



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań University of Life Sciences

## **Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

# **Autoreferat**

**Anna Olejnik**

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań 2014

**1. Imię i nazwisko:** Anna Olejnik

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 2001 – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologia - biotechnologia, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; tytuł pracy doktorskiej: „Optymalizacja produkcji heterologicznych białek w układzie komórek owadzych i zrekombinowanych bakulowirusów”, promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek
- 1993 – tytuł magistra inżyniera technologii żywności i żywienia, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu

**3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- od 2001 do chwili obecnej – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, adiunkt
- 1995-2001 – Akademia Rolnicza w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, asystent
- 1993-1995 – Akademia Rolnicza w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, starszy referent techniczny

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

**4.A Tytuł osiągnięcia naukowego będącego podstawą postępowania habilitacyjnego**

Olejnik A. (2014): Analiza aktywności biologicznej ekstraktu z owoców czarnej porzeczki z wykorzystaniem metod *in vitro*. Rozprawa naukowa 472, 1-114, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Recenzent pracy: prof. dr hab. Jadwiga Jodynis-Liebert (Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

Badania będące podstawą rozprawy stanowią podsumowanie moich kilkuletnich prac nad działaniem naturalnych związków bioaktywnych o potencjalnych właściwościach chemoprewencyjnych. Badania opublikowane we wskazanej pracy zostały wykonane w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N 312 211 338 realizowanego w latach 2010-2014.

#### **4.B Omówienie celu naukowego wskazanego osiągnięcia, otrzymanych wyników wraz z przedstawieniem ich ewentualnego wykorzystania**

W badaniach naukowych dużo uwagi poświęcono naturalnym związkom pochodzenia roślinnego o wysokiej aktywności biologicznej i potencjalnym zastosowaniu w prewencji i terapii chorób cywilizacyjnych. Czołowe miejsce w gronie schorzeń określanych mianem „cywilizacyjnych” zajmują choroby nowotworowe, które w krajach wysokorozwiniętych stanowią drugą pod względem liczebności przyczynę zgonów. Duże nadzieje pokłada się w chemoprewencji, czyli zapobieganiu nowotworom na wczesnych etapach rozwoju przez zastosowanie nietoksycznych środków farmakologicznych i substancji naturalnych, umożliwiających spowolnienie i zatrzymanie procesu kancerogenezy a nawet odwrócenie powstałych zmian. Wielu onkologów uważa, że wdrożenie działań chemoprewencyjnych mogłoby w przyszłości ograniczyć występowanie niektórych nowotworów, w tym nowotworów jelita grubego, wysoko klasyfikowanych w rejestrze nowotworów złośliwych. Obecnie chemoprewencja ma ograniczone zastosowanie w walce z rakiem jelita grubego, co jest związane przede wszystkim z brakiem jednoznacznych dowodów na ochronne i lecznicze działanie związków chemoprewencyjnych, dostarczonych przez badania kliniczne. Dużym utrudnieniem dla prób klinicznych jest brak czułych i miarodajnych markerów, za pomocą których można by monitorować zmiany nowotworowe w nabłonku jelita grubego. Z tego względu większość prac dotyczących analizy właściwości przeciwnowotworowych opartych jest na zastosowaniu komórkowych i zwierzęcych modeli doświadczalnych.

Związkami o potencjalnym działaniu chemoprewencyjnym celowanym w nowotworowe komórki jelita grubego są związki antocyjanowe, powszechnie występujące w wielu owocach i warzywach, stanowiących składniki codziennej diety. Ze względu na niski poziom wchłaniania antocyjanów, zwykle nieprzekraczający 0,1% podanej dawki, inicjowanie działań prozdrowotnych w obrębie innych tkanek niż przewód pokarmowy budzi wątpliwości, a opinie naukowców w tej kwestii są podzielone. Zagadnieniem nie budzącym wątpliwości jest natomiast działanie antocyjanów na komórki przewodu pokarmowego, z uwagi na ich bezpośredni wpływ niezdeteminowany przez proces wchłaniania. W przedstawianej pracy podjęto badania nad aktywnością przeciwnowotworową ekstraktu zasobnego w antocyjany pozyskanego z owoców czarnej porzeczki w odniesieniu do nowotworów jelita grubego. Istotnym elementem pracy było zastosowanie ekstraktu poddanego procesom trawienia w sztucznym przewodzie pokarmowym *in vitro*, co pozwoliło na zbliżenie warunków modelowych do środowiska naturalnie występującego w organizmie.

Założeniem pracy było zgłębienie wiedzy na temat zmian bioaktywności ekstraktu z owoców czarnej porzeczki, zachodzących podczas pasażu przez przewód pokarmowy oraz pozyskanie danych, które mogłyby być podstawą do podjęcia dalszych badań *in vivo* nad jego wykorzystaniem w chemoprewencji nowotworów jelita grubego. W badaniach analizowano wpływ ekstraktu na zjawiska związane z inicjacją procesu kancerogenezy oraz zdolność do ingerowania w kolejne etapy rozwoju nowotworu zlokalizowanego

w jelicie grubym. Oceniano właściwości przeciwmutagenne, przeciwzapalne i przeciwoksydacyjne ekstraktu, jego potencjał cytotoksyczny, antyproliferacyjny i proapoptotyczny w odniesieniu do komórek nowotworowych. Określono również wpływ na migrację i inwazyjność komórek nowotworowych. Badania zrealizowano przy zastosowaniu metod *in vitro*.

