

ZAŁĄCZNIK 2

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Marcin Ożarowski

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- **Dyplom mgr farmacji;** Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2003 rok, na podstawie pracy, pt. „*Epidemiologia i diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych*”
- **Dyplom mgr biologii;** Indywidualne Studia Przyrodnicze, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 2004 rok, na podstawie pracy, pt. „*Choroba Alzheimera i starzenie się mózgu w kontekście neurobiologii i antropologii medycznej*”
- **Dyplom dr nauk farmaceutycznych;** specjalność farmakognozja, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, 2007 rok, na podstawie obronionej rozprawy doktorskiej pt. "*Interakcje pomiędzy lekami roślinnymi i składnikami diety zawierającymi surowce roślinne oraz lekami syntetycznymi dotyczące ośrodkowego układu nerwowego*"

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2003 - 2004 stażysta, a następnie pracownik inżynierijno-techniczny w Zakładzie Produktów Leczniczych i Dietetycznych, w Instytucie Roślin i Przetworów Zielarskich (IRiPZ), Poznań
- 2004 - 2007 asystent w Zakładzie Produktów Leczniczych i Dietetycznych, w IRiPZ
- 2007 - 2008 asystent w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań,
adiunkt w Zakładzie Farmakologii i Biologii Doświadczalnej (obecnie Zakład Farmakologii i Fitochemii), Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich (IWNiRZ), Poznań

2008 - nadal adiunkt w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań;
adiunkt w Zakładzie Farmakologii i Fitochemii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich (IWNiRZ), Poznań

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Surowce roślinne scharakteryzowane fitochemicznie, jako źródło nowych substancji leczniczych w modelu zaburzeń pamięci z uwzględnieniem wpływu na ekspresję genów w ośrodkowym układzie nerwowym”

b) Publikacje naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H.1. Marcin Ożarowski, Przemysław Ł. Mikołajczak, Anna Bogacz, Agnieszka Gryszczyńska, Małgorzata Kujawska, Jadwiga Jodynis-Liebert, Anna Piasiecka, Hanna Napieczyńska, Michał Szulc, Radosław Kujawski, Joanna Bartkowiak-Wieczorek, Joanna Cichocka, Teresa Bobkiewicz-Kozłowska, Bogusław Czerny, Przemysław M. Mrozikiewicz. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain.

Fitoterapia 2013;91:261-271.

Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.216 (5-letni: 2,631)

Punktacja MNiSW: 25.000

Mój wkład w powstaniu tej pracy polegał na tym, iż byłem kierownikiem grantu, którego wyniki stanowią przedmiot publikacji, byłem pomysłodawcą koncepcji i założeń pracy, zaplanowałem doświadczenia, uczestniczyłem w badaniach, w opracowaniu i interpretacji wyników, w sformułowaniu wniosków, przygotowałem i redagowałem manuskrypt, udzielałem odpowiedzi na pytania recenzentów (autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 51%.

H.2. Marcin Ożarowski, Barbara Thiem, Przemysław Ł. Mikołajczak, Anna Piasecka, Piotr Kachlicki, Michał Szulc, Ewa Kaminska, Anna Bogacz, Radosław Kujawski, Joanna Bartkowiak-Wieczorek, Małgorzata Kujawska, Jadwiga Jodynis-Liebert, Jaromir Budzianowski, Izabela Kędziora, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz, Bogusław Czerny, Teresa Bobkiewicz-Kozłowska. Improvement in long-term memory following chronic administration of *Eryngium planum* root extract in scopolamine model: behavioral and molecular study.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol.2015, Article ID145140, 1-14.

Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.931

Punktacja Min. Nauki: 30.000

Mój wkład w powstaniu tej pracy polegał na tym, iż byłem pomysłodawcą koncepcji i założeń pracy, zaplanowałem doświadczenia, uczestniczyłem w badaniach, w opracowaniu i interpretacji wyników, w sformułowaniu wniosków, przygotowałem i redagowałem manuskrypt, udzielałem odpowiedzi na pytania recenzentów (autor do korespondencji).

Mój udział procentowy szacuję na 51%.

H.3. Marcin Ożarowski, Przemysław Ł. Mikołajczak, Anna Piasecka, Piotr Kachlicki, Radosław Kujawski, Anna Bogacz, Joanna Bartkowiak-Wieczorek, Michał Szulc, Ewa Kaminska, Małgorzata Kujawska, Jadwiga Jodynis-Liebert, Agnieszka Gryszczynska, Bogna Opala, Zdzisław Łowicki, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz, Bogusław Czerny. Influence of the *Melissa officinalis* leaf extract on long-term memory in scopolamine animal model with assessment of mechanism of action.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol. 2016, Article ID 9729818, 1-17.

Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.931

Punktacja Min. Nauki: 30.000

Mój wkład w powstaniu tej pracy polegał na tym, iż byłem kierownikiem grantu, którego wyniki stanowią przedmiot publikacji, byłem pomysłodawcą koncepcji i założeń pracy, zaplanowałem doświadczenia, uczestniczyłem w badaniach, w opracowaniu i interpretacji wyników, w sformułowaniu wniosków, przygotowałem i redagowałem manuskrypt, udzielałem

odpowiedzi na pytania recenzentów (autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 51%.

H.4. Marcin Ożarowski, Przemysław L. Mikołajczak, Anna Piasecka, Radosław Kujawski, Joanna Bartkowiak-Wieczorek, Anna Bogacz, Michał Szulc, Ewa Kamińska, Małgorzata Kujawska, Agnieszka Gryszczynska, Piotr Kachlicki, Waldemar Buchwald, Andrzej Klejewski, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz.

Effect of *Salvia miltiorrhiza* root extract on brain acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities, their mRNA levels and memory evaluation in rats.

Physiology and Behavior, 2017;173:223-230.

DOI 10.1016/j.physbeh.2017.02.019

Wskaźnik Impact Factor ISI: 2,461 (5-letni: 2,986)

Punktacja Min. Nauki: 30

Mój wkład w powstaniu tej pracy polegał na tym, iż byłem kierownikiem grantu, którego wyniki stanowią przedmiot publikacji, byłem pomysłodawcą koncepcji i założeń pracy, zaplanowałem doświadczenia, uczestniczyłem w badaniach, w opracowaniu i interpretacji wyników, w sformułowaniu wniosków, przygotowałem i redagowałem manuskrypt, udzielałem odpowiedzi na pytania recenzentów (autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 51%.

H.5. Marcin Ożarowski, Anna Piasecka, Agnieszka Gryszczynska, Aneta Sawikowska, Aurelia Pietrowiak, Bogna Opala, Przemysław Ł. Mikołajczak, Radosław Kujawski, Piotr Kachlicki, Waldemar Buchwald, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz.

Determination of phenolic compounds and diterpenes in roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia przewalskii* by two LC-MS tools: multi-stage and high resolution tandem mass spectrometry with assessment of antioxidant capacity.

Phytochemistry Letters, 2017

DOI 10.1016/j.phytol.2016.12.001

Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.353 (5-letni: 1,451)

Punktacja Min. Nauki: 20.000

Mój wkład w powstaniu tej pracy polegał na tym, iż byłem pomysłodawcą koncepcji i założeń pracy, zaplanowałem doświadczenia, uczestniczyłem w badaniach i w interpretacji wyników,

w sformułowaniu wniosków, w przygotowywaniu i redagowaniu manuskryptu, udzielałem odpowiedzi na pytania recenzentów (autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 51%.

Badania naukowe, zawarte w wymienionych publikacjach, były prowadzone w ramach projektu badawczego własnego, pt. "Rośliny lecznicze z rodziny *Lamiaceae* w chorobie Alzheimerera – badania modelowe" nr N405 417836 (2009-2011), finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, którego byłem kierownikiem (**publikacje H.1, H.3, H.4**). Badania opisane w publikacji **H.2**. były finansowane z projektu badawczego N405 065334 (2008-2011) przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Natomiast badania zawarte w publikacji **H.5**. przeprowadzono w ramach projektu badawczego, N405 678040 (2011-2015), finansowanego przez MNiSW, którego byłem współpomysłodawcą i wykonawcą.

Łączny Impact Factor dla tych 5 prac wynosi 9,892 (5-letni: 10,93)

Łączna punktacja KBN/MNiSW dla tych 5 prac wynosi 135.

Ponadto, tematyka z tego zakresu badań została przedyskutowana w trzech pracach poglądowych, które nie są ujęte w cyklu ale dotyczą tego samego problemu badawczego:

1. **Ożarowski M**, Mikołajczak PŁ, Bobkiewicz-Kozłowska T, Kujawski R, Mrozikiewicz PM. Neuroaktywne związki roślin leczniczych z rodziny *Lamiaceae* wykazujące potencjalne korzystne działanie w leczeniu choroby Alzheimerera. *Herba Polonica* 2009;55(4):148-163.
2. **Ożarowski M**, Mikołajczak PŁ, Bogacz A, Kujawski R, Mrozikiewicz PM. Plants and their chemical compounds affecting beta-amyloid and secretase activity as potential source of neuroprotective herbal medicinal products. Part 1. *Herba Polonica* 2010;56(4), 91-107.
3. **Ożarowski M**, Mikołajczak PŁ, Bogacz A, Kujawski R, Mrozikiewicz PM. Plants and their chemical compounds affecting beta-amyloid and secretase activity as potential source of neuroprotective herbal medicinal products. Part 2. *Herba Polonica* 2012;58(2):47-61.

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

1. Cel naukowy

Do badań przeprowadzonych w ramach projektu badawczego własnego, pt. „*Rośliny lecznicze z rodziny Lamiaceae w chorobie Alzheimerera - badania modelowe*”, wyselekcjonowano te surowce roślinne, których związki biologicznie czynne i wyciągi wykazują szeroki profil aktywności farmakologicznej, w tym działanie wywierane na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), ale mechanizmy ich działania w chorobach OUN nie są do końca poznane. W tym aspekcie zbadano ekstrakty z liści rozmarynu (RE, *Rosmarinus officinalis* L.), liści melisy (MO, *Melissa officinalis* L.), korzeni szałwii czerwonokorzeniowej (SE, *Salvia miltiorrhiza* Bunge) oraz dodatkowo z korzeni mało zbadanego mikołajka płaskolistnego (EP, *Eryngium planum* L., rodzina *Apiaceae*) [H.1, H.2, H.3, H.4].

