zastąpienie tych genów markerem 14pe-kanMX-loxP [Guldener i wsp. 1996], a następnie usunięciu markera. Użyto starterów *SOD1KAN* oraz *SOD2KAN* [Krasowska i wsp. 2003]. Szczepem wyjściowym był *S. cerevisiae* US50-18c [Balzi i wsp. 1987].

4.4 Wyniki

4.4.1 Wpływ badanych związków amfifilowych na wzrost drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* oraz mutantów drożdżowych z delecjami genów kodujących dysmutazy ponadtlencowe

Jedną z ważniejszych właściwości związków, które mogłyby mieć zastosowanie w produktach, z którymi ludzie mają bezpośredni kontakt, jest ich nietoksyczność. Fenolowe, syntetyczne antyoksydanty takie jak butylhydroksylu (BHT) czy butylhydroksyanizol (BHA), stosowane do ochrony środków spożywczych, w pewnych warunkach okazały się rakotwórcze lub toksyczne [Clayson i wsp. 1990]. Z drugiej strony, naturalnego pochodzenia flawonoidy, reagując z enzymami metabolizującymi leki, wywoływały apoptozę [Galati i O'Brien 2004]. *N*-tlenki znane są powszechnie ze swojej niskiej toksyczności, stąd ich zastosowanie jako komponentów kosmetyków, np. szamponów lub jako detergentów, a doniesienia literaturowe mówią o zastosowaniu *N*-tlenków jako leków bio redukujących [McKeown i wsp. 2007].

Pierwsze badania nad toksycznością związków, skupiły się na określaniu stopnia przeżywalności jednokomórkowego organizmu eukariotycznego *Saccharomyces cerevisiae* w ich obecności. Dwa szczepy *S. cerevisiae* z pełnym zestawem enzymatycznych przeciwutleniaczy: SP4 (MAT α , leu, arg) [Biliński i wsp. 1979] oraz US 50-18c (MAT α , PDR1-3, ura3, his1) [Balzi i wsp. 1987] nie różniły się między sobą wrażliwością na badane

związki, co wskazywało, że mutacja w genie kodującym czynnik transkrypcyjny PDR1 w szczepie *S. cerevisiae* US50-18c nie powoduje istotnych różnic w przeżywalności w obecności fenolowych lub *N*-tlenkowych przeciwutleniaczy. Dostrzeżono natomiast różnice w poziomie toksyczności między dwiema grupami przeciwutleniaczy. *N*-tlenki były w trzykrotnie wyższym stężeniu mniej toksyczne niż związki fenolowe. Związki o łańcuchach węglowodorowych krótszych, były mniej toksyczne niż te o łańcuchach dłuższych, a grupa oznaczona symbolem MPDA była nietoksyczna, a nawet lekko stymulowała wzrost drożdży [Krasowska i Sigler 2007].

Drożdżowe mutanty delecyjne w genach kodujących dysmutazy ponadtlenkowe, były niewrażliwe lub mało wrażliwe na toksyczne działanie stężenia 30 $\mu\text{mol/L}$ przeciwutleniaczy *N*-tlenkowych z jedną grupą $\text{N}\Rightarrow\text{O}$ (oznaczonych symbolami PDA i EDA), jak i z dwiema grupami $\text{N}\Rightarrow\text{O}$ (MEDA i MPDA), jedynie szczep JS-C128 wykazywał wrażliwość na związek MPDA-14 (jego przeżywalność wynosiła 33%) [Krasowska i wsp. 2006, 2007]. W przypadku fenolowych przeciwutleniaczy, związki PYA i PPA okazały się mniej toksyczne niż PYE, lecz, jak w przypadku szczepów z obecnymi dysmutazami ponadtlenkowymi, były bardziej toksyczne niż *N*-tlenki w stężeniu 3 razy niższym [Krasowska i wsp. 1999, 2006, Krasowska i Sigler 2007].

4.4.2 Ochrona komórek *S. cerevisiae* przez badane przeciwutleniacze przed działaniem hydrofilowych i amfifilowych utleniaczy

W celu sprawdzenia czy amfifilowy charakter testowanych przeciwutleniaczy umożliwi im działanie ochronne przed utleniaczami chemicznymi o różnej hydrofobowości, zastosowano utlenianie komórek drożdży amfifilowym wodoronadtlenkiem *tert*-butylowym (TBHP) oraz hydrofilowym parakwatem. TBHP powodował silny toksyczny efekt w stężeniach powyżej 10 $\mu\text{mol/L}$, a mutanty delecyjne były bardziej wrażliwe na ten chemiczny utleniacz niż szczepy posiadające dysmutazy ponadtlenkowe [Krasowska i wsp. 1999, Krasowska i Sigler 2007]. Obserwowano również zróżnicowanie we wrażliwości, w zależności od rodzaju usuniętej dysmutazy. Najbardziej wrażliwy okazał się szczep bez obydwu dysmutaz (JS-C128), a szczep bez cytoplazmatycznej dysmutazy był bardziej wrażliwy niż ten bez mitochondrialnej dysmutazy [Krasowska i wsp. 2006, Krasowska i Sigler 2007]. Podobne zależności obserwowano po potraktowaniu komórek parakwatem, ale ten utleniacz był mniej toksyczny niż TBHP [Krasowska i wsp. 2006, Krasowska i Sigler 2007]. Można wnioskować, że stosowane z zewnątrz chemiczne utleniacze wzmagają przede

wszystkim procesy wolnorodnikowe, przebiegające w cytoplazmie, kiedy nie ma w niej dysmutazy ponadtlenkowej. Wzmożenie stresu oksydacyjnego przez utlenienie lipidów w plazmalemie również wpływa przede wszystkim na poziom utleniania w cytoplazmie. Wydaje się, że na drugim miejscu, jeśli chodzi o szkody wywołane utlenianiem, znajduje się nagromadzenie anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach, gdy brak tam dysmutazy mitochondrialnej.

Pomimo, że fenolowe przeciwutleniacze były bardziej toksyczne dla komórek drożdży niż *N*-tlenki, to jednak chroniły komórki drożdży przed stresem oksydacyjnym, wywołanym przez chemiczne utleniacze lepiej, nawet w trzykrotnie niższym stężeniu [Krasowska i Sigler 2007]. Wyjątkiem był mutant bez dysmutazy mitochondrialnej, poddany działaniu parakwatu, gdzie *N*-tlenki wykazywały większy efekt ochronny.

4.4.3 Dobudowywanie się testowanych związków do błon liposomowych

Sprawdzono zdolność do dobudowywania się testowanych przeciwutleniaczy do błon liposomów, zbudowanych między innymi z lipidów wyizolowanych z plazmalemy drożdży – szczepu wyjściowego jak i z mutantów delecyjnych. Zarówno związki fenolowe, jak i *N*-tlenkowe dobudowywały się do liposomów [Krasowska i wsp. 2001b, 2006]. W prawie wszystkich przypadkach, związki z dłuższymi łańcuchami alkilowymi dobudowywały się głębiej, niż te z krótszymi łańcuchami, co było zgodne z założeniami. Nie zauważono dobudowywania się do liposomów grupy związków PYA [Krasowska i wsp. 2001]. Di-*N*-tlenki dobudowywały się do liposomów gorzej niż mono-*N*-tlenki, prawdopodobnie z powodu swojej bardziej rozbudowanej struktury chemicznej [Rys. 2]. Zauważono różnice w dobudowywaniu się związków do liposomów z lipidami z różnych szczepów. Najszybciej związki dobudowywały się do liposomów zbudowanych z lipidów ze szczepu bez obydwu dysmutaz. Analiza kwasów tłuszczowych obecnych w plazmalemie mutantów delecyjnych wykazała obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zarówno w drożdżach z dysmutazami ponadtlenkowymi [Krasowska i wsp. 2002], jak i w mutantach delecyjnych i była ona najwyższa w plazmalemie drożdży bez obydwu dysmutaz [Krasowska i wsp. 2006]. Obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w plazmalemie drożdży spowodowana jest prawdopodobnie pochłanianiem ich z podłoża pełnego (YEPD), na którym były hodowane szczepy. Powyższa obserwacja jest nowością w badaniach nad składem kwasów tłuszczowych u *S. cerevisiae*, a zależność od delecji w dysmutazach nie była opisana do czasów opublikowania jej przez autorów [Krasowska i wsp. 2006]. Obecność

wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach zwiększa ich płynność, stąd być może łatwiejsze dobudowywanie się do takich błon związków amfifilowych.

