

Łódź, dnia 19.03.2012 r.

Joanna Saluk

dr Joanna Saluk

**Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki**

AUTOREFERAT

Łódź 2012

Spis treści

1. Życiorys naukowy	2
1.1. Zatrudnienie	2
1.2. Wykształcenie	2
1.3. Życiorys	2
2. Osiągnięcia naukowe	3
2.1. Dorobek naukowy	3
2.2. Stypendia oraz nagrody i wyróżnienia za osiągnięcia naukowe	4
2.3. Udział w realizacji międzynarodowych projektów badawczych	4
2.4. Udział w konferencjach naukowych	5
2.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych	5
2.6. Recenzowane publikacje	5
3. Osiągnięcia dydaktyczne	6
3.1. Promotorstwo prac	6
3.2. Zajęcia dydaktyczne	6
4. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	7
5. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	9
5.1. Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny.....	11
5.1.1. Wpływ β -glukanu na równowagę układu hemostazy	15
5.1.2. Badanie ochronnego wpływu L-karnityny na układ hemostazy	18
5.1.3. Ochrona elementów układu hemostazy przez związki cukrowe	21
5.1.4. Badanie mechanizmów działania antocyjanów na układ hemostazy	24
5.1.5. Podsumowanie	27
5.2. Aktywność naukowa niewliczana do osiągnięcia naukowego	28
5.3. Literatura	31

1. Życiorys naukowy

1.1. Zatrudnienie

Od **2001** adiunkt w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego
2000-2001 asystent w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego

1.2. Wykształcenie

2001 stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii
1996 tytuł magistra biologii w zakresie biologii molekularnej

1.3. Życiorys

W roku 1996 uzyskałam tytuł magistra biologii w zakresie biologii molekularnej, na podstawie pracy magisterskiej „Wpływ lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* na płytki krwi świni” wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Wachowicz.

Bezpośrednio po ukończeniu studiów magisterskich, **w 1996 r.** rozpoczęłam studia doktoranckie, jako słuchaczka Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego.

W trakcie trwania studiów doktoranckich, **w październiku 2000 r.** zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego.

W kwietniu 2001 r. uzyskałam stopień doktora nauk przyrodniczych nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, na podstawie rozprawy na temat „Zmiany aktywności biologicznej płytek krwi wywołane działaniem lipopolisacharydów *Proteus mirabilis*”, której promotorem była prof. dr hab. Barbara Wachowicz.

W październiku 2001 r. zostałam mianowana na stanowisko adiunkta w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego.

2. Osiągnięcia naukowe

2.1. Dorobek naukowy

Mój całkowity dorobek naukowy obejmuje:

- **50 recenzowanych prac naukowych**
IF 58,36 (zgodnie z rokiem ich opublikowania)
pkt. MNiSW₂₀₁₁ 842
Indeks cytowań według danych Web of Science – 246
(bez autocytowań 203)
(indeks h – 9)
- **41 doniesień konferencyjnych**

Na dorobek ten składa się:

- **37 prac eksperymentalnych z tego 36 w języku angielskim w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (sumaryczny IF wynosi 57,40; MNiSW₂₀₁₁ 742)**
- **12 prac przeglądowych (sumaryczny IF 0,96; pkt. MNiSW₂₀₁₁ 100)**
- **1 rozdział książkowy w języku angielskim** (Kołodziejczyk-Czepas J, Tsirigotis-Wołoszczak M, Saluk J, Pawlaczyk I, Bijak M, Wachowicz B, Gancarz R. *Agrimonia* – antioxidative effects and perspectives for medicinal application. Serial Publication Recent Progress in Medicinal Plants 2012; Vol. 34(2): 21-33
- **41 drukowanych doniesień na kongresach, zjazdach oraz sympozjach międzynarodowych i krajowych:**
 - 21 doniesień międzynarodowych
 - 20 doniesień na konferencjach krajowych
- **Ustny referat** "Response of blood platelets to bacterial lipopolysaccharide" wygłoszony podczas XXIst Platelet Meeting odbywającego się w Lutherstadt Wittenberg w Niemczech w 2006 r.

Przed otrzymaniem stopnia naukowego doktora zostało opublikowanych 5 prac (IF 2,67; pkt. MNiSW₂₀₁₁ 52).

Na okres po uzyskaniu stopnia doktora przypada:

- **33 artykuły doświadczalne (łącznie IF 54,73; pkt. MNiSW₂₀₁₁ 690)**
- **11 artykułów przeglądowych (łącznie IF 0,96; pkt. MNiSW₂₀₁₁ 100)**
- **1 rozdział w książce w języku angielskim**
- **28 drukowanych komunikatów zjazdowych**
 - 16 doniesień międzynarodowych
 - 12 doniesień na konferencjach krajowych
- **Referat Ustny**

2.2. Stypendia oraz nagrody i wyróżnienia za osiągnięcia naukowe

W roku 2010 zostałam laureatką konkursu na stypendia L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki przyznawane przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO, za wybitny dorobek naukowy Polkom-Naukowcom biorącym udział w badaniach naukowych o charakterze aplikacyjnym w obszarze nauk biologiczno-medycznych, które są w końcowym etapie realizacji pracy habilitacyjnej.

- Roczne stypendium habilitacyjne „L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki” dla badaczek kończących pracę habilitacyjną – 2010 r.
- W latach 2008-2010 otrzymywałam stypendium habilitacyjne UŁ.

Za cykle publikacji, których jestem współautorką otrzymałam nagrody zespołowe:

- Nagroda Zespołowa Rektora UŁ, stopnia pierwszego – 2009 r. za współautorstwo w cyklu publikacji pt. "Biochemiczne zmiany w układzie krążenia wywołane stresem oksydacyjnym".
- Nagroda Zespołowa Rektora UŁ, stopnia pierwszego, za cykl publikacji – 2004 r.
- Nagroda Zespołowa Ministra Edukacji Narodowej i Sportu za cykl publikacji – 2002 r. za współautorstwo w cyklu prac dotyczących badań stresu i zmian funkcji płytek krwi w stanach nowotworowych chemioterapii i pod wpływem wybranych składników diety.

2.3. Udział w realizacji międzynarodowych projektów badawczych

Od roku 2007 uczestniczę w pracach badawczych w ramach projektu WROVASC- Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej we Wrocławiu. Projekt Kluczowy PO IG, (2007-2013), w ramach Priorytetu 1., Działania 1.1 PO IG, Poddziałania 1.1.2.; zadanie nr 17 w projekcie, zatytułowane: „Antykoagulanty pochodzenia roślinnego z perspektywą wykorzystania w profilaktyce i leczeniu zakrzepic. Przeciwwagregacyjne właściwości preparatów roślinnych. Badania nad oddziaływaniem z receptorami błon płytek krwi”.

- Od czerwca 2011 r. jestem głównym wykonawcą w podzadaniu 17.H: „Ocena właściwości antyoksydacyjnych preparatów roślinnych wobec płytek krwi od dawców z powikłaniami sercowo-naczyniowymi”.
- Od listopada 2011 r. kieruję podzadaniem 17.G: „Badania wobec płytek krwi ludzkiej w celu oceny potencjalnych właściwości przeciwplatek i lub antyagregacyjnych preparatów roślinnych oraz ich frakcji”.

2.4. Udział w konferencjach naukowych

- Udział w organizowaniu konferencji naukowych:
 - w roku 2009 podczas organizacji 44 Zjazdu PTBioch w Łodzi (sesja „Biochemia hemostazy”)
 - w roku 2005 w przygotowaniu IX Konferencji Biologii Komórki w Łodzi (sesja „Płytki krwi i hemostaza”)
- Uczestnictwo w:
 - 11 konferencjach międzynarodowych (14 doniesień posterowych)
 - 22 konferencjach krajowych (27 doniesień posterowych)
- **Wykład** „Response of blood platelets to bacterial lipopolysaccharide” XXIst Platelet Meeting, Niemcy, 2006 r.

2.5. Członkostwo w towarzystwach naukowych

- Od roku 2010 członek Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki
- Od roku 2008 członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

2.6. Recenzowane publikacje

- World Journal of Biological Psychiatry 2007 (IF 1,691)
 - Isoprostanes as indicators of lipid peroxidation in schizophrenia
 - The changes of aggregability of blood platelets in schizophrenia
- Platelets 2010 (IF 2,117)
 - Comparative properties of commercial polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* and seeds of grape on activities of different antioxidative enzymes in human blood platelets
 - The nitrative and oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients; the protectory action of *aronia melanocarpa* extract
 - Homocysteine and its thiolactone may promote apoptotic events in blood platelets *in vitro*
 - Response of blood platelets to resveratrol during model of hyperhomocysteinemia
 - The extract from hop cones (*Humulus lupulus*) as a modulator of oxidative stress in blood platelets
- Platelets 2009 (IF 2,272)
 - Effects of garcinol and guttiferone K isolated from *Garcinia cambogia* on oxidative/nitrative modifications in blood platelets and plasma
 - Effects of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation

3.Osiągnięcia dydaktyczne

3.1. Promotorstwo prac

Informacja na temat promotora pomocniczego

Nie pełniłam funkcji promotora pomocniczego w przewodach doktorskich

Kierowanie 5 obronionymi pracami licencjackimi i jedną bieżącą, prowadzonymi na Kierunku Biotechnologia UŁ:

- 2011/2012 „Metody pozyskiwania aktywnych biologicznie składników najpopularniejszych odżywek dla sportowców. Ich budowa, właściwości, szlaki biochemiczne, w które ingerują. Badania kliniczne potwierdzające ich skuteczność”. (“Methods of obtaining biologically active components of the most popular sport supplements. Their structure, properties, and biochemical pathways in which they interfere. Clinical studies confirming their effectiveness”)
- 2010/2011 „Metody biotechnologiczne użyteczne w kreowaniu zmienności genetycznej roślin uprawnych” (“Biotechnological methods useful in creation of genetic variability of crops”)
- 2009/2010 „Lipopolisacharyd bakteryjny - immunostymulacja a cytotoksyczność” (“Bacterial lipopolysaccharide - immunostimulation and cytotoxicity”)
- 2009/2010 „Probiotyki i prebiotyki jako naturalne immunomodulatory” (“Probiotics and prebiotics as natural immunomodulators”)
- 2008/2009 „Ekstrakty roślinne źródłem biofarmaceutyków i nutraceutyków” (“The extracts from plants as a source of biopharmaceutics and nutraceutics”)
- 2008/2009 „Właściwości przeciwzapalne ekstraktów roślinnych – ich biodostępność i aktywność biologiczna” (“Anti-inflammatory properties of plant extracts – bioavailability and biological activity”)

3.2. Zajęcia dydaktyczne

Od roku 1996 prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów studiów stacjonarnych oraz niestacjonarnych, kierunków biologia, biotechnologia oraz ochrona środowiska, dla różnych specjalności (biochemia, biologia środowiskowa, fizjologia, genetyka i mikrobiologia). Prowadzone przeze mnie zajęcia to: ćwiczenia z biochemii, ćwiczenia z chemii organicznej i biochemii, ćwiczenia w ramach pracowni specjalistycznej, ćwiczenia z enzymologii, ćwiczenia stanowiące wstęp do analizy biochemicznej, seminarium licencjackie.

4. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Badania prowadzone przeze mnie w ramach przygotowywania pracy magisterskiej pt. „Wpływ lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* na płytki krwi świni” stanowiły podstawę mojej dalszej pracy badawczej. Po rozpoczęciu studiów doktoranckich uczestniczyłam w pracach zespołu naukowego kierowanego przez prof. dr hab. Barbarę Wachowicz, prowadząc badania koncentrujące się wokół zagadnień związanych z właściwościami i biologiczną aktywnością płytek krwi. Podstawową funkcją płytek krwi, związaną z ich wysoką reaktywnością, prowadzącą do adhezji, degranulacji oraz agregacji pobudzonych płytek, jest utrzymywanie prawidłowej hemostazy, w którą zaangażowane jest szereg oddziałujących ze sobą elementów, w tym: ściana naczyń krwionośnych, płytki krwi, elementy kaskady krzepnięcia i układ fibrynolizy oraz komórki fagocytarne (układ siateczkowo-śródbłonkowy). Zmiany biologicznej aktywności płytek, związane głównie z ich nadmierną aktywacją, stanowią ważny czynnik ryzyka stanów patologicznych będących istotnym elementem rozwoju chorób, w tym wielu uznawanych za tzw. choroby cywilizacyjne. Prowadzone przeze mnie prace badawcze, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, w głównej mierze koncentrowały się na poznaniu mechanizmów przemian metabolicznych towarzyszących aktywacji płytek krwi w wyniku ich interakcji z toksyną bakteryjną. Badania dotyczyły fizjologicznej odpowiedzi płytek oraz zmian stopnia ich aktywacji w wyniku bezpośredniego działania odpowiedzialnych za rozwój zapalenia silnych patogenów, tj. endotoksyn bakteryjnych (lipopolisacharydów; LPS) pochodzących z bakterii Gram-ujemnych. W swoich pracach wykazałam wyraźny stymulujący wpływ LPS na aktywność biologiczną płytek krwi w warunkach *in vitro*, przede wszystkim na pierwszy etap aktywacji tj. adhezję płytek do kolagenu (*Platelets*, 2001), jak również na sekrecję białek oraz nukleotydów adeninowych ze specyficznych ziarnistości płytkowych (*Microbios*, 1999). W roku 2001 stosując czułą metodę cytometrii przepływowej potwierdziłam aktywację płytek przez LPS oznaczając poziom powierzchniowej ekspresji markera aktywacji płytek, jakim jest białko selektyna P (*Acta Universitatis Lodzensis Folia Biochemica et Biophysica*, 2001). Stymulację płytek przez LPS w warunkach *in vitro* oceniałam również poprzez zmiany zachodzące w statusie red-ox komórek poddanych działaniu toksyny. Otrzymane przeze mnie wyniki

wskazują, że LPS indukuje enzymatyczną peroksydację lipidów płytkowych, w tym przemianę arachidonianu prowadzącą do powstania lipidowych mediatorów zapalenia - tromboksanu A_2 (TXA₂) i prostaglandyn, które pełnią istotną rolę w patogenezie szoku septycznego (*Platelets*, 1996; *Microbiology and Immunology*, 1998). LPS powoduje również wzrost produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, oznaczanego metodą redukcji cytochromu c (*Microbios*, 2000), a także innych reaktywnych form: nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylogowego, tlenu singletowego i rodników lipidowych, co wykazałam stosując metodę chemiluminescencji (*Cell Biology and Toxicology*, 2001). W celu wyjaśnienia mechanizmów tworzenia wolnych rodników w płytkach poddanych działaniu LPS prowadziłam badania z użyciem odpowiednich inhibitorów: staurosporyny, wortmaniny i indometacyny, hamujących aktywność kluczowych enzymów przekazywania sygnałów w komórce. Badania wykazały, że generowanie $O_2^{\cdot-}$ w pobudzonych przez LPS płytkach odbywa się na drodze kilku szlaków metabolicznych z udziałem cyklooksygenazy, białkowej kinazy C oraz 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (*Thrombosis Research*, 2001). W kolejnym etapie prac wykazałam, że LPS, podobnie jak inni agoniści płytek, generuje w tych komórkach nie tylko produkcję reaktywnych form tlenu, ale również zwiększa poziom wysoce reaktywnego tlenku azotu (*Current Microbiology*, 2007). Badając mechanizm stresu oksydacyjnego generowanego w płytkach krwi przez cząsteczki LPS oznaczałam także poziom grup tiolowych związków niskocząsteczkowych (stosując metodę HPLC) oraz białkowych grup -SH. Wyniki sugerują udział LPS w metabolizmie związków tiolowych, między innymi poprzez zdolność cząsteczek LPS do wiązania się z grupami -SH (*Current Microbiology*, 2005).

Z badań przeprowadzonych przeze mnie jednoznacznie wynika, że lipopolisacharyd bakteryjny jest czynnikiem bezpośrednio aktywującym płytki krwi w warunkach *in vitro*. Wcześniejsze badania opisywane w literaturze wskazywały głównie na pośrednie działanie LPS na płytki, przy udziale tzw. mediatorów zapalnych uwalnianych z komórek układu immunologicznego. Doniesienia te dotyczyły głównie wzmożonej agregacji płytek krwi w wyniku działania LPS w warunkach *in vivo*, gdzie w pełnej krwi istnieje szereg mechanizmów mogących współuczestniczyć w aktywacji płytek. Moje badania *in vitro* wykazały i potwierdziły istotną rolę płytek krwi, jako komórek istotnych w rozwoju reakcji zapalnych wywołanych bakteriami Gram-ujemnymi.

Cząsteczka lipopolisacharydu jest polimerem złożonym z lipidowej części rdzeniowej, połączonej z nim części oligosacharydowej oraz łańcuchów polisacharydowych. Analiza porównawcza aktywności cząsteczek LPS pochodzących z odpowiednio zmutowanych szczepów bakteryjnych pozwoliła mi ocenić, który region cząsteczki LPS odpowiedzialny jest za aktywację płytek, co ma znaczenie w planowaniu terapii. Z danych literaturowych wynika, że część lipidowa stanowi najmniejszy, czynny biologicznie fragment LPS i jest uznawana za tzw. centrum aktywne cząsteczki. Uzyskane przeze mnie wyniki również wykazały wysoką aktywność części lipidowej, jednak niższą niż cząsteczki kompletnej, co wskazuje na modulujący wpływ fragmentu polisacharydowego (*dwie prace w Platelets, 2002*).

W swoich badaniach dowiodłam, że w wyniku bezpośredniego oddziaływania LPS i płytek krwi zmienia się biologiczna aktywność tych komórek, a przez to ich fizjologiczne funkcje. Ma to istotne znaczenie w stosowaniu skutecznych terapii przeciwzapalnych, które oprócz hamowania interakcji endotoksyn z komórkami układu immunologicznego powinny być także skierowane przeciwko oddziaływaniom LPS z płytkami krwi.

Na podstawie wyników prowadzonych doświadczeń powstała moja rozprawa doktorska pt. „Zmiany aktywności biologicznej płytek krwi wywołane działaniem lipopolisacharydów *Proteus mirabilis*” oraz cykl 13 publikacji eksperymentalnych. Znaczne wzbogacenie mojej wiedzy teoretycznej w trakcie trwania prac badawczych umożliwiło mi napisanie 3 prac przeglądowych na temat aktywności LPS i jego wpływu na płytki krwi (*Acta Universitatis Lodziensi, Folia Biochimica et Biophysica, 1999; Postępy Biochemii, 2005; Postępy biologii komórki, 2007*).

5. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

W trakcie prowadzenia badań zmierzających do wyjaśnienia roli oraz mechanizmów działania LPS na płytki krwi zostałam włączona w prace zespołu koncentrujące się wokół zagadnień związanych z wpływem składników codziennej diety pokarmowej człowieka na funkcje hemostatyczne płytek. Pierwsze badania, w których uczestniczyłam, dotyczyły ochronnego wpływu resweratrolu na płytki poddane działaniu LPS (Olas i wsp., 2001a,b; Olas i wsp., 2002), w których

wykazano ochronny, przeciwplatek i antyoksydacyjny efekt resweratrolu względem toksycznego działania LPS.

Moje zainteresowania naukowe zaczęły stopniowo skupiać się na poszukiwaniu substancji, które dostarczane z pożywieniem mogłyby oddziaływać pozytywnie na elementy układu hemostazy, pełniąc istotną rolę zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu chorób układu krążenia. W pierwszym etapie prac rozpoczęłam badania nad rolą wybranych związków organicznych selenu w przemianach biochemicznych zachodzących w płytkach krwi w następstwie ich aktywacji. Badania te prowadziłam dzięki współpracy z profesorem dr hab. inż. Jackiem Młochowskim z Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej. Intensywne badania prowadzone na przestrzeni XX wieku, nad biologiczną aktywnością związków selenu doprowadziły do odkrycia, że organiczne połączenia selenu są znacznie mniej toksyczne, niż połączenia nieorganiczne (Klayman i Günther., 1973). Spowodowało to wzmożenie w latach 80. i 90. XX w. prac nad biochemią oraz farmakologią organicznych związków selenu, zmierzających do zastosowania ich jako terapeutyków pełniących funkcje antyutleniaczy, modulatorów enzymów, leków przeciwnowotworowych oraz substancji przeciwzapalnych. W toku badań klinicznych ebselen (2-fenilo-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on), związek działający jako mimetyk peroksydazy glutationowej, uznany został za potencjalny środek przeciwzapalny oraz przeciwnowotworowy (Parnham i wsp., 1991). Przeprowadzone przeze mnie badania porównawcze z użyciem ebselenu oraz 5 jego pochodnych wykazały, że bis (2-aminofenilo) diselenid jest związkiem o najsilniejszej aktywności antyoksydacyjnej, ocenianej poprzez zdolność do hamowania w płytkach krwi peroksydacji lipidów oraz utleniania niskocząsteczkowych tioli, a także poprzez ochronę białek i lipidów osocza przed ich oksydacyjnymi i nitracyjnymi uszkodzeniami. Z moich badań wynika, że biologiczna aktywność diselenidu jest znacznie wyższa niż ebselenu. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami literatury naukowej, wskazującej na diselenidy, jako na wysoce efektywne biologicznie syntetyczne analogi ebselenu. Wyniki moich badań zostały opublikowane w 2006 roku (Saluk-Juszczak i wsp., 2006; Nowak i wsp., 2006).

5.1. Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny

Podstawową funkcją płytek krwi jest ich udział w utrzymywaniu prawidłowej hemostazy. Aktywność biologiczna płytek, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i w stanach patologicznych zależy od stopnia ich aktywacji. Aktywacja płytek, pomimo braku jądra komórkowego, jest procesem bardzo złożonym, związanym z transdukcją sygnału poprzez szereg receptorów powierzchniowych znajdujących się w błonie komórkowej płytek, sprzężonych z elementami enzymatycznych łańcuchów przekazywania sygnałów. Duża liczba swoistych receptorów błonowych powoduje, że płytki charakteryzują się wysoką reaktywnością, łatwo ulegając aktywacji na skutek działania wielu fizjologicznych i niefizjologicznych agonistów (Sikora i Kostka, 2005). Szlaki przekazywania sygnału poprzez specyficzne receptory zależne są od rodzaju czynnika stymulującego, jednak wieloetapowy proces aktywacji płytek prowadzi zawsze do fizjologicznej odpowiedzi tych komórek, która wyraża się reorganizacją cytoszkieletu i zmianą kształtu komórki, adhezją do ściany naczynia krwionośnego, sekrecją związków zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach oraz tworzeniem agregatów płytkowych przy udziale fibrynogenu. Zmianom morfologicznym towarzyszą przemiany biochemiczne: kaskadowa przemiana kwasu arachidonowego, zmiana stężenia cAMP i cGMP, aktywacja kinaz i fosforylacja białek, powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) i przemiana fosfatydyloinozytoli (Kralisz, 2008 a,b).

