

Załącznik 2 do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr inż. Paweł Kowalczyk

**Analiza stanów zapalnych, jednostek chorobowych oraz stresu oksydacyjnego w tkankach
organizmów żywych pod wpływem wybranych patogenów szczepów bakteryjnych i ich
interakcje z czwartorzędowymi amonowymi cieczami jonowymi**

Warszawa 2018

1. Imię i Nazwisko.

Paweł Kowalczyk

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

- stopień naukowy: doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie; rok uzyskania 2005; tytuł rozprawy doktorskiej: „Sekwencyjnie zależna indukcja egzocyklicznych adduktów zasad DNA przez *trans*-4-hydroxy-2-nonenal oraz aldehyd chlorooctowy, mutageneza i naprawa w komórkach *Escherichia coli*”, praca w języku angielskim; promotor: prof. dr hab. Barbara Tudek

- tytuł zawodowy: magister inżynier w zakresie biotechnologii rolniczej

Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; rok uzyskania 1998; tytuł pracy magisterskiej: „Lokalizacja uszkodzeń ludzkiego genu *p53* przez aldehyd chlorooctowy metodą odcisku palca polimerazy DNA”- praca obroniona z wyróżnieniem.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 2016 - specjalista w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk.

2012-2013- adiunkt, Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, praca naukowa i dydaktyczna, prowadzenie zajęć ze studentami.

2011-2012- starszy specjalista naukowo-techniczny, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego (ICM UW).

2007-2010- adiunkt, Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego (ICM UW).

2005-2007- asystent, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Kontynuacja badań nad naprawą i oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych.

1998-2005- studia doktoranckie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w Zakładzie Biologii Molekularnej w pracowni Oksydacyjnych Uszkodzeń DNA o specjalności związanej z uszkodzeniami i naprawą DNA w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych.

1993-1998 - studia magisterskie na Wydziale Rolniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

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. 2016r. poz. 882 ze zm. W Dz, U, z 2016r.poz. 1311., Dz.U. 2017 poz 1852).

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Analiza stanów zapalnych, jednostek chorobowych oraz stresu oksydacyjnego w tkankach
organizmów żywych pod wpływem wybranych patogenów szczepów bakteryjnych i ich
interakcje z czwartorzędowymi amonowymi cieczami jonowymi**

b. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

B. 1. Miskiewicz A, **Kowalczyk P.**[✉], Mahdi-Oraibi S., Cybulska K., Misiewicz A. (2018) Bird feathers as potentially source of pathogen microorganisms- a new look at old diseases. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* vol 111, Nr 3, 1-15, 10.1007/s10482-018-1048-2. (IF=1,795), (MNI_{SW}=20).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji artykułu, syntezie dostępnej literatury; dotyczącej podrozdziału opisującego choroby bakteryjne ptaków indukowanych przez bakterie z rodzaju E.coli i Salmonella, współtworzeniu rozdziału opisującego choroby bakteryjne ptaków indukowanych przez bakterie z rodzaju Bacillus i Pseudomonas, współtworzeniu rozdziału opisujących choroby wirusowe i grzybowe układu oddechowego i pokarmowego u ptaków, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu wraz z wysłaniem do czasopisma.

Mój udział procentowy określám na 50%.

B. 2. Borkowski A., **Kowalczyk P.**[✉], Czerwonka G., Cieśla J., Cłapa T., Misiewicz A., Szala M., Drabik M. (2017) Interaction of quaternary ammonium ionic liquids with bacterial membranes - Studies with *Escherichia coli* R1–R4-type lipopolysaccharides. *Journal of Molecular Liquids* 246, 282–289. (IF=3,648), (MNI_{SW}=30).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń związanych z: syntezą cieczy jonowych i ich prekursorów, współwykonaniu badań mikrobiologicznych w zakresie oznaczeń toksyczności cieczy jonowych, modyfikacji cieczami jonowymi i ich prekursorami komórek wybranych szczepów bakteryjnych; K12, R1-R4, oznaczeniu żywotności komórek bakteryjnych metodą MIC i MBC po modyfikacji, uczestnictwie w wykonaniu pomiarów potencjału elektrokinetycznego cieczy jonowych oraz komórek wybranych szczepów bakteryjnych K12, R1-R4 po modyfikacji cieczami jonowymi (od C8-C18) i ich prekursorów, syntezie dostępnej literatury, opracowaniem graficznym rysunków, współudziale w opracowaniu wstępu, metodyki badawczej, wyników i ich dyskusji, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu, redakcji manuskryptu, wysłaniu manuskryptu do czasopisma.

Mój udział procentowy określám na 40 %.

B. 3. **Kowalczyk P.**, Jaworek J., Kot M., Sokołowska B., Bieleń A., Janowska B., Cieśla J.M., Szparecki G., Sadoś B., Tudek B. (2016) Inflammation increases oxidative DNA damage repair and stimulates preneoplastic changes in colons of newborn rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol 67, No 2, 277-286. (IF=2.883), (MNI_{SW}=25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń (polegających na oznaczeniu aktywności enzymatycznych z wykorzystaniem białek naprawy DNA w analizowanych homogenatach tkankowych metodą wycinania zasad, analizie ekspresji genów naprawy DNA oraz genów stanów zapalnych metodą Real time-PCR, analizie mikroskopowej stanów przednowotworowych w analizowanych tkankach), syntezie dostępnej literatury, współudziale w opracowaniu wyników i ich dyskusji, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu . **Mój udział procentowy określám na 40 %.**

B 4. Langie S.A.S., **Kowalczyk P.**, Tomaszewski B., Vasilaki A., Maas L.M., Moonen E.J., Palagani A., Godschalk R.W.L., Tudek B., van Schooten F.J., Berghe W. V., Zabielski R., Mathers J.C. (2014) Redox and epigenetic regulation of the APE1 gene in the hippocampus of piglets: The effect of early life exposures. *DNA Repair*, 18, 52–62. (IF=3,111), (MNI_{SW}=35)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu tkanek do analiz, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na; oznaczeniu aktywności cięcia DNA z wykorzystaniem białek naprawy powiązanych z system wycinania zasad i nukleotydów w analizowanych homogenatach tkankowych, analizę ekspresji genu Ape1 z wykorzystaniem metod Real time-qPCR), współudziale w opracowaniu wstępu, metodyki i dyskusji, analizę wyników, syntezie dostępnej literatury, przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy określám na 25 %.

B 5. A16. Langie S.A.S., **Kowalczyk P.**, Tudek B., Zabielski R., Dziaman T., Oliński R., van Schooten F.J, Godschalk R.W.L. (2010) The effect of oxidative stress on nucleotide-excision repair in colon tissue of newborn piglets. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Vol. 695, Nr 1-2, 75-80. (IF=2,938), (MNI_{SW}=32).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracowaniu koncepcji badań , przygotowaniu tkanek do analiz, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń polegających na; oznaczeniu aktywności enzymatycznych z wykorzystaniem białek naprawy DNA w analizowanych homogenatach tkankowych metodą wycinania nukleotydów, nadzorowanie analizy próbek moczu na zawartość 8-oxoGua współudziale w opracowaniu wstępu, metodyki i dyskusji, analizę wyników, syntezie dostępnej literatury, oraz przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy określám na 30 %.

Punktacja pięciu prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji zgodnie z rokiem wydania lub zgodnie z ostatnią dostępną wartością: Łączny IF= 14,375, MNI_{SW}=142

c) Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Stres oksydacyjny jako czynnik toksyczny dla komórek poprzez reakcje redoks może regulować szlaki naprawy DNA. Podstawowym enzymem naprawy miejsc purynowych i pirymidynowych jest endonukleaza 1 (APE1) w szlaku błędnie sparowanych zasad tzw. BER (ang. Base Excision Repair) oraz NER (z ang. Nucleotide Excision Repair). Czynniki środowiskowe mogą zmieniać metylację genów naprawy DNA i ich ekspresję, modulować aktywność BER lub NER oraz podatność na oksydacyjne uszkodzenie DNA. Oprócz aktywności Ap-endonukleazy w BER i jej roli w rekrutacji innych białek systemu naprawy, APE1 (inaczej Ref-1) działa również jako czynnik redoks kontrolujący wewnątrzkomórkowy stany utleniania i redukcji, modulując ekspresję genów takich jak: *AP-1*, *Egr-1*, *p53*, *HIF* i *CREB*.

Mechanizm, w którym stres oksydacyjny może wpływać na ekspresję enzymów naprawczych DNA, wciąż nie jest w pełni zrozumiały. Liczne dane sugerują, że ekspozycje środowiskowe (np. styl życia, zanieczyszczenie powietrza i metale ciężkie, nanocząstki, ciecze jonowe) mogą zmieniać status metylacji promotorów genów, modyfikując ich ekspresję i funkcje

komórek. Zaobserwowano iż, ekspozycje na te czynniki we wczesnym okresie życia utrzymują się przez cały cykl życia powodując deregulację mechanizmów obronnych w tym metylacji DNA.

W ciągu całego życia jesteśmy narażeni na różne endogenne (patogeny bakteryjne) lub egzogenne czynniki tworzące reaktywne formy tlenu (ROS). Mogą one powodować stres oksydacyjny czyli zaburzenie stanu w wyniku braku równowagi między formowaniem ROS a dostępnymi systemami antyoksydacyjnymi (np. glutation, enzymy antyoksydacyjne). Tego typu przykładem są narodziny i przejście z życia płodowego na noworodkowe, które związane jest ze zwiększonym stresem oksydacyjnym spowodowanym przeniesieniem z wewnątrzmacicznego środowiska niedotlenionego ($PO_2 = 20-25$ mmHg) do środowiska normotycznego anektro-macicy ($PO_2 = 100$ mmHg) (Shoji i Koletzko 2007). To 5-krotne zwiększenie ciśnienia tlenu może zwiększyć wytwarzanie ROS (Shoji i Koletzko 2007) i powodować uszkodzenia oksydacyjne i alkilacyjne w DNA. Dodatkowo, domięśniowe wstrzyknięcie żelaza w postaci dekstranu tzw. FeDex w trzeciej dobie po stymulacji porodu, może katalizować wytwarzanie ROS poprzez reakcję Fentona (Meneghini 1997), podobnie jak to opisano u szczurów (Wellejus and Paulsen 2000).

Jeśli uszkodzenia oksydacyjne nie zostaną usunięte przez mechanizmy naprawy DNA, BER lub NER, wówczas akumulują się w postaci licznych modyfikacji kwasów nukleinowych szczególnie w tkankach takich jak hipokamp mózgu, jelito cienkie i grube. W tkankach tych mogą utrwalac się samoczynnie mutacje, powodujące zaburzenia w genomie w młodym wieku a podczas starzenia się organizmu mogą prowadzić powstawania stanów zapalnych indukujących różnego typu jednostki chorobowe co w konsekwencji przyczynia się do rozwoju nowotworu (Ames 1989, Seeberg i wsp. 1995, Luo i wsp. 2010, Langie i wsp. 2007, 2010, Cooke i wsp. 2003, Zawia i wsp. 2009) .

Hipokamp mózgu - jako organ docelowy, jest dobrym modelem badawczym ponieważ posiada gęstą sieć neuronów postmitotycznych i jest szczególnie podatny na stres oksydacyjny w wyniku wysokiego stężenia tlenu, wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, względnie wysokich poziomów jonów metali przejściowych i niskich poziomów antyoksydantów. Ponadto słaba aktywność enzymów naprawy DNA w dojrzałej tkance nerwowej jest bezpośrednio powiązana z chorobami neurodegeneracyjnymi (Luo i wsp. 2010, Langie i wsp.2010). Jelito cienkie i grube z uwagi na swoją budowę i właściwości oraz specyficzną biotę bakteryjną jest również idealnym modelem do badań metylacji i oksydacji kwasów nukleinowych.