Nadrzędnym celem przeprowadzonych doświadczeń była interdyscyplinarna ocena aktywności standaryzowanych ekstraktów wybranych roślin leczniczych (z rodziny *Lamiaceae* i *Apiaceae*) poprzez przeprowadzenie kilku etapów badań:

- 1) na poziomie molekularnym (badanie wpływu na ekspresję genów kodujących acetylocholinoesterazę - AChE, butyrylocholinoesterazę - BuChE oraz beta-sekretazę - BACE1),
- 2) na poziomie subkomórkowym (badanie hamowania aktywności AChE i BuChE),
- 3) na poziomie organizmu (badanie wpływu ekstraktów roślinnych na procesy uczenia się i zapamiętywania u zwierząt oraz na ich aktywność ruchową) w modelu zaburzeń pamięci indukowanych podaniem skopolaminy (odniesienie do choroby Alzheimerera) oraz u kontrolnych zwierząt (szczury szczepu Wistar).

Zbadanie molekularnego mechanizmu oddziaływania wybranych ekstraktów roślinnych na ekspresję genu kodującego AChE, BuChE oraz BACE1 dokonano poprzez pomiar mRNA z zastosowaniem metod biologii molekularnej (izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, PCR w czasie rzeczywistym) w hipokampie i korze czołowej mózgu szczurów. Podobnie, selektywność hamowania aktywności enzymów przez ekstrakty roślinne badano w wyizolowanych strategicznych regionach mózgu (hipokamp, kora czołowa). Ocenę wpływu ekstraktów roślinnych na procesy pamięci szczurów dokonano poprzez przeprowadzenie

testów oceniających różne rodzaje pamięci (test biernego unikania, test rozpoznawania obiektów “object recognition”) oraz wykonano testy oceniające aktywność lokomotoryczną oraz koordynację ruchową zwierząt. Otrzymane wyniki porównywano pomiędzy grupami zwierząt, którym podawano: wyciągi roślinne, kwas rozmarynowy, związek referencyjny - hupercynę A oraz skopolaminę i *vehiculum*. Oprócz tego dodatkowym celem było dokonanie kompleksowej charakterystyki fitochemicznej z zastosowaniem zawansowanych technik chromatograficznych [H.1, H.2, H.3, H.4, H.5].

Na podstawie tych wieloetapowych badań wyciągnięto wnioski, czy badane ekstrakty wpływają na poziom mRNA AChE, mRNA BuChE oraz mRNA BACE1 w korze czołowej i hipokampie, i czy na drodze tego mechanizmu można wyjaśnić wpływ na aktywność AChE oraz BuChE w tych samych regionach mózgu, oraz czy koreluje to z wynikami testów farmakologicznych oceniających pamięć długo- i krótkotrwałą. Badania fitochemiczne miały zidentyfikować grupy związków, które mogły być odpowiedzialne za aktywność ekstraktów roślinnych.

2. Wprowadzenie w tematykę badawczą

W ciągu ostatnich dwóch dekad stosowanie medycyny komplementarnej i alternatywnej na całym świecie znacznie wzrosło, jednak uważa się, że współczesna fitoterapia powinna być oparta na solidnych dowodach naukowych, a nie tylko bazować na długiej tradycji stosowania roślin leczniczych, stąd obserwuje się ciągłą potrzebę naukowej weryfikacji ich stosowania z zastosowaniem nowoczesnych badań celem potwierdzenia skuteczności działania stosowanych historycznie i obecnie przetworów roślinnych. Przeprowadzanie racjonalnych badań naukowych wyznacza szeroki obszar dla rozwoju współczesnego ziołolecznictwa w Polsce i na świecie.

Poszukiwanie nowych leków i poznawanie ich mechanizmów działania jest jednym z najintensywniej rozwijających się obszarów na platformie naukowej. Aktualne tendencje w badaniach rozwojowych nad nowymi produktami leczniczymi oraz ciągły postęp w badaniach botanicznych, fitochemicznych, farmakologicznych, w tym z zastosowaniem metod biologii molekularnej sprawiają, że zwraca się szczególną uwagę na ocenę aktywności standaryzowanych substancji pochodzenia roślinnego w kontekście interdyscyplinarnym. Na zagadnienia dotyczące leku roślinnego, a szczególnie leku innowacyjnego, należy spojrzeć więc szerzej i kompleksowo. Uważa się, że wielokierunkowe programy badawcze są

niezbędne dla zintegrowanego rozwoju medycyny tradycyjnej oraz dla postępu nowoczesnej farmakognozji opartej na solidnych dowodach naukowych.

Długa historia tradycyjnego stosowania substancji pochodzenia roślinnego wskazuje na to, że wiele roślin leczniczych wywiera wpływ na OUN i znajduje uznanie w profilaktyce i/lub fitoterapii chorób tego układu, m.in. *Rosmarinus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Salvia miltiorrhiza*. Wiele związków biologicznie czynnych, wywiera plejotropowy wpływ na metabolizm komórkowy w chorobach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), zarówno w modelach *in vitro* i *in vivo* [Pinho i wsp., 2013]. Jednak mechanizmy farmakologicznego działania oraz ich wpływ na ekspresję genów w OUN nie są jeszcze dokładnie poznane i wymagają dalszych badań w celu przyszłej optymalizacji fitoterapii chorób OUN i wydłużenia oraz poprawienia parametrów jakości życia starzejącej się populacji. Według Europejskiej Agencji ds. Leków szczególną uwagę zwraca się obecnie na choroby związane z zaburzeniami i utratą pamięci.

Choroba Alzheimera (AD) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną o złożonej patogenezie wliczając w to interakcje pomiędzy czynnikami ryzyka pochodzenia środowiskowego i genetycznego [Francis i wsp., 1999; Anand i wsp., 2014]. Jest najczęściej występującą formą demencji występującą aktualnie u więcej niż 30 milionów osób na świecie; przy czym szacuje się, że chorych będzie 90 milionów do roku 2050 [Yu & Zhang, 2016]. Pomimo znaczących postępów w zdobywaniu wiedzy na temat choroby Alzheimera, jej etiologia wyjaśniająca mechanizmy molekularnego podłoża nadal opiera się głównie na hipotezie cholinergicznnej oraz hipotezach dotyczących patologicznych agregacji białek (kaskada beta-amyloidu, hiperfosforylacja białka Tau) [Francis i wsp., 1999; Anand i wsp., 2014]. W przebiegu procesu neurodegeneracyjnego w chorobie Alzheimera dochodzi do zmian neurochemicznych (zaburzenia w gospodarce neuroprzekaźników) oraz neuropatologicznych, które wzajemnie ze sobą korelują, choć zmiany te nie są etapami jednej kaskady wypadków [Anand i wsp., 2014]. W chorobie Alzheimera dochodzi do odkładania się w mózgu i w mózdku dwu patologicznie konformowanych białek: beta-amyloidu pod postacią amyloidowych blaszek starczych (zewnątrkomórkowo) i białka Tau (wewnątrzneuronalnie), tworzącego alzheimerowskie zwyrodnienie neurofibrylarne oraz wielu innych intensywnie badanych markerów [Yu & Zhang, 2016].

Cholinergiczne struktury okolic podstawno-czołowych mózgu są najwcześniej dotknięte chorobą Alzheimera (hippocampus, neocortex) [Kar i wsp., 2004]. Zaburzenia układu cholinergicznego, który jest związany z układem limbicznym oraz strukturami kory nowej, ujawniają się klinicznie w postaci deficytów uwagi oraz innych funkcji poznawczych.

Niedoczynność układu cholinergicznego może być również przyczyną zaburzeń zachowania i zdolności wykonywania codziennych czynności życiowych. Dodatkowo w kaskadzie neurodegeneracyjnej, odkładający się neurotoksyczny beta-amyloid oprócz indukowania śmierci neuronów, zmniejsza wyrzut acetylocholino do szczeliny synaptycznej, a także hamuje jej synaptyczny wychwyty zwrotny w hipokampie oraz korze mózgowej [Kar i wsp., 2004]. Uważa się również, że w kaskadzie biochemicznych procesów neurodegeneracyjnych zaangażowane są mediatory procesu zapalnego ze strony komórek mikrogleju i astrocytów OUN, przez co choroba Alzheimera (i inne amyloidozy) ma przebieg chroniczno-zapalny z włączeniem stresu oksydacyjnego [Garcia-Blanco i wsp., 2017].

Obecnie uważa się, że zwiększenie dostępności acetylocholino uwalnianej do szczeliny synaptycznej może poprawić aktywność układu cholinergicznego w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera na drodze zahamowania hydrolizy tego neuroprzekaźnika [Anand i wsp., 2014]. Mimo intensywnych badań dostępne dziś metody leczenia pozostają jedynie metodami objawowymi. Inhibitory AChE są jak dotąd najważniejszą grupą leków stosowanych w leczeniu zaburzeń czynności poznawczych w przebiegu otępienia w chorobie Alzheimera. Obecnie do leczenia pacjentów stosowane są w Polsce w tej chwili tylko dwie substancje lecznicze o nazwie międzynarodowej: donepezyl (kod ATC: N 06 DA 02) oraz rywastygmina (kod ATC: N 06 DA 03), które są inhibitorami acetylocholinoesterazy i są zarejestrowane jako leki objawowe. Nie spełnia to oczekiwań, zarówno pacjentów, jak i lekarzy. Dostępne, stosowane sposoby leczenia chorób neurodegeneracyjnych (w tym choroby Alzheimera) mają znacznie mniejszą skuteczność niż się spodziewano [Sun i wsp., 2015], a terapia dłuższa niż sześć miesięcy w ogóle nie jest zalecana z uwagi na możliwość działania odwrotnego (donepezyl, galantamina) [Lane i wsp., 2006], dlatego poszukiwanie nowych leków w terapii tych chorób degeneracyjnych i poznawanie ich mechanizmów działania jest jednym z najważniejszych wyzwań badawczych, ze względu na starzenie się społeczeństwa i pilną potrzebę społeczną. Przy tym substancje pochodzenia roślinnego mogą być cenną alternatywą i przynieść nowe rozwiązania w medycynie komplementarnej, w prewencji i leczeniu wczesnych etapów w zespołach otępiennych [Pinho i wsp., 2013; Liu i wsp., 2016, H.1, H.2, H.3, H.4], do których zaliczane jest otępienie typu alzheimerowskiego.