Nieprawidłowe funkcjonowanie płytek krwi, związane z ich nadmierną aktywacją, jest jednym z podstawowych czynników ryzyka chorób w układzie sercowo-naczyniowym, związanych z występowaniem powikłań zakrzepowo-zatorowych (Wu, 1996; Patrono i wsp., 2004). Powikłania zakrzepowo-zatorowe, prowadzące do choroby niedokrwiennej serca, zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwiennego mózgu, miażdżycy, zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych, są przyczynami zgonów lub przewlekłych stanów chorobowych, ograniczających w znacznym stopniu jakość życia chorych oraz generującymi duże koszty dalszego leczenia i opieki (Eby, 1993). Jednym z podstawowych czynników zwiększających ryzyko zachorowania jest nieprawidłowa dieta. W związku z kluczowym znaczeniem funkcjonowania płytek w występowaniu powikłań zakrzepowo-zatorowych, profilaktyka ograniczająca nadmierną aktywację tych komórek, poprzez zachowanie

właściwej diety, ma priorytetowe znaczenie w przeciwdziałaniu chorobom kardiologicznym (Dutta-Roy, 2002).

Badania epidemiologiczne, podejmowane w celu wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za skutki nieprawidłowej diety, złych nawyków żywieniowych i niewłaściwego trybu życia, podkreślają udział wolnych rodników i stresu oksydacyjnego w powstawaniu i rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego (Bray, 2000). W związku z tym dostarczanie z pożywieniem naturalnych przeciwutleniaczy może mieć istotny wpływ na zachowanie prawidłowej hemostazy w profilaktyce chorób kardiologicznych.

W codziennej diecie pokarmowej człowieka zawarte są liczne związki o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych, jednak aktywność biologiczna, biodostępność i szlaki metaboliczne większości z nich wciąż pozostają słabo poznane. Dlatego moje zainteresowania naukowe koncentrują się na poszukiwaniu aktywnych biologicznie substancji naturalnych, w celu wdrożenia ich jako suplementów diety lub składników żywności funkcjonalnej w profilaktyce chorób związanych z nadmierną aktywacją płytek krwi, w tym stanowiących globalny problem społeczny chorób sercowo-naczyniowych.

Główny cel prowadzonych przeze mnie badań naukowych, stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny, związany jest z oceną potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych oraz przeciwplatekcyjnych związków, których zastosowanie w formie nutraceutyków lub suplementów diety mogłoby chronić układ hemostazy przed skutkami stresu oksydacyjnego. Do badań wybrałam związki naturalne, które są już stosowane jako suplementy, ale w celach innych niż ochrona układu hemostazy, a także substancje stanowiące składniki ogólnodostępnych w diecie owoców i warzyw. Są to: β -glukan - związek stosowany jako immunostymulator, L-karnityna – suplement diety sportowców i składnik preparatów odchudzających, glukaran wapnia – preparat chemoprewencyjny, oraz inne pochodne kwasu glukarowego i glukonowego obecne w jabłkach i innych owocach, a także wyciąg antocyjanów z powszechnej w diecie czerwonej kapusty, stosowanych jako barwniki spożywcze. Prowadzone przeze mnie badania skupiają się na dostępnych preparatach oraz na substancjach zawartych w roślinach powszechnie występujących, tanich i łatwych w uprawie, dzięki czemu stosowanie ich w ramach profilaktyki nie jest kłopotliwe, natomiast łatwe pozyskanie substancji czynnej może obniżyć koszty leczenia powikłań chorób naczyniowych.

Prowadzone badania są badaniami podstawowymi, *in vitro*, opartymi na modelu komórkowym, jakim są wyizolowane płytki krwi oraz na osoczu, w którym znajdują się podstawowe białka układu krzepnięcia oraz fibrynolizy.

Wyniki badań będące podstawą osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny zawarte są w cyklu publikacji naukowych pod wspólnym tytułem: „**Ochrona hemostatycznej aktywności płytek krwi oraz elementów osocza przez antyoksydanty egzogenne w stresie oksydacyjnym**”.

Cykl ten zawiera **11 publikacji**, w tym 10 prac eksperymentalnych (wszystkie w języku angielskim, w czasopismach znajdujących się w bazie JCR) oraz 1 pracę przeglądową. Łączny IF (zgodny z rokiem opublikowania) cyklu publikacji wchodzących w zakres osiągnięcia naukowego wynosi **21,35**, a liczba punktów MNiSW₂₀₁₁ **232**.

Cykl publikacji przedłożony do oceny:

1. **Saluk-Juszczak J***, Królewska K, Wachowicz B. Response of blood platelets to β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. Platelets 2010; 21(1): 37-43 (IF 2,117), (pkt.MNiSW-20) (*udział 70%: zaprojektowanie doświadczeń oraz wykonanie części z nich, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu i współudział w przygotowaniu publikacji do druku*)

2. **Saluk-Juszczak J***, Królewska K, Wachowicz B. β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as a blood platelet antioxidant. Platelets 2010; 21(6): 451-9 (IF 2,117), (pkt.MNiSW-20) (*udział 65%: zaprojektowanie doświadczeń oraz wykonanie części z nich, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu i współudział w przygotowaniu publikacji do druku*)

3. **Saluk-Juszczak J***, Królewska K, Wachowicz B. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan inhibits a dual mechanism of peroxynitrite stroke. International Journal of Biological Macromolecules 2011; 48(3): 488-94 (IF 2,502), (pkt.MNiSW-20) (*udział 70%: zaprojektowanie doświadczeń oraz wykonanie części z nich, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu i współudział w przygotowaniu publikacji do druku*)

4. **Saluk-Juszczak J***, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E. L-carnitine modulates blood platelet oxidative stress. Cell Biology and Toxicology 2010; 26(4): 355-65 (IF 2,056), (pkt.MNiSW-20) (*udział 50%: zaplanowanie eksperymentów oraz wykonanie części doświadczeń, udział w opracowaniu wyników oraz w napisaniu i przygotowaniu publikacji do druku*)

5. Kołodziejczyk J, **Saluk-Juszczak J***, Wachowicz B. L-carnitine protects plasma components against oxidative alterations. Nutrition 2011; 27(6): 693-9 (IF 2,726),

(pkt.MNiSW–27) (udział 50%: zaprojektowanie i wykonanie doświadczeń, opracowanie wyników)

6. Olas B, **Saluk-Juszczak J**, Nowak P, Glowacki R, Bald E, Wachowicz B. Protective effects of D-glucaro 1,4-lactone against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins. Nutrition 2007; 23(2): 164–71 (IF 2,104), (pkt.MNiSW–27) (udział 30%: współudział w projektowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowanie części wyników)

7. **Saluk-Juszczak J***, Olas B, Nowak P, Staroń A, Wachowicz B. Protective effects of D-glucaro 1,4-lactone against oxidative modifications in blood platelets. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2008; 18(6): 422-8 (IF 3,565), (pkt.MNiSW-32) (udział 50%: zaplanowanie doświadczeń, współudział w badaniach i w opracowaniu wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu i współudział w przygotowaniu publikacji do druku)

8. **Saluk-Juszczak J***. A comparative study of antioxidative activity of calcium-D-glucarate, sodium-D-gluconate and D-glucono-1,4-lactone in human blood platelet model. Platelets 2010; 21(8): 632-40 (IF 2,117), (pkt.MNiSW-20)

9. Kołodziejczyk J, **Saluk-Juszczak J***, Wachowicz B. In vitro study of the antioxidative properties of the glucose derivatives against oxidation of plasma components. Journal of Physiology and Biochemistry 2011; 67(2): 175-83 (IF 1,357), (pkt.MNiSW–20) (udział 50%: zaprojektowanie i wykonanie doświadczeń, opracowanie wyników)

10. Kołodziejczyk J, **Saluk-Juszczak J**, Posmyk MM, Janas KM, Wachowicz B. Red cabbage anthocyanins may protect blood plasma proteins and lipids. Central European Journal of Biology 2011; 6(4): 565-74 (IF 0,685), (pkt.MNiSW-20) (udział 40%: zaprojektowanie oraz wykonanie doświadczeń na otrzymanym ekstrakcie, opracowanie wyników)

11. **Saluk-Juszczak J***, Kołodziejczyk J, Babicz K, Królewska K. Żywność funkcjonalna – rola nutraceutyków w profilaktyce chorób układu krążenia. Kosmos 2010; 59(3-4): 527-38 (pkt.MNiSW-6) (udział 60%: projekt pracy oraz współudział w pisaniu pracy i w przygotowaniu publikacji do druku)

**autor korespondencyjny*

(prace stanowiące cykl zostały **wyróżnione** w tekście poniżej)

Badania naukowe skupiające się na poznaniu i wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów zaburzeń w układzie hemostazy, związanych z zakłóceniami w prawidłowym funkcjonowaniu płytek krwi oraz białek osocza, dowodzą, że jedną z głównych przyczyn zachwiania dynamicznej równowagi pomiędzy procesami pro- i przeciwzakrzepowymi jest stres oksydacyjny. Istotny udział reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA) w powstawaniu powikłań zakrzepowo-zatorowych związany jest z indukowaniem znacznego wzrostu potencjału prokoagulacyjnego krwi, przy

jednoczesnym obniżeniu funkcji antykoagulacyjnych układu fibrynolizy. Wolne rodniki oraz RFT i RFA odpowiedzialne za oksydacyjne modyfikacje cząsteczek to głównie anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenuk wodoru, tlen singletowy, rodnik tlenku azotu (Nowak i wsp., 2010). Jak wykazano w ostatnich latach, jednym z głównych czynników stresu oksydacyjnego, powstającym w układzie krążenia, zarówno w ostrych jak i w przewlekłych stanach patologicznych, jest nadtlenoazotyn (ONOO^-) (Reiter i wsp., 2000). Beckman i wsp. w 1990 roku opisali powstawanie nadtlenoazotynu w warunkach *in vivo*. W układach biologicznych ONOO^- jest tworzony w wyniku spontanicznej reakcji dwóch stosunkowo mało reaktywnych, lecz powszechnie występujących wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu ($\cdot\text{NO}$) (Beckman i wsp., 1990). Powstanie ONOO^- w ścianie naczynia wzmacnia syntezę czynników prozapalnych, powoduje uszkodzenie komórek śródbłonna, zmianę właściwości białek adhezyjnych i zwiększoną adhezję komórek zapalnych (Eiserich i wsp., 1998; Radi, 1998). ONOO^- jest czynnikiem silnie utleniającym większość biomolekuł oraz nitrującym przede wszystkim aminokwasy siarkowe i aromatyczne, głównie tyrozynę. Dotyczy to zarówno modyfikacji białek strukturalnych jak i enzymatycznych biorących udział w procesach hemostazy (Pacher i wsp., 2005).