4.4.4 Aktywność przeciwutleniająca badanych związków mierzona *in vitro*

Równocześnie z badaniami nad przeżywalnością komórek drożdżowych w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego i niwelowaniem tego stresu przez syntetyczne przeciwutleniacze, prowadzono badania nad utlenianiem lipidów wyizolowanych z plazmalem drożdży. W celu sprawdzenia, czy lipidy wyizolowane z drożdży podlegają peroksydacji po utlenieniu różnymi chemicznymi prooksydantami i induktorami utlenienia, dokonywano spektrofotometrycznych pomiarów pierwszych produktów peroksydacji lipidów, czyli skoniugowanych dienów, jak i ostatecznych produktów – TBRŚów (produktów rozpadu kwasów tłuszczowych reagujących z kwasem tiobarbiturowym) [Krasowska i wsp. 2000, 2002]. Okazało się, że pomimo braku u *S. cerevisiae* desaturaz wprowadzających w łańcuchach alkilowych kwasów tłuszczowych drugie i trzecie wiązanie podwójne, lipidy z *S. cerevisiae* ulegają utlenieniu [Krasowska i wsp. 2000, 2002]. Po analizie metodą chromatografii gazowej stwierdzono obecność kwasów wielonienasyconych w błonie komórkowej drożdży. Ponadto zauważono, że w zależności od delecji dysmutaz ponadtlenkowych, ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest różna i w związku z tym natężenie procesu utleniania również zależy od rodzaju mutantu delecyjnego, z którego wyizolowano lipidy [Krasowska i wsp. 2006]. W odróżnieniu od wyników uzyskiwanych w badaniach na komórkach, *N*-tlenki okazały się bardziej aktywnymi przeciwutleniaczami niż związki fenolowe w hamowaniu peroksydacji lipidów, wywoływanej przez TBHP [Krasowska i Sigler 2007].

Określono także aktywność przeciwutleniającą badanych związków w układzie czysto chemicznym. Opracowano metodę, która opiera się na reakcji z wolnymi rodnikami, w wyniku której można mierzyć luminescencję. Stały poziom wolnych rodników generowany jest przez 2,2'-Azobis-metyloamidynopropanonu (AAPH). W temperaturze pokojowej AAPH jest procesem stabilnym, a generowanie wolnych rodników peroksydowych przebiega na jednym poziomie. Kiedy do mieszaniny reakcyjnej dodawana jest substancja wyłapująca wolne rodniki (przeciwutleniacz), zmniejsza się poziom luminescencji. Pomiar zahamowania luminescencji odzwierciedla potencjał przeciwutleniający testowanych związków [Krasowska i wsp. 2000]. Wyniki badań wskazywały na niższą aktywność *N*-tlenków niż przeciwutleniaczy fenolowych, z wyjątkiem związków oznaczonych MEDA o 12 i 14 atomach węgla w łańcuchach alkilowych. Te przeciwutleniacze miały aktywność

podobną do związków fenolowych lub nawet były bardziej aktywne [Krasowska i wsp. 2001, Krasowska i Sigler 2007].

4.5 Podsumowanie osiągniętych wyników

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że:

- Przeciwutleniacze *N*-tlenkowe wykazywały się mniejszą toksycznością w stosunku do komórek *Saccharomyces cerevisiae* niż przeciwutleniacze fenolowe, nawet w trzykrotnie wyższym stężeniu. Zależność ta utrzymywała się także w stosunku do drożdżowych mutantów delecyjnych w dysmutazach ponadtlenkowych.
- Obydwa rodzaje przeciwutleniaczy okazały się aktywne przeciw rodnikom tworzącym się w trakcie peroksydacji lipidów (pod wpływem TBHP), jak i przeciw anionorodnikowi ponadtlenkowemu, (indukowanemu przez parakwat).
- W testowanych stężeniach, prawie we wszystkich przypadkach, przeciwutleniacze fenolowe chroniły komórki drożdżowe przed stresem oksydacyjnym, wywołanym przez parakwat i TBHP lepiej niż *N*-tlenki.
- Zgodnie z założeniami, związki z dłuższymi łańcuchami węglowodorowymi, dobudowywały się głębiej w dwuwarstwę liposomową, niż związki o łańcuchach krótszych. Generalnie, związki, które dobudowywały się głębiej, były również bardziej toksyczne dla komórek drożdży niż te, które znajdowały się bliżej powierzchni błony. Efekt toksyczności był prawdopodobnie wywołany przez zakłócenie struktury błon przez znajdujące się w niej związki.
- W układzie z lipidami, których peroksydacja była indukowana TBHP, zaobserwowano lepszą przeciwutleniającą ochronę w obecności *N*-tlenków niż związków fenolowych przy zastosowaniu tych samych stężeń obydwu grup przeciwutleniaczy. Biorąc pod uwagę niższą toksyczność *N*-tlenków, do zastosowania w przemyśle spożywczym, preferowane powinny być *N*-tlenki.
- W przypadku niwelowania rodników peroksydowych, indukowanych przez azowy utleniacz AAPH w testach pomiarów chemiluminescencji, oprócz jednej grupy przeciwutleniaczy *N*-tlenkowych (MEDA-n), pozostałe *N*-tlenki wykazały niższą aktywność niż związki fenolowe.
- Okazało się, że aktywność przeciwutleniająca zależy nie tylko od rodzaju przeciwutleniacza czy stosowanego rodzaju stresu oksydacyjnego, ale także od warunków oraz metod przy pomocy których przeprowadzono doświadczenia.

4.6 Ewentualne zastosowanie

Przeprowadzone badania miały charakter poznawczy, polegający na poszukiwaniu relacji pomiędzy strukturą chemiczną indywidualnych związków a określonym typem właściwości. Docelowo przewidziane są zastosowania przemysłowe. Opatentowano struktury chemiczne badanych związków [zgłoszenia patentowe P-361368 oraz P-361369 z dnia 21.07.2003], związki fenolowe opatentowano jako środki do ochrony tłuszczów przed oksydacyjną destrukcją [patent nr PL 338760 z dnia 10.09.2001]. Obecnie prowadzone są badania z wykorzystaniem do syntezy przemysłowych surowców technicznych (olejów roślinnych, przemysłowo dostępnych frakcji estrów naturalnych kwasów tłuszczowych), co pozwoli na wytwarzanie produktów o optymalnych właściwościach w skali większej niż laboratoryjna i zastosowanie wybranych, przebadanych w laboratorium przeciwutleniaczy w przemyśle.