Celem pierwszego etapu badań była ocena wpływu trawienia imitowanego w sztucznym żołądku, jelicie cienkim i jelicie grubym na zawartość związków fenolowych, które zostały zidentyfikowane w ekstrakcie nietrawionym. Analizy chromatograficzne przeprowadzone metodą HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> pozwoliły na detekcję szeregu bioaktywnych związków należących do 4 grup: flawan-3-oli, pochodnych kwasów hydroksycynamonowych, flawonoli i antocyjanów. W grupie antocyjanów stwierdzono obecność 6. podstawowych związków: glikozylowanych pochodnych delfinidyny (delfinidyno-3-*O*-glukozyd i delfinidyno-3-*O*-rutynozyd), cyjanidyny (cyjanidyno-3-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd), petunidyny (petunidyno-3-*O*-rutynozyd) i peonidyny (peonidyno-3-*O*-rutynozyd). W tej grupie oznaczono również 3-*O*-glukozyd i 3-*O*-rutynozyd pelargonidyny oraz glukozydy cyjanidyny i delfinidyny w formie skoniugowanej z kwasem *p*-kumarowym (delfinidyno-3-*O*-(6''-kumaroilo) glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-(6''-kumaroilo) glukozyd). W grupie pochodnych kwasów hydroksycynamonowych zidentyfikowano estry i glikozydy kwasów: kawowego (kwas 3-kawoilochinowy, kawoiloglukoza), *p*-kumarowego (kumaroiloglukoza, kwas *p*-kumaroilochinowy), ferulowego (feruloiloglukoza) i synapinowego (izomery synapoiloglukozy) oraz dwa związki: kumarynian i ferulanu nigruminy, które do tej pory były identyfikowane jedynie w nasionach czarnej porzeczki. W ekstrakcie oznaczono również 10 związków klasyfikowanych do grupy flawonoli: 3-*O*-glukozydy i 3-*O*-rutynozydy mirycetyny, kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny oraz 3-*O*-(malonylo)glukozydy mirycetyny i kwercetyny. W ostatniej grupie obejmującej flawan-3-ole zidentyfikowano monomery katechiny, epikatechiny, gallokatechiny i epigallokatechiny.

Analiza ilościowa wykazała, że grupą związków fenolowych, najliczniej występujących w ekstrakcie z owoców czarnej porzeczki były barwniki antocyjanowe. Całkowita ilość pochodnych antocyjanowych została określona na poziomie 433,3 µg/ml, co stanowiło 85% wszystkich oznaczonych ilościowo związków polifenolowych. Pozostałe grupy: pochodne kwasów hydroksycynamonowych, flawan-3-ole i flawonole stanowiły odpowiednio: 7,9; 5,6 i 1,5% ogólnej zawartości oznaczonych związków fenolowych. Związkiem bioaktywnym obecnym w ekstrakcie z owoców czarnej porzeczki była również witamina C, której stężenie oznaczono na poziomie 177 µg/ml.

Analizy chromatograficzne profilu polifenoli ekstraktu trawionego w przewodzie pokarmowym *in vitro* wykazały, że warunki panujące w żołądku nie indukują zmian w zawartości związków antocyjanowych, pochodnych kwasów hydroksycynamonowych i flawonoli. Niewielkie straty oszacowane na poziomie 7% odnotowano w grupie flawan-3-oli. W kolejnych etapach trawienia jelitowego obserwowano znaczną utratę związków zidentyfikowanych w ekstrakcie nietrawionym. W czasie inkubacji ekstraktu w warunkach imitujących środowisko jelita cienkiego nastąpiło obniżenie zawartości

antocyjanów ogółem o 59% oraz pochodnych kwasów hydroksycynamonowych o 47%. Straty związków należących do pozostałych dwóch grup: flawan-3-oli i flawonoli oszacowano na poziomie, odpowiednio: 28 i 20%. Następująca po jelicie cienkim ekspozycja ekstraktu na czynniki imitujące trawienie w jelicie grubym powodowała dalsze obniżenie zawartości związków polifenolowych w ekstrakcie. Największe straty w wysokości 92% obserwowano w grupie antocyjanów. Podczas pasażu jelitowego zachodziły również zmiany w grupie pochodnych kwasów hydroksycynamonowych. Stwierdzono, że po trawieniu w jelicie grubym pozostaje 36% związków tej grupy. Znacznie większa stabilność była znamieną dla flawonoli i flawan-3-oli, których pozostałość po trawieniu *in vitro* stanowiła odpowiednio 65 i 60% początkowej ich ilości przed pasażem przez przewód pokarmowy.

Wyniki analiz wskazywały, że związki polifenolowe zawarte w ekstrakcie z owoców czarnej porzeczki charakteryzuje różna stabilność w czasie trawienia jelitowego. Procentowy udział poszczególnych grup związków: antocyjanów, pochodnych kwasów hydroksycynamonowych, flawan-3-oli i flawonoli w całej puli związków fenolowych, zawartych w ekstrakcie trawionym był istotnie różny od tego oznaczonego w ekstrakcie nietrawionym. Widoczne było obniżenie procentowego udziału antocyjanów z 85% w ekstrakcie nietrawionym do 49% w ekstrakcie trawionym. Konsekwencją tych zmian było zwiększenie udziału procentowego związków z pozostałych grup, które przed trawieniem razem stanowiły ok. 15%, natomiast po zakończonym trawieniu obejmowały ponad 50% oznaczonych związków polifenolowych.

Zmniejszenie ilości związków fenolowych oraz istotne zmiany w ich profilu sugerowały, że przemiany następujące podczas procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym mogą mieć znaczący wpływ na aktywność biologiczną ekstraktu. Przypuszczać można było również, że inne związki fenolowe kształtują aktywność biologiczną ekstraktu trawionego w jelicie grubym, niż ekstraktu w żołądku, który nieznacznie różni się pod względem zawartości związków fenolowych od ekstraktu nietrawionego. Dlatego stwierdzono, że analiza efektów działania związków bioaktywnych powinna być prowadzona z uwzględnieniem zmian w ich strukturze i właściwościach, zachodzących podczas trawienia w przewodzie pokarmowym.