Przeciwdziałanie skutkom toksycznej aktywności nadtlenoazotynu w układzie krążenia ma szczególne znaczenie w profilaktyce i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

5.1.1. Wpływ β -glukanu na równowagę układu hemostazy

Jedną z badanych przeze mnie substancji pochodzenia naturalnego był (1 \rightarrow 3)- β -D-glukan, polisacharyd stanowiący składnik ściany komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, stosowany jako adiuwant wzmacniający działanie preparatów i suplementów wzbogacających dietę. Jest to związek posiadający wysoką zdolność pobudzania układu immunologicznego do zwalczania infekcji oraz do stymulowania jego sprawności przeciwnowotworowej (Pelizon i wsp., 2005; Akramiene i wsp., 2007). Intensywne badania biologicznej aktywności β -glukanu, prowadzone w ciągu ostatnich lat, pozwoliły na zastosowanie go w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz kosmetycznym (Laroche i Michaud, 2007). Nie ma jednak danych dotyczących wpływu tego polisacharydu na aktywność płytek krwi oraz na funkcjonowanie układu hemostazy.

Płytki krwi odgrywają ważną rolę w rozwoju reakcji zapalnych, gdyż ich charakterystyczną cechą jest szybkie reagowanie na niefizjologiczne czynniki, stanowiące potencjalne zagrożenie dla organizmu, w tym głównie toksyny, komórki bakteryjne, jad wężów, niektóre komórki nowotworowe, czy wirusy (Kroll i Schafer, 1989). Pobudzone płytki wzmacniają odpowiedź zapalną przekazując sygnał do komórek docelowych. Uwolnione podczas aktywacji płytkowe mediatory (IL-1, chemokina RANTES, PDGF, VEGF, PF4, TGF β , sCD40, β TG, NAP2, PAF) działają jako cząsteczki przekaźnikowe powodując indukcję sygnału w komórkach układu immunologicznego (Klinger i Jelkmann, 2002; Pitchford, 2007). W wyniku rozwoju reakcji zapalnych dochodzi do interakcji płytek krwi z leukocytami (Elzey i wsp., 2003). Pobudzone leukocyty wydzielają czynniki prozapalne inicjujące kaskadę reakcji zapalnych, w tym oddziaływanie płytek ze ścianą naczynia krwionośnego, przez co płytki stanowią ogniwo łączące procesy hemostazy z rozwojem zapalenia (Shebuski i Kilgore, 2002).

Znacząca rola płytek w inicjowaniu i rozwoju procesu zapalnego skłoniła mnie do przeanalizowania wpływu β -glukanu pochodzącego z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na aktywację tych komórek oraz ich właściwości i biologiczną odpowiedź. Po raz pierwszy silne antyoksydacyjne właściwości β -glukanu zostały zbadane pod kątem ochrony układu hemostazy przed skutkami stresu oksydacyjnego. Stosowane *in vitro* stężenia β -glukanu (1, 2, 4 μ g/ml) były porównywalne do jego fizjologicznego poziomu we krwi. Zalecana dzienna dawka β -glukanu stosowanego doustnie w profilaktyce zaburzeń odporności wynosi 2 mg na 1kg masy ciała (Babineau i wsp., 1994).

Nadprodukcja RFT i RFA stanowi często pierwszą linię obrony w procesach związanych z odpowiedzią immunologiczną, gdzie RFT i RFA pełnią rolę bakteriobójczą. Jednak utrzymujący się permanentnie stres oksydacyjny stanowi zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu (Remick, 2007). Moje badania miały na celu określenie antyoksydacyjnych możliwości β -glukanu oraz mechanizmów jego działania na ludzkie płytki krwi oraz składniki osocza w warunkach stresu oksydacyjnego. W tym celu prowadziłam badania w warunkach *in vitro* z użyciem dwóch silnych oksydantów endogennych: nadtlenoazotynu oraz nadtlenu wodoru. Powstający w naczyniach krwionośnych ONOO⁻ równocześnie utlenia większość reszt aminokwasowych (co manifestuje się głównie tworzeniem grup karbonylowych), jak i nitruje reszty tyrozyny, z przewagą jednej lub drugiej

aktywności, w zależności od warunków towarzyszących reakcjom. Pozbawione jądra komórkowego płytki krwi stanowią doskonały model do badania funkcjonalnych i strukturalnych zmian proteomu. Prowadząc badania z użyciem czułych metod immunoenzymatycznych, wykazałam istotny efekt ochronny β -glukanu na utlenianie i nitrowanie białek osocza (30-50%) (**Saluk-Juszczak i wsp., 2011**) oraz białek płytek krwi (50-60%) (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 a**). W badaniach tych oceniałam poziom grup karbonylowych, jako ustalonego markera utleniania białek (Levine, 2002) oraz poziom 3-nitrotyrozyny będącej markerem nitrującego działania RFA, głównie ONOO⁻ (Schwemmer i wsp., 2000). Ograniczając skutki oksydacyjnego i nitrującego działania ONOO⁻, β -glukan zapobiega zaburzeniom procesów fosforylacji białek sygnałowych. Poprzez oznaczenie poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) stwierdziłam silne zahamowanie peroksydacji lipidów błonowych płytek (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 a**) oraz związków lipidowych osocza (**Saluk-Juszczak i wsp., 2011**). Hamując wolnorodnikowe uszkodzenia błony komórkowej płytek β -glukan chroni przed zmianami struktury i funkcji receptorów błonowych oraz przed utratą integralności błony. Antyoksydacyjne działanie β -glukanu, wyrażające się w ochronie białek i lipidów przed utleniającym działaniem H₂O₂ i ONOO⁻, wynika z jego niespecyficznego oddziaływania z wolnymi rodnikami i prawdopodobnie tworzenia rodnika węglowodanowego, jak sugerują badania Jaehrig i wsp. (2007). Możliwy jest też mechanizm antyoksydacyjny polegający na reakcji grup hydroksylowych tego polisacharydu z cząsteczką ONOO⁻, w podobny sposób, jak zostało to opisane dla innych związków cukrowych (Moro i wsp., 1994; Corsaro i wsp., 2004).

W swoich badaniach wykazałam także, że β -glukan posiada zdolność hamowania enzymatycznej przemiany eikozanoidów, następującej w wyniku trombinowej aktywacji płytek (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 b**), co może być spowodowane blokowaniem aktywności fosfolipazy A₂ i fosfolipazy C, enzymów odpowiedzialnych za uwalnianie reszt kwasu arachidonowego z fosfolipidów błon komórkowych, jak również enzymów powodujących przemianę kwasu arachidonowego takich jak: cyklooksygenaza czy 12-lipooksygenaza (Kim i wsp., 2008). Towarzysząca enzymatycznym przemianom eikozanoidów nadprodukcja O₂⁻ (Wachowicz i wsp., 2002) była również wyraźnie ograniczona w obecności β -glukanu.

W prowadzonych przeze mnie badaniach aktywność β -glukanu oceniona została także pod kątem jego oddziaływania na fizjologiczne funkcje płytek. Stosując szereg

naturalnych agonistów płytkowych wykazałam, że badany polisacharyd wyraźnie hamuje biologiczną odpowiedź płytek. Stosowany w szerokim zakresie stężeń (1-220 µg/ml) β-glukan zmniejszał sekrecję nukleotydów z ziarnistości osmofilnych, oraz obniżał ilość białka uwalnianego z ziarnistości α płytek stymulowanych trombiną. Szczególne znaczenie ma fakt, że związek ten w istotny sposób hamował agregację płytek krwi indukowaną zarówno trombiną, jak i ADP czy kolagenem (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 b**). Otrzymane wyniki wskazują na zdolność β-glukanu do hamowania wieloetapowego procesu aktywacji płytek krwi, mającego istotne znaczenie w rozwoju reakcji zapalnych prowadzących *in vivo* do powstania szoku septycznego, któremu towarzyszy wewnętrzne wykrzepianie związane z tworzeniem agregatów płytek oraz sekrecją płytkowych substancji prozapalnych (Levi i wsp., 1993).

Podsumowując, należy podkreślić, że β-glukan jest związkiem wykazującym wysoką aktywność biologiczną, jako immunostymulator uczestniczący w prewencji i/lub współdziałający w terapii wielu chorób. Jego szerokie spektrum działania znajduje zastosowanie w rosnącej liczbie komercyjnych preparatów zawierających ten związek, rekomendowanych jako suplementy diety. Moje badania wskazują na możliwość wykorzystania przeciwplateletowych właściwości β-glukanu, który hamując oksydacyjne uszkodzenia płytek i ograniczając stopień ich aktywacji może przyczyniać się do zapobiegania stanom chorobowym związanym z nadmierną aktywacją tych komórek. Wyniki moich badań dotyczących roli β-glukanu w ochronie elementów hemostazy zostały opublikowane w 3 pracach eksperymentalnych oraz jednej pracy przeglądowej (**dwie prace *Platelets*, 2010; *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011; *Kosmos*, 2010**).

5.1.2. Badanie ochronnego wpływu L-karnityny na układ hemostazy

Jednym z badanych przeze mnie suplementów diety była L-karnityna, substancja powszechnie stosowana przez osoby intensywnie uprawiające sport. Około 75% karnityny obecnej w organizmie człowieka dostarczane jest z pożywieniem, a podstawowym jej źródłem są pokarmy mięsne oraz produkty mleczne. Nieprawidłowo zbilansowana dieta, w tym spożywanie wyłącznie produktów roślinnych, jak to ma miejsce w przypadku restrykcyjnej diety wegetariańskiej, wymaga suplementacji L-karnityny. Nie ma jednak jednoznacznie ustalonych dawek jej dziennego zapotrzebowania (Cerretelli i Marconi, 1990). Karnityna (β-hydroksy-γ-

trimetyloaminomaślan) aktywnie uczestniczy w metabolizmie lipidów transportując kwasy tłuszczowe do mitochondriów, co wzmacnia proces β -oksydacji, którego efektem jest zysk energetyczny wykorzystywany między innymi do długotrwałego wysiłku mięśni (Lohninger i wsp., 2005).

Istnieje szereg prac, w których wykazano, że intensywny wysiłek fizyczny, związany ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen, powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu i wolnych rodników, powyżej sprawności działania endogennego systemu antyoksydacyjnego, co generuje stres oksydacyjny (Alessio, 1993; Volek i wsp., 2002). Stres oksydacyjny indukowany nadmierną aktywnością fizyczną ma istotny wpływ na aktywację płytek krwi (Di Massimo i wsp., 2004; El-Sayed i wsp., 2005).

Pomimo powszechnego stosowania L-karnityny przez sportowców w trakcie treningów oraz wykazanej zależności pomiędzy intensywnymi ćwiczeniami, a nadprodukcją czynników stresu oksydacyjnego, niewiele jest prac dotyczących wpływu L-karnityny na status oksydacyjny w układzie hemostazy.