4.7 Wykaz literatury cytowanej w punkcie 4 autoreferatu:

Balcerczyk A, Łuczak K, Soszyński M, Bartosz G., *Prooxidative effects of TEMPO on human erythrocytes*. Cell Biol Int. 28, 585-91, 2004

Balzi E., Chen W., Ulaszewski S., Capieaux E., Goffeau A., *The multidrug resistance gene PDR1 from Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 262, 16871-16879, 1987

Barker G. M., Brimage L. J.E., Smart K. A., *Effect of Cu, Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in Saccharomyces cerevisiae*; FEMS Microbiol. Lett.; 177; 199 – 204, 1999

Bartosz G., *Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species*. Clin.Chim. Acta, 368, 53-76, 2006

Beilfuss W., Behrends S., Goroncy-Bermes P., Puchstein B., *Compositions for hygienic hand disinfection and disinfectant handwashing*, US Patent US 2011/0237626 A1, 2011

Bilinski T., Śledziewski A., Rytka J., *Hemoprotein formation in yeast – VI., Mutants with changed levels of catalase and of other heme enzymes under conditions of glucose repression*. Acta Microbiol. Polon. 29, 183-186, 1980

Clayson D.B., Iverson F., Nera E.A., Lok E., *The significance of induced forestomach tumors*, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30, 441-463, 1990

Culotta V.C., Cizewski V., Sturtz L. A.; *Superoxide dismutase null mutants of baker's yeast Saccharomyces cerevisiae*; Methods in Enzymology; 349; 167–172, 2002

Damiani E., Carloni P., Stipa P., Greci L. *Reactivity of an indolinic aminoxyl with superoxide anion and hydroxyl radicals*, Free Radic. Res. 31, 2405-2412, 1999

.

Damiani E., Greci L., Rizzoli C. *Reaction of indolinolic aminoxyls with nitric oxide*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1139-1144, 2001

Galati G., O'Brien P.J., *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemoprotective and anticancer properties*, Free Radic. Biol. Med. 37, 287-303, 2004

.

Guldener U., Heck S., Fiedler T., Beinhauer J., Hegemann J.H., *A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.*, Nucl. Acids Res. 24, 2519-2524, 1996

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fourth edition, Oxford University Press, ISBN-10: 019856869X; ISBN-13: 978-0198568698, 2007

Hiramoto K., Miura Y., Ohnuki G., Kato T., Kikugawa K. *Are water-soluble natural antioxidants synergistic in combination with α -tocopherol?* Journal of Oleo Science 51, 569-576, 2002

Kosman D. J., Gralla E. B.; *Molecular genetics of superoxide dismutase in yeast and related fungi*; Advances in Genetics; 30; 251–319, 1992

Krasowska A., Oświęcimska M., Pasternak A., Chmielewska L., Witek S., Sigler K., *New phenolic antioxidants of PYA and PYE class increase the resistance S. cerevisiae strain SP4 its SOD- and catalase deficient mutants to lipophilic oxidants.*, Folia Microbiol. 44, 657-662, 1999

Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Łukaszewicz M., *Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds*. Curr. Topics Biophys. 24, 89-95, 2000

Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Oświęcimska M., Witek S., Łukaszewicz M., *The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence.*, Cell. Mol. Biol. Letters. 6, 71-81, 2001

Krasowska A., Stasiuk M., Oświęcimska M., Kozubek A., Bien M., Witek S., Sigler K., *Suppression of radical-induced lipid peroxidation in a model system by alkyl esters of cinnamate quaternary ammonium salts*. Z. Naturforsch. C 56, 878-885, 2001b

Krasowska A., Chmielewska L., Gapa D., Prescha A., Vachova L., Sigler K., *Viability and formation of conjugated dienes in plasma membrane lipids of S. cerevisiae, S. pombe, R. glutinis and Candida albicans exposed to hydrophilic, amphiphilic and hydrophobic pro-oxidants*. Folia Microbiol. 47, 145-151, 2002

Krasowska A., Dziadkowiec D., Lukaszewicz M., Wojtowicz K., Sigler K., *Effect of antioxidants on Saccharomyces cerevisiae mutants deficient in superoxide dismutases.*, Folia Microbiol. 48, 754-760, 2003

Krasowska A., Piasecki A., Polinceusz A., Prescha A., Sigler K., *Amphiphilic amine-N-oxides with aliphatic alkyl chain act as efficient superoxide dismutase mimics, antioxidants and lipids peroxidation blockers in yeast.*, Folia Microbiol. 51, 99-107, 2006

Krasowska A., Piasecki A., Murzyn A., Sigler K. *Assaying the antioxidant and radical scavenging properties of aliphatic mono- and di-N-oxides in superoxide dismutase-deficient yeast and in a chemiluminescence test.*, Folia Microbiol. 52, 45-51, 2007

Krasowska A. and Sigler K., *Comparison of cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic amine N-oxides and phenolic antioxidants.*, Folia Microbiol. 52, 585-592, 2007b

Krasowska A., Piasecki A., Łuczyński J., Witek S., *Zastosowanie związków typu N-tlenkow amin trzeciorzędowych do ochrony przed zakażeniami bakteriami gram-dodatnimi i gram-ujemnymi*, zgłoszenie patentowe nr P-381636

Łukaszewicz M., Szopa J., **Krasowska A.**, *Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants*, Food Chem. 88, 225-231, 2004

McKeown S.R., Cowen R.L., Williams K.J. *Bioreductive drugs: from concept to clinic.*, Clin. Oncol. 19, 427-442, 2007

Packer J.E., Slater T.F., Wilson R.L. *Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C.*, Nature 278, 737-738, 1979

Piasecki, A., Wójcik, B., Łuczyński, J., *Nowe di-amidoaminy pochodne N,N-dimetyloetylenodiaminy i sposób ich wytwarzania*, zgłoszenie patentowe P-361368

Piasecki, A., Wójcik, B., Łuczyński, J., *Nowe N-tlenki di-amidoamin pochodnych kwasu 2-alkilomalonowego i sposób ich wytwarzania*, zgłoszenie patentowe P-361369

.

Rains J.L., Jain S.K. *Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes.*, Free Radical Biology & Medicine. 50, 567–575, 2011

Raport Toksykologiczny numer OS-17/00 z Instytutu Przemysłu Organicznego, Pszczyna, Polska, 2000

Raport Toksykologiczny numer OS-15/06 z Instytutu Przemysłu Organicznego, Pszczyna, Polska, 2000

Singh S. and Gupta A.K.; *Nitric oxide: role in tumour biology and NOS/NO-based anticancer therapies.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 67, 1211–1224, 2011

Slekar K. H., Kosman D. J., Culotta Cizewski V.; *The yeast Cooper / Zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection.*, J. Biol. Chem. 271, 28831–28836, 1996

Stanton R.C. *Oxidative stress and diabetic kidney disease*, Curr. Diab. Rep. 11, 330–336, 2011

Stipa P., Carloni P., Greci L., Damiani E. *Synthesis and thermal stability of alkoxyamines.*, Polym. Degrad. Stab. 55, 323-327, 1997

Wach A., Brachat A., Rebischung C., Steiner S., Pokorni K., Heesen S., Philippsen P., *PCR-based gene targeting in Saccharomyces cerevisiae.*, Meth. Microbiol. 26, 67-81, 1998

*** w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie**

5.. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych)

5.1 Zwalczanie oporności na terapię u mikroorganizmów

5.1.1 Aktywność transporterów ABC u *Saccharomyces cerevisiae*

1. Bartosiewicz D., **Krasowska A.**, Kozubek A., *Wpływ semisyntetycznych pochodnych kardanolu na aktywność wybranych transporterów błonowych u Saccharomyces cerevisiae*, (2008), Monografia wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu 129-132, ISBN 978-83-926758-0-8
2. Bartosiewicz D., **Krasowska A.**, *Inhibitors of ABC transporters and biophysical methods of study their activity*, (2009), Z. Naturforschung C. **64**, 454-458
3. **Krasowska A.**, Łukaszewicz M., Bartosiewicz D., Sigler K., *Cell ATP level of Saccharomyces cerevisiae sensitively responds to culture growth and drug-inflicted variations in membrane integrity and PDR pump activity*, (2010), Biochem. Biophys. Res. Commun. **395**, 51-55