3. Omówienie wyników badań

Wyniki badań farmakologicznych (ocena pamięci długo- i krótkotrwałej)

W badaniach farmakologicznych [H.1, H.2, H.3, H.X] do indukcji zaburzeń pamięci u szczurów wybrano skopolaminę (antagonista receptorów muskarynowych), która posiada

ugruntowane zastosowanie w tego typu badaniach modelowych [Lee i wsp., 2017]. Model skopolaminowy nawiązuje do „hipotezy cholinergicznej”, ze względu na to, że związek ten hamuje wiązanie acetylocholino do cholinergicznych receptorów muskarynowych w OUN i powoduje w ten sposób odwracalne uszkodzenia w procedurze nabywania i przetwarzania nowych informacji oraz upośledzenie utrzymania uwagi zarówno u gryzoni, jak i u człowieka [Klinkenberg & Blokland 2010]. Uważa się, że bezpośrednią przyczyną zaburzeń poznawczych będących osiowym objawem choroby Alzheimera jest niewydolność przekazywania sygnałów w układzie cholinergicznym przodomózgowia, następująca w wyniku wymierania neuronów cholinergicznych w jądrze podstawnym Meynerta i innych jąder przodomózgowia wysyłających aksony do hipokampa i kory skroniowej. Stanowi to biologiczne podłoże zaburzeń funkcji poznawczych w chorobie Alzheimera (tzw. hipoteza cholinergiczna) [Lyness i wsp., 2003].

W badaniach własnych skopolamina była zaaplikowana szczurom w dawce 0.5 mg/kg m.c. (i.p.) po 28 dniach podawania standaryzowanych wyciągów wodno-etanolowych z liści *Rosmarinus officinalis* (RE) [H.1], z liści *Melissa officinalis* (MO) [H.2], z korzeni *Salvia miltiorrhiza* (SE) [H.4] oraz z korzeni *Eryngium planum* (HP) [H.3] w dawkach 200 mg/kg m.c. (p.o.). Innym grupom zwierząt podawano: metylocelulozę (jako *vehiculum* dla ekstraktów), wodę do iniekcji (jako *vehiculum* dla skopolaminy), kwas rozmarynowy (10 mg/kg m.c., p.p.) oraz huperzinę A (0,5 mg/kg m.c., p.o.) Huperzinę A podawano jako substancję o charakterze kontroli pozytywnej. Związek ten jest alkaloidem występującym w gatunku *Huperzia serrata*, i wykazuje aktywność inhibitora AChE oraz BuChE, a także działanie antyoksydacyjne i neuroprotektoryjne w obrębie kory mózgowej i hipokampa [Wang et al., 2009]. Huperzinę A wykorzystano do badań również z uwagi na to, że brakuje informacji na temat jej wpływu na ekspresję genów dla AChE, BuChE oraz BACE1.

Wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność kognitywną w zakresie pamięci u szczurów oceniano przy użyciu dwóch testów, tj. test biernego unikania (ang. *the passive avoidance test*) do oceny pamięci długotrwałej oraz test rozpoznawania obiektów (ang. *object recognition test*) do oceny operacyjnej pamięci krótkotrwałej. Testy te standardowo są stosowane w tym aspekcie badań [Vogel-Ciernia & Wood, 2015]. Oprócz tego dodatkowo przeprowadzono testy behawioralne umożliwiające pomiar spontanicznej aktywności ruchowej (do oceny aktywności sedatywnej) i koordynacji ruchowej („test komina”, ang. *chimney test*). Dokładna procedura wykonania tych testów została opisana w publikacjach z powołaniem na źródło (H.1, H.2, H.3, H.4).

W modelu skopolaminowym po przeprowadzeniu testu biernego unikania wykazano, że dwa ekstrakty roślinne (RE oraz EP) podawane wielokrotnie zwierzętom w sposób statystycznie istotny wydłużały latencję. Oznacza to, że zwierzęta dłużej pamiętały o działającym na łapy negatywnym bodźcu elektrycznym w zaciemnionej części klatki (pomiar po 24 h). W badaniach stwierdzono, że ekstrakt RE wydłużał pamięć długotrwałą o 383% w porównaniu z grupą otrzymującą samą skopolaminę ($p < 0.05$) [H.1]. Natomiast najsilniejszym działaniem poprawiającym ten rodzaj pamięci okazała się ekstrakt EP, który wydłużał pamięć długotrwałą o 516% w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.05$) [H.2]. Tak więc wykazano po raz pierwszy, że HP oraz RE mogą niwelować skutki szkodliwego działania skopolaminy w procesie nabywania nowych informacji. Warto zauważyć, że ekstrakt MO i ekstrakt SE również wydłużały latencję w tym teście odpowiednio o 91% [H.3] oraz o 184% [H.4], jednak wyniki te nie były statystycznie istotne. Z drugiej strony wykazano, że badane ekstrakty w sposób statystycznie istotny poprawiały pamięć długotrwałą w grupie, której nie podawano skopolaminy. MO wydłużył latencję o 259% ($p < 0.05$) [H.3], SE o 159% ($p < 0.01$) [H.4], natomiast HP o 139% ($p < 0.05$) [H.2]. Oprócz tego w tej grupie zwierząt, zaobserwowano, że wielokrotne podawanie RE również poprawiało pamięć (o 66% w porównaniu z kontrolą), jednak wartość ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej [H.1]. Dla porównania huperzyna A powodowała istotne wydłużenie latencji o 186% ($p < 0.01$) [H.1]. W przypadku ekstraktów z liści melisy (MO) oraz z korzeni mikołajka płaskolistnego (HP) były to pierwsze opublikowane wyniki w tym obszarze badawczym. Stwierdzono także brak istotnego wpływu na pamięć długo- i krótkotrwałą po wielokrotnym podaniu kwasu rozmarynowego [H.1], co jest zgodne z wynikami innych autorów [Pereira i wsp., 2005]. Działanie bowiem ekstraktu z liści rozmarynu (150 i 300 mg/kg m.c., p.o.) dotyczące poprawiania pamięci długotrwałej zaobserwowano u myszy, którym nie podawano skopolaminy z użyciem tego samego testu [Zanella i wsp., 2012]. Z kolei w ocenie pamięci przestrzennej (test labiryntu wodnego Morrisa) u szczurów wykazano, że ekstrakt z liści rozmarynu podawany w niższej dawce (100 mg/kg m.c., p.o.) również poprawiał wyniki uczenia się i pamięci [Rasoolijazi i wsp., 2015]. W przypadku badań szalwii czerwonej oceniano głównie występujące w niej wybrane metabolity wtórne tj. tanshinon I, tanshinon IIA, kryptotanshinon oraz 15,16-dihydrotanshinon, które poprawiały funkcje pamięciowe w modelu skopolaminowym u myszy z zastosowaniem testu rozpoznawania obiektów [Kim i wsp., 2007].

W badaniach własnych nie wykazano statystycznie znaczącego wpływu ekstraktów roślinnych na deklaratywną pamięć krótkotrwałą mierzoną współczynnikiem dyskryminacji (OR) w teście rozpoznawania obiektów u szczurów.

Wyniki badań biochemicznych

A) Ocena wpływu badanych substancji na aktywność enzymatyczną

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność enzymów mózgowych: AChE oraz BuChE, a tym samym, czy istnieje związek pomiędzy poprawą pamięci długotrwałej a hamowaniem działania tych cholinoesteraz. Badania te przeprowadzono po testach farmakologicznych w korze czołowej i hipokampie mózgu szczurów. Dokładna procedura opisana została w publikacjach [**H.1, H.2, H.3, H.4**].

W OUN współdziałają dwa rodzaje cholinoesteraz metabolizujących acetylocholinę: acetylocholinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7.) i butyrylocholinesteraza (BuChE; EC 3.1.1.8.) [Darvesh, 2016]. Ich stężenie i aktywność jest zależna od lokalizacji w różnych częściach mózgu [Greig i wsp., 2005]. W zdrowym mózgu człowieka w metabolizowaniu acetylocholiny dominuje AChE. W przebiegu choroby Alzheimera aktywność AChE (dominująca izoforma G4) ulega zmniejszeniu do 90%, natomiast stężenie BuChE wzrasta o 30-60% w przypadku izoformy G1, ale też może ulec zmniejszeniu lub pozostawać bez zmian jak w przypadku izoformy G4 [Lane i wsp., 2006].

Początkowo badania naukowe skupiły się na hamowaniu aktywności AChE (standard terapeutyczny w AD), ale wykazano, że BuChE także odgrywa istotną rolę w metabolizmie acetylocholiny (na zasadzie kompensowania przy spadku aktywności lub stężenia AChE), zarówno w mózgu człowieka zdrowego, jak i chorego na AD z uwagi na to, że BuChE zlokalizowana jest nie tylko w neuronach regionów istotnych dla funkcji kognitywnych, ale również w gleju (istota biała mózgu) i endotelium [Gauthier i wsp., 2003; Lane i wsp., 2006]. Stwierdzono, że hamowanie aktywności obu enzymów może być bardziej racjonalniejsze i efektywniejsze w porównaniu z hamowaniem wyłącznie AChE, stąd nowa koncepcja aby w terapii AD (oraz innych zespołów otępiennych) stosować inhibitory o podwójnej funkcji lub selektywnie hamujące BuChE [Darvesh, 2016]. Wyniki badań wyraźnie wskazują, że BuChE można uważać za diagnostyczny i terapeutyczny cel (target) w AD [Greig i wsp., 2005; Darvesh, 2016]. Ostatnie badania w modelu zwierzęcym udowodniły, że hamowanie aktywności BuChE związane jest ze zmniejszeniem odkładania złogów beta-amyloidu, szczególnie w korze mózgowej [Darvesh, 2016]. Należy wspomnieć, że jak dotąd w

lecznictwie nie są dostępne selektywne inhibitory BuChE o farmakologicznym punkcie uchwytu w OUN.