W kolejnym etapie pracy analizowałam przenikalność związków antocyjanowych, zawartych w ekstrakcie z owoców czarnej porzeczki trawionym w żołądku i jelicie cienkim, przez zróżnicowaną kulturę komórek enterocyto-podobnych Caco-2, która stanowiła model ludzkiego nabłonka jelitowego *in vitro*. Wyniki analiz kinetycznych transportu przez nabłonkowy wykazały, że przez barierę jelitową *in vitro* przenikały cztery dominujące pochodne antocyjanidynowe: glukozyd i rutynozyd delfinidyny oraz glukozyd i rutynozyd cyjanidyny. Przy czym absorpcja tych związków była nieznaczna i kształtowała się na poziomie nieprzekraczającym 0,1% początkowej zawartości w części apikalnej modelu, imitującej obszar światła jelit. Niski stopień wchłaniania antocyjanów potwierdziły obliczone wartości współczynników przenikalności pozornej, nieprzekraczające progu  $10^{-8}$  cm/s. Spośród oznaczanych związków najlepszą absorpcją charakteryzowały się pochodne cyjanidynowe: glukozyd i rutynozyd cyjanidyny.

Kolejne etapy pracy były związane z analizą potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych ekstraktu z owoców czarnej porzeczki poddanego trawieniu w sztucznym przewodzie pokarmowym.

Komórki organizmu, w tym również komórki przewodu pokarmowego, są narażane na wiele czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych, wykazujących pośrednie lub bezpośrednie działanie mutagenne i kancerogenne. Proces kancerogenezy jest związany z kumulacją wielu mutacji w genach regulujących komórkową homeostazę, głównie w onkogenach, genach supresorowych, czy genach regulujących proces apoptozy. Dlatego istotną aktywnością związków przeciwnowotworowych jest ochronne działanie przeciwmutagenne, zmierzające do zablokowania czy ograniczenia procesu mutagenyzy. Wyniki badań prowadzonych na zmutowanych szczepach bakterii *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 i TA1537, według metody opisanej przez Ames, wykazały, że ekstrakt z owoców czarnej porzeczki posiada właściwości przeciwmutagenne przejawiające się w zdolności do ograniczania mutacji genowych indukowanych mutagenami wzorcowymi. Ekstrakt hamował również biokonwersję promutagenu, zachodzącą w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej, i w konsekwencji obniżał jego aktywność promutageną. Potencjał przeciwmutageny ekstraktu był zależny od jego stężenia, przy czym efektywne działanie hamujące mutagenezę było obserwowane już przy zastosowaniu dawki na poziomie 10 µg/ml.

W procesie kancerogenezy obok czynników egzogennych wywołujących mutacje, istotne znaczenie mają czynniki endogenne, do których zaliczane są reaktywne formy tlenu i azotu, wytwarzane w stanach zapalnych przez pobudzone neutrofile i makrofagi. Długotrwały stan zapalny może prowadzić do uszkodzeń DNA i mutacji w genach krytycznych dla kancerogenezy oraz nasilać przebieg kancerogenezy przez produkowane cytokiny i inne białka, które promują proliferację i zwiększają inwazyjność komórek nowotworowych oraz pobudzają angiogenezę. W przedstawianej pracy oznaczałam przeciwzapalne właściwości trawionego ekstraktu z owoców czarnej porzeczki w odniesieniu do stanów zapalnych jelita grubego, imitowanych w modelowym układzie komórek jelitowych i makrofagów, w którym stan zapalny indukowany był lipopolisacharydami bakterii *E. coli*. Wyniki doświadczeń wykazały, że ekstrakt wprowadzony do układu wpływał na obniżenie ekspresji prozapalnych genów: interleukiny 8 (*IL8*) w komórkach nabłonka jelitowego oraz interleukiny 6 (*IL6*) i interleukiny 1 (*IL1a* oraz *IL1b*), indukowanej syntazy tlenu azotu (*Nos2*), syntazy nadtlenku prostaglandynowego (*Ptgs2 - Cox2*) i czynnika martwicy nowotworów (*Tnfa*) w makrofagach. Inhibicja ekspresji *Cox2* powodowała ograniczenie powstawania prostaglandyny E<sub>2</sub>, natomiast obniżona ekspresja *Nos2* prowadziła do zmniejszenia stężenia tlenu azotu w układzie. Efektem tłumienia stanu zapalnego w modelach komórkowych zawierających ekstrakt była zwiększona integralność nabłonka jelitowego, porównywalna do tej oznaczonej w modelach utrzymywanych bez indukcji zapalenia oraz z dodatkiem budezonidu - leku przeciwzapalnego, stosowanego w stanach zapalnych jelit.

Istotnym elementem pracy była analiza właściwości antyoksydacyjnych ekstraktu z czarnej porzeczki, w tym zdolności do ograniczania produkcji reaktywnych form tlenu

(RFT), związanych zarówno z procesami metabolicznymi, jak i z indukcją stresu oksydacyjnego w komórkach nabłonka jelitowego. W badaniach wykorzystywałam ludzkie komórki linii NCM460 pozyskane z tkanki prawidłowej nabłonka jelita grubego oraz komórki linii HT-29 wyizolowane z gruczolakoraka okrężnicy. Oznaczałam wpływ ekstraktu na wewnątrzkomórkowy poziom nadtlenu wodoru, uznawany za marker wskazujący pośrednio na zawartość RFT w komórkach. Wyniki doświadczeń dowiodły, że ekstrakt po przemianach w przewodzie pokarmowym nie traci właściwości antyoksydacyjnych i nawet w niewielkich dawkach (10 µg/ml) ma zdolność do ograniczania wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, związanej z procesami metabolicznymi oraz z indukcją stresu oksydacyjnego.