5.1.2 Izolacja, charakterystyka właściwości przeciwrzybiczych oraz oznaczenie struktury czynnika wydzielanego przez *Saccharomyces boulardii*

1. **Krasowska A.**, Murzyn A., Dyjankiewicz A., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D., *The antagonistic effect of Saccharomyces boulardii on Candida albicans growth, filamentation, adhesion and biofilm formation*, (2009), FEMS Yeast Research, **9**, 1312-1321
2. Murzyn A., **Krasowska A.**, Augustyniak D., Majkowska-Skrobek G., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D., *The effect of Saccharomyces boulardii cells and compounds secreted by S. boulardii on Candida albicans adhesion to intestinal epithelial-like Caco-2 cells and cytokine response of Caco-2 cells*, (2010), FEMS Microbiol Lett, **310**, 17-23
3. Murzyn A., **Krasowska A.**, Dziadkowiec D., Stefanowicz P., Łukaszewicz M., *Capric acid secreted by S. boulardii inhibited C. albicans filamentous growth, adhesion and biofilm formation*, (2010), PloS One, **10**, 5(8): e12050

5.1.3 Izolacja, oznaczenie struktury i właściwości przeciwdrobnoustrojowe biosurfaktantu wydzielanego przez *Pseudomonas fluorescens* BD1

1. Janek T., Łukaszewicz M., Rezanka T., **Krasowska A.**, *Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by Pseudomonas fluorescens BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard*, (2010), Bioresource Technology, **101**, 6118-6123
2. **Krasowska A.**, *Biomedyczna aktywność biosurfaktantów*, (2010), Postępy Higieny i Medycyny Eksperymentalnej, **64**, 310-313

3. **Krasowska A.**, Łukaszewicz M., *Izolacja, identyfikacja oraz aktywność proteolityczna i lipolityczna mikroorganizmów arktycznych*, (2011), Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia, **10**, 3-12
4. Janek T., Łukaszewicz M., **Krasowska A.**, *Antiadhesive activity of pseudofactin-biosurfactant secreted by arctic bacteria Pseudomonas fluorescens BD5*, (2012), BMC Microbiology, DOI: 10.1186/1471-2180-12-24
5. Janek T., **Krasowska A.**, Radwanska A. Łukaszewicz M., *Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane*, (2013) Plos ONE, 8(3) doi:10.1371/journal.pone.0057991
6. **Krasowska A.** – kierownik grantu Narodowego Centrum Nauki nr N N302 640940, pt. „*Biomedyczne zastosowania biosurfaktantów syntetyzowanych przez mikroorganizmy pochodzenia arktycznego*” (2011-2013)

5.1.4 Surfaktanty lizosomotropowe oraz wybrane, komercyjne związki powierzchniowo czynne jako związki przeciwdrobnoustrojowe

1. Lachowicz T.M., Witek S., Łuczyński J., Witkowska R., **Balakuszew (Krasowska) A.**, Kleszczyńska H., Kral T., Kuczera J., Przestalski S., *Aminoethyl esters of fatty acids as model lysosomotropic substances*, (1996), Folia Microbiol. **41**, 102-105
2. Lachowicz T.M., **Krasowska A.**, Łuczyński J., Witek S., *Plasma membrane H^+ ATPase activity in wild type and mutants of yeast Saccharomyces cerevisiae treated by some lysosomotropic drugs*, (1998), Folia Microbiol. **43**, 203-205
3. Łuczyński J., **Krasowska A.**, *Struktura a aktywność biologiczna lizosomotropowych amino estrów*, (2002), Prace naukowe Instytutu Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej, **51**, 13-18
4. **Krasowska A.**, Chmielewska L., Łuczyński J., Witek S., Sigler K., *Dual mechanism of the antifungal effect of new lysosomotropic agents on Saccharomyces cerevisiae RXII strain*, (2003), Cell. Mol. Biol. Lett. **8**, 111-120
5. **Krasowska A.**, Chmielewska L., Adamski R., Łuczyński J., Witek S., Sigler K., *The sensitivity of yeast and yeast-like cells to new lysosomotropic agents*, (2004), Cell. Mol. Biol. Lett. **9**, 675 – 683
6. Obłąk E., **Krasowska A.**, *Biologiczna aktywność związków lizosomotropowych*, (2010), Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej **64**, 459-456
7. Obłąk E., **Krasowska A.**, *Influence of organic nitrogen drugs on bacterial, fungal and melanoma cells*, (2010), Adv. Clin. Exp. Med. **19**, 65-75
8. **Krasowska A.**, Biegalska A., Łukaszewicz M., *Comparison of antimicrobial activity of three commercial used quaternary ammonium surfactants*, (2012), Sepsis, **in press**

5.1.1 Aktywność transporterów ABC u *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są uważane za podstawowe mikroorganizmy eukariotyczne, służące często w badaniach za odpowiednik komórek ludzkich. Duży problem stanowi obecnie wielolekowa oporność występująca zarówno u drobnoustrojów, jak i w komórkach nowotworowych. Stosowane w terapii leki są wypompowywane poza komórkę przez transportery ABC, przy użyciu energii uzyskanej w trakcie hydrolizy ATP.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, były pierwszymi organizmami eukariotycznymi, dla których w 1996 roku w pełni określono sekwencję genomu, ujawniając w nim istnienie 30 białek należących do rodziny transporterów ABC. Transportery ABC u *S. cerevisiae* pogrupowane są w odrębnych pięć klas, reprezentowanych przez następujące podrodziny: PDR (*pleiotropic drug resistance*), MRP (*multidrug resistance –associated protein*), MDR (*multidrug resistance*), ALDp (*adrenoleukodystrophy protein*) i YEF3/RLI [1,2,3-5]. Białka PDR (*pleiotropic drug resistance*) tworzące u drożdży złożoną sieć regulatorów transkrypcyjnych, kontrolujących ekspresję określonych pomp ABC, są analogami ssaczych białek MDR odpowiadających m. in. za zjawisko oporności wielolekowej [4]. Znanych jest co najmniej pięć zlokalizowanych w błonie *S. cerevisiae* transporterów ABC powiązanych z fenotypem PDR. Są to Pdr5p, Pdr12p, Snq2, Yor1p oraz Ycf1p [6,7].

Badania nad inhibitorami transporterów ABC są prowadzone od ponad dwóch dekad [8].

W jednym z rozdziałów monografii wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu [Bartosiewicz, **Krasowska**, Kozubek 2008] opisano hamujący wpływ szeregu semisyntetycznych pochodnych kardanolu na aktywność transporterów ABC u *S. cerevisiae*. W publikacji [Bartosiewicz i **Krasowska** 2009] zostały przedstawione biofizyczne metody określania aktywności transporterów ABC oraz poznane ich inhibitory.

W pracy **Krasowska** i wsp. (2010) autorzy stwierdzili, że poziom wewnątrzkomórkowego ATP u *S. cerevisiae* jest odwrotnie proporcjonalny do aktywności metabolizmu w różnych fazach wzrostu. W czasie logarytmicznej fazy wzrostu wykryto niski poziom ATP, który następnie gwałtownie rośnie w fazie diauksji, nadal rośnie w fazie post diauksji i stabilizuje się w fazie stacjonarnej. Wydaje się, że transporter PDR zużywa najwięcej energii wśród wszystkich transporterów ABC. Zaobserwowano, że pod wpływem FK506, inhibitora pompy Pdr5p oraz związku 23.1 – semisyntetycznej pochodnej lipidu fenolowego rośnie poziom ATP w komórkach. Najbardziej poziom ATP wzrastał w komórkach szczepów z nadprodukcją pomp Pdr5p i Snq2p kiedy potraktowano je związkiem 23.1. Pomiary różnic w poziomie ATP w komórkach, spowodowane przez różne inhibitory

mogą wskazywać na możliwość wdrożenia w praktykę laboratoryjną nowej metody pomiaru aktywności transporterów ABC, jak i testowania nowych, potencjalnych inhibitorów pomp [Krasowska i wsp. 2010].

