

Streszczenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia to choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną zgonów na którą umiera średnio 18 mln ludzi. Uważa się, że to stres oksydacyjny stoi u podłoża wielu chorób cywilizacyjnych. Jednym z istotnych zaleceń ekspertów Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego jest profilaktyka żywieniowa oparta przede wszystkim na urozmaiconej diecie, jak i suplementacji preparatami roślinnymi, które bogate są w szeroką gamę naturalnych przeciwutleniaczy czy związków o aktywności antypłytkowej, takich jak substancje polifenolowe.

Przykładem rośliny o wielokierunkowym działaniu zdrowotnym jest mniszek pospolity (*T. officinale*). To szeroko rozpowszechniona na całym świecie bylina należąca do rodziny astrowatych (*Asteraceae*), która jest bogatym źródłem zarówno kwasów fenolowych, flawonoidów, terpenów, jak i witamin czy składników mineralnych. Oprócz walorów smakowych mniszek pospolity od wielu wieków był wykorzystywany jako remedium na wiele różnych dolegliwości. Jednak, mimo wielu doniesień i prowadzonych badań nad aktywnością mniszka pospolitego, nadal występują luki w wiedzy na temat wpływu preparatów z tej rośliny na układ hemostazy. Dlatego też, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie aktywności preparatów (ekstraktów i frakcji) wyizolowanych z korzeni, liści, płatków i owoców mniszka pospolitego (*T. officinale*) oraz kwasu cykoriowego pod kątem wybranych parametrów stresu oksydacyjnego i hemostazy w warunkach *in vitro*.

Analiza składu chemicznego poszczególnych preparatów była prowadzona we współpracy z Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Otrzymane ekstrakty, jak i frakcje były zasobne w pochodne kwasów hydroksycynamonowych, jak i flawonoidów. W przeprowadzonych doświadczeniach użyto preparaty w zakresie stężeń 0,5 – 50 µg/ml, co odpowiada stężeniom uzyskiwanym podczas suplementacji związkami fenolowymi w osoczu. Wpływ preparatów z mniszka na stres oksydacyjny zbadano oznaczając poziom anionorodnika ponadtlenkowego w płytkach krwi, peroksydacji lipidów, grup tiolowych i karbonylowych w białkach osocza i płytkach krwi. Induktorem stresu oksydacyjnego była mieszanina H_2O_2/Fe^{2+} stanowiąca donor rodnika hydroksylogowego. Natomiast kluczowym aspektem badań była ocena skuteczności preparatów z mniszka pospolitego względem parametrów hemostazy. W tym, celu przeprowadzono pomiary agregacji i adhezji płytek krwi, czasów krzepnięcia, ekspresji selektyny P i receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi z użyciem metody cytometrii przepływowej oraz tworzenia

skrzepliny w warunkach pół-fizjologicznych z wykorzystaniem techniki microchipów. Dodatkowo, wykonano oznaczenie aktywności zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej w celu sprawdzenia cytotoksyczności badanych preparatów względem płytek krwi.

Uzyskane wyniki potwierdzają, iż wszystkie preparaty z mniszka pospolitego użyte do badań są bezpieczne i nie powodują cytotoksyczności względem płytek krwi. Ponadto, posiadają one aktywność antyoksydacyjną, ponieważ wpływają istotnie na hamowanie peroksydacji lipidów i karbonylacji białek, a także chronią białka osocza i płytek krwi w warunkach stresu oksydacyjnego. Właściwości te skorelowano z obecnością aktywnych składników chemicznych w badanych frakcjach i ekstraktach z mniszka. Oprócz działania przeciwutleniającego, testowane preparaty wykazały inne właściwości kardioprotekcyjne, tj. aktywność przeciwpłytkową i antykoagulacyjną. Ich wpływ na układ hemostazy był oparty na różnych mechanizmach m.in. na hamowaniu kaskady przemian kwasu arachidonowego czy interakcji z receptorami ADP na błonie komórkowej płytek krwi. Wśród wszystkich testowanych preparatów z mniszka pospolitego, najlepsze działanie antyoksydacyjne, jak i przeciwwzkrzepowe zaobserwowano w przypadku frakcji z liści mniszka, w których też zidentyfikowano największą zawartość kwasu cykoriowego.

