



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY
—
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny

**Biotechnologiczne metody intensyfikacji biosyntezy
aktywnych biologicznie naftochinonów w kulturach *in vitro*
Rindera graeca (A. DC.) Boiss. & Heldr.**

Mateusz Kawka

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Katarzyna Sykłowska-Baranek
Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej

Promotor pomocniczy: dr n. biol. Irena Bubko
Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków

Warszawa 2024

Mateusz Kawka

Badania opisane w niniejszej pracy były finansowane z projektów:

Grant Narodowego Centrum Nauki „Preludium”, pt.
„Mechanizm aktywności przeciwnowotworowej oraz biotechnologiczne
otrzymywanie rinderolu - nowej pochodnej naftochinonu”,
nr projektu 2019/33/N/NZ7/01782,
kierownik projektu: lek., mgr inż. Mateusz Kawka

Grant BIOTECHMED-2 w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki
„Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”, pt.
„Bifunkcjonalne kserożelowe platformy do intensyfikacji biosyntezy
cytotoksycznych naftochinonów w hodowlach *in vitro* korzeni
transgenicznych”,
kierownik projektu: dr hab. inż. Maciej Pilarek, profesor PW
wykonawcy: prof. dr hab. Katarzyna Sykłowska-Baranek
lek., mgr inż. Mateusz Kawka
mgr inż. Kamil Wierzchowski
mgr inż. Bartosz Nowak

Streszczenie

Temat przedstawionej pracy doktorskiej obejmuje badania nad opracowaniem różnorodnych technik biotechnologicznych ukierunkowanych na intensyfikację wytwarzania w kulturach *in vitro* korzeni *Rindera graeca* (A. DC.) Boiss. & Heldr. z rodziny Boraginaceae, metabolitów z grupy barwnych naftochinonów, wykazujących aktywność biologiczną. W badaniach skupiono się przede wszystkim na zastosowaniu zróżnicowanych konstruktyw materiałowych w celu immobilizacji biomasy korzeni różnego pochodzenia oraz ekstrakcji *in situ*. Ponadto, celem było zbadanie mechanizmu aktywności cytotoksycznej rinderolu, nowej pochodnej naftochinonu zidentyfikowanej w profilu chemicznym badanego gatunku na podstawie wyróżniającej cytotoksyczności względem komórek nowotworowych, w zakresie indukowania procesu apoptozy.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowana została nowa technika izolacji *in situ* metabolitów wyspecjalizowanych z grupy barwnych pochodnych naftochinonu, w tym rinderolu oraz deoksyzikoniny, z użyciem innowacyjnych materiałów w postaci kserożeli krzemooorganicznych oraz pianki poliuretanowej. Ponadto, w badaniach biologicznych na modelu *in vitro* komórek nowotworowych HeLa, wykazana została proapoptotyczna aktywność rinderolu.

W prowadzonych pracach badawczych wykonano serie hodowli *in vitro* korzeni *R. graeca* w różnorodnych układach hodowlanych, modyfikowanych przez zastosowanie wybranych wariantów kserożeli krzemooorganicznych oraz konstruktyw z pianki poliuretanowej. Eksperymentalnie zweryfikowano wpływ na wzrost korzeni i produktywność analizowanych układów hodowlanych następujących właściwości kserożeli: postaci kserożelu (aerożel zdeintegrowany lub monolityczny konstruktyw), wielkości porów (kserożele mezoporowate, makroporowate oraz precypitaty kserożelu) oraz funkcjonalizację powierzchni grupami funkcyjnymi (hydroksylową, metylową, karboksylową i aminową). Badaniom wstępnym poddane zostały korzenie anatomiczne, regenerowane z tkanki kalusowej oraz dwie linie korzeni transgenicznych. Następnie, do badań z użyciem kserożeli wybrano linię RgTR17 korzeni transgenicznych, charakteryzująca się najwyższym potencjału biosyntezy rinderolu i deoksyzikoniny. Hodowle tej linii prowadzono przez 28 do 42 dni (w zależności od eksperymentu) w pożywce płynnej DCR (Gupta & Durzan, 1985). W trakcie badań w poszczególnych wariantach hodowlanych przeprowadzono oznaczenia przyrostu świeżej i suchej biomasy, zawartości badanych pochodnych naftochinonu we wszystkich fazach układów hodowlanych (metodą chromatograficzną HPLC-DAD-UV-VIS) oraz kinetyki

zużycia cukrów przez biomasę. Dokonano również szczegółowej charakterystyki opracowanych materiałów kserożelowych.