Literatura

1. Jungwirth H., Kuchler K., Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging, (2006), FEBS Lett, 580, 1131-1138
2. Decottignes A., Goffeau A., Complete inventory of the yeast ABC proteins,. (1999), Nat Genet. 15, 137-145
3. Taglicht D., Michaelis S., *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease, (1998), Methods Enzymol 292, 130-62
4. Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K., Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance, (1999), Biochim Biophys Acta, 1461, 217-236
5. Wolfger H., Mamnun Y.M., Kuchler K., Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification, (2000), Res Microbiol. 152, 375-389
6. Lage H., ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers, (2003), Int J Antimicrob Agents, 22, 188-199
7. Del Sorbo G., Schoonbeek H.J., De Waard M.A., Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides (2000), Fungal Genet Biol. 30, 1-15
8. Ozben T (2006) Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS Lett 580: 2903-2909

5.1.2 Izolacja, oznaczenie struktury oraz charakterystyka właściwości przeciugrzybiczych czynnika wydzielanego przez *Saccharomyces boulardii*

Candida albicans jest oportunistycznym patogenem, wywołującym często grzybicę powierzchniową, błon śluzowych i organów wewnętrznych, u ludzi z obniżoną odpornością organizmu [1]. Zbyt częste stosowanie przeciugrzybiczych leków, takich jak flukonazol, doprowadziło do rosnącej oporności *Candida*. Intensywne badania dotyczące zwalczania grzybic wywoływanych przez *C. albicans* w dużej części skupiają się nad hamowaniem aktywności transporterów ABC oraz nad zwalczaniem biofilmów. *Candida albicans* posiada dwa transportery ABC: Cdr1 i Cdr2 oraz transporter MFS (major facilitator superfamily) – Mdr1. Są one odpowiedzialne za oporność grzyba m.in. na związki azolowe [2].

Inną formą oporności *Candida* na środki przeciwgrzybiczne jest tworzenie wielokomórkowych struktur, zanurzonych w polimerycznej otoczce (matriks), czyli biofilmów. Biofilmy tworzą się zarówno na syntetycznych jak i naturalnych podłożach [3].

Saccharomyces boulardii to szczep drożdżowy wyizolowany przez Henri Boularda ze skórki owoców liczi rosnących w Indonezji [4]. Podczas migracji w układzie pokarmowym *S. boulardii* wchodzi w interakcje z mikroflorą gospodarza i błoną śluzową jelit, dzięki czemu znalazł zastosowanie głównie w walce z patogenami jelitowymi, takimi jak: *Clostridium difficile* [5], *Vibrio cholerae* [6], *Shigella flexneri* i *Salmonella typhimurium* [7] czy *Escherichia coli* [8].

Autorzy pracy **Krasowska** i wsp. (2009) wykazali hamujący wpływ *S. boulardii* na główne czynniki wirulencji *C. albicans*. Obecność komórek *S. boulardii*, jak i ekstraktu zawierającego związki wydzielane przez ten mikroorganizm, znacząco redukowało tworzenie filamentów przez *C. albicans* w różnych warunkach, m. in., podczas inkubacji w podłożu YPG lub surowicy króliczej. Obserwowana redukcja tworzenia filamentów w osoczu króliczym ma szczególnie korzystne znaczenie, biorąc pod uwagę fakt, iż wraz z krwią komórki *C. albicans* mogą rozprzestrzenić się do innych narządów wewnętrznych, powodując ich zakażenia.

Wykazano również hamujący wpływ ekstraktu *S. boulardii* na adhezję *C. albicans* do polistyrenowej powierzchni, zarówno w warunkach tlenowych, jak i z obniżoną zawartością tlenu (warunki mikroaerofilne). Adhezja jest pierwszym etapem tworzenia biofilmu, więc zgodnie z założeniami, zaobserwowano również wpływ komórek oraz ekstraktu *S. boulardii* na rozwój biofilmu *C. albicans*. Dodanie *S. boulardii* spowodowało zaburzenie tworzenia dwóch rodzajów biofilmów: złożonego głównie z komórek drożdżowych, oraz składającego się zarówno z komórek w formie drożdżowej, strzępek, jak i pseudostrzępek.

Zbadano także wpływ komórek oraz ekstraktu *S. boulardii* na adhezję *C. albicans* do dwóch ludzkich linii komórek jelita cienkiego (Intestin 407) oraz grubego (Caco-2) [Murzyn, **Krasowska** i wsp. 2010]. Zastosowanie komórek *S. boulardii* znacząco obniżyło poziom adhezji *C. albicans* do obu linii. W badaniach wykazano, że nie tylko komórki *S. boulardii*, ale również ekstrakt hamuje adhezję *C. albicans* do komórek obu linii. Wynik sugeruje, że obserwowany efekt nie jest spowodowany przestrzennym zajęciem wolnego miejsca adhezji, ale skutkiem wydzielania przez komórki *S. boulardii* nieznanych czynników, które zaburzają adhezję patogena. Przebadano wpływ ekstraktu *S. boulardii* na ekspresję IL-8, IL-1 β oraz IL-6 – cytokin, głównych mediatorów ostrej odpowiedzi zapalnej Caco-2 zainfekowanej *C. albicans*. Dodanie ekstraktu *S. boulardii* do zainfekowanych *C. albicans* linii Caco-2

spowodowało zmniejszenie ekspresji IL-8, co sugeruje anty-zapalne właściwości *S. boulardii* [Murzyn, **Krasowska** i wsp. 2010]. Niewielki wzrost ekspresji IL-1 β i IL-8 przez komórki Caco-2 w obecności ekstraktu *S. boulardii* może świadczyć nie o reakcji zapalnej, ale raczej o stymulacji mechanizmów obronnych organizmu.

Analiza GC/MS ekstraktu *S. boulardii* wykazała, że mikroorganizm ten produkuje kilkadziesiąt różnych związków [Murzyn, **Krasowska** i wsp. 2010]. Wśród nich oznaczono krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwas kapronowy (C6:0), kaprylowy (C8:0) i kaprynowy (C10:0) oraz 2-fenyletanol. Badania aktywności biologicznej oznaczonych związków wykazały, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zahamowanie filamentacji *C. albicans* jest kwas kaprynowy (C10:0), gdyż jego działanie było porównywalne do efektu spowodowanego obecnością ekstraktu *S. boulardii* [Murzyn, **Krasowska** i wsp. 2010].

Literatura

1. Odds F.C., Schmid J., Soll D.R., Epidemiology of *Candida* infection AIDS. in H. Vanden Bossche et al (ed.), *Mycoses in AIDS patients*, Plenum Press, New York (1990), 67-74
2. Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L., Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms, (2002), *J. Antimicrob. Chem.* 49, 973-980
3. Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.M., Ghannoum M.A., Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols, (2003), *Infect. Immun.* 71, 4333–4340
4. Zanello G., Meurens F., Berri M., Salmon H., *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases, (2009), *Curr. Issues Mol. Biol.* 11, 47-58
5. Castagliuala I., Riegler M.F., Valenick L., LaMont J.T., Pothoulakis C., *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa, (1999), *Infect. Immun.* 67, 302-307
6. Czerucka D., Nano J.L., Bernasconi P., Rampal P., Response to cholera toxin of 2 epithelial intestinal cell lines. Effect of *Saccharomyces boulardii*, (1989), *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13, 383-387
7. Rodrigues A.C., Nardi R.M., Bambirra E.A., Vieira E.C., Nicoli J.R., Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice, (1996), *J. Appl. Bacteriol.* 81, 251-256

8. Czerucka D., Dahan S., Mograbi B., Rossi B., Rampal P., *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells, (2000), Infect. Immun. 68, 5998-6004

5.1.3 Izolacja, oznaczenie struktury i właściwości przeciwdrobnoustrojowych biosurfaktantu wydzielanego przez *Pseudomonas fluorescens* BD1.

