

Załącznik 2a

dr Joanna Kołodziejczyk-Czepas

AUTOREFERAT

**Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki**

Łódź, 2018

1. Imię i Nazwisko: Joanna Maria Kołodziejczyk-Czepas

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- **1997-2002** studia magisterskie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, kierunek biologia, specjalność - biochemia,
- **2002** - tytuł magistra biologii, praca magisterska „*Nadtlenoazotyn a układ fibrynolityczny; wpływ nadtlenoazotynu na plazminę*” (promotor: dr hab. Alojzy Zgirski, prof. nadzw. UŁ),
- **2002-2006** - studia doktoranckie w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego, Uniwersytet Łódzki,
- **2006** - stopień doktora w zakresie nauk biologicznych (dyscyplina: biochemia), tytuł pracy doktorskiej: „*Wpływ nadtlenoazotynu na układ fibrynolizy*” (promotor: dr hab. Alojzy Zgirski, prof. nadzw. UŁ).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej:

- **20.02.2006 r. do 30.11.2006 r.** – asystent w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ
- **01.12.2006 r.** do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Aktywność biologiczna ekstraktów z wybranych gatunków koniczyn (Trifolium) – ocena działania przeciwutleniającego, przeciwplytkowego i antykoagulacyjnego in vitro

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Na przedłożone do oceny osiągnięcie składa się **9 poniższych prac**, opublikowanych w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej (JCR), o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor*, **IF**) z roku opublikowania* = **21,335** oraz **punktacji MNiSW** (wg wykazu czasopism punktowanych z roku 2016) = **225** i **liczbie cytowań** wg *Web of Science* (bez autocytowań) = **34**

* dla prac opublikowanych w latach 2017-2018 podano IF z roku 2016

Prace doświadczałne:

1. Kołodziejczyk-Czepas J., Wachowicz B., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Oleszek W., Stochmal A. 2013. *Antioxidative effects of extracts from Trifolium species on blood platelets exposed to oxidative stress.* Journal of Physiology and Biochemistry 69, 879-887 (IF=2,496; punktacja MNiSW: 20); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i samodzielnym wykonaniu wszystkich zawartych w pracy badań aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z koniczyn, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu większości manuskryptu (z wyj. fragmentów sekcji *Materials and Methods*, dotyczących szczegółów uzyskiwania badanych frakcji/ekstraktów), wykonaniu wszystkich tabel i rycin. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 71%.

2. Kołodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Kowalska I., Stochmal A. 2014. *Biological activity of clovers - free radical scavenging ability and antioxidant action of six Trifolium species*. *Pharmaceutical Biology* 52(10):1308-14 (IF=1,241; punktacja MNiSW: 20); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i samodzielnym wykonaniu wszystkich zawartych w pracy doświadczeń z użyciem badanych ekstraktów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu większości manuskryptu (z wyj. sekcji „*Preparation of Trifolium extracts*”) oraz wykonaniu wszystkich tabel i rycin.

Mój wkład obejmuje również zaplanowanie i samodzielne przeprowadzenie oznaczeń wstępnych - optymalizację warunków przeprowadzenia pomiarów aktywności przeciwrodnikowej i redukującej badanych ekstraktów. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 82%.

3. Kołodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Stochmal A. 2015. *Free radical scavenging actions of three Trifolium species in the protection of blood plasma antioxidant capacity in vitro*. *Pharmaceutical Biology* 53(9):1277-84 (IF=1,546; punktacja MNiSW: 20); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i samodzielnym wykonaniu wszystkich zawartych w pracy badań aktywności ekstraktów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu większości manuskryptu (z wyj. sekcji „*Plant material*” oraz „*Separation of extracts*”), wykonaniu wszystkich tabel i rycin. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 79%.

4. Kołodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Kowalska I., Stochmal A. 2015. *Antioxidant action of six Trifolium species in blood platelet experimental system in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 410:229-237 (IF=2,613; punktacja MNiSW: 20); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i samodzielnym wykonaniu wszystkich zawartych w pracy badań właściwości ekstraktów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu większości manuskryptu (z wyj. sekcji „*Plant material*”), wykonaniu wszystkich tabel i rycin. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 87%.