Ocena wpływu na aktywność AChE

W badaniach własnych stwierdzono, że najsilniejsze działanie wykazywało wielokrotne podawanie RE szczurom, gdyż ekstrakt ten powodował spadek aktywności AChE o 55% ($p < 0,01$) w korze mózgowej i o 72% w hipokampie ($p < 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną (vs. MC + H₂O) [H.1]. Drugim pod względem hamowania AChE był SE, hamujący aktywność tego enzymu o 47% w korze mózgowej ($p < 0,05$) oraz o 45% w hipokampie w porównaniu z kontrolą ($p < 0,01$) [H.4]. Natomiast MO [H.3] oraz HP [H.2] nie wykazywały statystycznie istotnego hamowania aktywności AChE. Z kolei kwas rozmarynowy (główny kwas fenolowy występujący w roślinach z rodziny Lamiaceae) istotnie hamował aktywność AChE w korze mózgowej o 38% ($p < 0,01$), a w hipokampie o 46% ($p < 0,01$) [H.1]. Dla porównania podawanie huperzyny A powodowało hamowanie aktywności AChE o 48% w korze mózgowej oraz o 47% w hipokampie ($p < 0,01$).

Ocena wpływu na aktywność BuChE

W przeciwieństwie do AChE, RE zwiększył aktywność BuChE o 32% w korze czołowej ($p < 0,05$) oraz o 61% w hipokampie ($p < 0,01$) [H.1]. Kwas rozmarynowy powodował zwiększenie aktywności BuChE o 81% w hipokampie ($p < 0,01$) [H.1]. Z kolei SE nie wykazywał statystycznie istotnego hamowania aktywności BuChE w dwóch częściach mózgu [H.4], podobnie jak MO [H.3], HP [H.2] oraz huperzyna A [H.1].

Większość opublikowanych badań z wykorzystaniem substancji roślinnych (ekstraktów lub czystych związków chemicznych obecnych w badanych roślinach) skupiało się na ocenie aktywności hamowania AChE i / lub BuChE tylko w systemie *in vitro*, z wykorzystaniem syntetycznych enzymów [Orhan i wsp., 2008; Pinho i wsp., 2013; Tundis i wsp., 2016]. Otrzymane wyniki w badaniach własnych są bardziej rzeczywiste, gdyż uwzględniają procesy, które mogły zachodzić w żywym organizmie przed pobraniem tkanek i wskazują na istotną aktywność hamowania AChE przez RE, RA oraz SE, czego nie stwierdzono wcześniej w licznych pracach. Oprócz tego po dokonaniu porównania pomiędzy obserwowanym efektem farmakologicznym (poprawianie pamięci długotrwałej) a hamowaniem aktywności AChE w korze czołowej i hipokampie, udało się wyjaśnić na tym etapie badań zależności przyczynowo-skutkowe dla ekstraktów RE i SE oraz dla huperzyny A. Ze względu na to, że ekstrakty roślinne i badane związki chemiczne nie hamowały aktywności BuChE, w następnym etapie przeprowadzono badania molekularne mające na celu wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania tych substancji na poziomie ekspresji

genów, nie tylko dla AChE i BuChE, ale również dla BACE1, jako dodatkowego potencjalnego celu (targeta) terapeutycznego w AD.

B) Ocena wpływu badanych substancji na poziom ekspresji genów

Badanie molekularnych mechanizmów działania ekstraktów roślinnych w chorobach neurodegeneracyjnych staje się podstawowym kierunkiem w poszukiwaniu nowych aktywnych związków o aktywności neuroprewencyjnej, które w przyszłości mogłyby stanowić matryce do opracowania skutecznych leków. Jednak do tej pory nie wiele badań przeprowadzono w zakresie oceny wpływu wieloskładnikowych ekstraktów roślinnych na ekspresję genów w OUN. Tak więc ocena wpływu ekstraktów roślinnych na poziom transkryptu mRNA dla genów kodujących AChE, BuChE oraz BACE1 w ośrodkowym układzie nerwowym stanowi nowe podejście naukowe w kontekście rozwoju farmakognozji molekularnej i fitoterapii.

Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej obejmowały sekwencję etapów, tj. 1) izolacja RNA z tkanki nerwowej kory mózgowej i hipokampa, 2) synteza cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji, 3) projektowanie starterów specyficznych dla oznaczanych genów i komplementarnych do fragmentu kodującego, 4) analiza ekspresji genów metodą łańcuchowej reakcji polimeryzacji z detekcją przyrostu ilości kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).

Ocena wpływu na ekspresję AChE

W badaniach własnych dokonując oceny wpływu czterech ekstraktów (RE, MO, HP, SE) oraz kwasu rozmarynowego i huperzyny A na ekspresję AChE w korze czołowej mózgu szczura wykazano, że największy spadek poziomu ekspresji powodował MO (spadek transkryptu AChE o 52% w porównaniu z grupą kontrolną, $p < 0,05$) [H.3], następnie SE (41%, $p < 0,01$) [H.4] oraz HP (38%) ($p < 0,05$) [H.2]. Stwierdzono również, że spadek poziomu transkryptu AChE w tej części mózgu powodowało podawanie huperzyny A o 47% ($p < 0,05$). Natomiast RE oraz kwas rozmarynowy nie powodowały żadnych zmian w poziomie ekspresji AChE w tym regionie mózgu [H.1]. Wynik ten, choć nieco kontrowersyjny, można podeprzeć wcześniejszymi badaniami innych autorów, w których wykazano, że zarówno krótkotrwałe, jak i 30 dniowe podawanie niektórych modelowych inhibitorów AChE, choć powodowało hamowanie aktywności AChE w mózgu zwierząt doświadczalnych, to jednak nie prowadziło do obserwowanych zmian w ekspresji mRNA dla genu AChE [Bansal i wsp., 2009]. Analiza ekspresji AChE w hipokampie wykazała, że tylko MO w statystycznie znamiennej sposób powodował spadek transkryptu AChE o 69% w

porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$) [H.3]. Huperzina A zmniejszyła poziom transkryptu AChE o w tej części mózgu 44% ($p < 0,05$). Natomiast RE powodował zwiększenie ekspresji o 65% ($p < 0,01$) [H.1].

Ocena wpływu na ekspresję BuChE

W następnym etapie analizowano poziom transkryptu BuChE. Wyniki badań własnych wykazały, iż w korze mózgowej wszystkie ekstrakty roślinne hamowały poziom ekspresji BuChE w sposób statystycznie znamienne. Największą aktywność wykazywał MO (hamowanie o 84%) w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$) [H.3], następnie HP (o 83%, $p < 0,05$) [H.2], RE (o 59%, $p < 0,05$) [H.1], SE (o 48%, $p < 0,05$) [H.4] oraz huperzina A (o 58%, $p < 0,05$) [H.1].

Analiza próbek hipokampu wykazała, że podawanie MO powodowało istotne zmniejszenie transkryptu o 36% w porównaniu z kontrolą ($p < 0,07$). Silniejsze działanie wykazał kwas rozmarynowy (hamowanie ekspresji o 44%, $p < 0,05$). Natomiast HP [H.2], SE [H.4] oraz huperzina A [H.1] nie powodowały zmian w poziomie transkryptu BuChE, w przeciwieństwie do RE, który przyczynił się do zwiększenia ekspresji BuChE o 124% ($p < 0,05$) w tej części mózgu [H.1].

Ocena wpływu na ekspresję BACE1

Ocena statystyczna wyników badań wykazała, że trzy ekstrakty roślinne istotnie hamowały ekspresję BACE1 w korze czolowej: MO o 64 % w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$) [H.3], HP o 43 % ($p < 0,05$) [H.2], SE o 38% ($p < 0,05$) [H.4] podobnie jak huperzina A, która zmniejszała ilość transkryptu BACE1 o 38% ($p < 0,05$) [H.1]. RE nie wykazywał znaczącego wpływu (dane nie publikowane). Natomiast kwas rozmarynowy przyczynił się do trendu zwiększenia ekspresji BACE1 o 26% ($p < 0,07$) [H.1].

W próbkach hipokampu stwierdzono, że tylko MO zmniejszała ilość transkryptu BACE1 o 50% ($p < 0,05$) [H.3], a SE zwiększał ekspresję o 33% ($p < 0,01$). Ekstrakt HP [H.2] oraz kwas rozmarynowy i huperzina A nie powodowały statystycznie istotnych zmian w tej części mózgu [H.1].

4. Wyniki badań fitochemicznych

Rozpoznawanie składu chemicznego wyciągów roślinnych za pomocą systemów chromatograficznych dostarcza naukowych podstaw do wyjaśniania charakteru i specyfiki leków pochodzenia roślinnego oraz do kontroli jakości surowców roślinnych. Oznaczanie jakościowe i ilościowe stanowi rutynowe podejście metodyczne do oceny ekstraktów roślinnych o bardzo złożonym i niejednorodnym składzie chemicznym. Stąd w fitochemii

znajdują zastosowanie metody o coraz większej czułości i selektywności. Rozdział składników i ich identyfikacja z użyciem technik separacyjnych w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS) może dostarczyć także informacji o nowych związkach chemicznych w matrycy roślinnej. Tylko zdefiniowane chemicznie ekstrakty roślinne w ocenie ich farmakologicznej aktywności dają podstawę do wyjaśniania, które grupy związków (lub związki ilościowo dominujące) mogą być odpowiedzialne za obserwowane działanie.

Wszystkie wyciągi roślinne, które objęto badaniami [H.1, H.2, H.3, H.4, H.5], wykonano z zastosowaniem tej samej metody ekstrakcyjnej i z tej samej ilości surowca roślinnego o potwierdzonej tożsamości (perkolacja 50% etanolem przez 24h). W badaniach spektrofotometrycznych, w których oznaczano sumę związków polifenolowych (w przeliczeniu na kwas galusowy), wykazano, że najwięcej tych związków zawierał ekstrakt MO (33.97%) [H.3] > RE (23.58%) [H.1] > SE (12.89%) [H.5]. Natomiast najmniej tych związków było w ekstrakcie EP [H.2], w którym dominowały triterpenowe saponiny. Z kolei w ekstrakcie SE dominowały tanszinony [H.4, H.5]. Po wykonaniu dodatkowych oznaczeń stwierdzono również, że najwyższa wartość sumy pochodnych kwasu hydroksycynamonowego (w przeliczeniu na kwas rozmarynowy) była w MO (21.15%) [H.3] > RE (12.95%) [H.1] > SE (6.92%) [H.4, H.5].

