

Molekularne mechanizmy działania flawonoidów na procesy komórkowe zachodzące w ludzkich fibroblastach

Marta Moskot

Flawonoidy, polifenolowe związki będące wtórnymi produktami metabolizmu roślin, występujące m.in. w warzywach, owocach, herbacie, kakao i winie, od wieków stanowią istotny element diety mieszkańców Azji, odpowiedzialne są również za tzw. „francuski paradoks”. Obejmują one grupę ponad 8 000 substancji, wśród których ze względu na strukturę chemiczną wyróżnić można m.in. flawony, flawonole, flawanony oraz izoflawony. W literaturze liczne są doniesienia na temat ich pozytywnego wpływu na procesy zapalne oraz układ krążenia, co wiąże się z właściwościami przeciwzapalnymi oraz antyoksydacyjnymi tych substancji. Prowadzone są również badania nad zastosowaniem flawonoidów w terapii nowotworów.

Genisteina (5,7-dihydrokso-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopirany-4-on), izoflawon pochodzenia roślinnego, spotykany w dużych ilościach w ziarnach soi, znalazła szczególne zastosowanie w terapii lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LChS), a wśród nich w leczeniu mukopolisacharydoz (MPS). Obiecujące wyniki uzyskane dla genisteiny przyczyniły się swego czasu do podjęcia dalszych prac badawczych mających na celu ocenę efektywności innych flawonoidów w terapii MPS. Spośród testowanych substancji szczególną uwagę zwrócono wówczas na kemferol (kaempferol (3,5,7-trihydrokso-2-(4-hydroksyfenylo)chromen-4-on) i daidzeinę (7-hydrokso-3-(4-hydroksyfenyl)chromen-4-on). Należący do grupy flawonoli kemferol, to obok kwercyliny i luteoliny najbardziej popularny związek z grupy flawonoidów, występujący w postaci licznych glikozydów w wielu surowcach, np.: liściach herbaty (łac. *Camelia sinensis*), czy kwiatach tarniny (łac. *Prunus spinosa*). Wykazuje on działanie spazmolityczne, przeciwzapalne, przeciwalergiczne i przeciwgrzybicze. Należąca do tej samej grupy flawonoidów co genisteina, tj. izoflawonów – daidzeina, również wykazuje działanie antyoksydacyjne, antyagregacyjne, a także ma zdolność do wiązania się z receptorami estrogenowymi.

Lizosomalne choroby spichrzeniowe to grupa schorzeń, u podstawy których leży dysfunkcja jednego z enzymów lizosomalnych, błonowych białek lizosomalnych, bądź też białek nielizosomalnych, wynikiem czego jest gromadzenie się w lizosomach złożeń substratów, które w normalnych warunkach ulegają rozkładowi. Lizosomy stanowią bowiem

dla komórki centrum recyklingu - rozpadu i ponownego wykorzystania makrocząsteczek pochodzenia endo- oraz egzogenne, co w dużym stopniu odpowiada za utrzymanie homeostazy w komórce. Makromolekuły podlegające degradacji w lizosomach to zarówno białka, węglowodany, tłuszcze, jak i kwasy nukleinowe, których degradacja wiąże się z obecnością w świetle lizosomu ponad 50 enzymów, w większości z grupy kwaśnych hydrolaz, takich jak proteazy, glikozydazy, nukleazy, fosfatazy i lipazy. Akumulowane makrocząsteczki powodują destrukcję komórek, a w konsekwencji uszkodzenie wielu tkanek i narządów organizmu człowieka. Często deficyt lub obniżenie aktywności danego enzymu skutkuje spichrzaniem więcej niż jednego substratu, gdyż wiele z hydrolaz uczestniczy w katabolizmie kilku makrocząsteczek. Stopień nasilenia fenotypu choroby jest ściśle związany z resztkową aktywnością enzymatyczną. Już niewielkie jej zmiany mogą znacznie wpływać na tempo akumulacji substratu. Klasyfikacja lizosomalnych chorób spichrzeniowych oparta na rodzaju akumulowanego substratu wskazuje, iż do najliczniej prezentowanych ze względu na mnogość grup chorób należą mukopolisacharydozy (7 typów, tj. MPS typu I, II, III, IV, VI, VII i IX) oraz sfingolipidozy (> 10 jednostek chorobowych).