Efektom przeciwoksydacyjnego działania ekstraktu, zarówno nietrawionego, jak i poddanego trawieniu jelitowemu, była również ochrona przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA indukowanymi w nowotworowych i prawidłowych komórkach okrężnicy. Detekcja pęknięć nici DNA była prowadzona przy wykorzystaniu elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym, tzw. testu kometowego.

Kolejnym zagadnieniem podejmowanym w pracy była analiza bezpośredniego wpływu ekstraktu z owoców czarnej porzeczki na wzrost, żywotność i aktywność metaboliczną nowotworowych komórek okrężnicy linii HT-29. Zjawiskiem znamionym dla większości komórek nowotworowych jest ich niekontrolowany i nieograniczony wzrost, niepodlegający działaniu zewnątrzkomórkowych sygnałów regulujących. Działania zmierzające do sprowadzenia komórki nowotworowej na drogę apoptozy, czy do zatrzymania cyklu komórkowego, są ważną strategią w chemoprewencji na etapie promocji i progresji nowotworów. Poszukiwanie związków bioaktywnych o właściwościach antyproliferacyjnych i proapoptotycznych o wysokiej specyficzności dla komórek nowotworowych, stanowi cel wielu badań naukowych. Mimo intensywnych wysiłków, wiedza na temat mechanizmów ich działania i wybiórczego ingerowania w rozwój nowotworów cały czas pozostaje niezgłębiona.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdziłam, że ekstrakt z owoców czarnej porzeczki ma zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych okrężnicy, ograniczania ich żywotności oraz zdolności do wzrostu klonalnego. Mechanizm antyproliferacyjnego działania ekstraktu był zależny od jego dawki, ekstrakt w mniejszych stężeniach wpływał na regulację cyklu komórkowego, powodując zatrzymanie komórek w fazie G<sub>1</sub>, natomiast w większych dawkach indukował proces apoptozy, przebiegający na drodze zależnej od kaspaz 3/7. Na drodze eksperymentalnej stwierdziłam, że proapoptotyczny potencjał ekstraktu trawionego może być związany z akumulacją reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych. Analizy wykazały, że ekstrakt trawiony indukuje proces apoptozy w mniejszych stężeniach niż ekstrakt nietrawiony, co wskazuje na jego większy potencjał proapoptotyczny. Cenną właściwością ekstraktu trawionego w jelicie grubym było silniejsze działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe niż komórki prawidłowe pochodzące z nabłonka okrężnicy.

Ostatnim zagadnieniem, podejmowanym w pracy, związanym z potencjałem przeciwnowotworowym była analiza wpływu ekstraktu z owoców czarnej porzeczki na

procesy związane z rozprzestrzenianiem się komórek nowotworowych i tworzeniem nowych ognisk nowotworu. W tym celu wykonałam badania nad wpływem ekstraktu na migrację i inwazyjność nowotworowych komórek okrężnicy linii HT-29. Stwierdziłam, że chemotaksja komórek HT-29 przez nieopłaszczoną membranę w kierunku chemoatraktanta nie została zakłócona w obecności ekstraktu. Znamienny efekt działania ekstraktu widoczny był natomiast w analizach zjawiska inwazyjności. Po ekspozycji komórek na ekstrakt obserwowałam zmniejszoną ich przenikalność przez membranę opłaszczoną substancją BD Matrigel™ imitującą macierz zewnątrzkomórkową. Ograniczenie inwazyjności komórek HT-29 potwierdziły obniżone w stosunku do kontroli wartości indeksu inwazyjności oraz procentowej inwazyjności komórek zdolnych do przemieszczania się przez membranę. Badania dowiodły, że zmiany w zawartości i strukturze biokomponentów ekstraktu, zachodzące podczas trawienia w sztucznym przewodzie pokarmowym, nie wpłynęły w znaczący sposób na jego potencjał antyinwazyjny. Zaobserwowane zjawisko było kolejną istotną wartością przemawiającą za potencjalnym działaniem chemoprewencyjnym ekstraktu, skierowanym na nowotwory jelita grubego.

Wyniki badań przedstawione w opracowaniu wskazują, że ekstrakt z owoców czarnej porzeczki po spożyciu i pasażu przez przewód pokarmowy dociera do jelita grubego w formie zmienionej, lecz wciąż aktywnej, obdarzonej zdolnością do ochrony komórek nabłonka jelitowego przed czynnikami, które mogą inicjować proces kancerogenezy. Otrzymane dane pozwalały wnioskować o hamowaniu przebiegu kancerogenezy, zlokalizowanej w jelicie grubym, na kolejnych etapach promocji i progresji nowotworu. Rezultaty potwierdzają hipotezę o potencjalnych właściwościach chemoprewencyjnych owoców czarnej porzeczki w odniesieniu do nowotworów jelita grubego.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **5.A Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

W trakcie studiów brałam udział w badaniach dotyczących immobilizacji bakterii kwasu propionowego wykorzystywanych do produkcji kwasu propionowego i witaminy B<sub>12</sub>. Zajmowałam się opracowaniem metody immobilizacji, oznaczaniem stabilności nośników w czasie fermentacji oraz optymalizacją podstawowych parametrów hodowli. Najważniejsze wyniki prowadzonych badań zostały przedstawione w mojej pracy magisterskiej oraz opublikowane w czasopismach *Folia Microbiologica* (zał. 4 II.A.1), *Journal of Biotechnology* (zał. 4 II.A.2) i *Acta Biotechnologica* (zał. 4 II.A.3). W czasie realizacji tej tematyki badawczej zebrałam materiały bibliograficzne będące podstawą dwóch prac przeglądowych dotyczących zastosowania komórek immobilizowanych w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, które ukazały się na łamach czasopisma *Przemysł Spożywczy* (zał. 4 II.D.3 i II.D.4).