W literaturze szeroko opisano aktywność neuroprotekcijną roślinnych związków polifenolowych [Kim i wsp., 2010; Kumar i wsp., 2012], saponin triterpenowych [Kim i wsp., 2013] oraz tanszinonów [Lee i wsp., 2013]. Większość badań jednak dotyczyła oceny aktywności pojedynczych związków niż wieloskładnikowych ekstraktów. Z uwagi na to, że w badaniach własnych zastosowany kwas rozmarynowy nie wyjaśnił obserwowanej aktywności ekstraktów, postanowiono oznaczyć ilościowo także inne metabolity, w przypadku ekstraktu RE był to kwas karnozowy, karnozol, olejek eteryczny, dla MO - kwas litospermowy, kwas salvianolowy A i B oraz kwas kawowy i olejek eteryczny, dla SE – tanszinon I, IIA, kryptotanszinon, dihydrotanszinon. Oprócz tego wykonano ocenę jakościową metabolitów z użyciem systemów LC-MS (profilowanie metabolomiczne).

Oznaczenia metabolitów wykonano pod kierunkiem Prof. dr hab. Piotra Kachlickiego w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Identyfikację metabolitów w badanych ekstraktach (HP, MO, SE) wykonano z użyciem dwóch systemów: (1) HPLC-DAD-MSⁿ ze spektrometrem mas z pułapką jonową (Bruker Daltonics); (2) UPLC z tandemową spektrometrią mas (hybrydowy spektrometr mas o wysokiej rozdzielczości: Q-Exactive MS/MS, Orbitrap). Widma MS/MS były analizowane po fragmentacji na jony ujemne i

dotądnie wg opisanych wcześniej metod [H.2, H.3, H.5]. Natomiast dla ekstraktu RE wykonano oznaczenia z wykorzystaniem pierwszego systemu HPLC [H.1].

Najwięcej związków chemicznych oznaczono w ekstrakcie EP (64) [H.2] > RE (45) [H.1] > MO (40) [H.3] > SE (32) [H.5]. Szczegółowa analiza fitochemiczna pozwoliła na oznaczenie prawdopodobnie 6 nowych związków flawonoidowych oraz innych pochodnych (głównie kwasu kawowego) w ekstrakcie z liści rozmarynu [H.1]. Oprócz tego oznaczono prawdopodobnie 7 wcześniej nie opisanych związków w ekstrakcie z liści szałwii (głównie pochodne tanszynonów) [H.5], 36 związków o nieznannej strukturze w ekstrakcie z korzeni mikołajka płaskolistnego [H.2] oraz prawdopodobnie po raz pierwszy oznaczono 7 związków w ekstrakcie z liści melisy (pochodne kwasu hydroksyjasmonego, teukrol, sagekumarynę i jej pochodne) [H.3].

Można przypuszczać, że związki te obecne w badanych ekstraktach mogły mieć wpływ na zaobserwowane działanie farmakologiczne.

4. Podsumowanie

W badaniach własnych postępowano według opracowanego standardu badawczego (algorytm), zgodnie z którym wielokierunkowo badano ekstrakty z wybranych roślin leczniczych. Kompleksowe badania modelowe pozwoliły na otrzymanie wyników badań, które można było porównywać pomiędzy grupami i ocenić statystyczną ich istotność. Takie postępowanie metodologiczne w porównaniu z innymi pracami umożliwiło otrzymanie pełnych, kompleksowych informacji o aktywności i mechanizmie działania fitochemicznie zdefiniowanych ekstraktów roślinnych oraz huperzyny A i kwasu rozmarynowego.

Kompleksowe porównanie wyników pozwoliło wywnioskować, że istnieje związek pomiędzy molekularnym mechanizmem działania z efektem farmakologicznym w aspekcie poprawiania pamięci długotrwałej dla ekstraktu z korzeni szałwii czerwonokorzeniowej (w skrócie: zmniejszenie ekspresji AChE w korze mózgowej + hamowanie aktywności AChE w korze mózgowej i hipokampie + poprawa pamięci długotrwałej). Inną zależność można stwierdzić dla ekstraktu z liści melisy i z korzeni mikołajka (zmniejszenie ekspresji AChE w korze mózgowej bez wpływu na aktywność AChE + poprawa pamięci długotrwałej). Natomiast w przypadku ekstraktu z liści rozmarynu, chociaż nie zaobserwowano wpływu na poziom transkryptu AChE, to stwierdzono związek pomiędzy istotnym zmniejszeniem aktywności AChE (w korze mózgowej i hipokampie) a wydłużaniem pamięci długotrwałej w modelu skopolaminowym. Dzięki wynikom przeprowadzonych badań uzupełniono również wiedzę o molekularnym mechanizmie działania huperzyny A. Wyjaśniono, że obserwowane poprawianie pamięci długotrwałej może być uzasadniane nie tylko hamowaniem aktywności

AChE w korze mózgowej i hipokampie, ale także zmniejszaniem poziomu transkryptu AChE w obu regionach mózgu zwierząt.

Ponadto wykazano, że wszystkie badane ekstrakty roślinne oraz huperzina A zmniejszały ilość transkryptu BuChE głównie w korze mózgowej zwierząt, jednak nie przełożyło się to na zahamowanie aktywności BuChE, z wyjątkiem ekstraktu z liści rozmarynu, który tą aktywność zwiększał w obu częściach mózgu. Działanie to nie było jednak dominujące, gdyż nie zaburzało to wpływu na poprawianie pamięci długotrwałej.

Oprócz tego stwierdzono, że ekstrakt z liści melisy, korzeni mikołajka i korzeni szaławii, a także huperzina A, obniżały ekspresję BACE1 głównie w korze mózgowej, co może zwrócić uwagę na potencjał terapeutyczny tych substancji ze względu na opisywany w literaturze potencjalny mechanizm zapobiegania powstawania toksycznego beta-amyloidu w mózgu w AD. Stanowi to więc o kolejnym interesującym spostrzeżeniu.

Podsumowując, wyniki badań zawarte w cyklu prac podniosły poziom wiedzy na temat mechanizmu działania oraz aktywności *in vivo* ekstraktów z wartościowych roślin leczniczych, bowiem w modelu zaburzeń pamięci indukowanych skopolaminą wykazano, że wszystkie oceniane wyciągi roślinne poprawiały pamięć długotrwałą, przy czym najsilniejsze działanie w tym zakresie wykazywał wyciąg z liści rozmarynu lekarskiego. Natomiast wyciąg z liści melisy najefektywniej zmniejszał ekspresję AChE, BuChE oraz BACE1 zarówno w korze mózgowej, jak i w hipokampie.

Stwierdzony w badaniach własnych bogaty skład fitochemiczny ocenianych ekstraktów roślinnych może wskazywać na wielokierunkowe działanie związków chemicznych poprzez wpływ na różne szlaki komórkowych procesów metabolicznych. Wcześniejsze badania wykazały bowiem, że związki polifenolowe wykazują działanie neuroprotekcyjne w chorobie Alzheimera ze względu na szerokie działanie biologiczne, tj. interakcje z metalami, wymiatanie wolnych rodników tlenowych, hamowanie mediatorów procesu zapalnego, modulowanie działania różnych enzymów oraz wpływ na wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału [Davinelli i wsp., 2012; Hu i wsp., 2013]. Uważa się, że wieloczynnikowe przyczyny i złożone procesy patologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym podczas wieloetapowej neurodegeneracji (w tym choroba Alzheimera) wymagają stosowania leków o plejotropowej aktywności z różnymi punktami uchwytu farmakologicznego działania. Ekstrakty roślinne o zdefiniowanym składzie i aktywności mogą być w przyszłości interesującą opcją profilaktyczną i terapeutyczną, a nie tylko źródłem pojedynczych aktywnych związków chemicznych, które nie zawsze same działają (np. kwas rozmarynowy).

Wyniki badań własnych mogą dostarczyć podstaw naukowych do opracowania nowego złożonego leku roślinnego zawierającego wyciągi: z liści rozmarynu, liści melisy, korzeni szalwii czerwonokorzeniowej i korzeni mikołajka płaskolistnego, o zdefiniowanym składzie fitochemicznym (głównie związki polifenolowe, triterpenowe saponiny, tanszynony i inne). Taki roślinny produkt leczniczy mógłby, na drodze synergizmu działania składników (jako tzw. „koktajl” związków biologicznie czynnych), wywierać korzystny wpływ na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego osób z grupy ryzyka oraz pacjentów w początkowych stadiach otępienia typu alzheimerowskiego.

Bibliografia

- Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology* 2014;76:27-50.
- Bansal I, Waghmare CK, Anand T, Gupta AK, Bhattacharya BK. Differential mRNA expression of acetylcholinesterase in the central nervous system of rats with acute and chronic exposure of sarin & physostigmine. *Journal of Applied Toxicology* 2009;29(5):386-94.
- Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Reviews – Drug Discovery* 2010;9:387-398.
- Darvesh S. Butyrylcholinesterase as a diagnostic and therapeutic target for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 2016;13(10):1173-77.
- Davies P, Maloney AJE. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976;2:1403.
- Davinelli S, Sapere N, Zella D, Bracale R, Intrieri M, Scapagnini G. Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012; Volume 2012, Article ID 386527: 1-11.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1999;54:137-47.
- Garcia-Blanco A, Baquero M, Vento M, Gil E, Bataller L, Cháfer-Pericás C. Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2017;373:295-302.
- Gauthier S, Emre M, Farlow MR, Bullock R, Grosberg GT, Potkin SG. Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Current Medical Research and Opinion* 2003; 19(8): 707-714.
- Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics* 2002; 14: 77-91.
- Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer - amyloid peptide in rodent. *PNAS*, 2005; 102(47): 17213-17218.
- Hu N, Yu JT, Tan L, Wang YL, Sun L, Tan L. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. *BioMed Research International* 2013; Volume 2013, Article ID 524820: 1-12.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 2004; 29(6): 427-41.