W przebiegu mukopolisacharydoz w lizosomach dochodzi do gromadzenia glikoaminoglikanów (GAG), uprzednio zwanych również mukopolisacharydami. Na skutek defektu jednego z białek enzymatycznych spichrzonym glikoaminoglikanem może być: siarczan heparanu (HS), siarczan dermatanu (DS), siarczan chondroityny (CS), siarczan keratanu (KS) lub hialuronian (HA). Za przyczyną tego, iż niektóre etapy szlaków degradacji tych makrocząsteczek angażują wspólne enzymy, dochodzi niekiedy do akumulacji więcej aniżeli jednego rodzaju GAG w danej jednostce chorobowej. MPS, jak i inne choroby lizosomalne, to schorzenia niezwykle rzadkie, występujące ze średnią częstością 1 na 100 000 żywych urodzeń i przejawiające wyraźną heterogenność obrazu klinicznego.

Sfingolipidozy, to podobnie jak mukopolisacharydozy, wielonarządowe dysfunkcje, u podłoża których leżą zaburzenia w przemianach sfingolipidów, podstawowych elementów strukturalnych błon biologicznych oraz wtórnych przekaźników sygnału w wielu procesach zachodzących w organizmie człowieka. W przypadku wielu sfingolipidoz zajęty chorobą jest głównie układ siateczkowo-śródbłonkowy, do którego możliwości dostępu terapeutycznego są zazwyczaj znacznie większe niż do układu nerwowego i tkanek podporowych. Dlatego to właśnie ta grupa LChS najlepiej odpowiada na leczenie, szczególnie w przypadku gdy nie dochodzi do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Stosowane obecnie strategie terapeutyczne dla lizosomalnych chorób spichrzeniowych oparte są przede wszystkim na dostarczaniu aktywnego enzymu lizosomalnego do komórek

w postaci enzymatycznej terapii zastępczej (ETZ) lub transplantacji szpiku kostnego. Istotnym mankamentem wymienionych terapii, poza ryzykiem (przeszczepienie szpiku) i wysokim kosztem (ETZ), jest fakt iż żaden spośród enzymów lizosomalnych nie ma zdolności przenikania bariery krew – mózg, a co za tym idzie, brak jest skuteczności w leczeniu objawów neurologicznych, występujących chociażby w kilku typach MPS oraz sfingolipidoz. Zdecydowanie innym podejściem terapeutycznym jest metoda oparta na obniżeniu syntezy substratu (ang. *SRT - substrate reduction therapy*), zakładająca redukcję syntezy akumulowanych makrocząsteczek przez niskocząsteczkowy inhibitor do poziomu, w którym reszkowa aktywność enzymu, biorącego udział w ich rozkładzie będzie wystarczająca do zapobiegania patologicznemu spichrzeniu. Terapię opartą na redukcji syntezy substratu zastosowano w przypadku mukopolisacharydozy typu III, wykorzystując w tym celu genisteinę. Zaobserwowano, iż związek ten hamuje biosyntezę GAG i wpływa na zmniejszenie ich spichrzenia w lizosomach fibroblastów pochodzących od pacjentów cierpiących na MPS I, II, IIIA oraz IIIB.

Nadrzędny cel mojej pracy doktorskiej stanowiło pozyskanie informacji na temat działania flawonoidów na procesy komórkowe zachodzące w ludzkich fibroblastach. W prowadzonych doświadczeniach wykorzystano genisteinę, kemferol i daidzeinę oraz mieszaniny genisteiny i kemferolu, a także genisteiny i daidzeiny, opierając się na wcześniejszych obiecujących doniesieniach o wpływie wymienionych związków na poziom glikozaaminoglikanów w ludzkich fibroblastach (zdrowych, jak i pochodzących od osób dotkniętych mukopolisacharydozami).