Po ukończeniu studiów, w 1993 roku, podjęłam pracę na stanowisku starszego referenta technicznego w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), gdzie zajmowałam się tworzeniem pracowni kultur komórkowych i tkankowych oraz



zdobywałam doświadczenie w technikach hodowli komórek zwierzęcych. W pierwszych latach pracy naukowej (1994-1995) odbyłam szereg krótkoterminowych staży w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach (Zakład Chorób Świń, Laboratorium Kultur Komórkowych). W tym czasie zajmowałam się immobilizacją komórek zwierzęcych na mikronośnikach i ich hodowlą w bioreaktorach w celu namnażania wirusa syndromu rozrodczo-oddechowego u świń (PRRS) i uzyskania szczepionki przeciwwirusowej. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy oryginalnej (zał. 4 II.D.1) i na konferencjach naukowych (zał. 6 B.2 i B.3).

Tematyka badawcza, która wzbudziła moje szczególne zainteresowanie, była związana z produkcją heterologicznych białek przy zastosowaniu bakulowirusowego systemu ekspresyjnego. W celu jej realizacji podjęłam współpracę z zespołami Instytutu Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) i Zakładu Wirusologii Molekularnej (Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu). Prace nad otrzymaniem i optymalizacją produkcji rekombinowanych białek: nukleoproteiny wirusa grypy (NP) oraz białka E2 wirusa *Papilloma* typ 16 przy zastosowaniu bakulowirusowego systemu ekspresyjnego były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej i zostały wykonane w ramach projektu nr 6 P04B 026 14 (zał. 4 II.I.3). Badania koncentrowały się na doborze parametrów hodowli komórek owadzich i infekcji wirusowej w celu uzyskania jak największej produktywności rekombinowanych białek NP i E2 w skali bioreaktorowej. Uważam, że wartościowym efektem prac było opracowanie uniwersalnej metody produkcji heterologicznych białek w komórkach owadzich hodowanych w bioreaktorze z membranowym systemem napowietrzania. W pracy doktorskiej określiłam najważniejsze czynniki wpływające na wydajność produkcji rekombinowanych białek, wskazałam owadzią linię komórkową zapewniającą wysoki poziom ekspresji, wyznaczyłam wartości parametrów infekcji wirusowej, opisałam wpływ surowicy i innych suplementów na produktywność systemu bakulowirusowego. Oryginalną metodą hodowli zaproponowaną w pracy doktorskiej była produkcja rekombinowanych białek w komórkach owadzich eksponowanych na stres osmotyczny przy jednoczesnej suplementacji hodowli w kluczowe składniki odżywcze. Metoda hodowli została przedstawiona w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Biotechnology* (zał. 4 II.A.5). Kolejnym ważnym osiągnięciem było opracowanie sposobu monitorowania przebiegu infekcji komórek owadzich i produkcji rekombinowanych białek poprzez pomiar poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Rezultaty prac zostały opublikowane w czasopiśmie *Biotechnological Products and Process Engineering* (zał. 4 II.A.6). Wyniki badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej były prezentowane również w postaci doniesień na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym (zał. 6, B.8-16, B.19-20, B.22-24, B.26) i międzynarodowym (zał. 6, B.5-6, B.17, B.31). Ponadto zdobyte doświadczenie i wiedza na temat właściwości bakulowirusów i możliwości ich wykorzystania w biotechnologii została upowszechniona w czterech publikacjach przeglądowych (zał. 4 II.D.2, II.D.5-7).

Oprócz prac, w których hodowle komórek owadzych stosowane były do produkcji biologicznie aktywnych rekombinowanych białek, uczestniczyłam również w badaniach ukierunkowanych na otrzymanie bakulowirusowych bioinsektycydów (zał. 6 B.4, B.12 i B.21). W celu realizacji tych zagadnień współpracowałam z zespołem Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt (Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu).

## **5.B Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora najwięcej uwagi poświęciłam analizie właściwości prozdrowotnych bioaktywnych składników żywności przy zastosowaniu modeli komórkowych.

W pierwszych etapach pracy skupiłam się na doskonaleniu systemu imitującego proces trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* oraz dopracowaniu modeli tkankowych naśladujących nabłonek jelita cienkiego i grubego. Model sztucznego przewodu pokarmowego wykorzystywałam w wielu badaniach do analizy zmian w strukturze i aktywności związków biologicznie czynnych, jakie zachodzą podczas procesu trawienia. Model bariery jelitowej *in vitro* stosowałam również w analizach procesu wchłaniania jelitowego, oznaczeniach właściwości adhezyjnych probiotycznych szczepów bakterii, analizach przeciwwzapalnego działania bioaktywnych składników żywności, czy badaniach nad wpływem związków na integralność nabłonka jelitowego, proliferację komórek jelitowych, ich żywotność i różnicowanie.

Istotnym osiągnięciem było opracowanie nowej szybkiej metody hodowli komórek Caco-2 w celu uzyskania zróżnicowanej kultury komórek enterocyto-podobnych budujących szczelny nabłonek jelitowy *in vitro*, strukturalnie i funkcjonalnie zbliżony do bariery jelitowej *in vivo*. Efektem prac było skrócenie czasu tradycyjnej hodowli komórek Caco-2 z 21 do 6 dni. Warunki indukowanego różnicowania komórek Caco-2 i szybkiej metody uzyskania sztucznego nabłonka jelitowego opublikowano w czasopiśmie *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* (zał. 4 II.D.8 i II.D.18).