Surfaktanty (ang. surface active agents), inaczej substancje powierzchniowo czynne, to związki chemiczne, które posiadają zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego cieczy, ułatwiając tym samym zdolność zwilżania powierzchni ciał stałych przez te ciecze, a także umożliwiające zmieszanie dwóch cieczy, które naturalnie tworzą dwie nie ulegające zmieszaniu fazy (np. woda i olej).

Mikroorganizmy syntezują różnorodne biosurfaktanty, które można podzielić m. in. pod względem masy cząsteczkowej. Do niskocząsteczkowych należą glikolipidy (zwłaszcza trehalozolipidy, soforolipidy, ramnolipidy) oraz lipopeptydy takie jak: cykliczne lipopeptydy, np. surfaktyna oraz polimyksyna. Jeszcze inną grupą związków o właściwościach biosurfaktantów są cykliczne peptydy, będące często antybiotykami, takie jak między innymi gramicydyna. Do wysokocząsteczkowych biosurfaktantów należą lipopolisacharydy, biopolimerowe kompleksy i lipoproteiny takie jak alasan, liposan oraz kompleksy złożone z tych biopolimerów [1].

Biosurfaktanty stanowią grupę związków, które często wykazują unikalne właściwości, przez co mogą znaleźć liczne zastosowania w medycynie czy przemyśle. Od surfaktantów chemicznych wyróżnia je to, że najczęściej ulegają łatwiejszej biodegradacji, co ma znaczenie w ochronie środowiska [2]. Dzięki dużo znaczącym dla przyszłego zastosowania w medycynie właściwości fizykochemicznym, jak zdolność do permeabilizacji błon, często biosurfaktanty zabijają drobnoustroje, ponadto chronią przed ich adhezją do różnych powierzchni, przez co zapobiegają tworzeniu się biofilmów bakteryjnych i grzybowych, czy, jak zaobserwowano, mogą wywoływać apoptozę w komórkach nowotworowych. W pracy **Krasowska** 2010 omówiono biomedyczne właściwości biosurfaktantów.

W Zakładzie Biotransformacji, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z próbek gleby i wody przywiezionych ze Spitsbergenu w roku 2005 przez XVIII ekspedycję polarną wyizolowano szesnaście szczepów bakteryjnych. Na podstawie sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA szczepy zidentyfikowano do gatunku. Trzynaście

szczepów określono jako *Pseudomonas fluorescens*, a trzy jako *Pseudomonas syringae* [Krasowska i Łukaszewicz 2011]. Oprócz tego, że szczepy te są zdolne do wydzielania do podłoża lipaz i proteaz, stwierdzono, że niektóre z nich syntezują biosurfaktanty. Analiza metodami chromatograficznymi pozwoliła na opisanie nieznanej do tej pory struktury biosurfaktantu, nazwanego przez autorów pseudofaktyną [Janek i wsp. Krasowska 2010].

Pseudofaktyna wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową, zarówno zabijając bakterie jak i grzyb *Candida albicans*, jak i działając przeciwadhezyjnie, i odrywając uformowane biofilmy [Janek i wsp. Krasowska 2012].

W ramach grantu z Narodowego Centrum Nauki N N302 640940 (kierownik Krasowska) prowadzone są dalsze badania nad właściwościami proapoptotycznymi pseudofaktyny oraz nad identyfikacją innych biosurfaktantów pochodzenia mikrobiologicznego.

Literatura

1. Ron E.Z., Rosenberg E., Natural roles of biosurfactants, (2001), Environ. Microbiol, 3, 229-236.
2. Mukherjee S., Das P., Sen R., Towards commercial production of microbial surfactants, (2006), Trends in Biotechnology, 24, 509–515

5.1.4 Surfaktanty lizosomotropowe oraz wybrane, komercyjne związki powierzchniowo czynne jako związki przeciwdrobnoustrojowe

Substancje lizosomotropowe to pojęcie wprowadzone przez de Duve'a i wsp. [1], do określenia związków chemicznych, mogących wnikać do komórki i gromadzić się w kompartmentach komórkowych o niskim pH, takich jak lizosomy komórek zwierzęcych czy wakuole komórek roślinnych lub grzybowych. Substancje lizosomotropowe mają bardzo różną strukturę, a wspólnym jej fragmentem jest atom azotu nadający cząsteczce słabo zasadowy charakter [2]. Po osiągnięciu lizosomu, amina wychwytuje proton i przechodzi w formę związku uprotowanego i – jeżeli ma odpowiednią strukturę – wykazuje właściwości kationowego surfaktantu oddziałując na błonę lizosomalną (lub wakuolarną) i białka błonowe. Jednocześnie następuje podniesienie wewnątrzlizosomalnego pH nawet o 1.7 jednostki, co ma duży wpływ na procesy transportowe i funkcjonowanie lizosomu [3].

Przebadano szereg aminoestrów lizosomotropowych, w tym chlorowoderek estru 2-(dimetyloamino)etylowego kwasu laurynowego (DM-11). Wykazano aktywność przeciwdrobnoustrojową wybranych, nowo syntetyzowanych związków lizosomotropowych [Lachowicz, Bałakuszew (Krasowska) i wsp. 1996]. Wykazano, że związek ten hamuje

aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej *S. cerevisiae* *in vivo* (ryc. 2) i *in vitro* [Lachowicz, **Krasowska** i wsp. 1998].

Badania nad aminoestrami lizosomotropowymi – DM 11, PY 11, PYG 12 i chlorowodorkiem N,Ndimetyloalaninianu n-dodecyłowego (DMAL-12)) wykazały, że związki te w kwaśnym pH (uprotonowane) działają hamująco na H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży. Najaktywniejsze były związki z 12-węglowym łańcuchem alkilowym. Ponadto wykazano podwójny mechanizm działania tych związków. Po wnikięciu do komórki, powodowały zakwaszenie jej wnętrza, prawdopodobnie poprzez blokowanie H^+ -ATPazy. Następnie badane związki mogą oddziaływać na wakuolarną ATPazę, powodując alkalizację wakuoli i śmierć komórki [**Krasowska** i wsp. 2003, Obląg i **Krasowska** 2010].

Przebadano także wpływ związków DM 11 i DMAL 12 na szczepy *Schizosaccharomyces pombe* i *Candida albicans*. W pH 6.0 DMAL 12 miał niższą aktywność przeciw *S. pombe* niż DM 11 i wyższą aktywność przeciw *C. albicans*. DM 11 powodował ogólne zakwaszenie wewnątrz komórek podczas gdy DMAL 12 jedynie słabe zakwaszenie. DMAL 12 nie wywoływał zmian morfologicznych u *C. albicans*, natomiast powodował liczne, niekorzystne zmiany w komórkach *S. pombe* [**Krasowska** i wsp. 2004].

Do dezynfekcji w szpitalach bardzo często używa się obecnie środków zawierających czwartorzędowe sole amoniowe (CAS). Niestety, szeroko rozpowszechnione stosowanie tych związków, spowodowało narastającą oporność patogennych szczepów, powiązaną z opornością również na innego rodzaju substancje. Z tego powodu ważne jest poszukiwanie nowych strukturalnie środków dezynfekcyjnych, lub ich nowych połączeń w mieszaninach.