Ponadto, jelito grube zostało wybrane jako narząd docelowy, ponieważ duże ilości ROS są wytwarzane podczas chorób zapalnych, takich jak wrzodziejące zapalenie okrężnicy, które predysponuje pacjentów do raka jelita grubego (Kitahora i wsp.1988, Babbs 1992, Seril i wsp. 2003, Lee i wsp. 2006). Również inne badania sugerują, że nieprawidłowości lub niedobory w NER odgrywają kluczową rolę w powstawaniu sporadycznych raków jelita grubego (Takebayashi i wsp. 2001, Steffensen i wsp. 2006).

Metylacja DNA jest epigenetyczną modyfikacją genomu, która może powodować zmiany w ekspresji genów i fenotypie bez zmiany sekwencji DNA. Proces ten występuje głównie w 5-metylocytozynie (5 mC) w dinukleotydach CpG, ponieważ grupa metylowa przyłącza się do cytozyny w pozycji 5 przez metylotransferazy DNA (Bird 2002). Do chwili obecnej niewiele wiadomo na temat związku między metylacją DNA w mózgu a jego oksydacją i alkilacją, podobnie jest w przypadku tkanek przewodu pokarmowego jelita cienkiego i grubego.

Uszkodzenia alkilacyjne i oksydacyjne zasad DNA mogą być indukowane zarówno *in vitro* przez niektóre kancerogeny środowiskowe takie jak chlorek winylu (ang. vinyl chloride VC) i jego metabolit aldehyd chlorooctowy (CAA), jak również mogą powstawać *in vivo* w toku normalnych procesów metabolicznych w komórce - które mogą prowadzić do stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów (LPO) w odpowiedzi na czynnik stresowy. Podczas peroksydacji dochodzi do utlenienia i fragmentacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z wytworzeniem wtórnych stabilnych produktów takich jak aldehydy, hydroksyaldehydy, ketony, węglowodory, czy wolne kwasy tłuszczowe. Jak dotąd najdokładniej scharakteryzowaną grupą są aldehydy, takie jak; dialdehyd malonowy (MDA), aldehyd akrylowy czy hydroksyaldehyd; *trans*-4-hydrokso-2-nonenal (HNE) (Schaur 2003), (ryc.1).

Ze względu na swoje specyficzne właściwości elektrofilowe, aldehydy i hydroksyaldehydy w warunkach tlenowych *in vivo* mogą atakować wiele cząsteczek występujących w komórce w tym białka i kwasy nukleinowe, tworząc z nimi trwałe związki z sześć- lub siedmiowęglowym łańcuchem bocznym do wszystkich czterech zasad DNA tworząc tzw. addukty (rys.1), (Cadet i wsp. 2000).

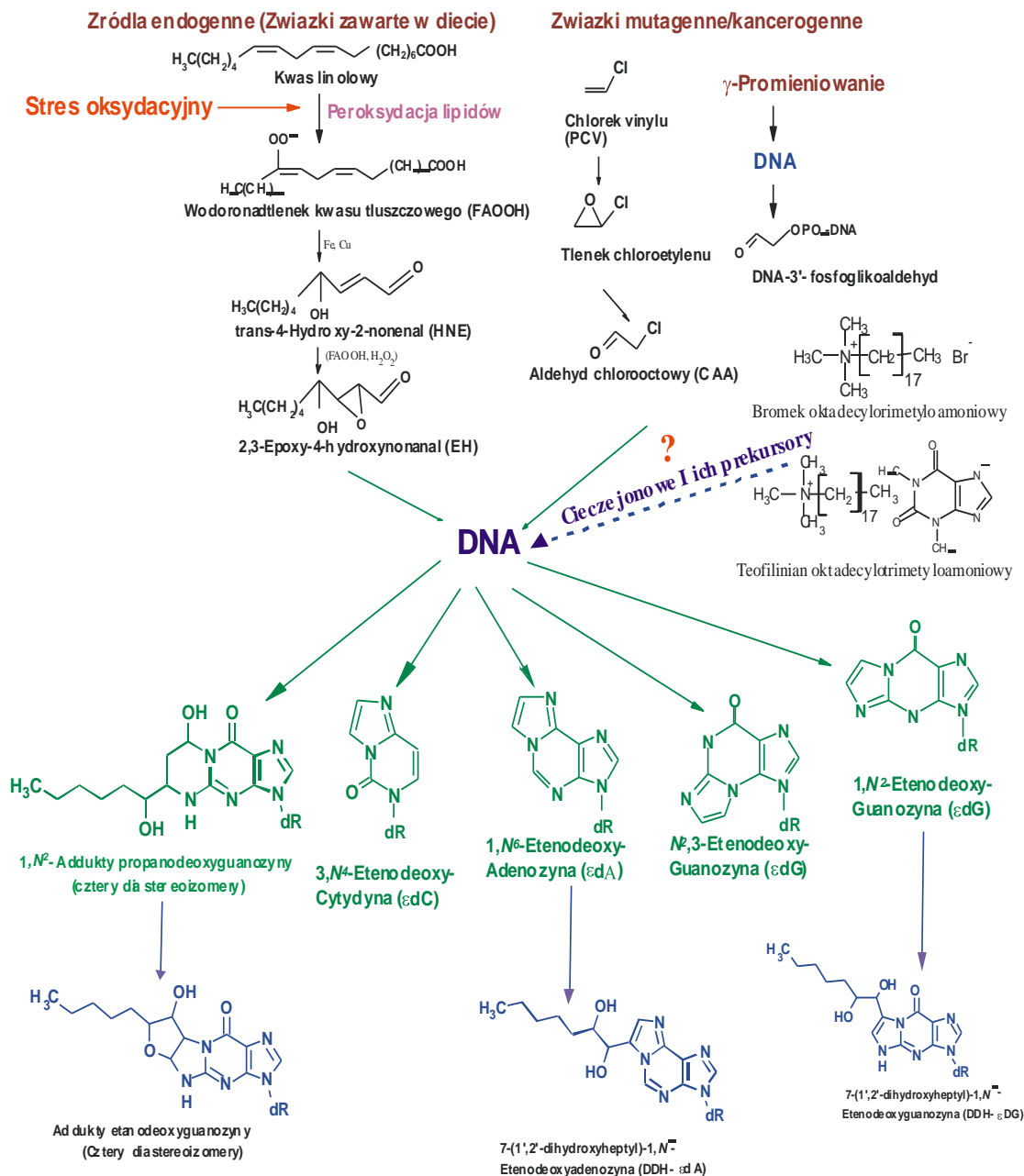
Wśród adduktów na szczególną uwagę zasługują - egzocykliczne addukty zasad DNA. Mogą być one typu eteno- i propano- takie jak: 1,N⁶-etenoadenina (ϵ A), 3,N⁴-etenocytozyna (ϵ C), N²,3-etenoguanina (ϵ G), 1,N²-propanoaddukty-guaniny (4 diastereoizomery), oraz - 8 oksoguanina (8-oxoG), (ryc.1). Uszkodzenia te są usuwane z matrycy DNA głównie przez system naprawy wycinania zasad (ang. Base Excision Repair). Naprawa w tym systemie jest inicjowana przez enzymy z grupy glikozylaz DNA rozpoznających zmodyfikowane zasady do których zaliczamy: glikozylazę OGG1 rozpoznającą 8-oxoG, glikozylazę ANPG rozpoznającą ϵ A i ϵ G oraz glikozylazę TDG rozpoznającą ϵ C. Enzymy te usuwają uszkodzoną zasadę z nici DNA w miejscu jej uszkodzenia.

Związki te w dwuniciowym DNA, indukują pęknięcie wiązań podwójnych, tworząc wiązania krzyżowe DNA-DNA (Kowalczyk i wsp. 2004) oraz zwiększają ekspresję genów naprawy DNA zaangażowanych w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym (Kowalczyk i wsp. 2016), (ryc.1).

Zmodyfikowane zasady DNA typu eteno lub propano i ich formy pośrednie (ryc.1) takie jak aldehydy i hydroksyaldehydy indukowane przez stany zapalne, ujawniają także wysoki potencjał nieprawidłowego kodowania w komórkach bakterii i ssaków. Powodują one m.in. aberracje chromosomowe, wymianę chromatyd siostrzanych, oraz tworzenie wszelkiego typu mutacji. Mogą one również działać kancerogennie, klastogennie i cytotoksycznie powodując niestabilność genomu i

prowadząc do powstawania licznych mutacji somatycznych będących prekursorami transformacji nowotworowej. Poznanie genotoksycznych właściwości endogennych uszkodzeń DNA oraz szlaków ich naprawy w organizmach żywych ma fundamentalne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów chorób zależnych od chronicznych stanów zapalnych takich jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne oraz procesów starzenia.

Niezależnie od powszechności występowania egzocyklicznych adduktów jako uszkodzeń DNA ze źródeł endo- i egzogennych, metody ich detekcji oraz wpływ na właściwości biologiczne i naprawę w różnych tkankach organizmu w oparciu także o inne związki takie jak czwartorzędowe amonowe ciecze jonowe (z ang. Ionic Liquids-IL) i ich prekursorzy teofilinowe (z ang. Theophylline Ionic Liquids-TIL) - są nadal fragmentaryczne.



Ryc.1. Główne szlaki powstawania eteno i propano adduktów ze źródeł egzo i endogennych

Niezależnie od tworzenia się *in vivo* egzocyklicznych adduktów zasad DNA, ważnym aspektem w analizie wewnątrzkomórkowego tworzenia się stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego są interakcje czwartorzędowych amoniowych cieczy jonowych (IL) z błonami komórek bakteryjnych produkujących endotoksyny. Ciecze jonowe są nową niedawno odkrytą grupą związków (Copeland 1974) które wywierają wpływ na aktywność mikrobiologiczną w glebie i środowiskach wodnych (Borkowski i wsp. 2016, El-Shamy i wsp. 2015, Ławniczak i wsp. 2016, Pernak i wsp. 2013, 2014, 2015, Choudhary i wsp. 2017). Ciecze jonowe są intensywnie badanymi związkami z powodu ich potencjalnego zastosowania w technologiach przemysłowych, medycynie i mikrobiologii (niska lotność, niskie częściowe ciśnienie pary, niepalność). Mogą one zastąpić toksyczne lotne rozpuszczalniki. (Marsh i wsp. 2004, Hang i wsp. 2011).

Ciecze jonowe to sole w stanie ciekłym, w których jony kationy i aniony są słabo skoordynowane i mają temperaturę topnienia poniżej 100°C (Welton 1999, Wilkes 2002). Dodatni ładunek kationu, może znajdować się przy atomie azotu, fosforu, siarki lub tlenu (Plechkova and Seddon 2008).

Z syntezą IL oraz wykorzystaniem wiąże się znaczne nadzieje upatrując możliwość zastąpienia toksycznych, lotnych rozpuszczalników organicznych w wielu procesach technologicznych jako przykład tzw. „zielonej chemii”. Obecnie są one powszechnie stosowane w procesach chemicznych jako rozpuszczalniki. Posiadają one potencjalnie korzystne właściwości; zdolność do rozpuszczania szerokiego zakresu związków metaloorganicznych i nieorganicznych oraz wodnych rozpuszczalników organicznych do biokatalizy (Thuy Pham i wsp. 2010). Właściwości biobójcze cieczy jonowych oraz ich prekursorów do których należą czwartorzędowe halogenki amoniowe umożliwiają stosowanie ich od lat jako środków aktywnych w sterylizacji lub jako środków dezynfekujących, bakteriobójczych i grzybobójczych w ochronie różnych powierzchni np. drewnianych, przed atakiem grzybów. Najczęściej są stosowane w postaci antyseptyków: chlorku i bromku benzalkoniowego (Foksowicz-Flaczyk i Walentowska 2013).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa związków zależy przede wszystkim od struktury kationu, a w szczególności od długości podstawników i liczby łańcuchów alkilowych w cząsteczce lub alkoksymetylowych. Jest ona najwyższa dla związków zawierających od 8 do 16 atomów węgla w łańcuchu alkilowym lub od 8 do 14 atomów węgla w grupie alkoksymetylowej (Payagala i Armstrong 2002). Zmiana anionu dla tych samych kationów zwykle nie wpływa na aktywność biologiczną (Hough-Troutman i wsp. 2009). Istnieją cztery podstawowe mechanizmy działania związków chemicznych na komórki bakteryjne: denaturacja białek i rozrywanie kompleksów nukleoproteinowych, uszkodzenie błony komórkowej, utlenianie grup sulfhydrylowych, reakcje z grupami aminowymi.