5. Kołodziejczyk-Czepas J., Sieradzka M., Wachowicz B., Nowak P., Oleszek W., Stochmal A. 2016. *The anti-adhesive and anti-aggregatory effects of phenolics from Trifolium species in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 412:155-164 (IF=2,669; punktacja MNiSW: 20); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, samodzielnym wykonaniu oznaczeń sekrecji płytkowego czynnika 4 (PF-4) i pomiarów poziomu dialdehydu malonowego w płytkach krwi oraz współudziale w przeprowadzeniu lub koordynowaniu wykonania pozostałych badań aktywności przeciwplateletowej ekstraktów. Koordynowanie prac badawczych obejmowało m.in. opiekę merytoryczną nad przeprowadzeniem

doświadczeń, transport materiału (krwi), udział w izolacji płytek krwi, izolację fibrynogenu do pomiarów adhezji i przygotowywanie części odczynników.

Mój wkład obejmuje także analizę i interpretację uzyskanych wyników, napisanie większości manuskryptu (z wyj. fragmentów sekcji *Materials and Methods*: „Plant material” oraz „Extraction and fractionation of extracts”), wykonanie wszystkich tabel i rycin. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 73%.

6. Kołodziejczyk-Czepas J., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Sieradzka M., Nowak P., Stochmal A. 2017. Clovamide and clovamide-rich extracts of three *Trifolium* species as antioxidants and moderate antiplatelet agents in vitro. *Phytochemistry* 143:54-63 (IF=3,205; punktacja MNiSW: 35); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, samodzielnym wykonaniu większości oznaczeń – tj. 3-nitrotyrozyny, białkowych tioli, nadtlenków lipidów, substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym, wycieku LDH z płytek krwi oraz cytotoksyczności wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Współwykonywałam również pomiary adhezji płytek krwi (wraz z M. Sieradzką). Koordynowałam wykonanie pozostałych oznaczeń, tj. sprawowałam opiekę merytoryczną nad przeprowadzeniem doświadczeń, przywoziłam materiał, uczestniczyłam w izolowaniu płytek krwi, przeprowadzałam izolację fibrynogenu do pomiarów adhezji, a także przygotowywałam część odczynników.

Mój wkład obejmuje także analizę i interpretację uzyskanych wyników, napisanie większości manuskryptu (z wyj. opisów aspektów izolacji i analizy fitochemicznej ekstraktów, tj.: „Plant material”, „Preparation of clovamide-rich fraction” oraz „Qualitative analysis of clovamide-rich fraction”). Wykonałam tabele 3-9. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 73%.

7. Kołodziejczyk-Czepas J., Sieradzka M., Moniuszko-Szajwaj B., Nowak P., Oleszek W., Stochmal A. Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2018; 70: 413-425. (Punktacja MNiSW: 25; IF=2,405); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, samodzielnym wykonaniu oznaczeń cytotoksyczności wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, pomiarów wycieku dehydrogenazy mleczanowej z płytek krwi oraz pomiarów czasu protrombinowego (PT) i czasu trombinowego (TT). Współwykonywałam (wraz z M. Sieradzką) oznaczenia czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), polimeryzacji indukowanej czynnikiem Innovin i pomiary aktywności amidolitycznej trombiny. Koordynowałam wykonanie pozostałych oznaczeń, m.in. sprawowałam opiekę merytoryczną nad przeprowadzeniem doświadczeń, przywoziłam materiał, przygotowywałam część odczynników. Mój wkład obejmuje także analizę i interpretację uzyskanych wyników, napisanie większości manuskryptu (z wyj. sekcji dotyczących aspektów izolacji ekstraktów). Wykonałam tabele 1, 4-8 oraz rycinę 2. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Prace przeglądowe:

8. Kołodziejczyk-Czepas J. 2012. *Trifolium* species-derived substances and extracts - biological activity and prospects for medicinal applications. *Journal of Ethnopharmacology* 143:14-23 (IF=2,755; punktacja MNiSW: 40); liczba cytowań wg *Web of Science* (bez autocytowań) = 26

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie dostępnego piśmiennictwa, napisaniu całości manuskryptu, wykonaniu wszystkich tabel i rycin. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

9. Kołodziejczyk-Czepas J. 2016. *Trifolium species - the latest findings on chemical profile, ethnomedicinal use and pharmacological properties.* Journal of Pharmacy and Pharmacology 2016; 68(7):845-61 (IF=2,405; punktacja MNiSW: 25); liczba cytowań wg Web of Science (bez autocytowań) = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie dostępnego piśmiennictwa, napisaniu całości manuskryptu, wykonaniu wszystkich tabel. Byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

Oświadczenia współautorów w/w prac zawarto w **załączniku 5**. Łączny wykaz prac objętych osiągnięciem oraz pozostałych opublikowanych prac zamieszczono w **załączniku 3**.