Modele nabłonka jelitowego *in vitro* były stosowane między innymi do analizy właściwości adhezyjnych bakterii probiotycznych, co zostało pokazane w pracach oryginalnych (zał. 4 II.A.21, II.D.8, II.D.10-11) oraz doniesieniach na konferencjach naukowych (zał. 6 B.25, B.27-30, B.32, B.34-35). Badania prowadzone w latach 2001-2004 nad wykorzystaniem komórek nabłonkowych jelit do oceny właściwości probiotycznych żywności były realizowane w ramach grantu pt. „Określenie i ocena specyficznej aktywności biologicznej żywności, a w szczególności ochronnej - prozdrowotnej: przeciwutleniającej, pre i probiotycznej” (zał. 4 II.I.4). Celem prac było określenie wpływu warunków trawienia w żołądku i jelitach na przeżywalność bakterii probiotycznych i zdolność wiązania do nabłonka jelitowego. Wyniki badań zostały upowszechnione w postaci oryginalnych publikacji (zał. 4 II.D.10-12), referatów (zał. 4 II.K.1-3) oraz doniesień (zał. 6 B.25, B.27-30, B.32, B.34-35) prezentowanych na konferencjach naukowych. Efektem aplikacyjnym wykonanych prac było wytypowanie szczepów bakterii probiotycznych o najlepszych cechach funkcjonalnych.

Modele nabłonka jelitowego *in vitro* zostały wykorzystane również w oznaczeniach wchłaniania jelitowego oraz analizach mechanizmu transportu przez nabłonek. Uzyskane wyniki stały się podstawą kilku prac dotyczących transportu przez nabłonkowy różnych związków, w tym witamin z grupy B (zał. 4 II.A.12), bioaktywnych składników żywności (zał. 4 II.A.13), czy związków o potencjale przeciwnowotworowym (zał. 4 II.A.18). Modele nabłonka jelitowego były stosowane także w analizach cytotoksyczności i genotoksyczności różnych substancji, w tym atrazyny (zał. 4 II.A.9 i II.A.15), bioskładników żywności (zał. 4 II.D.19 i II.D.27) czy toksycznych metabolitów trawienia jelitowego (zał. 4 II.D.14). Publikacja opisująca wpływ toksycznych metabolitów trawienia na proliferację i uszkodzenia DNA komórek nabłonka jelitowego (zał. 4, II.D.14) została wyróżniona przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności jako najlepsza praca oryginalna opublikowana w 2006 roku w czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*.

Opracowany układ sztucznego przewodu pokarmowego spotkał się z zainteresowaniem grup badawczych, między innymi z Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej oraz Katedry i Zakładu Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Katedry i Zakładu Fizjologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz zespołu Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Efektem podjętej współpracy są prace oryginalne opublikowane w czasopismach: *Phytotherapy Research* (zał. 4 II.A.13 i II.A.20), *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (zał. 4 II.A.18), *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* (zał. 4 II.A.21), *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* (zał. 4 II.D.16) i *Acta Scientiarum Polonorum* (zał. 4 II.D.17). Wyniki badań były również prezentowane na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych (zał. 6 B.37-38, B.40-41, B.43-47).

Kolejnym ważnym aspektem mojej działalności naukowej było konstruowanie układów modelowych złożonych z kultur komórkowych, pochodzących z różnych tkanek i narządów, w tym komórek nabłonka jelitowego w połączeniu z komórkami wątroby, makrofagami, czy komórkami krwi oraz komórek śluzówki żołądka z komórkami układu immunologicznego. Za pomocą złożonych układów komórkowych analizowałam właściwości prozdrowotne bioaktywnych składników żywności, w tym ich działanie przeciwzapalne, przeciwoksydacyjne i przeciwnowotworowe. Opracowane systemy komórkowe stosowane były w kilku projektach badawczych (zał. 4 II.I.2, II.I.4, II.I.6-11, II.I.13). Natomiast doświadczenie i wiedza na temat możliwości wykorzystania modeli komórkowych w analizach prozdrowotnych właściwości żywności zostały przekazane w pracach przeglądowych (zał. 4 II.A.7, II.D.9, II.D.13 i II.D.15).

Tematyka badawcza, która w ostatnich latach zajmuje ważne miejsce w mojej działalności naukowej związana jest z analizą przeciwnowotworowych właściwości związków bioaktywnych. Prace nad tym zagadnieniem rozpoczęłam w roku 2003 wraz z realizacją projektu pt. „Określenie przeciwkancerogennej, przeciwmutagennej i cytotoksycznej aktywności żywności przy pomocy kultur komórkowych *in vitro*” (zał. 4 II.I.1). Celem badań było określenie wpływu soku i chipsów z buraka czerwonego, soku z owoców aronii, brokuł i ekstrudatu z czerwonej fasoli na nowotworowe komórki jelita,

wątroby, gruczołu piersiowego i ostrej białaczki promielocytowej. Działanie produktów bioaktywnych na komórki nowotworowe było porównywane z ich działaniem na komórki prawidłowe – ludzkie fibroblasty i limfocyty typu B. Analizowana była cytotoksyczność i genotoksyczność wymienionych produktów, wpływ na status oksydacyjny komórek oraz właściwości przeciwmutagenne i przeciwnowotworowe. Oceniano również wpływ soku i chipsów z buraka czerwonego wyprodukowanych przez firmę Produkcyjno-Handlową Paula z Żelazkowa, na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów obojętnochłonnych analizowanych *ex vivo*. W badaniach dowiedziano, że produkty z buraka czerwonego poprzez blokowanie mutacji indukowanych mutagenami i silne działanie przeciwutleniające mają potencjalną zdolność do zapobiegania procesowi kancerogenezy na etapie inicjacji. Potwierdzono również możliwość ingerowania w kolejne etapy procesu nowotworzenia, przez hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz wpływ na ich eliminację na drodze apoptozy. Ważnym aspektem badań było potwierdzenie aktywności biologicznej produktów po pasażu przez sztuczny przewód pokarmowy oraz przenikaniu przez nabłonek jelitowy *in vitro*. Istotnym elementem prac była konfrontacja wyników badań uzyskanych z udziałem kultur pochodzących z tkanki nowotworowej i tkanki prawidłowej. Rezultaty doświadczeń wskazały na umiarkowany poziom cytotoksyczności i brak działania genotoksycznego produktów z buraka czerwonego na komórki prawidłowe. Stwierdzono, że sok i chipsy z buraka czerwonego mogą stanowić obiecujący element chemioprotekcyjny nowotworowej. Wyniki prac eksperymentalnych opublikowano w czasopismach *Phytotherapy Research* (zał. 4 II.A.13 i II.A.20) i *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* (zał. 4 II.D.16) a także promowano na konferencjach naukowych (zał. 6 B.36, B.38-41, B.44-46, B.50). Prace nad analizą właściwości prozdrowotnych zostały wyróżnione nagrodą Marszałka Województwa Wielkopolskiego w kategorii „Innowacyjna inwencja” w roku 2008.