Podjęty cel realizowano, w pierwszej kolejności, w oparciu o analizę wpływu wyselekcjonowanych flawonoidów na ekspresję genów ludzkich fibroblastów, w wybranych na podstawie wcześniejszych badań stężeniach, odpowiednio genisteiny bądź kemferolu: 30, 60 i 100 μM , daidzeiny zaś w stężeniu 60 i 100 μM , a także mieszanin genisteiny i kemferolu oraz genisteiny i daidzeiny w stężeniu 30 μM dla każdego związku, podawanych w 0,05% roztworze dimetylosulfotlenku (ang. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) stanowiącego rozpuszczalnik. Badania przeprowadzono w układzie *in vitro* z wykorzystaniem modelowych ludzkich fibroblastów skórnych HDFa (ang. *Human Dermal Fibroblast adult*). Są to pierwsze badania transkryptomyczne z zastosowaniem wymienionych flawonoidów, prowadzone na zdrowego typu, tj. o nie stwierdzonych zaburzeniach, komórkach człowieka. Dane literaturowe wskazują bowiem na testowanie wpływu flawonoidów jedynie na modelu komórek nowotworowych, których metabolizm jest mocno zmieniony i charakterystyczny jedynie dla danego typu nowotworu. W pracach eksperymentalnych wykorzystano również

fibroblasty skórne pochodzące od osób dotkniętych MPS II, jak i ludzkie komórki nowotworu szyjki macicy HeLa oraz mysie embrionalne fibroblasty MEF (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*).

Analizę transkryptomyczną przeprowadzono z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych, pozwalających m.in. na ocenę poziomu ekspresji poznanych i przewidywanych genów oraz sekwencji. Stosowano macierze Illumina HumanHT-12 BeadChip v3.0 (27 455 poznanych genów i sekwencji, 7 870 sekwencji przewidywanych genów, 48 804 oligosond) i v4.0 (28 688 poznanych genów i sekwencji, 11 121 przewidywanych genów, 47 231 oligosond). Pozyskane dane analizowano poprzez odniesienie wartości fluorescencyjnego sygnału sond próbki badanej względem stosowanej kontroli (X/K , gdzie X – wartość sygnału sond danego genu w próbce badanej, K – wartość sygnału sond w próbce kontrolnej), dla każdej sekwencji. Analiza globalna uwzględniająca dwukrotną zmianę poziomu ekspresji ($0.5 \geq X/K \geq 2.0$) wykazała, iż najwięcej genów o modulowanej aktywności odnotowano dla fibroblastów hodowanych w obecności kemferolu oraz mieszaniny genisteiny i kemferolu przez okres odpowiednio 24 i 48 godzin (698 i 362 geny dla 24 godzin oraz 1506 i 1328 genów dla 48 godzin traktowania związkiem) [2]. Podobnie poziom modulacji aktywności genomu, okazał się najsilniejszy w przypadku wspomnianych warunków inkubacji. Zarówno dla kemferolu, jak i jego mieszaniny z genisteiną, poziom ekspresji odpowiednio 4 i 3 genów określono na ponad dwudziestokrotnie zmieniony, co było najwyższą odnotowaną wartością w przypadku omawianej analizy [2].

Dane na temat poziomu modulacji aktywności transkryptomu posłużyły do analiz ontologicznych, które umożliwiły wytypowanie przedziałów komórkowych oraz szlaków i procesów, dla których najbardziej widoczny był wpływ badanych flawonoidów. Wykorzystano w tym celu programy GSEA (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*), GOrrilla (ang. *Gene Ontology enRIchment anaLysis and visualiZation tool*) oraz REVIGO (ang. *REduce + Visualize Gene Ontology*). Wśród struktur komórkowych charakteryzujących się największą liczbą genów o zmienionej ekspresji, wyróżniały się przedziały lizosomalny oraz jądrowy, dla odpowiednio najbardziej pozytywnie i negatywnie modulowanego poziomu ekspresji genów. Schemat ten powtórzył się dla genów fibroblastów hodowanych zarówno w obecności genisteiny, kemferolu oraz mieszaniny genisteiny i kemferolu, dla obu analizowanych punktów czasowych (24 i 48 godzin) w stężeniu 100 μM dla pojedynczych, zaś 30 μM każdy dla mieszaniny obu związków. W przypadku genów fibroblastów poddanych działaniu daidzeiny, jak i jej mieszaniny z genisteiną, nie zaobserwowano