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

Cel naukowy

Prace badawcze prowadzone były w kontekście poznania wpływu ekstraktów z wybranych gatunków koniczyn (*Trifolium*) na funkcjonowanie składników układu hemostazy (białek osocza oraz płytek krwi) *in vitro*. Założenia prowadzonych przeze mnie badań obejmowały ocenę ich działania przeciwutleniającego, przeciwpłytkowego oraz antykoagulacyjnego. W ramach prezentowanych prac badawczych, ocenie poddano aktywność biologiczną ekstraktów uzyskanych z 12 gatunków koniczyn, tj. frakcji fenolowych z 9 gatunków (*T. alexandrinum* L., *T. fragiferum* L., *T. hybridum* L., *T. incarnatum* L., *T. pratense* L., *T. resupinatum* var. *majus* Boiss., *T. resupinatum* var. *resupinatum* L., *T. scabrum* L., *T. pallidum* Waldst. & Kit.) oraz frakcji bogatych w klowamidy, wyizolowanych z kolejnych 3 gatunków *Trifolium* (*T. clypeatum* L., *T. obscurum* Savi i *T. squarrosum* L.). Ekstrakty uzyskałam w ramach współpracy z Zakładem Biochemii i Jakości Plonów, Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach (IUNG-PIB, Puławy).

Idea podjęcia badań powstała w oparciu o wyniki badań wstępnych prowadzonych w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ (m.in. Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *J. Thromb. Thrombol.*, 2013), analizy fitochemiczne wykonane w IUNG-PIB w Puławach (Oleszek i wsp., 2007 i późniejsze prace) oraz dane literaturowe (w tym badania etnomedyczne), wskazujące na potencjał leczniczy niektórych roślin z rodzaju *Trifolium* oraz różnorodność związków polifenolowych w nich obecnych w tych roślinach. W/w aspekty stały się również podstawą

wyboru gatunków koniczyn do badań. Prace badawcze dotyczyły frakcji fenolowych lub fenolowych-wzbogaconych w klowamidy (tzw. frakcji klowamidowych) (tabele 1 oraz 2).

Tabela 1. Ogólny profil fitochemiczny badanych frakcji fenolowych wyizolowanych z 9 gatunków koniczyn.

Gatunki koniczyn	zawartość (mg/g suchej masy)				
	Całkowita zawartość związków fenolowych	Klowamidy	Flawonoidy	Izoflawony	Kwasy fenolowe
<i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i>	22,54	-	9,76	11,17	1,61
<i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i>	17,32	-	11,25	5,21	0,86
<i>T. hybridum</i>	15,24	0,44	5,22	-	9,58
<i>T. pratense</i>	14,82	-	3,89	5,01	5,92
<i>T. fragiferum</i>	11,30	-	5,18	5,50	0,62
<i>T. scabrum</i>	81,09	-	7,67	72,76	0,66
<i>T. alexandrinum</i>	52,55	9,63	22,30	18,97	1,65
<i>T. incarnatum</i>	47,97	-	41,54	5,10	1,32
<i>T. pallidum</i>	35,06	12,94	0,61	7,31	14,20

Tabela 2. Zawartość klowamidów i ich pochodnych w badanych frakcjach klowamidowych izolowanych z *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosum* (LOD - limit detekcji).

	<i>T. clypeatum</i>	<i>T. obscurum</i>	<i>T. squarrosum</i>
% zawartości			
Klowamidy	21,0	21,9	30,5
Pochodne klowamidów	2,7	3,9	4,1
Kwasy fenolowe	17,7	8,1	1,3
Flawonoidy	47,8	45,7	44,5
Izoflawony	-	16,8	12,8
Zawartość (mg/g suchej masy)			
<i>cis</i> -klowamid	23,0 ± 2,2	16,7 ± 2,5	22,2 ± 4,2
<i>trans</i> - klowamid	268,9 ± 3,8	341,6 ± 11,2	452,6 ± 2,1
kawoilo- <i>N</i> -tyrozyna p1	<LOD	<LOD	<LOD
kawoilo- <i>N</i> -tyrozyna p2	<LOD	<LOD	<LOD
kawoilo- <i>N</i> -tyrozyna p3	<LOD	<LOD	<LOD
kawoilo- <i>N</i> -tyrozyna p4	7,5 ± 0,6	31,3 ± 0,6	31,1 ± 2,8
kumaroilo- <i>N</i> - tyrozyna p1	<LOD	2,5 ± 0,8	0,3 ± 0,1
kumaroilo - <i>N</i> - tyrozyna p2	8,4 ± 0,7	7,1 ± 0,2	10,0 ± 0,3
feruloilo- <i>N</i> -DOPA	<LOD	<LOD	4,1 ± 0,7