W pracy [**Krasowska** i wsp. 2011] zostały przebadane przeciwdrobnoustrojowe właściwości trzech rodzajów czwartorzędowych soli amoniowych (betainy kokamidopropylowej, tlenku dimetyloaminy i chlorku benzalkoniowego). Doświadczenia przeprowadzono także na mieszaninach tych preparatów. Wyznaczono minimalne stężenia hamujące według normy CSN PN-EN dla szczepów standardowych: *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Listeria monocytogenes*.

Chlorek benzalkoniowy wykazywał najwyższą, a betaina kokamidopropylowa najniższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. W mieszaninach rosła aktywność związków. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy krytycznym stężeniem micelizacji a aktywnością przeciw testowanym szczepom [**Krasowska** i wsp. 2012].

Literatura

1. de Duve C., de Barsy T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F.: Lysosomotropic agents, (1974), *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2495–2531
2. Firestone R.A., Pisano J.M., Bonney R.J., Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents, (1979), *J. Med. Chem.*, 22, 1130–1133
3. Dubowchik G.M., Gawlak S.L., Firestone R.A., The *in vitro* effects of three lysosomotropic detergents against three human tumor cell lines, (1995), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 893–898

5.2 Wpływ różnych czynników stresogennych na mikroorganizmy

1. Witek S., Oświęcimska M., Lachowicz T.M., **Balakuszew (Krasowska) A.**, Przestalski S., Kuczera J., Sarapuk J., Kleszczyńska H., Gabrielska J., Trela Z., Kral T., Podolak N., *General biological properties of antioxidant permeatoxins and their influence on natural and model membranes*, (1995), *Folia Microbiol.* **39**, 559-560
2. Witek S., Oświęcimska M., Lachowicz T.M., **Krasowska A.**, Przestalski S., Kleszczyńska H., Gabrielska J., *Functionalized permeatoxins: derivatives of dihydrosuccinamic acid with antioxidant function*, (1997), *Folia Microbiol.* **42**, 254-256
3. **Krasowska A.**, Łukaszewicz M., Oświęcimska M., Witek S., Sigler K., *Spontaneous and radical-induced plasma membrane lipid peroxidation in differently oxidant-sensitive yeast species and its suppression by antioxidants*, (2000), *Folia Microbiol.* **45**, 509-514
4. Podrazky O, Kuncova G., **Krasowska A.**, Sigler K., *Monitoring the growth and stress responses of yeast cells by two-dimensional fluorescence spectroscopy: first results*, (2003), *Folia Microbiol.* **48**, 189-192
5. Dziadkowiec D., **Krasowska A.**, Liebner A., Sigler K., *Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae**, (2007), *Folia Microbiol.* **52**, 120-126

Różnego rodzaju czynniki stresogenne, takie jak na przykład związki metali ciężkich, zbyt wysoka czy zbyt niska od optymalnej temperatura inkubacji, zmiany osmotyczności środowiska powodują w komórkach wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) i stres oksydacyjny [1]. Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, lipidów, kwasów nukleinowych i błon komórkowych, co prowadzi do zmian w ich budowie i czynnościach fizjologicznych [2].

Przebadano utlenianie lipidów błonowych u trzech gatunków grzybów (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Rhodotorula glutinis*) pod wpływem odczynników stosowanych w reakcji Fentona, tert-butyl hydroperoksydu (TBHP) i

związków azowych (AAPH, ACHN). Pomiary powstających po utlenieniu lipidów związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBRŚów) wykazały, że najbardziej podatne na utlenienie są komórki *R. glutinis*, a najmniej *S. pombe*. Najsilniejszym utleniaczem był związek TBHP oraz Fe II. Utlenieniu ulegały także lipidy izolowane z błon komórkowych testowanych mikroorganizmów. Proces peroksydacji lipidów był częściowo hamowany przez przeciwutleniacze: butyl hydroksytoluen (BHT) oraz zsyntezowany na Politechnice Wrocławskiej przeciwutleniacz fenolowy PYA 12. Obydwa związki wykazywały większą aktywność przeciwutleniającą wobec izolowanych lipidów niż wobec komórek [Krasowska i wsp. 2000].

W pracy Krasowska i wsp. [2007] wykazano, że u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* dysmutaza ponadtlenkowa SOD2 jest odpowiedzialna nie tylko za ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym, ale także przed takimi czynnikami stresogennymi jak wysoka osmotyczność środowiska czy obecność związków metali ciężkich. Natomiast dysmutaza ponadtlenkowa SOD1 chroni komórkę głównie przed stresem oksydacyjnym.

Do monitorowania wzrostu i reakcji komórek *Saccharomyces cerevisiae* na różne czynniki stresogenne zastosowano nieinwazyjną metodę przy użyciu dwuwymiarowego mikroskopu fluorescencyjnego [Podrazky i wsp. 2003]. Badania wykazały, że stosując fluorescencję 2D można obserwować zmiany stanu oksydacyjno-redukcyjnego w komórkach, zachodzące pod wpływem takich czynników jak na przykład: metanol lub cyjanki.

Zsyntetyzowane na Politechnice Wrocławskiej przeciwutleniacze z ugrupowaniem fenolowym serii PPE-n i PPA-n (gdzie n oznacza ilość atomów węgla w łańcuchu alkilowym), przetestowano pod względem aktywności przeciwutleniającej w obecności liposomów zbudowanych z fosfatydylocholiny. Uzyskano wyniki świadczące o wyższej niż stosowany jako standard przeciwutleniacz BHT, aktywności przeciwutleniającej badanych związków [Wietk i wsp. 1997]. Przeciwutleniacze typu DE-n i DA-n z ugrupowaniem fenolowym i z różnymi długościami łańcuchów alkilowych były przebadane pod względem oddziaływania na liposomy i wpływu na przeżywalność drożdży *S. cerevisiae*. Testowane związki w niskim stopniu zakłócały strukturę liposomów, a związek DA-14 najbardziej redukował przeżywalność drożdży [Witek i wsp. 1995].

Literatura

1. Thorpe W.G., Fong Ch.S., Nazif A., Higgins V.J., Dawes I.W., Cells have destined mechanisms to maintain protection against different reactive species oxidative stress-response genes, (2004), PNAS, 101, 6564-6569

2. Bartosz G, Druga twarz tlenu, (1995), PWN

5.3 Inne zrealizowane zadania badawcze

1. **Krasowska A.**, Rosiak D., Szkapiak K., Łukaszewicz M. (2000), *Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds*, Curr. Topics Biophys. 24, 89-95.
2. Łukaszewicz M., Szopa J., **Krasowska A.**, (2004), *Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants*, Food Chem. 88, 225-231.
3. **Krasowska A.**, Dziadkowiec D., Polinceusz A, Plonka A, Łukaszewicz M., (2007) *Cloning of flax oleic fatty acid desaturase and its expression in yeast*, Journal of American Oil Chemists Society 84, 809-816
4. Piasecki A., Piłakowska-Pietras D., Baran A., **Krasowska A.**, (2008) *Synthesis and properties of surface chemically pure alkylamidoamines N-oxides at the air/water interface*, Journal of Surfactants and Detergents 11, 187-194.
5. Piasecki A., Wojcik B., Luczynski J., Piłakowska-Pietras D., Witek S., **Krasowska A.**, (2009) *Bifunctional N-oxides of alkylidiamidoamines*, Journal of Surfactants and Detergents 12, 201-207.