podobnej tendencji. Do dalszych badań wybrano w efekcie takie procesy komórkowe jak: (i) metabolizm lizosomu [1-3], (ii) procesy syntezy i degradacji GAG [1,2], (iii) przemiany sfingolipidów [3], a także (iv) cykl komórkowy i proliferację [4]. Mechanizm odpowiadający za modulację tych procesów oceniano w komórkach traktowanych genisteiną, kemferolem oraz mieszaniną genisteiny i kemferolu w najwyższych testowanych w ramach prowadzonych badań stężeniach (100 μ M dla pojedynczych i 30 μ M każdy dla mieszaniny obu związków). Analiza poziomu ekspresji transkryptów przy uwzględnieniu kryterium $0.7 \geq X/K \geq 1.3$, wykazała znaczącą liczbę genów wspólnych dla obu badanych czasów, bez względu na typ modulacji [1,2]. Ze względu na szacunkowy charakter danych uzyskanych dzięki analizie mikromacierzowej, konieczna była ich weryfikacja z zastosowaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real time quantitative RT-PCR*, real time qRT-PCR) – najdokładniejszej metody oceny poziomu aktywności genów. Wyniki pozyskane dzięki zastosowaniu obu metod wykazały wysoką korelację.

Na podstawie listy genów przygotowanej w oparciu o dane z bazy KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) oraz AmiGO przeprowadzono szczegółową analizę poziomu ekspresji genów, których produkty białkowe należą do wytypowanych w toku niniejszych badań, procesów metabolicznych. W przypadku analizy genów związanych z metabolizmem GAG, dla obu czasów inkubacji ze związkiem, zaobserwowano zmianę ekspresji 16 genów dla fibroblastów hodowanych w obecności 100 μ M kemferolu, 11 genów dla mieszaniny genisteiny i kemferolu, jak również 10 genów dla 100 μ M genisteiny [2]. Na szczególną uwagę zasługuje obserwowane w przypadku fibroblastów traktowanych genisteiną, obniżenie poziomu ekspresji genów *XYLT1*, *EXT1* i *ST3GAL2*, których produkty białkowe zaangażowane są w początkowe etapy syntezy odpowiednio (i) łańcuchów siarczanu heparanu, dermatanu i chondroityny oraz polimeryzacji łańcucha (iii) siarczanu heparanu i (iii) siarczanu keratanu [1,2]. Korelowane może być to z obniżeniem poziomu syntezy GAG pod wpływem działania tego flawonoidu. Obniżenie ekspresji *EXT1* widoczne było dla wszystkich testowanych warunków [2].

W przypadku traktowania hodowli ludzkich fibroblastów 100 μ M genisteiną przez okres 24 godzin zaobserwowano najliczniejszą grupę genów o podwyższonym poziomie aktywności (7 genów), kodujących lizosomalne hydrolazy uczestniczące w degradacji glikozoaminoglikanów, defekty w ekspresji których korelowane są z występowaniem poszczególnych typów MPS [1,2]. Dla kemferolu z kolei było to 6 genów o podwyższonym poziomie ekspresji i 1 o obniżonym, 4 geny o podwyższonym poziomie ekspresji dla mieszaniny genisteiny i kemferolu [2]. Odkrycie to stanowiło bardzo istotny etap

prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy badań i wskazało na rolę genisteiny i kemferolu w procesie biogenezy i funkcji lizosomu [1,2]. Wiąże się ona z modulacją ekspresji, na poziomie genu jak i białka, a także translokacji czynnika transkrypcyjnego EB – TFEB (ang. *transcription factor EB*) z przestrzeni cytoplazmatycznej do jądra [1]. Czynniki te, zwany również ze względu na swoją rolę „czynnikiem biogenezy lizosomów“, po związaniu z odpowiednią sekwencją obecną w promotorach genów lizosomalnych (ang. *Coordinated Lysosomal Expression and Regulation, CLEAR*), pozytywnie reguluje ich aktywność. Efektem tego jest obserwowane w toku przeprowadzonych analiz podniesienie, pod wpływem działania genisteiny, poziomu ekspresji nawet ponad 60% genów kodujących białka lizosomalne, w tym lizosomalne hydrolazy, co skutkuje wzmożonym metabolizmem całego lizosomu. Odnotowane również zwiększenie liczby, a także zmiana rozmieszczenia lizosomów w komórce potwierdza zwiększenie efektywności omawianego procesu [1]. Eksperymenty z zastosowaniem genisteiny przy wyciszeniu ekspresji *TFEB*, uwiarygodniły modulację przez ten flawonoid aktywności genów *TFEB*-zależnych [1]. Opisany w efekcie przeprowadzonych badań mechanizm działania genisteiny wskazuje tym samym na holistyczny wpływ związku na metabolizm, zarówno bowiem na syntezę jak i degradację akumulowanych makrocząsteczek [1,2]. Zbliżone efekty w przypadku wpływu na poziom ekspresji *TFEB* wykazano również dla kemferolu oraz jego mieszaniny z genisteiną, jednakże największą liczbę genów kodujących białka lizosomalne o podwyższonej ekspresji zaobserwowano dla genisteiny [2,3]. Podwyższenie ekspresji genów defektywnych w przypadku poszczególnych LChS może mieć szczególne znaczenie u chorych obarczonych mutacją skutkującą obniżeniem ilości dostępnego w komórce enzymu. Efektywnym mogłoby być bowiem podniesienie poziomu białka enzymatycznego, co w przypadku nawet zaledwie kilkuprocentowej zmiany ma ogromne znaczenie terapeutyczne. Wiąże się bowiem ze znacznym podwyższeniem metabolizmu całego lizosomu i ma szczególne znaczenie w przypadku jednostek chorobowych, gdzie gromadzone są zarówno substraty charakterystyczne dla defektywnego białka, jak i makromolekuły będące produktami wtórnej akumulacji. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie analiz wyselekcjonowano lizosomalne choroby spichrzeniowe, dla których użycie badanej substancji mogłoby stanowić potencjalną terapię [1,3]. Większość ich stanowią mukopolisacharydozy, występujące w przypadku defektów genów: *IDUA* (MPS I), *SGSH* (MPS IIIA), *NAGLU* (MPS IIIB) i *GNS* (MPS IIID) [1,2] oraz sfingolipidozy: *ARSA* (leukodystrofia metachromatyczna), *ASAHI* (lipogranulomatoza Farbera), *CLN8* (lipofuscynoza ceroidowa - choroba Battena wariant późnoniemowłęcy), *GALC* (choroba Krabbe), *GBA1* (choroba Gauchera, otępienie

z ciałami Lewy'ego), *GLA* (choroba Fabry'ego), *GM2A* (choroba Tay-Sachsa wariant AB), *HEXA* (choroba Tay-Sachsa), *HEXB* (choroba Sandhoffa), *NAGA* (choroby Schindlera i Kanzaki), *NEU1* (sialidoza, mukolipidoza I, galaktosialidoza), *NPC1* (choroba Niemann-Picka typ C1), *NPC2* (choroba Niemann-Picka typ C2), *PPT1* (lipofuscynoza ceroidowa - choroba Battena wariant niemowlęcy), *SMPD1* (choroba Niemann-Picka typ A i B), *SUMF1* (mnogi niedobór sulfataz), i *TPP1* (lipofuscynoza ceroidowa - choroba Battena wariant późnoniemowlęcy) [2,4]. Wśród wytypowanych genów i chorób korelowanych z ich defektami znalazły się również: *AGA* (aspartyloglikozaminuria), *FUCA1* (fukozydoza), *GAA* (choroba Pompego) oraz *MANBA* (beta-mannozydoza) [1,2].

Analiza porównawcza profilu ekspresji genów kodujących wybrane białka lizosomalne, w tym hydrolazy, wykazała znaczące podobieństwo pomiędzy wpływem genisteiny (izoflawonu) i kemferolu (flawonolu). Bardzo obiecujące wydają się wyniki przy zastosowaniu mieszaniny genisteiny i kemferolu, zbliżone do danych dla genisteiny. Oba związki w wysokim stężeniu wykazują właściwości hamujące proliferację [4]. Znajduje to odzwierciedlenie w profilu modulacji ekspresji genów ludzkich fibroblastów pod wpływem działania flawonoidów [4].