Zagadnienie badawcze

Nasilona produkcja reaktywnych form tlenu i azotu, prowadząca do wystąpienia stresu oksydacyjnego stanowi ważny element patofizjologii różnorodnych jednostek chorobowych, zarówno o charakterze nagłym, jak i przewlekłym. W wielu pracach badawczych wykazano istotną rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju i progresji zaburzeń funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego. Stąd też, w przypadku chorób cywilizacyjnych związanych z funkcjonowaniem układu krążenia, poza tzw. „zdrowym stylem życia”, profilaktyka obejmuje na ogół suplementację naturalnych przeciwutleniaczy (Förstermann U, 2008; Tinkel i wsp., 2012; Pastori i wsp., 2014; Cheng i wsp., 2017). Jednak oprócz wzmacniania potencjału antyoksydacyjnego organizmu, w badaniach nad opracowaniem nowych skutecznych strategii profilaktycznych i leczniczych, dotyczących różnorodnych schorzeń układu krążenia, zwraca się uwagę na potrzebę znalezienia substancji wykazujących znacznie szerszy zakres działania ochronnego. Najnowsze strategie medyczne obejmują wieloaspektowe spojrzenie na profilaktykę oraz leczenie chorób układu krążenia – poza terapią farmakologiczną, obejmują one ziołolecznictwo i stosowanie suplementacji substancji pochodzenia naturalnego (np. Aggarwal i wsp., 2017; Hao i wsp., 2017; Liperoti i wsp., 2017; Rastogi i wsp., 2016).

Złożone mechanizmy etiologii i patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego obejmują procesy zapalne i towarzyszący im stres oksydacyjny, osłabienie przeciwzakrzepowych właściwości śródbłonna oraz nasilenie aktywności płytek krwi. Dochodzi również do zwiększenia potencjału prokoagulacyjnego osocza krwi, co wynika zarówno z zaburzeń funkcji białek krzepnięcia krwi, jak i obniżenia efektywności działania układu fibrynolizy. Stan zapalny towarzyszący różnym schorzeniom wpływa na aktywność białek układu krzepnięcia i przesuwa stan dynamicznej równowagi w kierunku prozakrzepowym. Stąd też pojawia się potrzeba znalezienia preparatów o działaniu plejotropowym, skutecznych w redukowaniu różnych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Wśród głównych kierunków pożądanej aktywności biologicznej substancji naturalnych, kluczowej dla ich efektu kardioprotekcyjnego wskazuje się właściwości przeciwutleniające, hamowanie aktywacji płytek krwi oraz działanie antykoagulacyjne (np. Rao i wsp., 2014; Almeida Rezende i wsp., 2016; Loffredo i wsp., 2017; Bijak i wsp., 2017).

Badania etnofarmakologiczne wykazały, że współczesne lecznicze zastosowania związków i mieszanin pochodzenia roślinnego nawet w 80% może być zgodne z ich tradycyjnymi zastosowaniami terapeutycznymi (Fabricant i Farnsworth, 2001). Medycyna tradycyjna stanowi punkt wyjścia dla wielu badań działania prozdrowotnego

(profilaktycznego) i leczniczego składników pochodzenia roślinnego. Koniczyny utożsamiane są zwykle z wartościowym źródłem pasz dla zwierząt hodowlanych. Kilka gatunków to również rośliny jadalne, a ponadto, niektóre z gatunków *Trifolium* znane są także w ziołolecznictwie różnych krajów jako naturalne środki przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, a także jako zioła pomocne w leczeniu chorób skóry, zaburzeń układu trawiennego i przyspieszające gojenie ran. Jako surowiec zielarski stosuje się całe części nadziemne, kwiaty, liście, a nawet nasiona tych roślin (**Kołodziejczyk-Czepas J., J. Ethnopharmacol., 2012; Kołodziejczyk-Czepas J., J. Pharm. Pharmacol., 2016**).