Ostatnio pojawiła się nowa generacja IL-ów jako składniki herbicydów i zamienników antybiotyków o szerszym zakresie działania (Choudhary i wsp. 2017, Pernak i wsp. 2013, 2015).

Jednak zwiększone zastosowanie nieznanymi w przyrodzie nowych związków o charakterze ksenoantybiotyków może wiązać się z zagrożeniami związanymi z nieznanym poziomem ich

toksyczności, genotoksyczności i bioakumulacji. Ciecze jonowe w swojej budowie posiadają łańcuch alkilowy zarówno o właściwościach hydrofobowych, jak i hydrofilowych (z greco. amfifil), który prawdopodobnie może silnie oddziaływać na właściwości błon biologicznych bakterii Gram-ujemnych otoczonych zewnętrzną membraną zawierającą lipopolisacharyd (LPS) o różnej długości i w ten sposób wpływać na toksyczność IL-ów. LPS jest głównym składnikiem bakterii Gram-ujemnej, i pokrywa do 75% powierzchni komórki (Łukaszewicz i wsp. 2003). LPS z *E. coli* zawiera hydrofobowy lipid A, rdzeniowy oligosacharyd, oraz polisacharydy tworzące antygen O (Appelmeil i wsp. 1994, Amor i wsp. 2000).

Szorstki LPS (znaleziony w szczepach typu R) nie ma antygeny O i ma skrócony rdzeniowy oligosacharyd (Amor i wsp. 2000). LPS zakotwiczone w zewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnych, odgrywają kluczową rolę nie tylko w interakcjach pasożytów żywicielskich bytujących na różnych organizmach (Nnalue i wsp. 1999) ale także w interakcjach z otaczającym środowiskiem np. w piórach ptaków (Heinricks i wsp. 1998).

IL w swojej budowie zawierają anion naturalnego pochodzenia, który może powodować zmiany przepuszczalności membrany poprzez interkalację z LPSami *E. coli* charakteryzującymi się różnym stopniem „szorstkości” - co może decydować o ich toksyczności IL-ów.

Toksyczność ILs często może różnić się w różnych bakteriach Gram-ujemnych. Dlatego szczepy *E. coli* z LPS typu R1-R4 są odpowiednie do tego typu badań. Może to potencjalnie skutkować zmianami niektórych właściwości fizykochemicznych, takich jak potencjał elektrokinetyczny i boczna dyfuzja lipidów w membranach zależnych od struktury ściany komórkowej bakterii; Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Dlatego też, ILs mogą potencjalnie funkcjonować jako antybiotyki, co jest istotne w odniesieniu do drobnoustrojów chorobotwórczych.

Analizowane związki należą do cieczy jonowych trzeciej generacji zawierających aniony hydrofobowe pochodzenia naturalnego. Wstępne dane literaturowe, dotyczą głównie IL jako prekursorów czwartorzędowych chlorków alkiloamoniowych, ale następna generacja IL-ów obejmuje już aniony pochodzenia naturalnego (Markiewicz i wsp. 2014) lub aniony w postaci czwartorzędowych bromków alkilo-amoniowych (prekursory) oraz jonów alkiloamoniowych opartych na teofilinie (TIL), (Borkowski i wsp. 2016). Mimo tego, wiedza na temat ILs i ich właściwości mikrobiologicznych (przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych) oraz biologicznych jest nadal niewystarczająca.

Omówienie wyników badań

Cykl pięciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wyjaśnia procesy związane z analizą stresu oksydacyjnego w indukcji stanów zapalnych w tkankach organizmów żywych pod wpływem:

- specyficznych szczepów bakteryjnych, bytującymi w piórach ptaków i ich endotoksyn wywołujących zoonozy u człowieka.
- analizą toksyczności cieczy jonowych i ich interakcji z LPS *E.coli* w szczepach R1-R4.

- analizą ekspresji genów naprawy DNA i ich aktywności w powstawaniu etenoadduktów zasad indukujących stany zapalne wywołane przez bakteryjne LPS pochodzące z *E.coli* i *S.typhimurium* w (tkankach gryzoni) z wykorzystaniem metody wycinania zasad (ang. nicking assay)

- analizą stanów zapalnych oraz poziomem metylacji DNA i stanów redox związanych ze stresem oksydacyjnym w hipokampie i jelitach prosiąt suplementowanych dietą wysokotłuszczową.

Powyższe zagadnienia mogą być pomocne w analizie genomu człowieka i ich potencjalnej roli w spontanicznej kancerogenezie DNA.

W pierwszej pracy zatytułowanej; „Bird feathers as potentially source of pathogen microorganisms- a new look at old diseases”, została opisana epidemiologia oraz okres inkubacji wybranych szczepów bakteryjnych które pasożytują w piórach i skrzydłach ptaków. Wywołują one charakterystyczne choroby u ptaków które w sposób pośredni lub bezpośredni mogą być przenoszone na człowieka, indukując groźne dla niego choroby odzwierzęce tzw. zoonozy.

Rosnąca zachorowalność na zoonozy jest znaczącym problem w zakresie globalnego zdrowia w Europie. Zoonozy jako choroby zakaźne lub pasożytnicze przenoszone przez zwierzęta do ludzi, powodują groźne infekcje grypopodobne dla jego zdrowia (ptasia grypa) a nawet życia. Opisano metody ich przenikania do organizmu człowieka różnymi drogami; (i) przez przewód pokarmowy, infekcje bakteriami z gatunku *Escherichia* i *Salmonella*, (Mellata 2013, Cohen et al. 2012; Liebana et al. 2013). (ii) przerwy w ciągłości skóry w wyniku skaleczeń - infekcję patogenami wirusa, gronkowce i paciorkowce (iii) oraz przez układ oddechowy w sposób pośredni lub bezpośredni (przez wdychanie powietrza lub pyłu w którym obecne są patogeny pochodzące np. z wydzielin ptaków lub ich piór).

Bakterie rozkładające pióra ptaków są grupą mikroorganizmów, zidentyfikowaną zarówno u dzikiego ptactwa żyjącego na wolności jak i drobiu. Odkrycie bakterii rozkładających pióra ptaków, jest względnie nowym wydarzeniem w mikrobiologii i ornitologii. W roku 1990, bakterie zdolne do degradacji piór były wyizolowane od kurcząt. Dziewięć lat później, potwierdzono obecność bakterii o podobnych właściwościach metabolicznych u dzikich ptaków. Wydaje się, że w dzikiej przyrodzie występowanie tych mikroorganizmów jest niemal wszechobecne. Ostatnie badania sugerują iż 39% poszczególnych ptaków wykazywała obecność takich bakterii w swoim upierzeniu. W postaci tabelarycznej zostały przedstawione aktualne dane z Unii Europejskiej w latach 2011-2017, które dotyczą również chorób i śmiertelności oraz kosztów ponoszonych przez krajowe systemy opieki zdrowotnej w leczeniu chorób odzwierzęcych występujących u ludzi.

Pierwszym rodzajem bakterii rozkładającym pióra zidentyfikowanym u dzikich ptaków był *Bacillus*. W tym czasie zidentyfikowano trzy konkretne gatunki: *B. subtilis*, *B. licheniformis* i *B. pumilus*. (Coker i wsp.. 2002, Lista i wsp. 2006). Udowodniono, że te bakterie są powszechne wśród ptaków a ich obecność i liczebność zależała od pory roku i środowiska żerowania określonych gatunków ptaków. Od tego czasu zidentyfikowano wiele gatunków bakterii do których oprócz rodzaju *Bacillus*, znaleziono także gronkowce (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. hemolyticus*) i enterokoki (*E. faecalis*) a także *Micrococcus*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. fulva* i *Streptomyces sp.* Jednakże na

szczególną uwagę zasługują bakterie z rodzaju *E.coli* i *Salmonella* i ich endotoksyny które wydzielają. Odkrycie bakterii rozkładających pióra ptaków było dużym osiągnięciem w wyjaśnieniu ptasich zoonoz, w tworzeniu nowoczesnej antybiotykoterapii i lekooporności dla wybranych patogenów bakteryjnych, które stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Bakterie rozkładające pióra stały się obszarem zainteresowania ornitologów ze względu na ich możliwą rolę jako istotnego wskaźnika w pogarszającym się upierzeniu ptaków i niskiej jakości pierza jako odpadu produkcyjnego wytwarzanego przez przemysł drobiarski. Jest to także szczególnie istotne dla zdrowia osób które mają częsty kontakt z ptakami jak ornitolodzy, weterynarze, personel ferm drobiarskich, właściciele zwierząt towarzyszących i pracownicy ogrodów zoologicznych.

Przedstawiona charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych w tym *E.coli* i wydzielanych przez nie endotoksyn lipopolisacharydów (LPS) bytujących na piórach ptasich jest unikatowym kompendium wiedzy na temat ptasich zoonoz istotnych dla zdrowia i życia człowieka.

W drugiej pracy pt. „Interaction of quaternary ammonium ionic liquids with bacterial membranes – Studies with *Escherichia coli* R1–R4-type lipopolysaccharides”, kontynuowano badania *in vitro* na membranach wybranych szczepów bakteryjnych z wykorzystaniem czwartorzędowych jonów alkiloamoniowych i ich prekursorów opartych na teofilinie (TIL). Testowanie TIL i ich czwartorzędowych prekursorów soli amoniowych różni się jedynie pod względem długości ich łańcucha alkilowego od C8- do C18. Badania przeprowadzono na pięciu szczepach *Escherichia coli* ze zmienną strukturą i długością lipopolisacharydów (gładki szczep K-12 i szorstkie szczepy R1-R4). Dodatkowo jako kontrola został użyty *Bacillus cereus* jako typowa bakteria Gram-dodatnia. Zazwyczaj wrażliwość bakterii Gram-dodatnich na łańcuch zawierający alkan ILs jest znacznie większa niż bakterii Gram-ujemnych. Dla bakterii Gram-dodatnich, łańcuch alkilowy może potencjalnie wiązać się z otoczką bakteryjną, ścianą komórkową lub błoną wewnętrzną nie powodując dużych zmian potencjału zeta. Po zdyspergowaniu w środowisku o pH zbliżonym do obojętnego, ściany komórek bakterii Gram-dodatnich są naładowane ujemnie z powodu obecności grup fosforylowych. Natomiast ujemny ładunek powierzchniowy u bakterii Gram-ujemnych jest powodowany przez grupy fosforylowe i karboksylanowe LPS w błonie zewnętrznej.

Stwierdzono, że toksyczność cieczy jonowych zależy od składu lipopolisacharydu w regionie antygeny O (najbardziej zewnętrzna warstwa LPS) i "szorstkości" zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych. Wyniki ujawniły różnice w czułości na badane związki określone dla prekursorów IL i TIL, minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimum stężenie bakteriobójcze (MBC), między gładkimi i szorstkimi szczepami, a także różnice w aktywności peroksydazy i peroksydacji lipidów. Szczepy R3 i R4 wykazywały większą czułość niż inne szczepy. Szczep R4 był najbardziej wrażliwy i miał bardzo podobną wrażliwość jak Gram-dodatnie *B. cereus*. C18 i C18T wykazywały największe różnice w MIC dla poszczególnych szorstkich szczepów *E. coli* i *B. cereus* i były wyraźnie widoczne w ich wzroście na mikroplątkach, po dodaniu do nich - rezazuryny, (organicznego związku

chemicznego stosowanego powszechnie jako wskaźnik pH i reakcjach redoks). W przypadku oceny MBC, szczep R4 pokazał zaskakująco wysoką odporność na „toksyczne” stężenia badanych związków. Dodatkowo, zwiększyła się także wrażliwość na MIC i wzrastała oporność na letalne stężenia zarówno dla szczepów R3 i R4. Ten efekt był szczególnie zauważalny w przypadku R4 i C18T, gdzie wartość MBC była 1000 razy większa niż MIC. Badania wykazały, że aniony teofiliny modyfikują toksyczność badanych związków, w zależności od zastosowanego szczepu i typu związku. W przypadku związku z łańcuchem alkilowym C18 teofilina zwiększała jego toksyczność.