Oprócz produktów otrzymanych z buraka czerwonego określono również aktywność biologiczną soku z aronii (zał. 4 II.D.16 i II.D.17), brokuł i chrupek fasolowo-kukurydzianych (zał. 4 II.D.19) w aspekcie działania przeciwnowotworowego. Publikacja (zał. 4 II.D.19), w której przedstawiono wyniki prac została wyróżniona przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności jako najlepsza praca badawcza z zakresu nauk o żywności opublikowana w czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* w 2008 roku. Wyniki badań były promowane również na konferencjach międzynarodowych: *3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols in Nutrition and Health, Malta Polyphenols 2006* (zał. 6 B.41) i *1<sup>st</sup> International Conference and Trade Fair "Biotechnology in Agriculture" Eurobiotech, Kraków 2007* (zał. 6 B.47). Na konferencji w Krakowie wyróżnienie zdobyła prezentacja badań dotyczących oznaczeń cytotoksyczności soku z owoców aronii dla ludzkich komórek nowotworowych (zał. 6 B.47).

W kolejnych latach kontynuowałam tę tematykę badawczą, zgłębiając kierunki i mechanizmy działania związków bioaktywnych z wykorzystaniem modeli komórkowych. Analizowałam przede wszystkim właściwości ekstraktów otrzymanych po procesie trawienia żołądkowo-jelitowego i przenikania przez barierę jelitową *in vitro*. Od roku 2010 skoncentrowałam się głównie na analizie właściwości

przeciwnowotworowych produktów bogatych w antocyjany: owoców aronii czarnoowocowej, czarnej porzeczki i bzu czarnego oraz korzeni marchwi purpurowej w odniesieniu do nowotworów jelita grubego. Analizom były poddawane ekstrakty wodne otrzymane z produktów liofilizowanych, jak i poszczególne ekstrakty barwników antocyjanowych, uzyskane na drodze ekstrakcji, separacji z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w odwróconej fazie, zagęszczane w wyparce i suszone sublimacyjnie. Aktywność przeciwnowotworowa ekstraktów była oznaczana w odniesieniu do zjawisk, które mogą wpływać na inicjację, promocję i progresję procesu kancerogenezy zlokalizowanego w obszarze jelita grubego. Przedmiotem analiz były właściwości przeciwmutagenne i przeciwoksydacyjne, zdolność do ograniczania reaktywnych form tlenu w komórkach nabłonka jelitowego, zdolność do ochrony przed oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA komórek jelitowych, potencjał przeciwzapalny w odniesieniu do stanów zapalnych jelit. Celem badań było również oznaczenie efektów bezpośredniego działania na komórki nowotworu okrężnicy, hamowanie ich proliferacji, ingerencja w przebieg cyklu komórkowego i indukcja śmierci apoptotycznej. Określany był także wpływ związków na adhezję, migrację i inwazję komórek nowotworowych, a także ekspresję i wytwarzanie metaloproteinaz 2 i 9. Wyniki analiz bioaktywności ekstraktu z owoców czarnej porzeczki przedstawiono w rozprawie naukowej, będącej podstawą postępowania habilitacyjnego. Badania nad potencjałem przeciwnowotworowym ekstraktów antocyjanowych w aspekcie ich zastosowania w chemoprewencji nowotworów jelita grubego zostały wykonane w ramach projektu finansowanego przez MNiSW w latach 2010-2014, realizowanego pod moim kierunkiem (zał. 4 II.I.2). Wyniki doświadczeń będą opublikowane w pracach, które w chwili obecnej są na etapie opracowania redakcyjnego i recenzji wydawniczych.

Kolejnym tematem badań, prowadzonych pod moją opieką, była analiza właściwości przeciwzapalnych soku z ziemniaka oraz jego bioaktywnych frakcji jako dodatków do produktów prozdrowotnych przeznaczonych dla pacjentów z nieswoistymi stanami zapalnymi jelit. Przedmiotem oznaczeń była również cytotoksyczność soku z ziemniaka dla prawidłowych i nowotworowych komórek żołądka i jelit. Prace były wykonywane w ramach zadania 2.2 projektu POIG 01.01.02-00-061/09 pt. „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” (zał. 4 II.I.13). Wyniki badań stały się podstawą zgłoszenia patentowego dotyczącego sposobu otrzymywania preparatu z soku z ziemniaka i wskazania możliwości jego zastosowania (zał. 4 II.C.1). Pozostałe rezultaty doświadczeń zostały opublikowane (zał. 4 II.D.27 i II.D.28) i zreferowane na konferencjach naukowych (zał. 4 II.K.8 i II.K.9.)