- Kim DH, Jeon SJ, Jung JW, Lee S, Yoon BH, Shin BY, Son KH, Cheong JH, Kim YS, Kang SS, Ko KH, Ryu JH. Tanshinone congeners improve memory impairments induced by scopolamine on passive avoidance tasks in mice. *European Journal of Pharmacology* 2007; 574: 140-147.
- Kim J, Lee HJ, Lee KW. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2010; 112: 1415-30.
- Kim EJ, Jung IH, Van Le TK, Jeong JJ, Kim NJ, Kim DH. Ginsenosides Rg5 and Rh3 protect scopolamine induced memory deficits in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 146(1): 294-299.
- Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2010; 34: 1307-50.
- Kumar G P, Khanum F. Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy Reviews* 2012; 6(12): 81-90, 2012.
- Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2006; 9: 101-124.
- Lee YW, Kim DH, Jeon SJ, Park SJ, Kim JM, Jung JM, Lee HE, Bae SG, Oh HK, Son KH, Ryu JH. Neuroprotective effects of salvianolic acid B on an A β 25-35 peptide-induced mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 2013; 704(1-3): 70-77.
- Lee S, Park HJ, Jeon SJ, Kim E, Lee HE, Kim H, Kwon Y, Zhang J, Jung IH, Ryu JH. Cognitive ameliorating effect of *Acanthopanax koreanum* against scopolamine-induced memory impairment in mice. *Phytotherapy Research* 2017 Feb 6. doi: 10.1002/ptr.5764.
- Liu W, Ma H, DaSilva NA, Rose KN, Johnson SL, Zhang L, Wan C, Dain JA, Seeram NP. Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. *Neurochemistry International* 2016; 100: 164-177.
- Lyness SA, Zarow C, Chui HC. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiology of Aging* 2003; 24(1): 1-23.
- Orhan I, Aslan S, Kartal M, Sener B, Can Baser KH. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry* 2008; 108: 663-668.
- Pachauri SD, Tota S, Khandelwal K, Verma PR, Nath C, Hanif K, Shukla R, Saxena JK, Dwivedi AK. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 139: 34 - 41.
- Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum LFS, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmaceutical Research* 2005; 52: 199-203.
- Pinho BR, Ferreres F, Valentao P, Andrade PB. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65:1681-1700.
- Rasoolijazi H, Mehdizadeh M, Soleimani M, Nikbakhte F, Farsani ME, Ababzadeh S. The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2015; 29: 187.
- Sun MK, Nelson TJ, Alkon DL. Towards universal therapeutics for memory disorders. *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2015; 36(6): 384-394.
- Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Loizzo MR. Recent knowledge on medicinal plants as source of cholinesterase inhibitors for the treatment of dementia. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2016; 16(8): 605-18.

Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience* 2015; 69: 8.31.1–8.31.17. doi:10.1002/0471142301.ns0831s69

Wang BS, Wang H, Wie ZH, Song YY, Zhang L, Chen HZ. Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *Journal of Neural Transmission* 2009; 116: 457-465.

Yu JT, Zhang C. Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease: from brain to periphery. *Neurotoxicity Research* 2016; 29(2): 197-200.

Zanella CA, Treichel H, Cansian R L, Roman SS. The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 48(3): 389-397.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W roku 1997 rozpocząłem studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (UAM). Natomiast w roku 1998 rozpocząłem kolejne studia magisterskie na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny w Poznaniu - UMP). W tym roku też, Pan prof. dr hab. Bogdan Jackowiak, Dziekan ds. studenckich Wydziału Biologii UAM, wyróżnił moje postępy w nauce i włączył do programu Indywidualnych Studiów Przyrodniczych.

Swoje wielokierunkowe zainteresowania naukowe związane z rozwojem, czynnością, diagnostyką i terapią chorób ośrodkowego układu nerwowego rozwijałem dzięki wsparciu swoich promotorów Pani prof. dr hab. Zofii Adamczewskiej - Goncerzewicz oraz Pana prof. dr hab. Jana Strzałko. Podczas studiów uczestniczyłem w spotkaniach Koła Naukowego Przyrodników (UAM) oraz pracując jako przewodniczący w Kole Naukowym STN przy Zakładzie Neurochemii Klinicznej Akademii Medycznej (obecnie Zakład Neurochemii i Neuropatologii, UMP). W roku 2003 uzyskałem stopień magistra farmacji na podstawie pracy „*Epidemiologia i diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych*” (promotor: prof. dr hab. Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, opiekun: dr Jolanta Dorszewska). Rok później otrzymałem stopień magistra biologii na podstawie pracy „*Choroba Alzheimera i starzenie się mózgu w kontekście neurobiologii i antropologii medycznej*” (promotor: prof. dr hab. Jan Strzałko, opiekunowie: dr Alicja Budnik, dr Agnieszka Rajewicz).

Na V roku studiów zostałem zatrudniony w Instytucie Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu (Zakład Produktów Leczniczych i Dietetycznych). W roku 2004 zostałem włączony jako wice-sekretarz do Międzynarodowej Sieci Naukowej, grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych, pt. „*Interakcje pomiędzy roślinnymi i*

syntetycznymi lekami. Korzyści i zagrożenia” (2004-2006) (dyrektor, koordynator sieci: doc. dr hab. Przemysław Mrozikiewicz). Tematyka ta stanowiła podstawę do rozwijania mojej pracy doktorskiej w Instytucie Roślin i Przetworów Zielarskich (obecnie Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich). W roku 2007 na podstawie przedłożonej i obronionej rozprawy doktorskiej pt. *„Interakcje pomiędzy lekami roślinnymi i składnikami diety zawierającymi surowce roślinne oraz lekami syntetycznymi dotyczące ośrodkowego układu nerwowego”* (promotor: doc. dr hab. n. med. Przemysław Mrozikiewicz) Rada Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nadała mi stopień doktora nauk farmaceutycznych (specjalność farmakognozja).

Pracując w Instytucie brałem udział w badaniach fitochemicznych z zastosowaniem metod chromatograficznych wyciągów roślinnych oraz wprowadzono mnie w techniki biologii molekularnej. Oprócz tego brałem czynny udział w realizacji tematów statutowych oraz projektów naukowych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych. Uczestniczyłem w organizowaniu konferencji naukowych (7th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2005; 11th International Congress of Polish Herbal Committee, 2005). Od roku 2004 prowadziłem także wykłady na potrzeby kursu zielarskiego: *„Postacie leku roślinnego”*, *„Podstawy farmakognozji”*, *„Leki roślinne wpływające na czynność OUN”*, *„Leki roślinne wpływające na czynność prostaty”*, *„Substancje naturalne wpływające na układ immunologiczny”*, *„Lek roślinny – lek syntetyczny”*, *Substancje roślinne w kosmetologii*”. Prowadziłem również współpracę z przedstawicielami: Polskiego Komitetu Zielarskiego, Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie, Akademii Medycznej w Poznaniu i Szczecinie, przemysłu zielarskiego, przemysłu farmaceutycznego, GIF, GIS.

W tym czasie opublikowałem 5 artykułów naukowych (wg załącznika 4, poz. D1 – D5), przygotowałem 20 naukowych streszczeń konferencyjnych i plakatów (wg załącznika 5, poz. A1 - A20) oraz byłem autorem i współautorem 4 referatów (wg załącznika 5, poz. A21- A24) wygłoszonych podczas: II Kongresu *„Żywność, Żywnienie a Zdrowie w Polsce Zintegrowanej z Unią Europejską”* (Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie) (A21), I Międzynarodowego Workshopu *„Interakcje pomiędzy roślinnymi i syntetycznymi lekami. Korzyści i zagrożenia”* (Poznań) (A22), konferencji Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego (Poznań) (A23), XII Międzynarodowego Sejmiku Zielarskiego (Poznań) (A24).

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Od września 2007 roku byłem zatrudniony na stanowisku asystenta, a od 2008 roku (do nadal) na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Zakładzie Farmakologii i Fitochemii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu (za zgodą Rektora UMP).

Od momentu zatrudnienia na Uniwersytecie Medycznym (2007) moje zainteresowania naukowe skupiły się na badaniach fitochemicznych i w zakresie biotechnologii roślin. Otrzymałem finansowanie przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego dwóch projektów badawczych (w ramach projektów skierowanych dla młodych pracowników nauki), pt. „Próby zwiększania metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* gatunków *Passiflora* L. z zastosowaniem metod biotechnologicznych” (2011-2012) oraz „Optymalizacja metod biotechnologicznych w zwiększaniu biosyntezy metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* wybranych gatunków z rodzaju *Passiflora* L.” (2013-2014)

Prowadzone przeze mnie badania były i są realizowane w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin UMP we współpracy z Zakładem Farmakologii i Fitochemii w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu oraz innymi zakładami UMP, w tym Katedrą i Zakładem Farmakologii UMP, oraz Instytutem Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Problematyka badawcza obejmuje kilka aspektów naukowych:

1) Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na OUN

Wyniki otrzymane z badań dotyczących aktywności ekstraktów z liści rozmarynu, liści melisy, korzeni mikołajka płaskolistnego oraz z korzeni szalwii czerwonokorzeniowej w modelu zaburzeń pamięci indukowanych skopolaminą (badania farmakologiczne, biochemiczne, genetyczne, fitochemiczne) przeprowadzone we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii UM, Katedrą i Zakładem Toksykologii UMP oraz z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, oprócz cyklu prac doświadczalnych (będących przedmiotem niniejszego autoreferatu), upowszechniono wcześniej w postaci 12 streszczeń konferencyjnych i plakatów na konferencjach krajowych i zagranicznych [wg załącznika 5, poz. B8, B11, B12, B14, B16, B17, B20, B23, B25, B36, B61].

Opublikowano także 10 artykułów naukowych z tematyki roślin oddziałujących na ośrodkowy układ nerwowy w zakresie oddziaływania ekstraktów roślinnych i związków biologicznie czynnych na receptory OUN, wpływu na aktywność sekretaz i powstawania beta-amyloidu, wpływu na transportery w barierze krew-mózg oraz w aspekcie uzależnień od

alkoholu i innych substancji, a także w terapii bólu neuropatycznego [wg załącznika 4, poz. A4, A8, D6, D7, D8, D12, D14, D189, D21, D25]. Tematykę tą prezentowano również w formie 3 streszczeń konferencyjnych, plakatów i 12 referatów na konferencjach krajowych i zagranicznych [wg załącznika 5, poz. B24, B31, B35].