Jednak pomimo faktu, że różne gatunki koniczyn wykorzystywane były (i są) w medycynie tradycyjnej oraz współczesnym ziołolecznictwie w wielu krajach, w trakcie prowadzonych przeze mnie badań wstępnych (lata 2009-2011) niewiele było danych pochodzących z badań naukowych potwierdzających aktywność biologiczną tych roślin. Większość informacji na temat efektów farmakologicznych preparatów zawierających składniki z koniczyn pochodziła z badań etnobiologicznych i etnomedycznych. Dane z biomedycznych badań naukowych dotyczyły głównie właściwości *T. pratense*, tj. koniczyny łąkowej (zwyczaj. koniczyny czerwonej), podczas gdy liczba doniesień odnoszących się do aktywności biologicznej i fizjologicznego działania preparatów z innych gatunków koniczyn uprawnych lub/i stosowanych w celach leczniczych była znikoma. Brak było m.in. jakichkolwiek danych dotyczących aktywności biologicznej części z badanych przeze mnie gatunków, tj. *T. incarnatum*, *T. hybridum*, *T. obscurum*, *T. pallidum*, *T. scabrum* oraz *T. squarrosum*. Poza *T. pratense*, żaden z badanych przeze mnie gatunków koniczyn nie był również opisany przez innych badaczy pod kątem wpływu na układ krążenia, w tym funkcjonowanie składników układu hemostazy. Większość dostępnych prac dotyczyła zastosowania *T. pratense* jako źródła fitoestrogenów pomocnych w łagodzeniu objawów menopauzy i stanowiących alternatywę dla hormonalnej terapii zastępczej, podczas gdy inne właściwości ekstraktów z tej koniczyny były badane w niewielkim stopniu. Podsumowanie i dyskusję ówczesnego stanu wiedzy, którego dokonałam w roku 2012 zestawiałam w pracy **J. Kołodziejczyk-Czepas, J. Ethnopharmacol., 2012**. Na przykład, na 82 prace (doświadczałne i poglądowe) stanowiące całościowo piśmiennictwo źródłowe w/w publikacji, 32 artykuły bezpośrednio odnosiły się właśnie do badań nad *T. pratense* (frazy „red clover” lub „*Trifolium pratense*” były wskazane w tytule). Co więcej, koniczyna czerwona stanowiła jeden z badanych lub omawianych gatunków roślin także wśród części pozostałego piśmiennictwa.