Celem podjętych przeze mnie badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy stosowana nagminnie przez sportowców w czasie intensywnego wysiłku L-karnityna wpływa na równowagę układu hemostazy narażonego na skutki stresu oksydacyjnego. W badaniach prowadzonych *in vitro* na ludzkim osoczu oraz wyizolowanych płytkach krwi stres oksydacyjny generowany był poprzez działanie nadtlenoazotynu, który powstaje w naczyniu krwionośnym w trakcie nadmiernej aktywności organizmu i stanowi jeden z głównych czynników prooksydacyjnych. W moich badaniach antyoksydacyjny efekt L-karnityny, zarówno na elementy osocza, jak i na płytki krwi, manifestował się przede wszystkim utrzymaniem równowagi redox związków tiolowych. W obecności L-karnityny utlenianie przez ONOO^- niskocząsteczkowych związków tiolowych (glutationu, cysteiny, homocysteiny) oznaczanych metodą HPLC, jak i białkowych grup tiolowych było silnie zahamowane, a poziom grup $-\text{SH}$ utrzymywał się na poziomie zbliżonym do kontrolnego (Saluk-Juszczak i wsp., 2010 c; Kołodziejczyk i wsp., 2011 a). Natomiast skutki działania ONOO^- w postaci tworzenia grup karbonylowych oznaczanych przeze mnie w białkach metodą immunoenzymatyczną, a także nitrowania reszt tyrozynowych, które oznaczałam z użyciem kompetycyjnego testu ELISA, hamowane były przez L-karnitynę jedynie w osoczu (Kołodziejczyk i wsp., 2011 a). Wyniki tych badań sugerują, że L-karnityna ogranicza niekorzystne efekty

nadprodukcji RFT i RFA w układzie krążenia prowadzące do zmian strukturalnych i funkcjonalnych elementów osocza. Hamując oksydacyjne uszkodzenia białek płytkowych L-karnityna może jednocześnie regulować biologiczną odpowiedź tych komórek, głównie poprzez wpływ na ich degranulację oraz agregację (Essex i Li, 2003). Prowadząc badania dotyczące wpływu L-karnityny na fizjologiczną aktywację płytek krwi oraz ich biologiczne właściwości w warunkach stresu oksydacyjnego wykazałam, że w płytkach stymulowanych trombiną L-karnityna wyraźnie obniża powstawanie dialdehydu malonowego (MDA), będącego markerem enzymatycznej przemiany kwasu arachidonowego (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 c**). Istnieją nieliczne prace, które potwierdzają hamujący wpływ L-karnityny na przemianę eikozanoidów w płytkach pobudzonych fizjologicznymi agonistami (Pignatelli i wsp., 2003). Na podstawie moich doświadczeń oraz wcześniejszych doniesień można stwierdzić, że L-karnityna hamuje metabolizm kwasu arachidonowego, przez co zapobiega aktywacji płytek krwi. W pobudzonych płytkach enzymatyczna przemiana kwasu eikozatetraenowego na drodze zależnej od cyklooksygenazy oraz 12-lipooksygenazy powoduje produkcję RFT (Jahn i Hansch, 1990). Jednak głównym źródłem RFT w aktywowanych płytkach jest działanie oksydazy NAD(P)H (Forde i Fitzgerald 1997) oraz oksydazy ksantynowej (Miller i wsp., 1993). W trakcie intensywnego wysiłku fizycznego rośnie aktywność oksydazy ksantynowej, co prowadzi do nadprodukcji $O_2^{\bullet-}$ (Hellsten i wsp., 1988). $O_2^{\bullet-}$ reagując z jonami Fe^{2+} powoduje tworzenie rodnika hydroksylowego, odpowiedzialnego za peroksydację lipidów błon komórkowych. Wzrost stężenia produktów peroksydacji, w tym MDA, obserwowano *in vivo* podczas wysiłku fizycznego (McBride i wsp., 1998). Przeciwpłytkowy mechanizm działania L-karnityny może być zatem związany z jej antyoksydacyjnymi właściwościami. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach L-karnityna obniżała indukowaną trombiną produkcję $O_2^{\bullet-}$, co wykazałam stosując metodę redukcji cytochromu C oraz hamowała wywołaną ADP agregację płytek (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 c**). Hamowanie produkcji $O_2^{\bullet-}$ w pobudzonych płytkach skutkuje obniżeniem stopnia agregacji tych komórek, a w warunkach *in vivo* ogranicza syntezę ONOO⁻. Doniesienia literaturowe z użyciem innych agonistów płytkowych, dowodzą podobnej aktywności karnityny (stosowanej w zbliżonym zakresie stężeń) w stosunku do płytek krwi stymulowanych na drodze zależnej od kolagenu lub arachidonianu (Pignatelli i wsp., 1998; Pignatelli i wsp., 2003).

Badania epidemiologiczne wskazują, że L-karnityna może być stosowana jako wspomagający środek leczniczy w chorobach układu krążenia, głównie związanych z zaburzeniami gospodarki lipidowej i otyłością (Brevetti i wsp., 1988). Z moich doświadczeń wynika, że L-karnityna wykazuje korzystny wpływ na układ hemostazy, a jej spożywanie w czasie wzmożonego wysiłku fizycznego może chronić przed skutkami stresu oksydacyjnego. Wyniki moich badań zostały opublikowane w dwóch pracach (*Cell Biology and Toxicology*, 2010; *Nutrition*, 2011).

5.1.3. Ochrona elementów układu hemostazy przez związki cukrowe

Problematyka kolejnych badań, podjętych przeze mnie, obejmowała ocenę potencjalnych możliwości ochrony układu hemostazy przez niskocząsteczkowe związki cukrowe powszechnie obecne w diecie. Badania dotyczyły pochodnych kwasu glukarowego (GA): laktonu-1,4-kwasu glukarowego (1,4-GL) oraz soli wapniowej tego kwasu (CaGL), a także pochodnych kwasu glukonowego: laktonu-1,4-kwasu glukonowego i soli sodowej tego kwasu.

Wybrane przeze mnie związki są naturalnymi składnikami wielu owoców i warzyw, głównie cytrusów, jabłek, oraz warzyw krzyżowych. Pochodne kwasu glukonowego są również obecne w miodzie, herbacie i winie (Walaszek i wsp., 1996; Raspor i Goranovic, 2008). Pomimo intensywnych badań epidemiologicznych, dzięki którym ustalona została korelacja pomiędzy dietą bogatą w soki owocowe, owoce i warzywa, a ryzykiem zapadalności na choroby o patogenezie związanej ze stresem oksydacyjnym, wyselekcjonowanie substancji biologicznie czynnych, których suplementacja przynosi bezpośrednie efekty zdrowotne nastęrcza wiele trudności. W ostatnich latach rośnie liczba doniesień sugerujących istotny efekt antyoksydacyjny związków cukrowych zawartych w produktach roślinnych (Lotito i Frei, 2004).

Pomimo szerokiego zastosowania w przemyśle, mechanizm biologicznej aktywności badanych przeze mnie związków jest słabo opisany. Pochodne kwasu glukonowego używane są powszechnie jako dodatek do żywności i napojów. Sól sodowa stosowana jest w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, gdzie pełni funkcję sekwestranta, tj. substancji zapobiegającej utlenianiu produktu poprzez wiązanie jonów metali. Kwas glukonowy używany jest jako stabilizator kwasowości (E574) (Ramachandran i wsp., 2006).

Natomiast pochodna kwasu glukarowego - CaGL jest rekomendowanym suplementem diety o właściwościach chemoprewencyjnych (Hanausek i wsp., 2003). Po spożyciu CaGL ulega przemianom do trzech metabolitów, z których 40% stanowi GA, 30% 1,4-GL i 30% 6,3 GL, z których najwyższą aktywność farmakologiczną wykazuje lakton-1,4 (Macfadyen i Ho, 1989). Istnieje szereg mechanizmów zapobiegających rozwojowi nowotworów, w których znaczący jest udział czynników o właściwościach antyoksydacyjnych (Klaunig i Kamendulis, 2004). Udowodniona jest również rola płytek krwi w procesie nowotworzenia, a hamowanie ich aktywacji może ograniczać proces metastazy (Gupta i Massague, 2004). W ostatnich latach intensywnie prowadzone są badania składników pokarmowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako komponenty żywności funkcjonalnej lub nutraceutyki w profilaktyce nowotworów oraz innych chorób związanych z hiperaktywacją płytek krwi (Dutta-Roy, 2002).

Przeprowadzone przeze mnie prace badawcze dotyczyły głównie antyoksydacyjnych właściwości oraz przeciwplatekowej aktywności badanych związków cukrowych.

W literaturze naukowej nie ma danych na temat dziennego zapotrzebowania organizmu na te substancje, czy maksymalnej dopuszczalnej dawki, gdyż nie powodują one skutków ubocznych, a ich nadmiar jest łatwo wydalany z moczem. Producenci suplementu w postaci soli CaGL zalecają dawkę profilaktyczną 200-400 mg, a wspomagającą w terapii przeciwnowotworowej nawet 3 g na dobę (Walaszek i wsp., 1997), to jest tyle, ile dostarcza zjedzenie 1 kg jabłek (Walaszek i wsp., 1996). Stosowane przeze mnie stężenia zawierały się w podanym zakresie, natomiast były około 100 krotnie niższe (3 mmol/l) niż stosowane *in vivo* w badaniach na szczurach (350 mmol/kg), gdzie nie zaobserwowano skutków ubocznych (Selkirk i wsp., 1980). Eksperymenty *in vitro* prowadzone przeze mnie na ludzkich płytkach krwi oraz na osoczu poddanych działaniu utleniającemu i nitrującemu nadtlenoazotynu wykazały wysoką aktywność antyoksydacyjną pochodnych kwasu glukarowego oraz kwasu glukonowego. Pierwsze badania zostały wykonane dla laktonu-1,4-kwasu glukarowego z zastosowaniem dwóch silnych oksydantów ONOO⁻ oraz H₂O₂. W obecności 1,4-GL zaobserwowałam wprost proporcjonalne do jego stężenia hamowanie utleniania białek, co wyrażało się ograniczeniem tworzenia grup karbonylowych, których poziom oznaczałam metodą kolorymetryczną oraz metodą ELISA. Badany związek powodował również około 40% inhibicję peroksydacji

lipidów, natomiast nie wykazywał wpływu na proces nitrowania reszt tyrozyny przez ONOO⁻. Uzyskane wyniki sugerują, że ochronny mechanizm działania 1,4-GAL oparty jest na jego właściwościach antyoksydacyjnych. (Olas i wsp., 2007; Saluk-Juszczak i wsp., 2008). Białka osocza, wśród których znajdują się elementy kaskady krzepnięcia oraz układu fibrynolizy są szczególnie narażone na modyfikacje oksydacyjne w wyniku nadprodukcji RFT/RFA w układzie krążenia (Madamanchi i wsp., 2005). Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że 1,4-GAL wpływa na zachowanie równowagi redox w osoczu poprzez ochronę szczególnie wrażliwych na utlenianie białkowych grup –SH, a także niskocząsteczkowych związków tiolowych, takich jak glutation i homocysteina (HCSH) (Olas i wsp., 2007). W obecności 1,4-GAL utlenianie białkowych grup –SH było częściowo zahamowane, natomiast stosując czułą metodę HPLC stwierdziłam, że niskie stężenia 1,4-GAL (0,4-0,8 mM) całkowicie chronią przed utlenianiem niskocząsteczkowych związków tiolowych w ludzkim osoczu. (Olas i wsp., 2007). Hamowanie utleniania HCSH zapobiega powstaniu jej reaktywnej pochodnej – tiolaktonu homocysteiny, uznawanego za istotny czynnik w patogenezie zmian miażdżycowych oraz zakrzepicy tętnic i żył głębokich (Ueland i wsp., 1992; Jakubowski i wsp., 2000). Chroniąc grupy tiolowe przed działaniem ONOO⁻ 1,4-GAL nie dopuszcza również do powstawania nitrozotioili (Yourd'heuil i wsp., 2000). Analizując w analogiczny sposób poziom markerów stresu oksydacyjnego w późniejszych badaniach, prowadzonych na pochodnych kwasu glukonowego oraz na glukananie wapnia, wykazałam podobny mechanizm antyoksydacyjny badanych związków, oparty głównie na ochronie cząsteczek białkowych przed ich karbonylacją oraz utlenianiem grup –SH. Ponadto, związki te, porównywalnie do 1,4-GAL, zapobiegały utlenianiu endogennego antyoksydanta, jakim jest glutation oraz peroksydacji lipidów. Jednocześnie, badane pochodne cukrowe, podobnie jak 1,4-GAL, tylko w niewielkim stopniu hamowały nitrujące działanie nadtlenoazotynu, ograniczając tworzenie 3-nitrotyrozyny jedynie w osoczu (Saluk-Juszczak i wsp., 2010 d; Kołodziejczyk i wsp., 2011 b).