Na podstawie danych literaturowych przewidywano, że toksyczność ILs na bakteryjną błonę lipidową będzie podwyższona poprzez poziom peroksydacji lipidów i wzrost aktywności peroksydazy, co umożliwi *in vitro* widoczne trwale uszkodzenie oksydacyjne w wyizolowanym DNA. Dlatego też, zbadano interakcje między cieczami jonowymi i wyizolowanym *in vitro* plazmidowym DNA z bakterii (Kowalczyk i wsp.2018, praca w recenzji). Dodatkowo, zostało wykonane trawienie białkiem Fpg (posiadającym funkcję glikozylazy i AP-endonukleazy), jako markera utlenionych zasad w tym 8-oxoG- w celu oceny potencjalnych oksydacyjnych uszkodzeń DNA, zarówno po pośrednim działaniu cieczy jonowych, jak i w procesie peroksydacji lipidów. W obu przypadkach nie stwierdzono wizualnie widocznych zmian topologicznych analizowanych plazmidów w obrazie rozdziału elektroforetycznego. Nie zaobserwowano także zmian przejścia form lub też pojawienia się jednej rozmytej formy tzw. „smear”, będącej efektem dużej ilości utlenionych par zasad w DNA trawionym przez białko Fpg (Kowalczyk i wsp.2018, praca w recenzjach).

Uzyskane wyniki po raz pierwszy pokazują, że interakcja cieczy jonowych z materiałem genetycznym zachodzi wewnątrzkomórkowo (różnice w aktywności peroksydazy i peroksydacji lipidów), poprzez zaindukowanie stresu oksydacyjnego w żywych komórkach i pomiar potencjału zeta błon bakteryjnych.

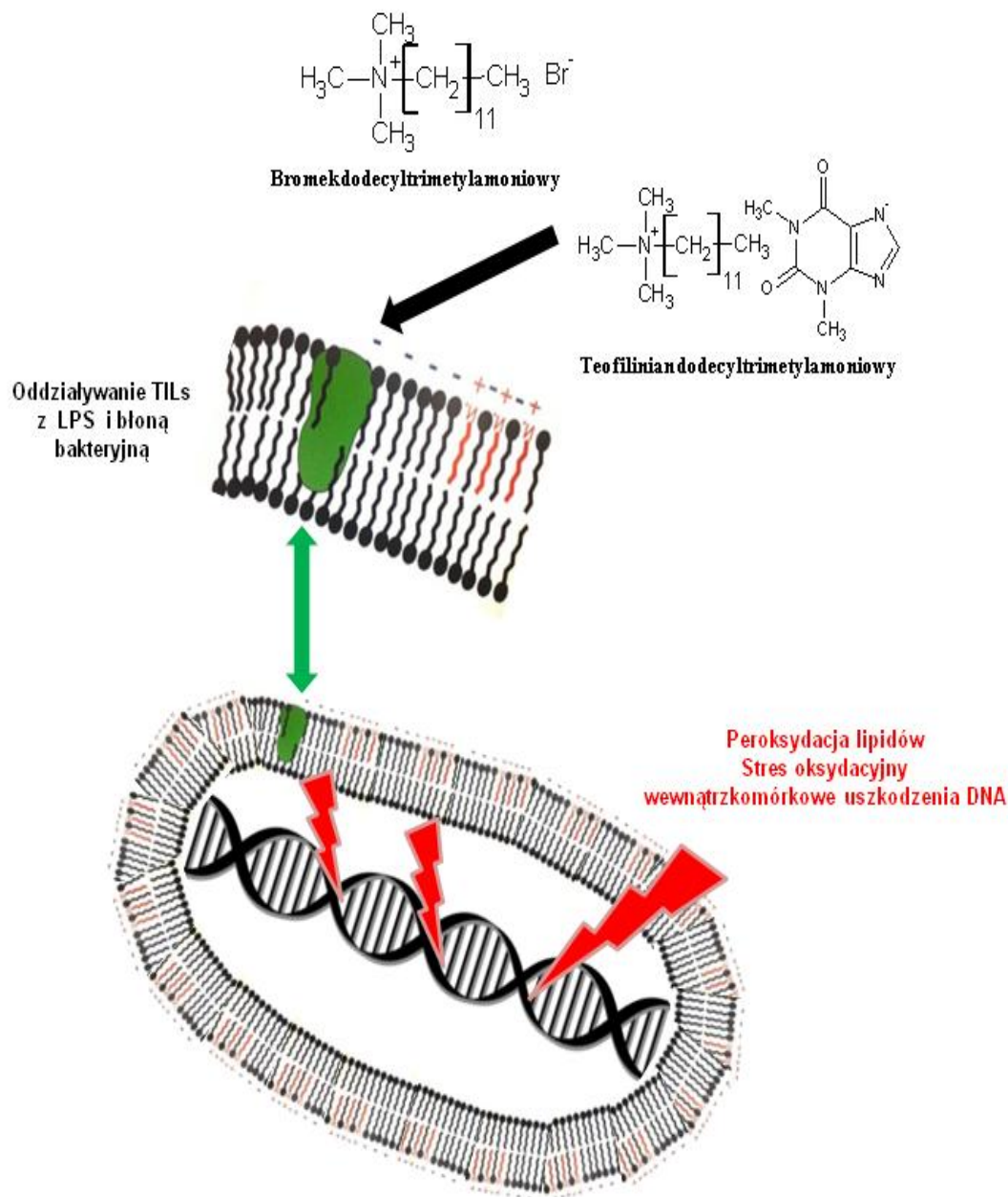
Bacillus cereus, który jest bakterią Gram-dodatnią, wykazywał znacznie mniejszy poziom ujemnego potencjału zeta niż Gram-ujemne szczepy *E. coli*.

Prawdopodobnie jony alkiloamoniowe mogą zakłócać przepływ przez zewnętrzne błony bakterii Gram-ujemnych. Mogą one powodować agregację lub aglomerację komórek bakteryjnych i mogą wpływać na aktywność drobnoustrojów, zmieniając „odpowiedź” bakterii na utlenianie i stres komórkowy, nie powodując apoptozy komórek w warunkach kontrolnych, przez widoczne zmiany potencjału zeta.

Obserwowane procesy są silnie skorelowane z długością łańcucha alkilowego w interakcji z błoną bakteryjną i stopniem jej utlenienia (np. korelację pomiędzy dyfuzją boczną membran w różnych szczepach i toksycznością cieczy jonowej).

Włączenie kationu alkiloamoniowego do ściany komórki bakteryjnej neutralizuje jej ujemny ładunek powierzchniowy. Wyniki wykazały, że dla TIL w tym samym stężeniu, dłuższy kation alkilowy w łańcuchu skutkował większym spadkiem ujemnego ładunku bakterii. Interakcja TIL i jego prekursorów z błoną bakteryjną jest niezbędna do oksydacyjnej indukcji dla DNA komórkowego

poprzez zmianę jej hydrofobowości (szczerp typu R4 był najbardziej czułym spośród wszystkich testowanych szczepów *E. coli*). Wprowadzanie TIL do zewnętrznej błony K-12 *E. coli* i szczepów szorstkich może odgrywać istotną rolę w komórce w odpowiedzi na ILs (ryc.2).



Ryc.2 Interakcje cieczy jonowych z błonami bakterii

Przedstawione wyniki badań in vitro mają szczególnie znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów interakcji pomiędzy komórkami bakteryjnymi i różnymi związkami chemicznymi o potencjalnym działaniu biologicznym i ich dalszym zastosowaniu praktycznym. Wstawienie kationów do błony komórkowej może odgrywać istotną rolę w zmniejszaniu oporności na antybiotyki lub inne leki poprzez zmiany we właściwościach lipidowych błon bakteryjnych; zmiany właściwości

fizykochemicznych z powodu dodatniego ładunku czwartorzędowego azotu w alkiloamonianie. Hipoteza ta została potwierdzona poprzez zmianę potencjału zeta mierzonego na powierzchni błon bakteryjnych.

Określenie w.w. mechanizmu działania cieczy jonowych na membrany bakteryjne zależne od długości bakteryjnego LPS i ich interakcji z zasadami DNA, było podstawą do dalszych badań związanych z tkankami układu pokarmowego zwierząt modelowych; młodych gryzoni i prosiąt.

W trzeciej publikacji z cyklu pt. „Inflammation increases oxidative DNA damage repair and stimulates preneoplastic changes in colons of newborn rats”, badano wpływ stanów zapalnych u młodych szczurów stada Wistar, indukowanych dootrzewnowym podaniem bakteryjnych lipopolisacharydów ze szczepów *S. typhimurium* lub *E. coli* w dawkach 1 - 10 mg, na aktywności enzymów z grupy glikozylaz naprawczych rozpoznających: ϵ A, ϵ C i 8-oxoG w jelicie cienkim szczurów oraz w powstawaniu wczesnych zmian nowotworowych w jelicie grubym tych zwierząt metodą wycinania zasad (z ang. nicking assay).

Metoda ta oparta jest na cięciu wyznakowanego radioaktywnego substratu - oligodeoksynukleotydu (40-meru) zawierającego w pozycji 20 zmodyfikowane zasady: ϵ A, ϵ C i 8-oxoG rozpoznawane przez glikozylazy i AP-endonukleazy zawarte w homogenatach tkankowych pochodzące z określonych tkanek zwierząt niezmiennych nowotworowo. Czynnikiem decydującym o przebiegu reakcji jest ilość glikozylazy DNA inkubowanej z substratem w odpowiednim buforze w 37°C przez 1 godzinę. Aktywność enzymów oblicza się z szybkości początkowych, gdzie występuje jak najmniejsze niespecyficzne hamowanie enzymu np. przez białka konkurujące o dane uszkodzenie w DNA. Uzyskane w tej metodzie wyniki wykorzystuje się w analizie statystycznej. Ponieważ jeden z badanych enzymów, glikozylaza 8-oksoguaniny ma bardzo duże powinowactwo do bezpośredniego produktu reakcji oraz miejsc apurynowych, co uniemożliwia cięcie oligonukleotydu przez kolejny enzym szlaku naprawczego; AP-endonukleazę. Mogłoby to spowodować znaczne, niekontrolowane zaniżenie wyników. Dlatego po inkubacji oligonukleotydu zawierającego 8-oksoG z ekstraktem białkowym, miejsca apurynowe przecinano chemicznie poprzez 30 minutową inkubację z (0,2 N NaOH w 70°C).

Od szczurów pobrano fragmenty jelita cienkiego po 5 dniach (waga szczura 30g) 1 i 2 miesiącach (waga szczura 200 g) od dootrzewnowego podania LPS. Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym nie podawano LPS.

Już po 5 dniach od traktowania szczurów lipopolisacharydem *S.typhimurium*, zarówno dawką 1 mg jak i 10 mg/kg wagi ciała, zaobserwowano niewielki wzrost aktywności wszystkich trzech badanych glikozylaz DNA, natomiast po podaniu LPS *E.coli* obserwowano wyraźny wzrost aktywności naprawczej jedynie dla 8-oxoG i ϵ A. Aktywności naprawcze dla obydwu uszkodzeń DNA wzrastały w miarę upływu czasu, aby po 2 miesiącach osiągnąć wartości dwukrotnie większe niż u

zwierząt kontrolnych, którym podawano 10 mg LPS i 1,5-krotnie większe u zwierząt, którym podawano LPS w ilości 1 mg niż w grupie kontrolnej.