Zarówno w przypadku traktowania komórek genisteiną, jak i kemferolem, największy odsetek genów ludzkich fibroblastów o obniżonej ekspresji, stanowiły bowiem geny, których produkty białkowe odgrywają istotną rolę w cyklu komórkowym i metabolizmie DNA, a zlokalizowane są w przedziale jądrowym i cytoszkielecie [4]. Do białek kodowanych przez poszczególne geny o aktywności modulowanej pod wpływem testowanych flawonoidów, należą odpowiednio: cykliny (*CCNA1*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNB3*), kinazy (*CDK2*), białka kompleksu MCM (*MCM2-7*, *MCM10*), czynniki związane z replikacją (*GINS2,3*, *GMNN*, *POLE*, *POLE2*), punktami kontrolnymi cyklu komórkowego (*p15-p19*, *p21*, *p53*, *p57*, *RBI*) oraz segregacją chromosomów (*BIRC5*, *CENPA*, *INCENP*). Analiza wpływu genisteiny na przebieg faz cyklu komórkowego ludzkich fibroblastów wykazała, iż flawonoid ten powoduje obniżenie liczby komórek w fazie G0/G1 i podwyższenie ich liczby w fazie G2/M. Ściśle koreluje to ze stopniem modulacji ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w przejściach komórki pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu [4]. Nie zaobserwowano jednakże negatywnego wpływu badanych flawonoidów na żywotność ludzkich fibroblastów skórnych [4]. Odnotowano natomiast pozytywne działanie genisteiny na proces migracji tych komórek [4].

W ramach niniejszej pracy, skoncentrowanej na określeniu mechanizmu działania flawonoidów na poziomie transkryptomu w ludzkich skórnych fibroblastach, zaproponowano

mechanizm działania tych związków na metabolizm akumulowanych w przypadku mukopolisacharydów i sfingolipidów, odpowiednio glikoaminoglikanów oraz sfingolipidów [1,2]. Stanowi to dopełnienie istniejącej na ten temat wiedzy, jak i podwaliny do dalszych badań. Wykazanie roli flawonoidów w pozytywnej modulacji ekspresji czynnika biogenezy lizosomu (TFEB) było pierwszym doniesieniem o wpływie naturalnych substancji niskocząsteczkowych na aktywność tego niezwykle istotnego dla utrzymania homeostazy komórki czynnika [1,2]. Prezentowana w pracy widoczna zmiana aktywności genów komórek eksponowanych na użyte w badaniach flawonoidy, w wielu przypadkach daje nadzieję na możliwość zastosowania tych związków w szeregu schorzeń, jako pojedynczej bądź też wspomagającej terapii [2,3]. Sprecyzowanie modulacji aktywności genów cyklu komórkowego i replikacji oraz wykazanie wpływu na poszczególne fazy cyklu pozwoliło lepiej poznać mechanizm hamowania proliferacji przez badane związki [4]. Poznanie mechanizmu działania flawonoidów na poziomie ekspresji genów stanowi nowy rozdział w badaniach nad tymi związkami, jako potencjalnymi terapeutykami.

Literatura:

1. **Moskot, M.**, Montefusco, S., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Mozolewski, P., Węgrzyn, A., Bernardo, D., Węgrzyn, G., Medina, L. D., Ballabio, A., Gabig-Cimińska, M. (2014) The phytoestrogen genistein modulates lysosomal metabolism and transcription factor EB (TFEB) activation. *Journal of Biological Chemistry*, 289:17054-17069. DOI: 10.1074/jbc.M114.555300.
2. **Moskot, M.**, Jakóbkiewicz-Banecka, J., Kloska, A., Smolińska, E., Mozolewski, P., Malinowska, M., Rychłowski, M., Banecki, B., Węgrzyn, G., Gabig-Cimińska, M. (2015) Modulation of expression of genes involved in glycosaminoglycan metabolism and lysosome biogenesis by flavonoids. *Scientific Reports*, 5:9378. DOI: 10.1038/srep09378.
3. **Moskot, M.**, Jakóbkiewicz-Banecka, J., Smolińska, E., Banecki, B., Węgrzyn, G., Gabig-Cimińska, M. (2015) Activities of genes controlling sphingolipid metabolism in human fibroblasts treated with flavonoids. *Metabolic Brain Disease*, DOI:10.1007/s11011-015-9705-x.
4. **Moskot, M.**, Jakóbkiewicz-Banecka, J., Smolińska, E., Piotrowska, E., Węgrzyn, G., Gabig-Cimińska, M. (2015) Effects of flavonoids on expression of genes involved in cell cycle regulation and DNA replication in human fibroblasts. *Molecular Cell Biochemistry*, 2015 May 24. DOI: 10.1007/s11010-015-2458-3.