Na podstawie uzyskanych wyników trudno jest jednoznacznie stwierdzić, który z badanych związków wykazuje najwyższą sprawność antyoksydacyjną. W przypadku osocza ochronny efekt pochodnych glukonowych był proporcjonalnie skorelowany z ich dawką, podczas gdy zależności takiej nie zaobserwowałam dla CaGL. W badaniach prowadzonych na płytkach krwi szczególne właściwości ochronne wykazywała sól sodowa kwasu glukonowego. Pochodne kwasu

glukonowego posiadają wysoką zdolność wiązania jonów metali, dzięki czemu mogą ograniczać reakcje utleniania poprzez wychwytywanie metali pełniących funkcje kofaktorów. Mechanizm przeciwutleniającego działania użytych przez mnie pochodnych cukrowych, może także opierać się, tak jak zostało to stwierdzone w przypadku innych cukrów, na ich zdolności do tworzenia wtórnych reaktywnych metabolitów pośrednich (Hawkins i Davies, 1996). Oksydacyjne działanie ONOO⁻ odbywa się albo na drodze jego bezpośredniego działania na różnego typu biomolekuły, lub poprzez działanie pośrednie, przy udziale wolnych rodników (głównie CO₃^{•-}, •NO₂, •OH) pełniących funkcje wtórnych przekaźników (Radi, 1998). Reakcje cukrów z wolnymi rodnikami prowadzą do powstania rodników cukrowych, które włączone zostają w dalsze przemiany wolnorodnikowe (Dowell i Martin, 1997).

Chroniąc białka płytkowe przed utlenianiem badane związki zapobiegały jednocześnie wzmożonej aktywacji tych komórek. Uszkodzenia oksydacyjne białek prowadzą do zaburzeń w transdukcji sygnału, konsekwencją czego jest nadmierna aktywacja płytek krwi. Pobudzone płytki generują RFT i RFA, które zostają włączone w proces aktywacji i stają się wtórnymi przekaźnikami sygnałów w pobudzonych komórkach. Przykładem jest O₂^{•-}, który generowany endogennie w płytkach krwi indukuje ich agregację (Krotz i wsp., 2004). W moich pracach pochodne cukrowe powodowały wyraźne zahamowanie kaskady enzymatycznych przemian kwasu eikozatetraenowego indukowanej trombiną, w tym produkcję O₂^{•-} (**Saluk-Juszczak i wsp., 2010 d**). Natomiast eksperymenty przeprowadzone z użyciem laktonu-1,4 kwasu glukarowego wykazały silną, zależną od stężenia badanego związku, inhibicję agregacji płytek krwi wywołanej ADP (**Saluk-Juszczak i wsp., 2008**).

Wyniki moich badań sugerują, że dzięki właściwościom antyoksydacyjnym, badane związki cukrowe, łatwo pozyskiwane z powszechnie występujących owoców, takich jak jabłka, mogłyby być rozpatrywane jako obiecujące nutraceutyki, stosowane w suplementacji diety skierowanej na prawidłowe funkcjonowanie układu hemostazy. Wyniki te zostały opublikowane w czterech pracach (**Nutrition, 2007; Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 2008; Platelets, 2010; Journal of Physiology and Biochemistry, 2011**).

5.1.4. Badanie mechanizmów działania antocyjanów na układ hemostazy

W kolejnym etapie prac prowadziłam badania dotyczące wpływu oraz mechanizmów działania ekstraktu antocyjanów z liści czerwonej kapusty na elementy układu hemostazy.

Opisana szeroko w literaturze wysoka aktywność antyoksydacyjna antocyjanów (Mazza i wsp., 2002; Bagchi i wsp., 2006; Kaliora i wsp., 2006), w połączeniu z ich przeciwzapalnymi (Lai i Roy, 2004) i kardioprotekcyjnymi właściwościami ma szczególne znaczenie w profilaktyce chorób układu sercowo-naczyniowego (Kay i wsp., 2006). Stosowanie diety bogatej w antocyjany powoduje poprawę parametrów biochemicznych ustroju, w tym zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL oraz trójglicerydów (Noonan i Noonan, 2004), a także obniżenie poziomu glukozy (Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006). Antocyjany zapobiegają utlenianiu LDL (Reed, 2002), co ogranicza rozwój zmian miażdżycowych i wraz z ich zdolnością do hamowania agregacji płytek krwi (Mazza, 2007) wpływa na utrzymanie prawidłowego przepływu krwi w naczyniu krwionośnym. Dane literaturowe odnoszą się głównie do biologicznej aktywności różnorodnych antocyjanów pochodzących z owoców aronii, winogron, czarnych jagód i jeżyn. Do tej pory zidentyfikowano kilkaset antocyjanów różniących się budową chemiczną oraz właściwościami (Clifford, 2000), z których część nie została jeszcze zbadana.

Celem zaplanowanych przeze mnie eksperymentów była ocena potencjalnej ochrony układu hemostazy przez ekstrakt niezbadanych do tych czas antocyjanów z liści czerwonej kapusty. Roślina ta stanowi popularny składnik pożywienia o wysokiej zawartości antocyjanów, wynoszącej około 100-300 mg/100g świeżej masy (Wu i wsp., 2006). Cechą charakterystyczną badanych antocyjanów jest szczególnie wysoki poziom acylowania zapewniający stabilność struktury (Charron i wsp., 2007). Dzięki temu antocyjany z czerwonej kapusty stosowane są powszechnie jako barwniki pokarmowe, gdyż zachowują trwałość w szerokim zakresie pH, podczas gdy antocyjany pochodzące z innych roślin są stabilne tylko w środowisku kwaśnym, znacznie poniżej warunków fizjologicznych (McDougall i wsp., 2007).

Wyniki moich badań, prowadzonych na ludzkim osoczu w warunkach *in vitro*, wykazały bardzo wyraźny, istotny statystycznie, zależny od stężenia badanego ekstraktu, hamujący wpływ antocyjanów na peroksydację lipidów osocza wywołaną H_2O_2 i $ONOO^-$ (Kołodziejczyk i wsp., 2011 c). Nadprodukcja wolnych rodników oraz

RFT i RFA jest czynnikiem wiążącym hiperlipidemię z patogenezą miażdżycy (Young i McEneny, 2001). Bogata w tłuszcze dieta prowadzi do wzrostu stężenia czynników stresu oksydacyjnego, które następnie wzmagają peroksydację lipidów (Harrison i wsp., 2003). Jeśli badane antocyjany, podobnie jak inne opisywane w literaturze, obniżają *in vivo* poziom lipidów w osoczu, to w połączeniu z wykazanymi przeze mnie silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, mogą w istotny sposób wpływać korzystnie na osoczowe elementy układu hemostazy. Stwierdzony przeze mnie efekt antyoksydacyjny antocyjanów dotyczył również ich zdolności do ochrony białek osocza ulegających modyfikacjom na skutek aktywności czynników utleniających oraz nitrującego działania ONOO⁻ (Kołodziejczyk i wsp., 2011 c). Badania na płytkach krwi potwierdziły antyoksydacyjne właściwości antocyjanów z czerwonej kapusty, poprzez zapobieganie peroksydacji lipidów i uszkodzeniom białek, prowadzącym do zaburzenia transdukcji sygnału w tych komórkach. Badany ekstrakt wykazywał wyraźny hamujący wpływ na wieloetapowy proces aktywacji płytek indukowany trombiną. Przede wszystkim powodował silną, zależną od dawki, inhibicję agregacji płytek indukowaną trombiną oraz hamował stymulowaną tym agonistą, enzymatyczną przemianę kwasu arachidonowego (poziom powstającego MDA był niższy o około 50%) wraz z towarzyszącą mu produkcją O₂⁻ hamowaną nawet o 80%. Otrzymane przeze mnie rezultaty sugerują, że antocyjany z czerwonej kapusty wykazują *in vitro* aktywność przeciwplatekową podobną do innych rodzajów antocyjanów opisywanych w literaturze. Silne właściwości antyoksydacyjne antocyjanów związane są z ich zdolnością do zmiatania wolnych rodników, w tym produktów peroksydacji lipidów, co kończy łańcuch reakcji rodnikowych i chroni komórki przed przerwaniem integralności błony (Bagchi i wsp., 2006; Blazovics, 2009). Obecność i ułożenie grup hydroksylowych w pierścieniach antocyjanów warunkuje chelatowanie jonów metali, które są aktywnymi induktorami wolnych rodników (Seeram i Nair, 2002). Natomiast mechanizm antyplatekowego działania antocyjanów oparty jest na hamowaniu aktywności cyklooksygenazy (Garbacki i wsp., 2002; Garcia-Alonso i wsp., 2004), kluczowego enzymu w metabolizmie kwasu arachidonowego i jest analogiczny do działania kwasu acetylosalicylowego (ASA), podstawowego leku przeciwplatekowego. Długotrwałe przyjmowanie ASA może prowadzić do przewlekłego krwawienia z przewodu pokarmowego, dlatego ostatnio powstała koncepcja połączonego przyjmowania niesteroidowych leków

przeciwzapalnych wraz z wyciągami roślinnymi o podobnych właściwościach leczniczych (Gum i wsp., 2003).

Z moich badań wynika, że wyciąg antocyjanów z liści czerwonej kapusty mógłby stanowić wspomagający preparat przeciwplatek. Antocyjany z czerwonej kapusty dodawane do żywności jako naturalny barwnik, mogą stanowić skuteczny składnik bioaktywny nadający żywności prozdrowotne właściwości. Wyniki badań na osoczu zostały opublikowane (***Central European Journal of Biology*, 2011**), a dotyczące płytek krwi prezentowane były na dwóch konferencjach naukowych i zostały przygotowane w formie manuskryptu wysłanego do redakcji.

5.1.5. Podsumowanie

Głównym celem przeprowadzonych przeze mnie badań było znalezienie substancji naturalnych, które mogłyby być stosowane jako suplementy diety i/lub składniki żywności funkcjonalnej w zapobieganiu rozwojowi miażdżycy, wspomagające zwalczanie stanu zapalnego, działające przeciwzakrzepowo, jak i przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu. Badaniom poddane zostały zarówno substancje, które są już stosowane jako suplementy diety jednak w celach innych niż ochrona układu hemostazy, jak i związki stanowiące składniki powszechnych w diecie produktów roślinnych.