2) Ocena fitochemiczna ekstraktów roślinnych

Nawiązana współpraca naukowa z Instytutem Genetyki Roślin PAN umożliwiła mi odbycie stażu naukowego, w czasie którego zapoznano mnie z technikami przygotowywania materiału roślinnego do badań metabolomicznych, a także przeprowadzania analiz metodą spektrometrii mas, wysokosprawnej chromatografii ciekowej, a także ultrasprawnej chromatografii ciekowej (UPLC-MS/MS). W ramach stażu prowadzono badania metabolomiczne ekstraktów z liści, z kultur pędowych i komórkowych oraz kalusowych pozyskanych z roślin leczniczych. Efektem stażu naukowego było określenie profilu oraz identyfikacja metabolitów wtórnych w badanym materiale roślinnym, a także porównanie chromatogramów między gatunkami. Badania są kontynuowane. Oprócz tego prowadzone są oceny składu ekstraktów roślinnych z zastosowaniem metod chromatograficznych TLC, HPTLC wraz z oceną densytometryczną (Camag). W zakresie badań fitochemicznych opublikowano 3 artykuły poglądowe [wg załącznika 4, poz. D16, D22, D23) oraz 19 streszczeń konferencyjnych i plakatów [wg załącznika 5, poz. B2, B6, B7, B9, B10, B13, B19, B33, B36, B38 - B40, B44, B45, B48, B49, B50, B51, B60].

3) Doświadczenia z zastosowaniem roślinnych kultur *in vitro*

Prowadzone badania w zakresie roślinnych kultur *in vitro* obejmują szereg doświadczeń biologicznych, które dotyczą trzech gatunków pnączy *Passiflora caerulea*, *P. incarnata*, *P. alata* i dotyczą: 1) indukcji kalusa na pożywkach stałych i płynnych oraz indukcji kultury komórkowej wraz z wykazaniem efektywnych stężeń fitohormonów, pożywek i reaktywności różnych eksplantatów roślinnych, 2) wpływu różnych czynników chemiczno-fizycznych na przyrost biomasy kalusa i zawiesiny komórkowej, 3) indukcji organogenezy przybyszowej, 4) optymalizacji warunków prowadzenia kultur pędowych, 5) ukorzeniania i aklimatyzacji zregenerowanych roślin metodą *in vitro*, 6) elicytacji biosyntezy metabolitów wtórnych z grupy C-glikozydów flawonowych oraz kwasów fenolowych w kulturach kalusowych i komórkowych z zastosowaniem jasmonianu metylu, 7) wpływu antybiotyków na parametry fizjologiczne kultury w tym na przyrost biomasy kalusa oraz rozwój kultury pędowej.

W ujęciu farmakognostycznym, metoda przebadanych przeze mnie roślinnych kultur *in vitro* umożliwia poszukiwanie alternatywnego źródła surowców leczniczych i związków biologicznie czynnych oddziałujących na układ nerwowy (np. apigenina, luteolina, witeksyna,

izowitekryna, orientyna, izoorientyna, chryzyna). Uzyskany tą metodą materiał biotechnologiczny jest obecnie badany w różnych aspektach doświadczalnych celem stwierdzenia jego profilu fitochemicznego oraz aktywności biologicznej. Z tej dziedziny opublikowano 3 artykuły [wg załącznika 4, poz. A2, D16, D21] oraz otrzymane wyniki z badań własnych i statutowych prezentowano na konferencjach krajowych i zagranicznych w postaci 20 streszczeń i plakatów [wg załącznika 5, poz. B1, B3-B7, B9, B10, B18, B19, B29, B30, B32 - B34, B41, B50, B53, B54, B58].

4) Oznaczanie potencjału antyoksydacyjnego *in vitro* z zastosowaniem metod DPPH, ABTS, FRAP. W badaniach tych bierze się pod uwagę udział stresu oksydacyjnego w patogenezie wielu schorzeń, w tym chorób OUN. Wyniki badań w których brałem udział dotyczyły ekstraktów z liści gatunków *Chelidonium majus*, *Salvia miltiorrhiza*, *Salvia Przewalski*, *Matricaria chamomila* (uprawy gruntowe), *Passiflora caerulea*, *P. incarnata*, *P. alata* (uprawy szklarniowe). Prowadzone są także badania dotyczące aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z kalusa oraz pędów zregenerowanych w roślinnej kulturze *in vitro*. Badania te przeprowadzałem i prowadzę we współpracy z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich. Otrzymane wyniki opublikowano w 2 artykułach [publikacja H.5 oraz wg załącznika 4, poz. D27] oraz prezentowano na konferencjach krajowych i zagranicznych w postaci 7 streszczeń i plakatów [wg załącznika 5, poz. B35, B40, B42, B43, B44, B52, B57].

5) Ocena aktywności przeciwpelzakowej wobec *Acanthamoeba sp.*, w modelu *in vitro*.

Pilna potrzeba przeprowadzanych badań jest uzasadniona tym, że *Acanthamoeba spp.* może spowodować chroniczne i postępujące choroby ośrodkowego układu nerwowego, takie jak zapalenie mózgu oraz ziarniniakowe zapalenie rogówki, zapalenie płuc. Poważne wyzwanie dla farmakoterapii tych chorób spowodowane jest brakiem skutecznego leczenia z powodu encystacji, co czyni te pasożyty odporne na leki przeciwpelzakowe. Badania dotyczą ekstraktów otrzymanych z liści roślin szklarniowych oraz z kultur *in vitro* *Passiflora caerulea*, *P. incarnata*, *P. alata*. Badania są przeprowadzane we współpracy z Katedrą Biologii i Parazytologii UM. Wyniki opublikowano w artykule naukowym [wg załącznika 4, poz. A.11].

6) Ocena aktywności antyalkoholowej i hipoglikemicznej ekstraktów roślinnych (zwierzęcy model uzależnienia od alkoholu oraz zwierzęcy model cukrzycy)

Badania dotyczą porównania aktywności zmniejszającej efekty odstawienne u szczurów uzależnionych od picia alkoholu dwóch ekstraktów z korzeni szałwii czerwonokorzeniowej i szałwii Przewalskiego. Badania były finansowane przez MNiSW (wykonawca grantu N405

678040). Obecnie, także we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii UMP, trwają badania w modelu cukrzycy indukowanej streptozotocyną mające na celu ocenić aktywność farmakologiczną standaryzowanego wyciągu z ziela *Passiflora caerulea*. Wyniki opublikowano w artykule naukowym [wg załącznika 4, poz. D21] oraz w postaci 3 streszczeń i plakatów na konferencjach naukowych [wg załącznika 5, poz., B22, B26, B27]. Ocena aktywności hipoglikemicznej ekstraktów roślinnych jest w trakcie realizacji.

7) Badania skryningowe *in vitro*

7.1. Ekstrakty roślinne (*Chelidonium majus*, *Passiflora caerulea*, *P. incarnata*, *P. alata*, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis*) badane są pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej (MIC, MBC, MFC) wobec szczepów bakterii i grzybów o znaczeniu klinicznym: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* oraz *Candida albicans* and *Microsporium gypseum*. Badania są przeprowadzane we współpracy z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich. Wyniki badań opublikowano w postaci 3 streszczeń i plakatów na konferencjach naukowych [wg załącznika 5, poz. B28, B35, B42].

7.2. Cytotoksyczna aktywność ekstraktów roślinnych oceniana była na komórkach ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej linii CCRF-CEM oraz jej sublinii CCRF-ADR5000 charakteryzującej się nadekspresją genu ABCB1 kodującego białko ABCB1/MDR1 odpowiedzialne za oporność wielolekową komórek nowotworowych. Celem badań było określenie potencjału działania biologicznego (działanie cytotoksyczne/cytostatyczne) ekstraktów z *Passiflora caeruleae*, *P. incarnata*, *P. alata* poprzez określenie wartości IC50 w zastosowaniu testu MTT lub barwienia błękitem trypanu oraz ocena zdolności badanych substancji do modulacji białka MDR1. Badania były przeprowadzane we współpracy z Katedrą Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP. Wyniki badań opublikowano w postaci streszczenia i plakatu na konferencjach naukowych [wg załącznika 5, poz. B28].

8. Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej

W obszarze moich zainteresowań naukowych są również badania w zakresie polimorfizmu genów związanych z osteoporozą, ze stanem przedrzucawkowym i z poronieniami nawracającymi, dzięki współpracy z Pracownią Biologii Molekularnej i Kliniki Chorób Kobięcych i Perinatologii UM. W tym zakresie opublikowano 4 prace [wg załącznika 4, poz. A6, A7, A9, A10] oraz 2 streszczenia i plakaty na konferencjach naukowych [wg załącznika 4, poz., B46, B47]. Zostałem włączony także w aspekty badawcze w zakresie ekspresji genów w prostaty [publikacje wg zał. 4: D19, wg zał. 5, B15, B21, B59] wraz w zakresie badania ekspresji genów cytochromu P450 w wątrobie szczurów dzięki współpracy z IWNiRZ oraz Katedrą Farmakologii UM [publikacje wg zał. 4: A1, A5, D9, D23, D28, wg zał. 5: B55].