Ponadto, wykazano, że u podstaw cytotoksyczności rinderolu leży jego zdolność do wywoływania apoptozy, depolaryzacji mitochondriów oraz morfologicznych zmian świadczących o indukcji programowanej śmierci komórkowej na modelu *in vitro* raka szyjki macicy (linia komórek HeLa).

Analiza uzyskanych wyników wykazała najwyższą produktywność, w stosunku do biosyntezy rinderolu oraz deoksyzikoniny, układów hodowlanych uzupełnionych kserożelami funkcjonalizowanymi grupami metylowymi zastosowanymi w formie zdezintegrowanej. Podobnie korzystną odpowiedź zaobserwowano w przypadku funkcjonalizacji kserożeli grupami hydroksylowymi. Zdecydowanie negatywny wpływ na proliferację korzeni *R. graeca* odnotowano w układach hodowlanych suplementowanych kserożelami z grupami karboksylowymi i aminowymi, które spowodowały całkowite zahamowanie wzrostu biomasy. Efekt ten okazał się być skutkiem znaczącego wpływu tych grup na pH medium hodowlanego. Porównanie wpływu porowatości kserożeli na efektywność adsorpcji metabolitów wtórnych pozwoliła zaobserwować wyższe wyniki dla kserożeli mezoporowatych, cechujących się najmniejszą z badanych średnicą porów. Zastosowanie kserożeli w formie monolitycznych konstruktyw miało ograniczony wpływ na przyrost biomasy oraz wytwarzanie pochodnych naftochinonu w porównaniu do formy zdezintegrowanej, co stanowiło bezpośrednią konsekwencję znacząco mniejszej powierzchni aktywnej odpowiadającej za adsorpcję i oddziaływanie z tkanką korzenia. Drugi z badanych materiałów, konstruktyw z pianki poliuretanowej, zastosowano w eksperymentalnych układach hodowlanych do symultanicznej immobilizacji biomasy oraz izolacji *in situ* metabolitów wyspecjalizowanych. Pianki poliuretanowe wykazały silnie intensyfikujący wpływ na wytwarzanie rinderolu, jednak znacząco ograniczały przyrost korzeni.

Badania nad aktywnością biologiczną rinderolu wykazały jego umiarkowanie wysoki cytotoksyczny wpływ na wykorzystane do badań komórki nowotworowe HeLa. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń nad mechanizmem tej aktywności sugerują indukujący wpływ rinderolu na programowaną śmierć komórkową, na co wskazuje proporcjonalny do dawki i czasu inkubacji wzrost frakcji komórek apoptotycznych, depolaryzacja błony mitochondriów oraz zmiany morfologiczne komórek widoczne w analizie mikroskopowej.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań opracowano i scharakteryzowano optymalne warunki intensyfikacji biosyntezy barwnych pochodnych naftochinonów w hodowlach *in vitro* korzeni *R. graeca*. Cel ten został osiągnięty przez zastosowanie techniki

izolacji *in situ* badanych metabolitów wyspecjalizowanych z użyciem kserożeli krzemoorganicznych. Eksperymentalnie określone zostały korzystne właściwości aerożeli w postaci preferencyjnie najmniejszej średnicy porów, funkcjonalizacji materiałów za pomocą grup metylowych powodujących wzrost lipofilowości oraz możliwie największej dezintegracji materiału i jego rozproszenia w układzie hodowlanym. W układach hodowlanych z pianką poliuretanową, odnotowano porównywalną wydajność biosyntezy rinderolu, okupioną jednak zahamowaniem przyrostu biomasy. Dla wyizolowanego rinderolu określono umiarkowanie wysoką cytotoksyczność i aktywność proapoptotyczną.

Wykaz publikacji i doniesień zjazdowych wchodzących w skład pracy doktorskiej

W zakres przedstawionej rozprawy doktorskiej wchodzi cykl sześciu publikacji.

Wśród publikacji dwie są pracami przeglądowymi, a pozostałe cztery artykułami oryginalnymi. Ponadto wyniki prac badawczych, dotyczących zastosowania kserożeli krzemoorganicznych do hodowli biomasy roślinnej, intensyfikacji metabolizmu wyspecjalizowanego oraz ekstrakcji *in situ*, uzyskały ochronę patentową - Pat.242593.