W swoich pracach *in vitro* badałam wpływ substancji naturalnych na układ hemostazy, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości antyoksydacyjnych i wynikających z nich funkcji ochronnych wobec płytek krwi i elementów osocza.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały antyoksydacyjny i antyplatekowy efekt dwóch suplementów diety: β -glukanu, który jako silny środek immunostymulujący jest stosowany w preparatach używanych w profilaktyce i leczeniu m.in. stanów zapalnych, oraz L-karnityny powszechnie występującego składnika większości odżywek dla sportowców oraz preparatów odchudzających. Z moich badań wynika, że stosowany w trakcie infekcji β -glukan oraz L-karnityna spożywana przy wzmożonym wysiłku fizycznym wykazują ochronny wpływ na układ hemostazy narażony na skutki stresu oksydacyjnego.

Badania *in vitro* naturalnych substancji pochodzenia roślinnego powszechnie obecnych w diecie wykazały, że pochodne kwasu glukarowego oraz kwasu glukonowego będące składnikami owoców, w tym łatwo dostępnych jabłek, jak i antocyjany zawarte w liściach popularnej w diecie czerwonej kapusty, mogą znaleźć

zastosowanie jako komponenty żywności funkcjonalnej skierowanej na ochronę układu hemostazy.

W ostatnich latach rośnie liczba publikacji zwracających uwagę na istotną rolę profilaktyki zdrowotnej wykorzystującej naturalne substancje pochodzenia roślinnego oraz na poszukiwanie nowych fitoterapeutyków (Jew i wsp., 2009). Opracowana została koncepcja żywności funkcjonalnej oraz związana z nią koncepcja nutraceutyków (Kalra, 2003; Coppens i wsp., 2006). Moje badania od lat koncentrują się na znalezieniu związków pochodzenia naturalnego, stanowiących powszechnie dostępne składniki diety, o korzystnych właściwościach biologicznych, w celu zastosowania ich w formie łatwo dostępnych i tanich nutraceutyków lub suplementów diety w profilaktyce chorób związanych ze wzmożoną aktywnością płytek, wynikającą z działania czynników stresu oksydacyjnego. Zajmując się tymi zagadnieniami wzbogaciłam wiedzę teoretyczną, co umożliwiło mi napisanie pracy przeglądowej na temat profilaktyki chorób układu krążenia (*Kosmos*, 2010).

5.2. Aktywność naukowa niewliczana do osiągnięcia naukowego

Poza badaniami dotyczącymi zastosowania suplementów diety w ochronie układu hemostazy, prowadzę także prace badawcze nad wykorzystaniem w tym celu substancji czynnych pochodzących z popularnych ziół leczniczych. Badane przeze mnie naturalne środki roślinne to polifenolowo-polisacharydowe preparaty wyizolowane z roślin należących do rodzin *Asteraceae* oraz *Rosaceae*, z których pochodzi wiele ziół uważanych w Polsce za lecznicze. Ten etap badań rozpoczęłam w roku 2006 pracami dotyczącymi przeciwplatek i przeciwoksydacyjnych właściwości ekstraktu z przymiotna kanadyjskiego (*Conyza canadensis*). Wcześniejsze doniesienia dotyczące antyoksydacyjnych właściwości ekstraktu z przymiotna (Woźniak i wsp., 2004) zostały potwierdzone w moich badaniach na wyizolowanych ludzkich płytkach krwi. Badany ekstrakt wykazywał zdolność niemal całkowitego hamowania nitrowania białek oraz znacznie ograniczał uszkodzenia oksydacyjne (Olas i wsp., 2006). Badany przeze mnie ekstrakt został w roku 2002 objęty wnioskiem patentowym (Pawlaczyk i wsp., 2002), dotyczącym metod jego wytwarzania, jako „preparatu hamującego krzepliwość krwi”, jednak mechanizm jego przeciwwkrzepego działania nie został określony. Prowadzone przeze mnie

badania agregacji płytek metodą turbidymetryczną przyniosły obiecujące wyniki dotyczące wysokiej aktywności przeciwagregacyjnej zarówno ekstraktu jak i jego poszczególnych frakcji (Saluk-Juszczak i wsp., 2007). Dzięki temu w roku 2007 prowadzone przeze mnie prace zostały włączone w jeden z największych projektów badawczych w Polsce – WROVASC- Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej. Jest to projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013. Celem projektu jest powstanie i ewaluacja nowych technologii medycznych i metod leczenia chorób sercowo-naczyniowych. Głównym zamierzeniem projektu jest poprawa jakości życia mieszkańców województwa dolnośląskiego i Polski, dzięki utworzeniu zintegrowanego systemu łączącego wiedzę i badania naukowców reprezentujących różne dziedziny medycyny, zajmujących się problemami chorób serca i naczyń. W projekcie współpracuję bezpośrednio z Zakładem Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej realizując zadanie dotyczące oceny wpływu wyizolowanych preparatów roślinnych na aktywność biologiczną i funkcje fizjologiczne płytek krwi. Celem tego zadania jest określenie korelacji pomiędzy chemicznymi i biologicznymi właściwościami wyizolowanych roślinnych substancji makrocząsteczkowych o charakterze polifenolowo-polisacharydowym, zaliczanych do grupy pektyn czy hemiceluloz, wykazujących działanie antykoagulacyjne i przeciwplatek. Do badań wytypowanych zostało 10 roślin stosowanych jako zielarski surowiec leczniczy. Trwające i zaplanowane badania zmierzają do wytworzenia nowego produktu leczniczego pochodzenia roślinnego, który działając jako antykoagulant i równocześnie substancja hamująca właściwości pro-zakrzepowe płytek krwi, wykazywałby szeroko rozumianą zdolność przeciwwzakrzepową, dzięki czemu znalazłby istotne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Innowacyjne działanie poszukiwanego produktu ma polegać na jego równoczesnym, kilkutorowym działaniu hamującym, zarówno na osoczowe elementy kaskady krzepnięcia, jak i aktywację płytek krwi. Obecnie nie jest znana substancja lecznicza, której stosowanie spełniałoby równocześnie funkcje antykoagulacyjne i przeciwplatek. Ze względu na naturalne źródła pochodzenia substancji aktywnej, z roślin powszechnie dostępnych oraz tanich i łatwych w uprawie, uzyskany produkt może być atrakcyjny

pod względem stosunkowo niskich kosztów wytworzenia oraz bezpieczny ekologicznie.

Moje badania koncentrują się na roli wytypowanych preparatów roślinnych w ochronie procesów krzepnięcia, fibrynolizy oraz właściwości i funkcji płytek krwi w stanie zaburzonej równowagi oksydacyjnej układu hemostazy. Prace prowadzone są zarówno na osoczu i płytkach krwi pochodzących od zdrowych dawców, jak i na materiale od pacjentów z powikłaniami w układzie krwionośnym tj. od pacjentów ze stabilną przewlekłą chorobą sercowo-naczyniową. W prowadzonych pracach wyróżnić można dwa nurty badawcze. Pierwszy jest kontynuacją badań dotyczących antyoksydacyjnych właściwości badanych preparatów roślinnych. W tym zakresie opublikowane zostały wyniki otrzymane dla ekstraktu z przymiotna kanadyjskiego, który podobnie jak w przypadku płytek krwi, silnie hamował nitrowanie oraz karbonylację białek osocza, a także wykazywał wpływ na potencjał redox grup –SH białek oraz niskocząsteczkowych związków tiolowych (Saluk-Juszczak i wsp., 2010 e). Ponadto opublikowane zostały wstępne wyniki badań koniugatów polifenolowo-polisacharydowych wyizolowanych z sześciu roślin z rodziny *Asteraceae*, które wskazują, że aktywność antyoksydacyjną względem białek osocza, na poziomie zbliżonym do przymiotna kanadyjskiego posiadają także preparaty pochodzące z krwawnika pospolitego, arniki górskiej i jeżówki purpurowej, natomiast znacznie słabsza wydaje się aktywność preparatów z nawłoci pospolitej oraz rumianku pospolitego (Saluk-Juszczak i wsp., 2010 f).

Drugi nurt badań odnosi się do przeciwplatek i antykoagulacyjnych właściwości preparatów roślinnych. Badania fizjologicznych funkcji płytek krwi dotyczą hamowania przez polifenolowo-polisacharydowe koniugaty mechanizmów agregacji płytek na drodze zależnej od różnych agonistów. Zakres tych badań obejmuje oddziaływanie preparatów na płytki kontrolne oraz pochodzące od pacjentów stosujących standardowe leki przeciwplatekowe. Do badania właściwości oraz biologicznej aktywności płytek stosowana jest turbidymetryczna metoda agregacji oraz metoda cytometrii przepływowej. Przedmiotem badań jest również ustalenie oddziaływań preparatów roślinnych na hemostatyczne funkcje osocza. W celu poznania potencjalnych mechanizmów antykoagulacyjnych badanych koniugatów oznaczono ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy, stosując metody spektrofotometryczne. Ponadto określono wpływ preparatów na koagulacyjne właściwości osocza, poprzez pomiar czasów PT, TT oraz APTT.

Oznaczono również udział preparatów w amidolitycznej aktywności trombiny, kluczowego enzymu kaskady krzepnięcia. Uzyskane wyniki są obecnie analizowane i przygotowywane do publikacji. Do tej pory w ramach prowadzonych badań powstały cztery prace eksperymentalne (*Platelets*, 2006; *General Physiology and Biophysics* 2007; *Central European Journal of Biology* 2010; *International Journal of Biological Macromolecules* 2010) oraz trzy prace przeglądowe (*Przegląd Menopauzalny* 2011; *Przegląd Menopauzalny* 2012; *Przegląd Lekarski* 2011) i jeden rozdział książkowy (*Serial Publication Recent Progress in Medicinal Plants Vol. 34*, 2012).

W ostatnich latach włączona zostałam również w badania kliniczne dotyczące procesów pro- i antyoksydacyjnych u chorych na stwardnienie rozsiane. Celem badawczym była ocena poziomu markerów stresu oksydacyjnego oraz uszkodzeń oksydacyjnych, jako czynników odgrywających istotną rolę w patogenezie tego schorzenia. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch pracach (*Neurochemical Research*, 2011; *Clinical Biochemistry*, 2011). Szczególny aspekt prowadzonych prac dotyczył zmniejszenia negatywnych skutków stresu oksydacyjnego w stwardnieniu rozsianym poprzez zastosowanie kriostymulacji ogólnoustrojowej. Z przeprowadzonych przez nasz zespół badań klinicznych wynika, że wykorzystanie zabiegu z użyciem temperatur kriogenicznych u chorych na przewlekłe stwardnienie rozsiane poprawia sprawność ruchową chorych oraz wpływa korzystnie na zwiększenie aktywności układu antyoksydacyjnego. Wyniki tych badań opublikowano w trzech pracach (*The World Journal of Biological Psychiatry*, 2010; *Journal of Thermal Biology*, 2010; *European Journal of Applied Physiology*, 2011).