5.3. Udział w projektach badawczych (w ramach współpracy z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich)

- "Rośliny lecznicze z rodziny *Lamiaceae* w chorobie Alzheimerera – badania modelowe" nr N405 417836 (2009-2011), projekt badawczy własny finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (KBN) - zakończony (**kierownik**)
- Zadanie na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej zlecone przez MRiRW pt.: „Badania biologiczne nad wprowadzeniem różeńca górskiego (*Rhodiola rosea* L.) do upraw polowych oraz badania fitochemiczne nad zmiennością cech jakościowych surowca z upraw konwencjonalnych i ekologicznych" (2011- 2012) – zakończony (wykonawca)
- „Badania porównawcze aktywności przeciwalkoholowej ekstraktów *Salvia miltiorrhiza* oraz *Salvia przewalskii* otrzymanych z uprawy oraz kultur *in vitro*” N405 678040 (2011-2015), projekt badawczy finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – zakończony (wykonawca)
- “New Bioactive Food Programmed for Pro-health Properties”, (2009-2015), no. 01.01.02-00-061/09, OPIE - Operation Programme Inovative Economy – zakończony (wykonawca)
- “Bioactive clothing with healing properties”, BIOAKOD (2012-2015), no. PBS1 177463, National Centre for Research and Development - zakończony (wykonawca)
- “Opracowanie technologii pozyskiwania kannabinoidów z konopi o niskiej zawartości THC jako środków wspomagających leczenie pacjentów onkologicznych” (2014–2017), INNOMED/I/11/NCBIR/2014 - trwa (wykonawca)

Projekty własne UM w Poznaniu:

- „Próby zwiększania metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* gatunków *Passiflora* L. z zastosowaniem metod biotechnologicznych” (2011-2012), projekt badawczy finansowany przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UMP (dla młodych naukowców), nr 502-14-03303407-09140, (kierownik)
- „Optymalizacja metod biotechnologicznych w zwiększaniu biosyntezy metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* wybranych gatunków z rodzaju *Passiflora* L.” (2013-2014), projekt badawczy finansowany przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UMP (dla młodych naukowców) nr 502-14-03303407-09140, (kierownik)

5.4. Nagrody i wyróżnienia

- Wyróżnienie i przyznanie tytułu honorowego: „Amicus Studentium” (2009) przyznane przez Radę Uczelnianą Samorządu Studenckiego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego, Poznań
- Nagroda i dyplom za prezentację posterową (2011) przyznana przez Komitet Naukowy II Ogólnopolskiej Konferencji “Bioaktywne związki roślinne – aspekty strukturalne i aplikacyjne” Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy

5.5. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Uczestniczyłem w 48 konferencjach naukowych. Jestem autorem i współautorem 82 naukowych streszczeń zjazdowych i plakatów (wykaz streszczeń załącznik 5)

Problematykę badawczą dotyczącą wpływu substancji roślinnych na aktywność ośrodkowy układ nerwowy prezentowałem jako autor lub współautor w formie 13 wystąpień ustnych (2004-2016):

1. **Ożarowski M**, Krajewska-Patan A, Mrozikiewicz PM. Interactions between herbal and synthetic drugs in aspect of transition of herbal preparations from group of medicinal products (herbal drugs) to group of novel food. Note on margin of state committee for scientific research granted international scientific Network activity. 2nd Congress Food, Nutrition and Health in Poland Integrated with European Union, National Food and Nutrition Institute in Warsaw, June 23-26, 2004.
2. **Ożarowski M**, Mrozikiewicz PM. Interakcje preparatów dziurawca z lekami syntetycznymi. I Międzynarodowy Workshop ”Interakcje pomiędzy roślinnymi I syntetycznymi lekami. Korzyści i zagrożenia.” 14 września, 2004r.
3. Mrozikiewicz PM, **Ożarowski M**. Czy interakcje pomiędzy ziołami a lekami syntetycznymi są niebezpieczne? Próba analizy. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa ”Interakcje ksenobiotyków”, Polskie Towarzystwo Toksykologiczne, Poznań, 20 maja, 2004.
4. **Ożarowski M**, Mrozikiewicz P. Rośliny o działaniu na ośrodkowy układ nerwowy – lepsze zrozumienie aktywności farmakologicznej. 12th Międzynarodowy Sejmik Zielarski, Poznań, 24-25 maja, 2007.
5. **Ożarowski M**, Mikołajczak P, Mrozikiewicz P. Molecular aspects of herbal medicinal products activity and interactions with synthetic drugs on the central nervous system level. 42nd Meeting of the Polish Biochemical Society, Szczecin, September 18-21,

2007.

6. Thiem B, **Ożarowski M**. Production of triterpenoid saponins in plant *in vitro* cultures. Central European Congress of Life Science "EuroBiotech 2008". Cracow, October 17-19, 2008.
7. **Ożarowski M**. Rośliny lecznicze oddziałujące na ośrodkowy układ nerwowy – poszukiwanie nowych leków i sposobów zapobiegania chorobom mózgu. Wykład dla słuchaczy Uniwersytetu III Wieku, Gniezno, 1 lutego, 2009.
8. Mikołajczak P, **Ożarowski M**, Kujawski R, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Cichocka J, Mrozikiewicz PM. Farmakoterapia choroby Alzheimera - rośliny zielarskie a ekspresja wybranych genów. Konferencja Naukowa „Geny i leki“. I Polski Kongres Farmakogenetyki. VI Kongres PTFKIT. Poznań, 27-28 XI 2012.
9. **Ożarowski M**, Mikołajczak LP, Thiem B, 2013, Rośliny lecznicze stosowane w fitoterapii uzależnień od nikotyny lub alkoholu - implikacje dla zastosowania roślinnych kultur *in vitro*, Konferencja naukowo-szkoleniowa “Tytoń a zdrowie” – Moda na życie bez używek, Poznań, 13-15 listopad, 2013.
10. **Ożarowski M**. Fitoterapia chorób neurodegeneracyjnych. Koło Naukowe STN przy Katedrze Farmakologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań, grudzień, 2015.
11. **Ożarowski M**, 2016, Postępy i perspektywy fitoterapii chorób neurodegeneracyjnych. Materiały Konferencyjne. XVI Sejmik Zielarski, Polski Komitet Zielarski, Trzebaw k / Stęszew, 17-18 czerwiec, 2016.
12. **Ożarowski M**, Potencjał roślin leczniczych w chorobach neurologicznych. Konferencja Naukowa Studenckiego Towarzystwa Naukowego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, kwiecień, 2016
13. Mikołajczak P, **Ożarowski M**, Kujawski R, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Szulc M, Kaminska E, Kujawska M, Seremak-Mrozikiewicz A. "Pharmacotherapy of Alzheimer's disease - medicinal plants and expression of selected genes", 20th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology – Narossa, Magdeburg, Germany, 13 czerwiec, 2016.

5.6. Szkolenia i kursy naukowe

Celem zwiększania swoich kwalifikacji w zakresie badawczym i dydaktycznym brałem udział w studiach podyplomowych, odbyłem staż naukowy, uczestniczyłem w wielu kursach i szkoleniach oraz konferencjach naukowo-szkoleniowych (załącznik 5):

Studia podyplomowe:

1. „Menedżer projektów badawczych”, dwa semestry, 2009-2010, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Centrum Integracji Europejskiej, Poznań (świadectwo)

Staż naukowy:

2. w Zespole Metabolomiki, w Instytucie Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań (22.09.2014r.- 03.10.2014r.) za zgodą Dyrektora Instytutu (opieka naukowa: prof. dr hab. Piotr Kachlicki, dr Anna Piasecka)

Kursy i szkolenia podyplomowe:

3. Kurs doskonalący „Podstawy kształcenia w uczelni medycznej”, 2007-2008. Uniwersytet Medyczny, Poznań (certyfikat)
4. Szkolenie „Medycyna ekologiczna a choroby przewlekłe”, 2008. Centrum Medyczne Szkolenia Podyplomowe, Uniwersytet Jagielloński, Kraków (certyfikat)
5. XXVIII Szkoła Zimowa „Metody badania mózgu” 2011. Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, Kraków
6. Kurs dla ekspertów: „Przygotowywanie przeglądów dokumentacji (raportów eksperta) produktów leczniczych roślinnych”, 2011. Polski Komitet Zielarski, Sekcja Fitoterapii Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, Poznań (certyfikat)
7. Szkolenie „Projektowanie i optymalizacja procesów hodowlanych w bioreaktorach” 2015. Centrum Biotechnologii, Poznański Park Naukowo-Biotechnologiczny, Labobaza, Poznań (zaświadczenie)
8. „Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta” 2015, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (PollASA), Poznań (certyfikat nr 1953/2015)
9. Kurs: specjalista ds. HR (ds. zasobów ludzkich), 2016, Niepubliczna Placówka Kształcenia Ustawicznego GoWork.pl (zaświadczenie i certyfikat)
10. Seminarium chromatograficzne organizowane przez Firmę Merck Sp. Z o.o., 2016. Centrum Konferencyjne Ośrodek Nauki PAN, Poznań (certyfikat)
11. Konferencja szkoleniowa „Stan i perspektywy rozwoju upraw zielarskich w Polsce”, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich oraz Polski Komitet Zielarski, 2016. Poznań (certyfikat)

5.7. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

Jestem członkiem następujących towarzystw naukowych:

- Polski Komitet Zielarski (od 2003)
- Sekcja Fitoterapii Polskiego Towarzystwa Lekarskiego (od 2004)
- Polskie Towarzystwo Botaniczne – Sekcja Kultur *in vitro* (od 2015)

5.8. Recenzje

Byłem recenzentem 26 prac w następujących czasopismach: *Phytomedicine (Elsevier)*, *Fitoterapia (Elsevier)*, *Journal of Psychopharmacology (British Association of Psychopharmacology)*, *Metabolic Brain Disease (Springer)*, *Journal of Neurodegenerative Diseases (Hindawi)*, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences (Springer)*, *Zeitschrift für Naturforschung (De Gruyter)*, *Medicinal Chemistry (Betham)*, *BMC Complementary and Alternative Medicine (Springer Link)*, *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, *Plant Science Today*, *Acta Physiologiae Plantarum (Springer)*, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica (De Gruyter)*, *Polish Journal of Agronomy*, *Herba Polonica (De Gruyter)*.

5.9. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

- Grupa specjalistów ds. monitorowania bezpieczeństwa stosowania produktów leczniczych (w rejestrze Urzędu Rejestracji Produktów leczniczych, Wyrobów Medycznych I Produktów Biobójczych od 2010) – sporządzanie okresowych raportów dotyczących bezpieczeństwa stosowania produktów leczniczych (PSUR) wytwarzanych w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
- Konkursy Prac Magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu: członek Jury (x2), recenzent prac magisterskich (x4)

6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

W skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi 18 prac oryginalnych oraz 24 prace pogładowe. Jestem współautorem 1 monografii książkowej i 1 rozdziału z łączną punkcją KBN/MNiSW=544 oraz IF=19,463. Prace cytowano (bez autocytowań) w 50 publikacjach wg Web of Sciences/60 publikacjach w bazie Scopus. Mój Indeks Hirscha wynosi 3 wg Web of Sciences/4 wg Scopus.

Brałem udział w realizacji 6 projektów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN (w jednym jako kierownik projektu) i 2 projektach uczelnianych UM jako kierownik. Jestem autorem lub współautorem 81 komunikatów naukowych (48 konferencji naukowych): 30 prezentowanych na zjazdach ogólnokrajowych, 64 na zjazdach międzynarodowych. W tym byłem autorem lub współautorem 7 referatów na konferencjach krajowych oraz 6 na konferencjach międzynarodowych.

21.03.2017 *Maciej Ożarowski*