Na podstawie zastosowanych metod stwierdzono że stan zapalny wywołany LPS *S.typhimurium* indukuje obronne enzymy naprawcze dla 8-oksoguaniny oraz ϵ A.

Aby zbadać czy wzrost aktywności naprawczej był spowodowany indukcją enzymów naprawy DNA przez stres oksydacyjny, badano poziom mRNA glikozylaz ANPG (dla ϵ A), TDG (dla ϵ C) oraz OGG1 (dla 8-oxoG), a także potencjalnego aktywatora tych enzymów, endonukleazy miejsc apurynowych APE1 metodą real-time qPCR w jelitach cienkich szczurów, którym podawano LPS *S.typhimurium*.

Zaobserwowano, że niższa dawka LPS indukowała transkrypcję jedynie dwóch enzymów naprawczych, glikozylazy TDG i AP-endonukleazy. Indukcja ta była przejściowa, osiągając maksimum po 30 dniach od podania LPS, a następnie malała. Wyższa dawka indukowała transkrypcję wszystkich badanych enzymów naprawczych, z tym, że najsilniejszy efekt obserwowano dla AP-endonukleazy, której poziom wzrastał nawet po 2 miesiącach od podania LPS. Indukcja innych enzymów była przejściowa, wzrastała po 30 dniach od podania LPS by po 2 miesiącach zmniejszyć się, w przypadku OGG1 i TDG do poziomu kontroli, w przypadku MPG powyżej kontroli. Najmniej wrażliwa na indukcję LPS była glikozylaza OGG1. Zarówno TDG jak i OGG1 należą do genów metabolizmu podstawowego.

Obserwowany wzrost aktywności po podaniu LPS był więc prawdopodobnie spowodowany wzrostem poziomu AP-endonukleazy, która jest enzymem indukowanym przez stres oksydacyjny.

Wykorzystując metodę Real-time qPCR oznaczono poziom mRNA lipooksygenazy (LOX) i cyklooksygenazy-2 (COX-2) w jelitach szczurów traktowanych LPS *S.typhimurium*. Produkty aktywności enzymów kodowanych przez te geny są mediatorami stanów zapalnych. Podanie LPS stymulowało transkrypcję zarówno lipooksygenazy jak i cyklooksygenazy, przy czym poziom mRNA lipooksygenazy obniżał się do poziomu kontroli po 2 miesiącach od podania LPS, a cyklooksygenazy utrzymywał się na podwyższonym poziomie, ale tylko po podaniu wyższej dawki (10 mg). **Stwierdzono że stan zapalny wywołany LPS *S.typhimurium* indukuje obronne enzymy naprawcze dla 8-oksoguaniny (8-oxoG), ϵ A oraz ϵ C, co jest związane głównie z indukcją transkrypcji aktywatora wszystkich badanych glikozylaz DNA, AP-endonukleazy APE1.**

Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono badania zmierzające do stwierdzenia czy stany zapalne przechodzone w wieku noworodkowym zwiększają ryzyko rozwinięcia nowotworów jelita grubego w wieku dorosłym. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem techniki mikroskopowej. Badaną grupę stanowiły zwierzęta, którym podawano dwie substancje pro-zapalne. W wieku noworodkowym szczury otrzymywały LPS *E.coli* lub *S.typhimurium* w iniekcji dootrzewnowej w dawkach 5 lub 10 mg/kg masy ciała. Zwierzęta utrzymywane były do okresu dojrzałości (2-miesięczne szczury, 220-240 g). Następnie indukowano u nich ostre ceruleinowe

zapalenie trzustki poprzez podskórne podawanie analogu CCK (cholecystokininy); ceruleiny (5 mg/kg-godz x 5 godz. CIP). Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym nie podawano LPS *S.typhi*.+CIP lub LPS *E.coli*+ CIP.

Zaobserwowano, że podanie nowonarodzonym szczurom lipopolisacharydu *E.coli* wywołuje powstawanie ognisk wczesnych przednowotworowych zmian, tzw. zaberrowanych krypt (z ang. ACF) w jelicie grubym tych zwierząt po dwóch miesiącach od podania LPS i że wzrost ten jest zależny od dawki oraz od rodzaju zastosowanej endotoksyny – która była wyższa dla (LPS) *E.coli* niż *S. typhimurium*

Na przykład; ilość zaberrowanych krypt po zastosowaniu dawki 5 mg dla szczurów po 2 miesiącach nastrzykiwania wynosiła średnio 1,2 krypty dla LPS *S. typhimurium* oraz 2,5 krypty dla LPS *E.coli*. Zaobserwowano, że dawka 10 mg indukuje średnio 2 krypty po 2 miesiącach nastrzykiwania dla LPS *S. typhimurium* oraz średnio 3,7 krypty po 2 miesiącach dla LPS *E.coli*. Podanie ceruleiny nie miało wpływu na pojawianie się zaberrowanych krypt w jelicie grubym szczurów.

Zaobserwowano, że dootrzewnowe podanie LPS *S.typhimurium* młodym szczurom indukuje aktywność naprawczą dla wszystkich badanych uszkodzeń DNA. Stymulacja ta ma charakter długotrwały i narasta aż do dwóch miesięcy od podania LPS, tzn. do czasu, w którym przerwano doświadczenie. Efekt LPS *E.coli* był podobny, ale mniejszy, gdyż nie obserwowano efektu stymulującego naprawę ϵ C, a jedynie ϵ A i 8-oxoG.

Sugeruje to, że wzrost aktywności naprawczych jest spowodowany głównie indukcją transkrypcji endonukleazy miejsc apurynowych, która stymuluje aktywność glikozylaz, a w mniejszym stopniu indukuje transkrypcję mRNA glikozylaz DNA wycinających uszkodzone zasady.

Stwierdzono, że podanie LPS zarówno od *E.coli* jak i *S.typhimurium* oseskom szczurów indukuje powstawanie wczesnych zmian nowotworowych w jelicie grubym dorosłych zwierząt.

Na podstawie uzyskanych badań po raz pierwszy stwierdzono iż, niezależnie od typu zastosowanego bakteryjnego rodzaju LPS, stany zapalne które tworzą się pod jego wpływem, przechodzone w wieku noworodkowym zwiększają ryzyko rozwinięcia nowotworów jelita grubego w wieku dorosłym.

Dodatkowo, nieprawidłowa dieta i jej poszczególne składniki mogą również indukować stres oksydacyjny w organizmie prowadząc w konsekwencji do zaburzeń w mechanizmach naprawy DNA.

Wiadomo że dieta wywiera istotny wpływ na rozwój i funkcjonowanie układu pokarmowego. Zapalenie jelitowego układu odpornościowego młodych zwierząt może spowodować krótkotrwałe efekty np. biegunkę, utratę masy ciała, zapalenie nabłonka jelitowego lub opóźnione dojrzewanie. Może to również prowadzić do długoterminowych skutków, takich jak powstawanie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i raka jelita. Model zastosowany w badaniach *in vivo* dotyczył noworodków

prosiąt ze względu na ich fizjologiczne i metaboliczne właściwości do noworodków innych ssaków u których układy antyoksydacyjne - są słabo rozwinięte. Przez co są bardziej podatne na szkodliwe działania skutki stresu oksydacyjnego.

Stres oksydacyjny jako prekursor licznych uszkodzeń kwasów nukleinowych w tym etenopochodnych zasad DNA w tkankach gryzoni i człowieka jest czynnikiem sprawczym w rozwoju wielu nowotworów. Może regulować ścieżki naprawy kwasów nukleinowych poprzez wycięcie zasad (BER) lub nukleotydów (NER) z wykorzystaniem enzymu o właściwościach endonukleazy I (APE1) rozpoznających miejsca apurynowe i apirymidynowe w DNA.

Użycie nowo narodzonych prosiąt jako organizmów modelowych, z uwagi na podobieństwa w budowie i funkcji układu pokarmowego noworodków człowieka (o wiele większe niż zwierząt laboratoryjnych), poza możliwością bezpośredniego wykorzystania wyników badań w produkcji zwierzęcej, może dostarczyć również niezbędnej wiedzy medycynie ludzkiej.

Dlatego też, w dwóch ostatnich publikacjach z cyklu, czwartej pt. „Redox and epigenetic regulation of the APE1 gene in the hippocampus of piglets: The effect of early life exposures“ oraz w piątej pt. „The effect of oxidative stress on nucleotide-excision repair in colon tissue of newborn piglets“; zbadano wpływ żywienia suplementowanych świń od 80 dnia ciąży do 28 dnia laktacji na rozwój jelitowego układu odpornościowego ich prosiąt. Pierwszym celem tego badania była ocena wpływu zwiększonego stresu oksydacyjnego na zdolność naprawy zasad i nukleotydów w tkankach okrężnicy nowonarodzonych prosiąt. Zbadano także możliwości sterowania rozwojem układu odpornościowego jelita przez odpowiedni dobór dodatków paszowych u suplementowanych matek w diecie bogatej w przeciwutleniacze a przez to rozwoju odpowiedniej mikroflory jelitowej, co pozwoliło określić na ile okres rozwoju przewodu pokarmowego u noworodków i zaburzenia tego procesu, mogą mieć wpływ na jego funkcje w wieku dojrzałym.

Badania te są związane z mechanizmem powstawania uszkodzeń i patogenezą nowotworów jelita cienkiego, grubego oraz mózgu (hipokamp) w wyizolowanym materiale genetycznym pochodzącym z tkanek zwierzęcych i ich wpływie na ekspresję genów naprawy DNA. Niezależnie od prowadzonych badań, fragmenty tkanek prosiąt (trzustki, jelita cienkiego 25% i 50% długości, dwunastnicy, wątroby i mózgu w 1,4,7, 15 i 28 dniu od rozpoczęcia suplementacji diety matek), których dieta była uzupełniana o antyoksydanty lub żelazo) - zostały wysłane do Uniwersytetu Maastricht w celu, oznaczenia aktywności enzymów systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER), (współpraca naukowa z Prof. Frederikiem van Schootenem, Prof. Rogerem Godschalkiem i Prof. Sabiną Langie).

Badania były komplementarne do prowadzonych w IBB PAN gdzie oznaczono aktywności naprawcze dla 8-oxoG, εA i εC w jelicie grubym oraz cienkim prosiąt, których matki pozostawały na diecie suplementowanej witaminami antyoksydacyjnymi, tauryną, roślinnymi katecholaminami oraz nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Badania uzupełniono dodatkowo o pomiar aktywności naprawczych uszkodzonych zasad z jelita młodych prosiąt z wykorzystaniem metody wycinania zasad

„nicking assay” w 14 i 28 dniu od momentu rozpoczęcia suplementacji diety macior karmiących wzbogaconym w wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz witaminę E. Badania także miały na celu dostarczenie informacji w jaki sposób mechanizmy epi-genetyczne i redoks, pojedynczo i razem, mogą regulować procesy naprawy DNA w analizowanych tkankach.

Zaobserwowano, że zarówno u zwierząt kontrolnych jak i pozostających na diecie suplementowanej aktywności naprawcze względem wszystkich trzech uszkodzeń DNA jedynie nieznacznie różnią się w czasie między 1 a 28 dniem suplementacji. Suplementacja diety statystycznie znacząco podwyższała aktywność enzymów naprawczych dla ϵ A (średnio 4,6 u zwierząt kontrolnych versus, 8,4 pmola/godz/mg białka grupa badana) i 8-oxoG (śr. 7,6 kontrola vs, 11,4 pmola/godz/mg białka, u badanych) w jelicie grubym prosiąt, natomiast nie miała wpływu na wycinanie ϵ C (śr. 2,8 kontrola, vs, 2,6 pmola/godz/mg białka, grupa badana).