Podsumowując, preparaty z mniszka pospolitego mogą stanowić wartościowe źródło naturalnych substancji, których działanie może zostać wykorzystane w terapii chorób u podłoża, których stoi stres oksydacyjny. Co więcej, naturalne substancje czynne biologicznie mogą stanowić suplement diety wspomagający leczenie dolegliwości ze strony układu sercowo- naczyniowego, które związane są m.in. z nadreaktywnością płytek krwi.

Benadetta Lis

Summary

According to the World Health Organization, cardiovascular diseases are the leading cause of death for an average of 18 million people. Oxidative stress is believed to be at the core of many civilization diseases. One of the important recommendation of the European Society of Cardiology experts is the nutritional prevention based primarily on a varied diet, as well as supplementation with plant preparations that are rich in a wide range of natural antioxidants or compounds with antiplatelet activity, such as polyphenolic substances.

An example of a plant with multidirectional health benefits is the dandelion (*T. officinale*). This perennial plant, which belongs to the *Asteraceae* family, is widespread throughout the world and is a rich source of phenolic acids, flavonoids, terpenes, as well as vitamins and minerals. In addition to its taste, the dandelion has been used for many centuries as a remedy for many different ailments. However, despite many reports and ongoing studies on dandelion activity, there are still gaps in the knowledge of the plant's effects on the hemostatic system. Therefore, the main objective of this dissertation was to investigate the activity of preparations (extracts and fractions) isolated from roots, leaves, petals and fruits of dandelion (*T. officinale*) and chicoric acid for selected oxidative stress and hemostasis parameters *in vitro*.

Analysis of chemical composition of different preparations was performed in cooperation with the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Puławy. The obtained extracts and fractions were rich in derivatives of hydroxycinnamic acids and flavonoids. In the experiments, the preparations were used in the concentration range of 0.5 - 50 µg/ml, which corresponds to the concentrations obtained during supplementation with phenolic compounds in plasma. The effect of dandelion preparations on oxidative stress was studied by determining the levels of superoxide anion radical in platelets, lipid peroxidation, thiol and carbonyl groups in plasma proteins and platelets. The inducer of oxidative stress was the H_2O_2/Fe^{2+} mixture as a hydroxyl radical donor. On the other hand, the key aspect of the study was to evaluate the efficacy of dandelion preparations against haemostasis parameters. Therefore, the platelet aggregation and adhesion, clotting time, P-selectin and GPIIb/IIIa receptor expression on the platelet surface were measured using flow cytometry and thrombus formation under semi-physiological conditions with the use of microchip technique. In addition, determination of extracellular lactate dehydrogenase activity was performed to check the cytotoxicity of the tested preparations against platelets.

The obtained results confirm that all dandelion preparations used in this study are safe and do not cause cytotoxicity against platelets. In addition, they have antioxidant activity because they have significant effect on inhibition of lipid peroxidation and protein carbonylation; and they protect plasma and platelet proteins under oxidative stress conditions. These properties were correlated with the presence of active chemical constituents in the tested dandelion fractions and extracts. Besides of antioxidant activity, the tested preparations showed other cardioprotective properties, i.e. antiplatelet and anticoagulant properties. Their influence on haemostasis was based on different mechanisms including inhibition of arachidonic acid metabolism cascade or interaction with ADP receptors on platelet cell membrane. Among all the dandelion preparations tested, the best antioxidant as well as anticoagulant activity was observed in the case of fractions from dandelion leaves, in which also the highest content of chicoric acid was identified.

To sum up, dandelion preparations may be a valuable source of natural substances whose effects may be used in the therapy of diseases underlying oxidative stress. Moreover, natural biologically active substances may be a dietary supplement supporting the treatment of cardiovascular ailments, which are related to, among others, platelet hyperreactivity.

Benadetto, Lis