5.3. Literatura

Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43: 597-606

Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25: 218-224

Babineau TJ, Hackford A, Kenler A, Bistran B, Forse RA, Fairchild PG, Heard S, Keroack M, Caushaj P, Benotti P. A phase II multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. *Arch Surg* 1994; 129: 1204-1210

Bagchi D, Roy S, Patel V, He G, Khanna S, Ojha N, Phillips C, Ghosh S, Bagchi M, Sen CK. Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Mol Cell Biochem* 2006; 281: 197-209

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1620-1624

Blazovics A. From free radicals to science of nutrition. *Orv Hetil* 2009; 150: 53-63

Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition* 2000; 16: 578-581

Brevetti G, Chiariello M, Ferulano G, Policicchio A, Nevola E, Rossini A, Attisano T, Ambrosio G, Siliprandi N, Angelini C. Increases in walking distance in patients with peripheral vascular disease treated with L-carnitine: a double-blind, cross-over study. *Circulation* 1988; 77: 767-773

Cerretelli P, Marconi C. L-carnitine supplementation in humans. The effects on physical performance. *Int J Sports Med* 1990; 11: 1-14

Charron CS, Clevidence BA, Britz SJ, Novotny JA. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata). *J Agric Food Chem* 2007; 55: 5354-5362

Clifford MN. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1063-1072

Coppens P, da Silva MF, Pettman S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology* 2006; 221: 59-74

Corsaro MM, Pietraforte D, Di Lorenzo AS, Minetti M, Marino G. Reaction of peroxynitrite with hyaluronan and related saccharides. *Free Radic Res* 2004; 38: 343-353

Di Massimo C, Scarpelli P, Tozzi-Ciancarelli MG. Possible involvement of oxidative stress in exercise-mediated platelet activation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30: 313-316

Dowell FJ, Martin W. The effects of peroxynitrite on rat aorta: interaction with glucose and related substances. *Eur J Pharmacol* 1997; 338: 43-53

Dutta-Roy AK. Dietary components and human platelet activity. *Platelets* 2002; 13: 67-75

Eby CS. A review of the hypercoagulable state. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7: 1121-1142

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19: 221-357

El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed AZ. Aggregation and activation of blood platelets in exercise and training. *Sports Med* 2005; 35: 11-22

Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BL, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003; 19: 9-19

Essex DW, Li M. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry* 2003; 42: 129-136

Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997; 95: 787-789

Garbacki N, Angenot L, Bassleer C, Damas J, Tits M. Effects of prodelpinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 365: 434-441

Garcia-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, De Pascual-Teresa S. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A-studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3378-3384

Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 961-965

Gupta GP, Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* 2004; 114: 1691-1693

Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer. *Integr Cancer Ther* 2003; 2: 139-144

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91: 7-11

Hawkins CL, Davies MJ. Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 275-290

Hellsten Y, Ahlborg G, Jensen-Urstad M, Sjodin B. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 1988; 134: 159-160

Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Fleischer LG, Kurz T. In vitro potential antioxidant activity of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 4710-4716

Jahn B, Hansch GM. Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 93: 73-79

Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 2000; 87: 45-51

Jew S, AbuMweis SS, Jones PJ. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *J Med Food* 2009; 12: 925-934

Jourd'heuil D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 409-417

Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187: 1-17

Kalra EK. Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci* 2003; 5: 27-28

Kay CD, Kris-Etherton PM, West SG. Effects of antioxidant-rich foods on vascular reactivity: review of the clinical evidence. *Curr Atheroscler Rep* 2006; 8: 510-522

Kim C, Kim JY, Kim JH. Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep* 2008; 41: 555-559

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267

Klayman DL, Günther WH. *Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology*, Wiley, New York, 1973

Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 913-922

Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations. *Nutrition* 2011; 27: 693-699 (**2011a**)

Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. In vitro study of the antioxidative properties of the glucose derivatives against oxidation of plasma components. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 175-183 (**2011b**)

Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Posmyk M, Janas K, Wachowicz B. Red cabbage anthocyanins may protect blood plasma proteins and lipids. *Central European Journal of Biology* 2011; 6: 565-574 (**2011c**)

Kralisz U. Oddziaływania płytek krwi z komórkami śródbłonna w stanach zapalnych część I. Receptory adhezyjne płytek krwi, komórek śródbłonna i mikropecherzyków w hemostazie i stanach zapalnych. *Post Biol Kom* 2008; 35: 45-60 **a**

Kralisz U. Oddziaływania płytek krwi z komórkami śródbłonna w stanach zapalnych część II. Substancje uwalniane z płytek krwi - szlaki regulujące przewodzenie sygnału w komórkach śródbłonna w stanach zapalnych. *Post Biol Kom* 2008; 35: 61-78 **b**

- Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74: 1181-1195
- Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1988-1996
- Lai PK, Roy J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1451-1460
- Laroche C, Michaud P. New developments and prospective applications for beta (1,3) glucans. *Recent Pat Biotechnol* 2007; 1: 59-73
- Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993; 270: 975-979
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790-796
- Lohninger A, Pittner G, Pittner A. L-carnitine: new aspects of a known compound-a brief survey. *Monatsh Chem* 2005; 136: 1255-1268
- Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 251-258
- Macfadyen A, Ho KJ. D-glucaro-1,4-lactone: its excretion in the bile and urine and effect on the biliary secretion of beta-glucuronidase after oral administration in rats. *Hepatology* 1989; 9: 552-556
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 29-38
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7731-7737
- Mazza G. Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43: 369-374
- McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, Sebastianelli W. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 67-72
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage-stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2007; 68: 1285-1294
- Miller DM, Grover TA, Nayini N, Aust SD. Xanthine oxidase - and iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993; 301: 1-7
- Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6702-6706

Noonan PW, Noonan C. Legal requirements for "functional food" claims. *Toxicol Lett* 2004; 150: 19-24

Nowak P, Saluk-Juszczak J, Olas B, Kołodziejczyk J, Wachowicz B. The protective effects of selenoorganic compounds against peroxynitrite-induced changes in plasma proteins and lipids. *Cell Mol Biol Lett* 2006; 11: 1-11

Nowak P, Olas B, Wachowicz B. Oxidative stress in haemostasis. *Post Biochem* 2010; 56: 239-247

Olas B, Waczowicz B, Saluk-Juszczak J, Zieliński T, Kaca W, Buczyński A. Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin – stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17: 117-125 **(2001a)**

Olas B, Wachowicz B, Szewczuk J, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios* 2001; 105: 7-13 **(2001b)**

Olas B, Waczowicz B, Saluk-Juszczak J, Zieliński T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thromb Res* 2002; 107: 141-145

Olas B, Saluk-Juszczak J, Pawlaczyk I, Nowak P, Kolodziejczyk J, Gancarz R, Wachowicz B. Antioxidant and antiaggregatory effects of an extract from *Conyza canadensis* on blood platelets in vitro. *Platelets* 2006; 17: 354-360

Olas B, Saluk-Juszczak J, Nowak P, Glowacki R, Bald E, Wachowicz B. Protective effects of D-glucaro 1,4-lactone against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins. *Nutrition* 2007; 23: 164-171

Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 2005; 12: 267-275

Parnham MJ, Leyck S, Graf E, Dowling EJ, Blake DR. The pharmacology of ebselen. *Agents Actions* 1991; 32: 4-9

Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: 234-264

Pawlaczyk I, Gancarz R, Czerchawski L, Kawala Z. The manner of the production of blood anticoagulatory speciment. 2002; Patent No 351697

Pelizon AC, Kaneno R, Soares AM, Meira DA, Sartori A. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Res* 2005; 54: 557-564

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998; 91: 484-490

Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 41-48

Pitchford SC. Novel uses for anti-platelet agents as anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 987-1002

Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 720-721

Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44: 185-195

Raspor P, Goranovic D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 2008; 28: 101-124

Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42: 301-316

Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 32460-32466

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 2007; 170: 1435-1444

Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Wójtowicz H, Kloc K, Bald E, Glowacki R. Novel selenoorganic compounds as modulators of oxidative stress in blood platelets. *Cell Mol Biol Lett* , 2006; 22: 323-329

Saluk-Juszczak J, Olas B, Pawlaczyk I, Gancarz R, Wachowicz B. Effects of the extract from *Conyza canadensis* on human blood platelet aggregation. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26: 150-152

Saluk-Juszczak J, Olas B, Nowak P, Staron A, Wachowicz B. Protective effects of D-glucaro-1,4-lactone against oxidative modifications in blood platelets. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 422-428

Saluk-Juszczak J, Królewska K, Wachowicz B. β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as a blood platelet antioxidant. *Platelets* 2010; 21: 451-459 (**2010a**)

Saluk-Juszczak J, Królewska K, Wachowicz B. Response of blood platelets to β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Platelets* 2010; 21: 37-43 (**2010b**)

Saluk-Juszczak J, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E. L-carnitine modulates blood platelet oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 2010; 26: 355-365 (**2010c**)

Saluk-Juszczak J. A comparative study of antioxidative activity of calcium-D-glucarate, sodium-D-gluconate and D-glucono-1,4-lactone in a human blood platelet model. *Platelets* 2010; 21: 632-640 (**2010d**)

Saluk-Juszczak J, Olas B, Nowak P, Wachowicz B, Bald E, Głowacki R, Pawlaczyk I, Gancarz R. Extract from *Conyza Canadensis* as a modulator of plasma protein

oxidation/nitration induced by peroxynitrite. *Central European Journal of Biology* 2010; 5: 800-807 (2010e)

Saluk-Juszczak J, Pawlaczyk I, Olas B, Kolodziejczyk J, Ponczek M, Nowak P, Tsirigotis-Woloszczak M, Wachowicz B, Gancarz R. The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins. *Int J Biol Macromol* 2010; 47: 700-705 (2010f)

Saluk-Juszczak J, Kolodziejczyk J, Babicz K, Królewska K. Żywność funkcjonalna - rola nutraceutyków w profilaktyce chorób układu krążenia. *Kosmos* 2010; 59: 527-538

Saluk-Juszczak J, Królewska K, Wachowicz B. (1→3)-β-D-Glucan inhibits a dual mechanism of peroxynitrite stroke. *Int J Biol Macromol* 2011; 48: 488-494

Schwemmer M, Fink B, Kockerbauer R, Bassenge E. How urine analysis reflects oxidative stress-nitrotyrosine as a potential marker. *Clin Chim Acta* 2000; 297: 207-216

Seeram NP, Nair MG. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5308-5312

Selkirk JK, Cohen GM, MacLeod MC. Glucuronic acid conjugation in the metabolism of chemical carcinogens by rodent cells. *Arch Toxicol Suppl* 1980; 3: 171-178

Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 729-735

Sikora J, Kostka B. Struktura i aktywacja płytek krwi oraz ich zastosowanie jako komórek modelowych. *Post Biol Kom* 2005; 232: 561-570

Ueland P, Refsum H, Brattstrom L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis BR, editor *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function*. New York: Marcel Dekker 1992; 183

Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)* 2006; 48: 11-17

Volek JS, Kraemer WJ, Rubin MR, Gomez AL, Ratamess NA, Gaynor P. L-Carnitine L-tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: 474-482

Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; 13: 175-182

Walaszek Z, Szemraj J, Hanausek M, Adams A, Sherman U. D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat. *Nutr Res* 1996; 16: 673-681

Walaszek Z, Szemraj J, Narog M, Adams AK, Kilgore J, Sherman U, Hanausek M. Metabolism, uptake, and excretion of a D-glucaric acid salt and its potential use in cancer prevention. *Cancer Detect Prev* 1997; 21: 178-190

Woźniak T, Pawlaczyk I, Kleszczyńska H, Gancarz R. Antioxidant activity of polysaccharide extract from *Conyza Canadensis*. 22nd International Carbohydrate Symposium, SECC, Glasgow, UK 2004; 325

Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J Intern Med* 1996; 239: 17-34

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4069-4075

Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 358-362

Łódź, dnia 19.03.2012 r.