Podobnie w różnych odcinkach jelita cienkiego pobieranego do badań (25% i 50% długości). Dieta suplementowana około dwukrotnie zwiększała aktywność naprawczą dla ϵ A (7,6 pmola/godz/mg białka, kontrola vs, 15 pmola/godz/mg białka, grupa badana) i 8oxoG (12,1 pmola/godz/mg białka, grupa kontrolna, vs, 23,2 pmola/godz/mg białka, grupa badana), natomiast jedynie nieznacznie dla ϵ C (5,0 pmola/godz/mg białka, grupa kontrolna, vs, 6,1 pmola/godz/mg białka, grupa badana).

Zaobserwowano zwiększoną aktywność glikozydaz DNA związaną z BER między poszczególnymi grupami analizowanych prosiąt. Wyraźny dwukrotny wzrost aktywności naprawczych dla ϵ A i 8-oxoG był obserwowany u zwierząt których matki pozostawały na diecie suplementowanej, w porównaniu do niskiej aktywności w naprawie ϵ C u zwierząt będących na diecie niemodyfikowanej. Aktywności dla poszczególnych glikozylaz naprawczych zaobserwowano już w pierwszym dniu po porodzie. Pozostawały one na stałym poziomie aż do końca eksperymentu (7-28 dzień życia). Stwierdzono iż, u prosiąt będących na diecie suplementowanej w substancje odżywcze i dodatkowo w przeciwutleniacze zwiększał się istotnie poziom 8-oxoG w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

Stwierdzono że obniżenie stresu oksydacyjnego przez dodatek przeciwutleniaczy może zwiększyć aktywność naprawy DNA i usprawnić utrzymanie integralności genomu.

Uzupełnienie diety w żelazo o wysokiej aktywności chemicznej, może uszkadzać komórki organizmu poprzez wytwarzanie większej ilości pęknięć w nici DNA prowadząc do niestabilności genomu.

Stres oksydacyjny wywoływano u nowonarodzonych prosiąt za pomocą iniekcji domięśniowej żelaza (200 mg) w 3 dniu po urodzeniu. Wstrzyknięcie żelaza znacznie zwiększało markery stresu oksydacyjnego DNA w jelicie do których należy 8-okso-7,8-dihydro-2 (3-dezoksyguanozyny) (8-oksydG) oraz 8-okso-7,8-dihydroguaniny (8-oxodG), która jest wydalana z moczem.

Równolegle, badano wpływ suplementacji matek będących na diecie antyoksydacyjnej i ich

potomstwa. Suplementacja powodowała zmniejszenie stężenia żelaza w jelicie grubym ($p = 0,004$) w 7 dniu i 40% redukcję 8-oxodG w DNA okrężnicy ($p = 0,044$) w 14 dniu po urodzeniu. Zdolność NER u zwierząt, które nie otrzymały przeciwutleniacza została znacznie zmniejszona do 32% w 7 dniu w porównaniu z początkową zdolnością NER w pierwszym dniu po urodzeniu. Z licznych udokumentowanych danych literaturowych i badań własnych, wynikają zależności między ekspresją genów naprawy a aktywnością enzymów systemu BER. Natomiast, nadal niewiele wiadomo na temat interakcji między wzorcami metylacji genów naprawy DNA i zmianami w ich ekspresji.

Badano także wpływ stresu oksydacyjnego na aktywność cięcia DNA związanego z APE1 i BER w hipokampie nowonarodzonych prosiąt pod wpływem suplementacji składnikami odżywczymi oraz przeciwutleniaczami zawartymi w diecie matek. Badania metylacji promotora APE1 koncentrowały się miejscach CpG zlokalizowanych w rdzeniowych wiązaniach dla TF wrażliwych na reakcje redoks, które mogą odgrywać rolę w regulowaniu ekspresji APE1. Badano również rolę glutationu (GSH) jako głównego przeciwutleniacza, który chroni komórki przed stresem oksydacyjnym poprzez utrzymywanie ich w stanie równowagi redoks.

Wysokie poziomy 8-okso-7,8-dihydro-2-deoksyguanozyny (8-oxoG) i niskie poziomy glutationu zostały wykryte u prosiąt kontrolnych (nie suplementowanych) po urodzeniu w porównaniu do prosiąt suplementowanych - mogą wskazywać na obecność stresu oksydacyjnego. Prawdopodobnie po wyczerpaniu się GSH z powodu stresu oksydacyjnego, może on być resyntezywany do poprzedniej wielkości kosztem metioniny (donor metylowy), co prowadzi do upośledzenia metylacji DNA. U zwierząt kontrolnych stres oksydacyjny wiązał się z demetylacją genomowego DNA, zmniejszoną metylacją promotora APE1 i zwiększoną ekspresją genu APE1 i co było statystycznie znaczące we wzroście aktywności systemów naprawy BER. W bieżącym badaniu ekspresja APE1 była podwyższona we wczesnym okresie po porodzie i korelowała specyficznym ze stanem metylacji trzech rejonów CpG zlokalizowanych w promotorze APE1.

W badaniach po raz pierwszy wykazano, rolę jaką pełni regulator APE1 w funkcji epigenetycznej poprzez metylację DNA w kontrolowanych reakcjach redoks indukowanych przez ekspozycje na czynniki transkrypcyjne we wczesnym etapie życia. Stwierdzono, że:

- modyfikacje epigenetyczne odgrywają istotną rolę w regulacji redoks APE1 w hipokampie noworodków i w suplementacji diety ciężarnych loch wzbogaconych w przeciwutleniacze gdzie badano stres oksydacyjny, metylację i naprawę DNA u ich potomstwa.
- interakcję pomiędzy epigenetycznymi mechanizmami regulacyjnymi w ekspresji APE1 i metylacji CpG 11 i 13 w rejonie promotora genu, gdzie znajdują się w miejsca wiązania redox – które są szczególnie wrażliwe na czynniki transkrypcyjne.
- suplementacja antyoksydantami podczas ciąży chroni potomstwo przed niekorzystnym wpływem stresu oksydacyjnego i poprawia aktywność systemu BER.

- czynniki żywieniowe zawarte w diecie oraz dodatek określonych przeciwutleniaczy mogą modulować zdolność do naprawy 8-oxoG i εA, ale nie mają wpływu na częstość wycinania tych uszkodzeń w jelitach prosiąt.
- czynniki środowiskowe takie jak dieta i jej suplementacja różnymi składnikami przeciwutleniającymi mogą zmieniać metylację genów naprawy DNA i mogą modulować aktywność systemów naprawy BER i NER oraz podatność na oksydacyjne uszkodzenia DNA w komórce.
- stres oksydacyjny zmienia ekspresję genów związanych przez zmiany w metylacji DNA, a tym samym moduluje aktywność BER i podatność na utleniające uszkodzenia DNA, hamuje NER *in vivo*, dlatego też dieta bogata w przeciwutleniacze może chronić DNA poprzez zmniejszenie poziomu stresu oksydacyjnego.

(Jest to pierwsza próba pokazania metylacji promotora APE1 i jego wpływu na reakcję redoks wywołane przez stres oksydacyjny).

W cyklu pięciu publikacji przedstawiono zestawienie zagadnienia dotyczących analizy ilościowej zjawisk jakimi są stany zapalne, choroby, jednostki chorobowe oraz stres oksydacyjny zachodzący w organizmach żywych. Na wybranych przykładach wskazano procesy wymagające szczególnej uwagi, podczas opracowania w przyszłości terapii klinicznych związanych z dietą w celu modulowania mechanizmów molekularnych w odpowiedzi na ekspozycje środowiskowe.

Literatura:

- B.N. Ames, (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer, *Free Radic.Res. Commun.* 7, 121–128.
- B.J. Appelmek, Y. An, T.A. Hekker, L.G. Thijs, D.M. MacLaren, J. de Graaf, (1994) Frequencies of lipopolysaccharide core types in *Escherichia coli* strains from bacteraemic patients, *Microbiology* 140, 1119–1124.
- C.F. Babbs, Oxygen radicals in ulcerative colitis, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 169–181.
- A. Bird, (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.* 16, 6–21.
- A. Borkowski, Ł. Ławniczak, T. Cłapa, D. Narożna, M. Selwet, D. Pęziak, B. Markiewicz, Ł. Chrzanowski, (2016) Different antibacterial activity of novel theophylline-based ionic liquids – growth kinetic and cytotoxicity studies, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130, 54–64, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.004>.
- J. Cadet, A.G. Bourdat, C. D’Ham, V. Duarte, D. Gasparutto, A. Romieu, J.L. Ravanat, (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes, *Mutat. Res.* 462, 121–128.

H. Choudhary, J. Pernak, J.L. Shamshina, M. Niemczak, R. Giszter, Ł. Chrzanowski, T. Praczyk, K. Marcinkowska, O.A. Cojocar, R.D. Rogers, (2017) Two herbicides in a single compound: double salt herbicidal ionic liquids exemplified with glyphosate, dicamba, and MCPA, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 6261–6273, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01224>.

SJ Cohen, T van den Munckhof, G, Voets J Scharringa, A, Fluit, ML Hall (2012) Comparison of ESBL contamination inorganic and conventional retail chicken meat. *Int J Food Microbiol* 154, 212–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.034>

PR Coker, KL Smith, ME Hugh-Jones (2002) Antimicrobial susceptibilities of diverse *Bacillus anthracis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3843–3845. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3843-3845.2002>

M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17, 1195–1214.

J.L Copeland (1974) *Transport Properties in Ionic Liquids*, Gordon and Breach Science Publishers, New York,

A.M. El-Shamy, K. Zakaria, M.A. Abbas, S. Zein El Abedin, (2015) Anti-bacterial and anticorrosion effects of the ionic liquid 1-butyl-1-methylpyrrolidinium trifluoromethylsulfonate, *J. Mol. Liq.* 211, 363–369, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.028>.

J. Foksowicz-Flaczyk, J. Walentowska, (2013) Antifungal activity of ionic liquid applied to linen fabric. *Int. Biodeter. Biodegr.* 84, 412–415.

D.E. Heinrichs, J.A. Yethon, P.A. Amor, C. Whitfield, (1998) The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli* the R1 core-specific β -glucosyltransferase provides a novel attachment site for opolysaccharides, *J. Biol. Chem.* 273, 29497–29505.

W.L Hough-Troutman, M. Smiglak, S. Griffin, W.M Reichert, I. Mirska, J. Jodynis-Liebert, T. Adamska, J. Nawrot, M. Stasiewicz, R.D. Rogers, J. Pernak. (2009) Ionic Liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts. *New Journal of Chemistry*, 33 (1), 26–33.

Ł. Ławniczak, A. Syguda, A. Borkowski, P. Cyplik, K. Marcinkowska, Ł. Wolko, T. Praczyk, Ł. Chrzanowski, J. Pernak, (2016) Influence of oligomeric herbicidal ionic liquids with MCPA and Dicamba anions on the community structure of autochthonic bacteria present in agricultural soil, *Sci. Total Environ.* 563–564, 247–255 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.109>.

T. Kitahora, K. Suzuki, H. Asakura, T. Yoshida, M. Suematsu, M. Watanabe, S. Aiso, M. Tsuchiya, Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease, *Dig. Dis. Sci.* 33 (1988) 951–955.

P Kowalczyk, J. M Cieśla, M KomisarSKI, J. T KuśmierEK, B Tudek. (2004) Long-chain adducts of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 550, 33–48.

P. Kowalczyk, J. Jaworek, M. Kot, B. Sokołowska, A. Bieleń, B. Janowska, J.M. Cieśla, G. Szparecki, B. Sadoś, B. Tudek. (2016) Inflammation increases oxidative DNA Damage repair and stimulates preneoplastic changes in colons of newborn rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol 67, No 2, 277–286.

P. Kowalczyk, A Borkowski G., Czerwonka T., Cłapa J.Cieśla, A. Misiewicz., M. Borowiec, M. Szala. (2018) The microbial toxicity of quaternary ammonium ionic liquids is dependent on the type of lipopolysaccharide. *Molecular Liquids – praca w recenzjach*.