Kolejnym nurtem badań, które wpisują się w moje zainteresowania naukowe, była analiza wpływu owoców bogatych w związki antocyjanowe (aronii, bzu czarnego, czarnej porzeczki, czerwonej jagody, maliny, żurawiny, jeżyny) na przebieg procesu adipogenezy, lipogenezy i lipolizy z wykorzystaniem modelu komórkowego 3T3-L1. Procesy związane z różnicowaniem prekursorowych komórek tłuszczowych linii 3T3-L1 w dojrzałe adipocyty zachodzące w obecności ekstraktów z wymienionych owoców analizowane były na poziomie komórkowym i molekularnym. Określany był wpływ ekstraktów na proliferację i różnicowanie preadipocytów oraz zdolność indukcji śmierci apoptotycznej

komórek tłuszczowych. Istotnym zagadnieniem była także ingerencja w procesy związane z metabolizmem lipidów (lipogenezę i lipolizę) zachodzące w adipocytach. Z uwagi na to, że różnicowaniu preadipocytów w dojrzałe komórki tłuszczowe towarzyszy intensywne wewnątrzkomórkowe wytwarzanie reaktywnych form tlenu, określano również efekty antyoksydacyjne i modulację statusu oksydacyjnego komórek tłuszczowych. W celu wyjaśnienia wpływu ekstraktów na regulację procesu adipogenezy i lipogenezy analizowano ekspresję genów głównych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces różnicowania (*Pparγ*, *C/ebpα*, *Srebp1*) oraz ekspresję genów najważniejszych białek uczestniczących w metabolizmie lipidów (*ap2*, *Fas*, *Lpl*, *Hsl* i *perilipiny*). Wiedząc, że biała tkanka tłuszczowa jest aktywnym organem endokrynnym, syntetyzującym wiele specyficznych dla adipocytów, biologicznie czynnych peptydów - adipocytokin, działających nie tylko w obrębie samej tkanki tłuszczowej, ale również znacząco wpływających na odległe narządy i tkanki, określono wpływ ekstraktów na regulację ekspresji dwóch najważniejszych adipocytokin: leptyny i adiponektyny. Prace nad antyadipogennymi właściwościami ekstraktów bogatych w antocyjany były realizowane w ramach zadania 2.2 i 4.3 projektu POIG 01.01.02-00-061/09 (zał. 4 II.I.13). Na podstawie wyników badań wytypowano owoce będące źródłem związków o potencjalnych zdolnościach do hamowania proliferacji preadipocytów i różnicowania w dojrzałe komórki tłuszczowe. Istotnym aspektem aktywności była również zdolność do ograniczenia niekorzystnych efektów towarzyszących otyłości. Analizy na poziomie komórkowym i molekularnym dostarczyły dowodów potwierdzających wysoką aktywność antyadipogenną ekstraktów z owoców aronii, bzu czarnego, czarnej porzeczki, czerwonej jagody i żurawiny, wskazując na ich wielokierunkowy wpływ na różne mechanizmy i ścieżki sygnałowe w komórkach tłuszczowych. Uzyskane wyniki pokazały, że ekstrakty mogą być cennym składnikiem diety wspomagającej terapię otyłości, a dzięki modulowaniu uwalniania hormonów leptyny i adiponektyny, mogą być również stosowane w prewencji chorób metabolicznych związanych z otyłością, takich jak cukrzyca typu 2, czy hiperlipidemia.

Wyniki prac nad antyadipogennym działaniem ekstraktu z żurawiny błotnej były podstawą pracy doktorskiej dr Katarzyny Kowalskiej, przy której decyzją Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Rezultaty badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Food Chemistry* (zał. 4 II.A.25) i zaprezentowane na sympozjach naukowych (zał. 6 B.54, B.56-57).

W ostatnich latach pracy naukowej podjęłam współpracę z zespołem Zakładu Technologii Chemicznej Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, który zajmuje się oznaczaniem właściwości adsorpcyjnych czwartorzędowych pochodnych substancji lizosomotropowych (QDLS, *quaternary derivatives of lysosomotropic substances*). Stwierdzono, że mieszaniny QDLS wykazują silne efekty synergistyczne, które wzmacniają ich aktywność powierzchniową i działanie biologiczne. Celem prowadzonych prac było zaprojektowanie mieszanin zawierających QDLS o najlepszych właściwościach synergistycznych oraz określenie korelacji między strukturą chemiczną komponentów a ich aktywnością powierzchniową

i potencjałem biologicznym. Efekty doświadczeń mają doprowadzić do skonstruowania układów mieszanin, które mogłyby mieć potencjalne zastosowanie jako czynniki wspomagające działanie leków cytostatycznych, o selektywnym działaniu na komórki nowotworowe. Mój udział w pracach zespołu polegał na oznaczeniu aktywności biologicznej i cytotoksyczności mieszanin z QDLS oraz ich komponentów dla komórek pochodzących z tkanek nowotworowych jelita grubego, piersi, żołądka i wątroby. Wyniki kilkuletnich badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Colloids and Surfaces* w dwóch sekcjach - A: *Physicochemical and Engineering Aspects* (zał. 4 II.A.24) oraz - B: *Biointerfaces* (zał. 4 II.A.23 i II.A.26).

W czasie mojej pracy zawodowej na etacie naukowo-dydaktycznym uczestniczyłam w wielu projektach badawczych i współpracowałam z zespołami naukowców z różnych uczelni i instytutów. Efektem wspólnych prac są publikacje w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Mój całkowity dorobek naukowy według punktacji MNiSW wynosi 878 punktów, a sumaryczny *Impact Factor* 48,093. Wartość wskaźnika Hirscha obliczona na podstawie bazy Web of Science wynosi 7, natomiast liczba cytowań 165. Zestawienie dorobku naukowego z podziałem na poszczególne formy aktywności przedstawiałam w poniższej tabeli.

### Zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj aktywności	Ilość	IF	Punkty MNiSW
Prace oryginalne	38	45,208	742
Prace przeglądowe	15	2,885	122
Rozdziały w książkach	2	-	14
Zgłoszenia patentowe	1	-	-
Referaty na konferencjach	9	-	-
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych	23	-	-
krajowych	37	-	-
Łącznie	125	48,093	878

Anna Olejnik