W publikacji **Krasowska** i wsp. [2000] opisano chemiluminescencyjną metodę do szybkiego testowania przeciwutleniaczy. Zastosowano związek azowy 2,2'-diazobis (2-amidinopropan) dichlorowodorku (AAPH) jako źródło wolnych rodników i luminol do uzyskania luminescencji. Przetestowano dwa standardowe przeciwutleniacze: Trolox jako odpowiednik witaminy E oraz butyl hydroksytoluen BHT. Trolox wygaszał chemiluminescencję całkowicie w stężeniu 100 razy niższym niż BHT. Opracowana metoda została zastosowana także w innych laboratoriach badawczych [1, 2, 3]

Nasiona lnu zawierają około 40% oleju i są najbogatszym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, odgrywających ważną rolę w zdrowiu człowieka. Kwasy wielonienasycone są podatne na utlenianie, stąd wynika bardzo krótki czas życia półkowego oleju lnianego. W pracy Łukaszewicz i wsp. [2004] przeanalizowano skład i podatność na utlenianie olejów wyekstrahowanych z nasion dziewięciu odmian lnu. Ponadto zbadano przeciwutleniający wpływ β -karotenu i kwercetyny. Aktywność obydwu tych przeciwutleniaczy była różna, w zależności od stosowanej odmiany lnu. Wykazano również, że β -karoten w wyższych stężeniach powoduje utlenianie olejów.

Desaturazy kwasów tłuszczowych to enzymy, które powodują powstanie wiązań podwójnych w nienasyconych kwasach tłuszczowych [4]. Desaturaza FAD2 wprowadza wiązanie podwójne w kwasie oleinowym.

Oleje, które zawierają odpowiedni stosunek kwasów omega 3 do omega 6 odgrywają ważną, pozytywną rolę w diecie i zdrowiu człowieka. Z drugiej strony oleje takie łatwo ulegają utlenieniu. Jednym z rozwiązań tego problemu jest obniżenie całkowitego stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w nasionach, bez zakłócenia odpowiednich proporcji kwasów omega 3 do omega 6. Można to zrobić poprzez na przykład delecję genu desaturazy FAD2. W pracy **Krasowska** i wsp. [2007] sklonowano gen desaturazy kwasów tłuszczowych $\Delta 12$ (Fad2) zawierający 378 aminokwasów. Heterologiczna ekspresja tego białka w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykazała lokalizację tego enzymu w retikulum endoplazmatycznym. Komórki drożdży zawierające desaturazę FAD2 z lnu nie wykazywały większej predyspozycji na utlenienie, jedynie mutanty delecyjne pozbawione genów dysmutaz ponadtlenkowych były bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny.

W dwóch pracach Piasecki i wsp. [2008 i 2009] opisano syntezę i właściwości fizykochemiczne związków powierzchniowo czynnych z ugrupowaniem N-tlenkowym. Związki typu EDA-n, PDA-n, MEDA-n oraz MPDA-n zsyntezowano na Politechnice Wrocławskiej. Przebadano następujące właściwości fizyko chemiczne N-tlenków: krytyczne stężenie micelizacji (CMC), wolną energię adsorpcji i micelizacji, obszar przekroju zaadsorbowanych cząsteczek oraz równowagowe napięcia powierzchniowe.

Literatura:

1. Korycińska M., Czelna K., Jaromin A., Kozubek A., Antioxidant activity of rye bran alkylresorcinols and extracts from whole-grain cereal products (2009), Food Chemistry 116, 1013-1018
2. Oliveira M.W.S., Minotto J.B., de Oliveira M.R., Zanotto-Filho A., Behr G.A., Rocha R.F., Moreira J.C.F., Klamt F. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species, (2010), Pharmacological Reports, 62, 185-193
3. Żuk M., Kulma A., Dymińska L., Szołtysek K., Prescha A., Hanuza J., Szopa J., Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application, (2011), BMC Biotechnology 11:10 doi:10.1186/1472-6750-11-10
4. Ohlrogge J., Browse J., Lipid biosynthesis, (1995), Plant Cell, 7 957–970

5.4 Udział w projektach badawczych

5.4.1. Projekty z funkcją kierownika projektu

1. Kierownik grantu Narodowego Centrum Nauki nr N N302 640940, pt. „*Biomedyczne zastosowania biosurfaktantów syntetyzowanych przez mikroorganizmy pochodzenia arktycznego*” (2011-2013)
2. Kierownik grantu pomiędzy Uniwersytetem Wrocławskim, a przedsiębiorstwem Transvet sp. z o.o., Polska (011/1/WBT/07) „*Analiza aktywności bakteriobójczej wybranych, potencjalnych substancji dezynfekcyjnych*” (3 m-ce 2007)
3. Kierownik grantu pomiędzy Uniwersytetem Wrocławskim, a przedsiębiorstwem Biocodex, Francja (002/1/WBT/07) “*The influence of the active factor from the extract from S. boulardii culture filtrate on virulence factors of Candida albicans and Escherichia coli – the molecular mechanisms*” (2007)
4. Kierownik grantu pomiędzy Uniwersytetem Wrocławskim, a przedsiębiorstwem Biocodex, Francja (978/1/IGiM/06) „*Saccharomyces boulardii - Candida albicans, Escherichia coli and Enterococcus faecalis biofilms formation: the role of gut environmental conditions*” (2006)
5. Kierownik grantu pomiędzy Uniwersytetem Wrocławskim, a przedsiębiorstwem Biocodex, Francja (931/1/IGiM/05) „*Saccharomyces boulardii – Candida albicans interactions*” (2005)
6. Kierownik umowy na naukową współpracę pomiędzy Instytutem Fizyki, Uniwersytetu Karola w Pradze a Instytutem Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytetu Wrocławskiego “*Molecular mechanisms of cell resistance against xenobiotics: yeast as model organism*” (2002-2005)
7. Kierownik wewnętrznego grantu Uniwersytetu Wrocławskiego (2483/W/IGiM) „*Przeciwwutleniające właściwości amfifilowych N-tlenków amin*” (2003-2004)
8. Kierownik międzynarodowego grantu (KBN P04 23/40) - Czesko-Polskiej Fundacji na Naukową i Naukowo-Techniczną Współpracę, “*Toxic/oxidative cell stress and stress defence - yeast as a model*” (2002-2003)

5.4.2. Projekty z funkcją głównego wykonawcy i wykonawcy projektu

1. Główny wykonawca w grantcie Inicjatywa Technologiczna KB/48/13639/IT 1-B/325 U/08 pt. *„Opracowanie innowacyjnej w skali światowej technologii produkcji środków do mycia instalacji membranowych w przemyśle spożywczym”* (2008-2013)
2. Główny wykonawca w grantcie MENiS nr 3 T09B 075 27, pt. *„Substancje amfifilowe z funkcją antyoksydanta”* (2004-2007)
3. Wykonawca w 4 grantach KBN: nr 7 S203 013 07, pt. *„Miękkie substancje lizosomotropowe”*, zakończony w 1997 r., nr 3 T09B 059 15, pt. *„Czwartorzędowe sole amoniowe z funkcją antyoksydanta”* (1998 – 2000), nr 3 T09B 081 18, pt. *„Lizosomotropowe pochodne aminokwasów”* (2000 – 2003) oraz nr 4T09B07922 pt. *„Nowe antyelektrostatyki i środki dezynfekcyjne”* (2002-2004).

5.4.3. Projekty współfinansowane przez Unię Europejską

1. Wykonawca w projekcie kluczowym nr POIG.01.01.02-00-016/08 pt. *„Modelowe kompleksy agroenergetyczne jako przykład kogeneracji rozproszonej opartej na lokalnych i odnawialnych źródłach energii”* (2008-2013)

5.5. Udział w konferencjach

Od 1997 roku współautorka 55 komunikatów na konferencjach krajowych (24) i międzynarodowych (31).



Dr Anna Krasowska