S.A. Langie, A.M. Knaapen, J.M. Houben, F.C. van Kempen, J.P. de Hoon, R.W.Gottschalk, R.W. Godschalk, F.J. van Schooten, (2007) The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress, *Tox. Lett.* 168, 302–309.

S.A. Langie, P. Kowalczyk, B. Tudek, R. Zabielski, T. Dziaman, R. Olinski, F.J. van Schooten, R.W. Godschalk, (2010) The effect of oxidative stress on nucleotide-excision repair in colon tissue of newborn piglets, *Mutat. Res.* 695, 75–80.

Lista F, Faggioni G, Valjevac S et al (2006) Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-33>

J. Lukaszewicz, W. Jachymek, T. Niedziela, M. Dzieciatkowska, J. Lakomska, R. Miedzybrodzki, W. Fortuna, S. Szymaniec, M. Misiuk-Hojlo, C. Lugowski, (2003) Serological characterization of anti-endotoxin serum directed against the conjugate of oligosaccharide core of *Escherichia coli* type R4 with tetanus toxoid, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 3759–67, [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00104-4).

M. Luo, H. He, M.R. Kelley, M.M. Georgiadis, (2010) Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development, *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1247–1269.

K. Marsh, J. Boxall, R. Lichtenthaler, (2004) Room temperature ionic liquids and their mixtures – a review, *Fluid Phase Equilib.* 219, 93–98, <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2004.02.003>.

B. Markiewicz, A. Sznajdrowska, Ł. Chrzanowski, Ł. Ławniczak, A. Zgoła-Grzeškowiak, K. Kubiak, J. Nawrot, J. Pernak, (2014) Ionic liquids with a theophyllinate anion, *New J. Chem.* 38, 3146, <https://doi.org/10.1039/c4nj00463a>.

Mellata M (2013) Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis* 10:916–932. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1533>

R. Meneghini, (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 23, 783–792.

Liebana E, Carattoli A, Coque TM et al (2013) Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis* 56,1030–1037. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1043>

R.A. Lee, H.A. Kim, B.Y. Kang, K.H. Kim, Hemoglobin induces colon cancer cell proliferation by release of reactive oxygen species, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 5644–5650.

N.A. Nnalue, G.N. Khan, N. Mustafa, (1999) Cross-reactivity between six Enterobacteriaceae complete lipopolysaccharide core chemotypes, *J. Med. Microbiol.* 48, 433–441.

T. Payagala, D. Armstrong. W., Chiral ionic liquids: a compendium of syntheses and applications (2005-2012). *Chirality*, 24(1), 17-53, 2012. doi: 10.1002/chir.21975.

- J. Pernak, B. Markiewicz, A. Zgoła-Grześkowiak, Ł. Chrzanowski, R. Gwiazdowski, K. Marcinkowska, T. Praczyk, (2014) Ionic liquids with dual pesticidal function, RSC Adv. 4 39751, <https://doi.org/10.1039/C4RA04816D>.
- J. Pernak, M. Niemczak, K. Zakrocka, T. Praczyk, (2013) Herbicidal ionic liquid with dualfunction, Tetrahedron 69, 8132–8136, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.053>.
- J. Pernak, K. Czerniak, M. Niemczak, Ł. Chrzanowski, Ł. Ławniczak, P. Fochtman, K. Marcinkowska, T. Praczyk, (2015) Herbicidal ionic liquids based on esterquats, New J. Chem. 39, 5715–5724, <https://doi.org/10.1039/C5NJ00609K>.
- N.V. Plechkova and K.R. Seddon (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. Chem. Soc.Rev 37, 123-150.
- E. Seeberg, L. Eide, M. Bjoras, (1995) The base excision repair pathway, Trends Biochem.Sci. 20, 391–397.
- D.N. Seril, J. Liao, G.Y. Yang, C.S. Yang, Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models, Carcinogenesis 24 (2003) 353–362.
- H. Shoji, B. Koletzko, (2007) Oxidative stress and antioxidant protection in the perina-tal period, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 10, 324–328.
- Schaur RJ. (2003) Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Mol Aspects Med. Aug-Oct;24 (4-5),149-59.
- I.L. Steffensen, H.A. Schut, J.M. Nesland, K. Tanaka, J. Alexander, Role of nucleotide excision repair deficiency in intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia (Min) mice, Mutat. Res. 611 (2006) 71–82.
- Y. Takebayashi, K. Nakayama, A. Kanzaki, H. Miyashita, O. Ogura, S. Mori, M. Mutoh, K. Miyazaki, M. Fukumoto, Y. Pommier, Loss of heterozygosity of nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implication for their roles of carcinogenesis in human solid tumors, Cancer Lett. 174 (2001) 115–125.
- Thuy Pham TP, Cho C-W, Yun Y-S (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. Water Res. 44, 352–372. doi:10.1016/j.watres.2009.09.030
- A. Wellejus, H.E. Poulsen, S. Loft, (2000) Iron-induced oxidative DNA damage in ratsperm cells *in vivo* and *in vitro*, Free Radic. Res. 32, 75–83
- Welton T (1999) Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. Chem. Rev. 99, 2071-2084.
- Wilkes J. (2002) A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. Green Chem. 4, 73–80. doi:10.1039/b110838g
- N.H. Zawia, D.K. Lahiri, F. Cardozo-Pelaez, (2009) Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease, Free Radic. Biol. Med. 46, 1241–1249.
- Q. Zhang, S. Zhang, Y. Deng, (2011) Recent advances in ionic liquid catalysis, Green Chem. 13, 2619, <https://doi.org/10.1039/c1gc15334j>.

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

5.1 Zestawienie bibliometryczne osiągnięć naukowych wg. WoS :

lp	Typ publikacji	PRZED UZYSKANIEM TYTUŁU DOKTORA		PO UZYSKANIU TYTUŁU DOKTORA		ŁĄCZNIE
		autor	współautor	autor	współautor	
I	Orginalne prace recenzowane (z IF) w bazie WoS	1	-	4 w tym 2*	21 w tym 3*	26
II	Rozdziały w książkach i monografiach podręcznikach i inne publikacje w bazie WoS	-	1	-	-	1
III	Rozdziały w książkach i monografiach podręcznikach i inne publikacje poza bazą WoS	-	-	-	6	6
IV	Publikacje popularnonaukowe	-	-	15	17	32
Publikacje łącznie (pkt I-IV)		1	1	20	44	65
V	Zaproszenie wystąpienia konferencyjne	7	2	17	12	38
VI	Pozostałe abstrakty konferencyjne	5	1	-	-	6
VII	Raporty i ekspertyzy naukowe, dokumentacja badań i inne publikacje	-	-	-	5	5
Łącznie (suma pkt V-VII)		12	3	17	17	49
Impact factor		3,61		64,869		68,479
Punkty MNiSW		35		857		892
Liczba cytacji		37		123		160
Index Hirscha						7

* publikacje stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego określonego w art. 16 ust 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym, IF-impact factor WoS -Web of Science, MNiSW- Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

IF=14,375, MNiSW=142 (*Dane ze stycznia 2018)

5.2 Przed uzyskaniem tytułu doktora

Pracę naukową rozpocząłem w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN) cyklem badań nad powstawaniem i lokalizacją miejsc uszkodzeń ludzkiego genu *p53* przez występujący w środowisku aldehyd chlorooctowy (CAA) oraz produkt peroksydacji lipidów – *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Oba typy związków indukują powstawanie w organizmie człowieka egzocyklicznych adduktów zasad DNA takich jak: etenoadenina (ϵ A), etenocytozyna (ϵ C) i etenoguanina (ϵ G). Wstępne badania były prowadzone na plazmidzie zawierającym pełnej długości cDNA genu *p53* który modyfikowano *in vitro* różnymi stężeniami CAA od 0,5 do 360 mM i lokalizowano miejsca

uszkodzenia zasad w gorących miejscach mutacji genu z wykorzystaniem metody odcisku palca polimerazy DNA (ang. DNA polymerase fingerprint analysis- DPFA).

Uzyskane wyniki badań były podstawą do obrony pracy magisterskiej pt. Lokalizacja uszkodzeń ludzkiego genu *p53* przez aldehyd chloroocetowy metodą odcisku palca polimerazy DNA. Zostały również przedstawione w postaci monografii:

- a) pt. Localisation of chloroacetaldehyde- induced DNA damage in human *p53* gene by DNA polymerase fingerprint analysis. W: Exocyclic DNA adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis in (Singer B. and Bartsch H. eds), Tudek, B., **Kowalczyk P.**, Cieśla, J.M. (1999). IARC Scientific Publications No. 150. Lyon IARC. pp. 279-293.

Następnie rozpoczęto badania nad drugim z analizowanych związków *trans*-4-hydrokso-2-nonenalem (HNE), który jest jedną z głównych pochodnych nienasyconych kwasów tłuszczowych. W celu uzyskania wstępnych danych o naprawie adduktów HNE do DNA prowadzono *in vitro* modyfikację plazmidu, niosącego cDNA ludzkiego genu *p53* w określonych warunkach: (1 mM lub 100 mM HNE, w pH 5.5 przez 2 godziny).

Podjęto próbę identyfikacji adduktów HNE do wszystkich zasad występujących w DNA, a zwłaszcza do cytozyny i tyminy, które wcześniej nie były badane. Stwierdzono, że HNE może tworzyć addukty zawierające długie, alifatyczne łańcuchy boczne ze wszystkimi czterema zasadami występującymi w DNA. Związek ten ma zdolność wiązania się zarówno do kwasów nukleinowych jak i do białek w różnych przedziałach komórkowych, a także ma znaczenie regulatorowe dla różnych procesów metabolicznych, np. transkrypcji poprzez wiązanie się z czynnikami transkrypcyjnymi czy też powstawania wolnych rodników w mitochondriach. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono iż występowanie egzocyklicznych adduktów w tkankach ludzi i zwierząt a także wzrost ich poziomu w wielu stanach patologicznych sugeruje, że mogą one być uszkodzeniami krytycznymi w kancerogenezie, szczególnie w nowotworach których etiologia związana jest z dietą wysokotłuszczową (jelita grubego, sutka, prostaty) lub procesami oksydacyjnymi. Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w publikacji:

- b) pt. Long-chain adducts of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. **Kowalczyk, P.**, Cieśla, J. M., Komisarski, M., Kuśmierk, J. T., Tudek, B. (2004). Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 550; 33–48. (IF=3,680), (MNI₅W=35).

Były również prezentowane na licznych konferencjach naukowych w formie prezentacji ustnych lub plakatów, a także były podstawą do napisania rozprawy doktorskiej pt. „Sequence-dependent induction of exocyclic DNA adducts by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal and chloroacetaldehyde, mutagenesis and repair in *Escherichia coli* cells”, praca w języku angielskim.

5.3 Po uzyskaniu stopnia doktora

Opanowanie zaawansowanego warsztatu badawczego wykorzystującego najnowsze techniki biologii molekularnej umożliwiło mi już na etapie studiów doktoranckich, szeroką współpracę naukową z różnymi grupami i ośrodkami badawczymi w kraju i za granicą w ramach trzech projektów badawczych. Wtedy także podjąłem badania (stosując poznane techniki) na wybranych tkankach zwierzęcych i w modelowych komórkach bakteryjnych *E.coli* w patogenezie przewodu pokarmowego. Po uzyskaniu stopnia doktora przebieg mojej dotychczasowej kariery naukowej można podzielić na cztery główne tematy badawcze (5.3.1-5.3.4) oraz dodatkową tematykę naukową (5.3.5).