Łączny wskaźnik oddziaływania Impact Factor cyklu publikacji wynosi **19,301**, a suma punktów MEiN **460**:

1. **Kawka, M., Pilarek, M., Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., 2017.** Roślinne metabolity jako kluczowy bioprodukt biotechnologii roślin. *Prospects in Pharmaceutical Sciences* 15, 68–79. <https://doi.org/10.56782/pps.80>. (MNiSW 5)
2. **Kawka, M., Pilarek, M., Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., 2017.** Ekstrakcja *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych. *Prospects in Pharmaceutical Sciences* 15, 60–67. <https://doi.org/10.56782/pps.78>. (MNiSW 5).
3. **Nowak, B., Kawka, M., Wierzchowski, K., Sykłowska-Baranek, K., Pilarek, M., 2021.** MTMS-Based Aerogel Constructs for Immobilization of Plant Hairy Roots: Effects on Proliferation of *Rindera graeca* Biomass and Extracellular Secretion of Naphthoquinones. *J Funct Biomater* 12, 19. <https://doi.org/10.3390/jfb12010019>. (IF₂₀₂₁ 4,901; MNiSW 100).
4. **Kawka, M., Bubko, I., Koronkiewicz, M., Gruber-Bzura, B., Graikou, K., Chinou, I., Jeziorek, M., Pietrosiuk, A., Sykłowska-Baranek, K., 2022.** Polyurethane Foam Rafts Supported *In vitro* Cultures of *Rindera graeca* Roots for Enhanced Production of Rinderol, Potent Proapoptotic Naphthoquinone Compound. *Int J Mol Sci* 23, 56. <https://doi.org/10.3390/ijms23010056>. (IF₂₀₂₂ 5,600; MNiSW 140).

5. Wierzchowski, K., Nowak, B., Kawka, M., Więckowicz, P., Dąbkowska-Suszał, K., Pietrosiuk, A., Sykłowska-Baranek, K., Pilarek, M., 2022. Selective Impact of MTMS-Based Xerogel Morphology on Boosted Proliferation and Enhanced Naphthoquinone Production in Cultures of *Rindera graeca* Transgenic Roots. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 13669. <https://doi.org/10.3390/ijms232213669>. (IF₂₀₂₂ 5,600; MNiSW 140).
6. Wierzchowski, K., Nowak, B., Kawka, M., Sykłowska-Baranek, K., Pilarek, M., 2024. Effect of Silica Xerogel Functionalization on Intensification of *Rindera graeca* Transgenic Roots Proliferation and Boosting Naphthoquinone Production. *Life* 14, 159. <https://doi.org/10.3390/life14010159>. (IF₂₀₂₃ 3,200; MNiSW 70).
7. Patent Pat.242593 udzielony 04.10.2023 r. na rzecz Politechniki Warszawskiej oraz Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za wynalazek: „Zastosowanie aerozeli krzemooorganicznych do proliferacji i immobilizacji biomasy roślinnej w hodowlach *in vitro* oraz zastosowanie aerozeli do intensyfikacji produkcji metabolitów roślinnych i intensyfikacji ekstrakcji *in situ* metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro*”. Twórcy: Pilarek M., Nowak B., Wierzchowski K., Kawka M., Sykłowska-Baranek K.

Tematyka objęta pracą doktorską była również prezentowana w postaci plakatów na konferencjach naukowych zagranicznych i krajowych:

1. Kawka M., Pilarek M., Sykłowska-Baranek K. *In situ* extraction approach for enhancement of secondary metabolites production in *Rindera graeca* hairy root cultures. 13th Warsaw International Medical Congress, 11-14.05. 2017, Warsaw, Poland. Abstract book: ISBN 978-83-7637-422, s. 212.
2. Mańko K., Kawka M., Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., Pietrosiuk A. A simultaneous root immobilization and *in situ* extraction for intensification of secondary metabolism in *Rindera graeca in vitro* cultures. *BioTechnologia, Journal of Biotechnology, Computational Biology and Biotechnology*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych OWN, vol. 99, nr 3, 2018, s 262.
3. Kawka M., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A. Roślinne systemy tkankowe w intensyfikacji wytwarzania metabolitów wtórnych. VII Cykliczna Ogólnopolska Konferencja Naukowa Oddziału Białostockiego Polskiego Towarzystwa Botanicznego „Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Nowe

wyzwania w badaniach botanicznych i środowiskowych”. Białystok 14-15.09.2018, s 15.

4. **Kawka M., Nowak B., Wierzchowski K., Sykłowska-Baranek K., Pilarek M.** Bifunctional constructs for *in vitro* transgenic roots immobilisation and *in situ* product removal. 3rd International Scientific Conference “Chemical Technology and Engineering”, Chemical Technology and Engineering. Proceedings, 2021, Lviv Polytechnic National University, s. 164-165.

Łączna liczba punktów MNiSW, jaką uzyskały prace z moim udziałem wynosi 1050, łączny IF = 38,372, liczba cytowań = 34 (wg. Web of Science, bez autocytowań), indeks Hirscha h=4.