5.3.1. Kontynuacja badań związanych z rolą egzocyklicznych adduktów zasad DNA w komórkach bakteryjnych indukowanych przez aldehyd chlorooctowy (CAA) i *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE):

- a) analiza właściwości mutagennych, sekwencyjnej zależności oraz kinetyki ich naprawy przez enzymy naprawy DNA z grupy glikozydaz.
- b) zastosowanie metody transformacji bakteryjnej genu *lacZ* w systemie faga M13 z zaindukowanym systemem SOS do analizy mutacji w szczepach *uvr*- *E.coli* posiadających polimerazy układu SOS DNA: Pol II, Pol IV czy Pol V.
- c) Badania związane z wpływem produkcji peroksydacji lipidów indukowanych HNE na powstawanie uszkodzeń DNA i jego naprawę w leukocytach krwi pacjentów (PBL) oraz tkankach okrężnicy ze stwierdzonym nowotworem jelita grubego (CRC). Poziomy adduktów były mierzone metodą LC / MS / MS z wykorzystaniem metody ^{32}P -postlabelingu. Aktywności naprawcze uszkodzeń były analizowane metodą wycinania zasad („nicking assay”).

Badania te prowadziłem we współpracy z prof. dr hab. Barbarą Tudek w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, których wynikiem są prace naukowo-badawcze (załącznik 4 punkt A2, A14, A17, A20). Wyniki były prezentowane także na konferencjach zjazdowych (załącznik 4 punkt K10, K15, K16, K17, E1).

5.3.2. Dynamika i molekularne mechanizmy rozwoju i przebudowy nabłonka przewodu pokarmowego u zwierząt.

- a) Badano również rolę stanów zapalnych indukowanych lipopolisacharydem (LPS) *E.coli* oraz *S.typhimurium* w modulowaniu naprawy 8-oksoG, ϵA i ϵC w jelicie cienkim szczurów oraz w powstawaniu wczesnych zmian nowotworowych w jelicie grubym tych zwierząt.

(Badania wchodzi w skład Osiągnięcia Naukowego, publikacja B3).

- b) Badano wpływ suplementacji (dodatki paszowych) w diecie karmiących macior witaminami antyoksydacyjnymi, tauryną, roślinnymi katecholaminami oraz nienasyconymi kwasami tłuszczowymi na aktywności naprawcze oksydacyjnych uszkodzeń DNA; 8-oksoG, 1, N^6 -

etenoadeniny (ϵA) i 3, N^4 -etenocytozyny (ϵC) w tkankach prosiąt (jelita grubego i mózgu) we wczesnym okresie postnatalnym.

(Badania wchodzi w skład Osiągnięcia Naukowego, publikacja B4 i B5).

c) Dodatkowo, badano wpływ dwóch dawek żelaza (75 i 200mg) u młodych prosiąt na aktywności naprawcze oksydacyjnych uszkodzeń DNA; 8-oksoguaniny (8-oksoG), 1, N^6 -etenoadeniny (ϵA) i 3, N^4 -etenocytozyny (ϵC) w wybranych tkankach prosiąt (trzustki, jelita cienkiego 25% i 50% długości, dwunastnicy, wątroby) we wczesnym okresie postnatalnym tych zwierząt w 4, 7 i 14 dniu, i analizowano je za pomocą metody „nicking assay”. Podanie obydwu dawek żelaza w analizowanych tkankach, zwiększało aktywności naprawcze dla 8-oxoG, ϵA i ϵC , ale standardowo stosowana dawka (200 mg) miała słabszy wpływ niż dawka niższa (75 mg). Niewykluczone, że standardowo stosowana dawka żelaza jest zbyt wysoka, co powoduje niekontrolowaną produkcję reaktywnych form tlenu utleniających białka naprawcze i hamujących ich aktywność.

Może to być związane ze stresem oksydacyjnym powstałym po podaniu żelaza i zwiększeniu transkrypcji niektórych enzymów w kompleksach naprawczych, np. endonukleazy miejsc apurynowych (APE1), która stymuluje cały proces naprawczy.

Badania prowadzono przy współpracy z prof. Romualdem Zabielskim z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie i prof. Pawłem Lipińskim z Instytutu Genetyki i Zwierząt (IGHZ) w Jastrzębcu w ramach projektu pt. „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego”. 2003-2006 PBZ-KBN-093/P06/2003. Wynikiem tej współpracy jest powstanie prac naukowo-badawczych (**załącznik 4 punkt A16, A18, A19**). Wyniki były prezentowane także na konferencjach zjazdowych (**załącznik 4 punkt E3 i E5, K12, K13, K14, K18, K19, K22, K24, K25, K26, K27, K28, K29**) oraz rozdziale w podręczniku akademickim (**I-a**).

5.3.3 Wpływ cieczy jonowych na długość LPS w komórkach bakteryjnych oraz analiza bakterii redukujących siarczany i tworzących biofilmy

a) We współpracy z Zakładem Geomikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, Uniwersytetu im. Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie, prowadzone są badania pozwalające na określenie wpływu cieczy jonowych na błonę i ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Na podstawie uzyskanych badań stwierdzono, że ciecze jonowe zawierające łańcuch alkilowy przy azocie czwartorzędowym mogą zmieniać wypadkowy ładunek powierzchniowy komórki co może prowadzić do znacznej agregacji komórek. Przyczyną może być przenikanie łańcucha alkilowego do zewnętrznej błony bakteryjnej, co powoduje zmianę płynności błony. Badania w tym zakresie są prowadzone w błonach bakterii poprzez oznaczenie potencjału elektrokinetycznego, dyfuzji lateralnej poddanych działaniu roztworów cieczy jonowych.

(Badania wchodzi w skład Osiągnięcia Naukowego, publikacja B2).

- b) Dodatkowo, prowadzone są oznaczenia produktów peroksydacji lipidów (HNE i MDA), aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy) oraz oksydacyjnych uszkodzeń DNA (zwłaszcza 8-oxoG) w wyniku oddziaływania komórek z badanymi związkami, przy użyciu enzymów naprawy DNA z grupy glikozylaz.
- c) Badany jest także stopień i szybkość biodegradacji cieczy jonowych oraz analiza ich toksyczności względem zespołów mikrobiologicznych tworzących biofilmy.
- d) We współpracy z Instytutem Biotechnologii i Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie im. Prof. Wacława Dąbrowskiego prowadzone są badania mające na celu określenie wpływu cieczy jonowych na błonę i ścianę komórkową drożdży i grzybów.
- e) We współpracy z Zakładem Geomikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Uniwersytetu im. Jana Kochanowskiego w Kielcach prowadzono także badania dotyczące; stresu oksydacyjnego bakterii (*Pseudomonas putida*) oddziałującego z nanostrukturami węgla krzemowego, drenażu w strefie wietrzenia łupków piritotwórczych w Rudawach Janowickich, mikroorganizmów redukujących siarczan w wodach naftowych i w pożywce z cynkiem oraz roli ściany komórkowej *Proteus mirabilis* w tworzeniu biofilmu. Wynikiem tej współpracy jest powstanie prac naukowo-badawczych (**załącznik 4 punkt A6, A7, A8, A11, A12**). Wyniki były prezentowane także na konferencjach zjazdowych (**załącznik 4 K9, K23**).

5.3.4 Badania interakcji środowiskowych komórek bakterii, grzybów i ssaków z nanokompozytami, nanocząstkami oraz metalami ciężkimi

W mojej pracy naukowo-badawczej zajmowałem się interakcjami środowiskowymi komórek:

- a) bakterii wytwarzających patogeny bytujące w piórach ptaków, ich właściwościach biochemicznych i genetycznych oraz wpływie na zdrowie człowieka.
(Badania wchodzi w skład Osiągnięcia Naukowego, publikacja B1).
- b) w hodowlach komórkowych fibroblastów z nanokompozytem (grafenem) jako biorusztowanie zastosowane w inżynierii tkankowej.
- c) ssaków z nanocząstkami na bazie dendrymeru do spersonalizowanej terapii przewlekłej białaczki limfocytowej: ukierunkowanie na szlak sygnałowy BCR.
- d) bakterii środowiskowych w interakcji z metalami ciężkimi zawartymi w pyłach ulicznych oraz ogniach paliwowych
- e) grzybów w wytwarzaniu enzymów lignolitycznych i aminopeptydaz

Badania zostały wykonane z wykorzystaniem różnych procesów i technik stosowanych w inżynierii tkankowej, mikrobiologii, biologii molekularnej (**załącznik 4 punkt I-e**). Są one oparte często na systemach do analizy i rozdziału materiału genetycznego z użyciem specjalistycznej aparatury jak np. elektroforezy kapilarnej i cytometrii przepływowej. Współpracę naukową z tego obszaru badań

podjąłem z krajowymi ośrodkami naukowymi takimi jak Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Wydziałem Nauk o Zwierzętach oraz Wydziałem Rolnictwa i Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydziałem Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego a także innymi ośrodkami (załącznik 4 punkt F). Wynikiem tej współpracy jest powstanie prac naukowo-badawczych (załącznik 4 punkt A1, A3, A4, A5, A9, A10, A13, A15). Wyniki były prezentowane także na konferencjach zjazdowych (załącznik 4 punkt E2 i 4, K11, K20, K21), rozdziału w książce w postaci monografii (załącznik 4 punkt D-a) oraz publikacji z listy ministerialnej B (załącznik 4 punkt D-b, D-1-19c, 21-23c).

5.3.5. Wpływ stresu oksydacyjnego na bioenergetyczne funkcje komórek układu sercowo-naczyniowego i ruchowego w oparciu o nowe techniki analizy - dodatkowa tematyka badawcza

Moją dodatkową tematykę, stanowią badania związane z analizą stresu oksydacyjnego w krzepnięciu krwi po zastosowaniu leków przeciwplatek, przeciwzakrzepowych i trombolitycznych oraz ich wpływie na funkcje oraz metabolizm mitochondriów płytek krwi w organizmach żywych, jako nowego markera stresu oksydacyjnego w chorobach niedokrwiennych serca z zakresu medycyny interwencyjnej. Stres oksydacyjny, oprócz badań związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, rakiem lub cukrzycą typu 2, obejmuje również choroby układu krwiotwórczego.

Tlen molekularny jest kluczowym substratem metabolizmu tlenowego specyficznym do monitorowania utleniania komórek, funkcjonowania mitochondriów i metabolicznych implikacji sygnalizacji komórkowej. Jego obecność w tkankach, umożliwia ocenę w czasie rzeczywistym przemijających zmian w oddychaniu komórkowym, gradientach tlenu i reakcjach fizjologicznych w różnych modelach komórkowych. Jedną z metod umożliwiających pomiar poziomu tlenu wewnątrzkomórkowego jest metoda która umożliwia analizę stężenia tlenu cząsteczkowego w pojedynczej warstwie komórek i ich przemijających zmian aktywności metabolicznej w czasie rzeczywistym (z ang. oxygen consumption assay). Jest ona niezwykle przydatna w badaniu stanów niedotlenienia zawartych w mitochondriach płytek krwi pod wpływem różnych związków chemicznych o działaniu farmakologicznym. Analizy te są obecnie szeroko stosowane w wielu dziedzinach biologii komórki (w tym różnicowaniu i proliferacji komórek, interakcji międzykomórkowych, nowotworów i toksykologii).

Zastosowanie leków aktywujących lub obniżających działanie płytek krwi oraz różnych związków środowiskowych, może wpływać na działanie mitochondriów płytek krwi poprzez nadmierne dostarczanie lub wyczerpywanie cząsteczkowego tlenu. Co z kolei, może powodować interakcje z innymi składnikami komórki w tym z białkami i kwasami nukleinowymi prowadząc do ich utlenienia.

W literaturze nie ma bezpośrednich danych na ten temat, dlatego istnieje potrzeba wyjaśnienia ich roli. Współpracę naukową z tego obszaru badań podjąłem z krajowymi ośrodkami naukowymi i

medycznymi takimi jak; Instytut Kardiologii im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego w Aninie, Uniwersytetem Medycznym w Białymstoku, Poznaniu i w Warszawie. Wstępne wyniki badań były prezentowane na konferencjach zjazdowych (**załącznik 4 punkt K1-K8**) oraz w publikacjach z listy ministerialnej B (**załącznik 4 punkt D-20c, D-24-26c**).

Paweł Kowalczyk

podpis