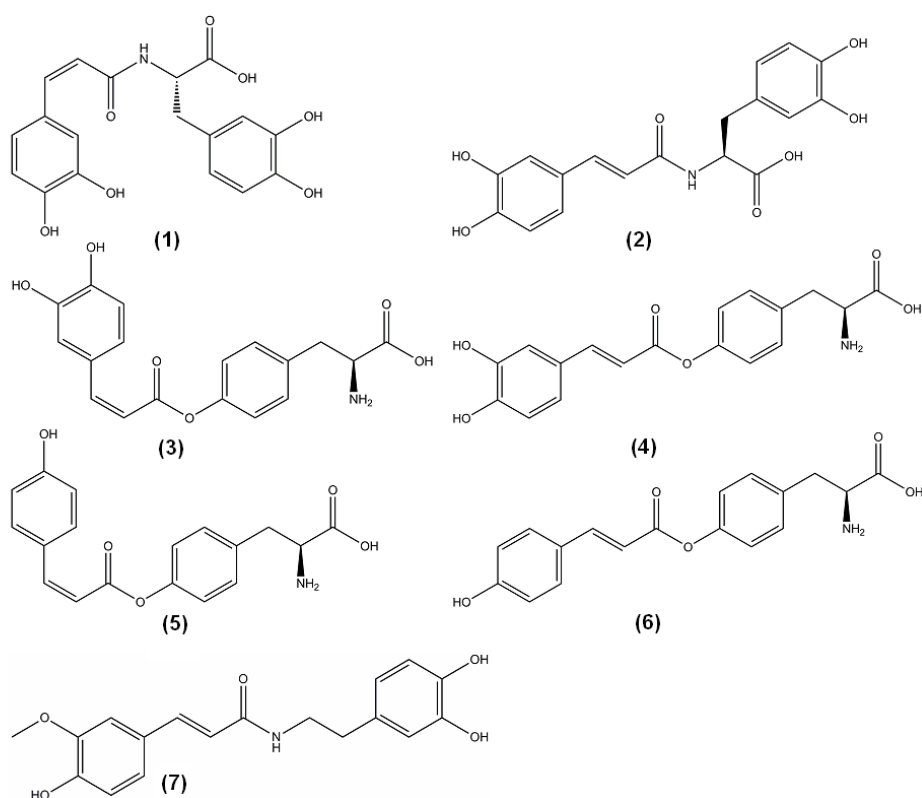
Istniały jednak pewne sugestie wskazujące na możliwy efekt antyplatekrowy ekstraktów z *T. pratense*. Wykazano bowiem, że izoflawony z koniczyny czerwonej mogą *in vitro* pobudzać syntezę tlenku azotu – fizjologicznego czynnika wazorelaksacyjnego i przeciwplatekowego w komórkach śródbłonna (Simoncini i wsp., 2005). Sugerowano też działanie przeciwmiażdżycowe tej rośliny, jednak również i te badania miały charakter wstępny (Asgary i wsp., 2007). Z dostępnych wyników analiz fitochemicznych wynikało również, że części nadziemne koniczyn zawierają wiele substancji biologicznie aktywnych: liczne flawonoidy (w tym izoflawony), saponiny, kwasy fenolowe i klowamidy (Oleszek i wsp., 2007; Szajwaj i wsp., 2011). Dane te pochodziły w większości z badań zespołu naukowców z IUNG-PIB w Puławach. Obejmowały one wyniki badań części nadziemnych 57 gatunków koniczyn i zwróciły uwagę na wysoką zawartość naturalnych związków polifenolowych, syntetyzowanych przez te rośliny (Oleszek i wsp., 2007).

Ponadto, już w trakcie prowadzenia przeze mnie badań dotyczących wyselekcjonowanych 9 gatunków *Trifolium* pojawiły się przesłanki zwracające moją uwagę na aktywność biologiczną pochodnych kwasu kawowego, należących do grupy klowamidów. Właściwości biologiczne tych związków są jeszcze słabo poznane. Dostępne informacje dotyczące właściwości biologicznych klowamidów zebrano w pracy poglądowej autorstwa J. Kołodziejczyk-Czepas i A. Stochmal (Żywn. Nauk. Technol. Jak., 2015). Jak dotąd, ww. praca stanowi jedyne dostępne poglądowe opracowanie dotyczące aktywności biologicznej tej grupy związków. Obecność klowamidów zidentyfikowano po raz pierwszy w *T. pratense* (nazwa „*clovamide*” pochodzi właśnie od słowa „*clover*”), ale obecne są również w innych gatunkach koniczyn. Moją uwagę na klowamidy zwróciła zarówno wysoka aktywność antyoksydacyjna bogatego w te związki ekstraktu z *T. alexandrinum*, jak i dane literaturowe, sugerujące, że mogą one wykazywać właściwości przeciwplatekowe. Stąd też, początkowy zakres badań obejmujących 9 ekstraktów (Tabela 1) poszerzyłam o 3 bogate w klowamidy frakcje pochodzące z następujących gatunków koniczyn: *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosum* (Tabela 2). Chociaż są to gatunki uprawne, ich aktywność biologiczna pozostawała prawie nieopisana. Jedyna praca, jaką udało się znaleźć na temat ich działania, dotyczyła przeciw pasożytniczych właściwości *T. clypeatum* (El-On i wsp., 2009).

Uzyskane wyniki - ocena właściwości biologicznych ekstraktów z wybranych gatunków koniczyn i ich wpływu na funkcjonowanie układu hemostazy in vitro

W przypadku większości gatunków koniczyn objętych prowadzonymi przeze mnie badaniami, przeprowadzone doświadczenia stanowiły pierwsze pomiary ich aktywności w

układach doświadczalnych osocza lub płytek krwi. Dla części z badanych gatunków, była to również pierwsza ocena właściwości biologicznych. Prace badawcze obejmowały ocenę efektywności działania ekstraktów z wybranych gatunków *Trifolium*, przeprowadzoną w różnych układach doświadczalnych *in vitro*. Ze względu na brak możliwości uzyskania materiału roślinnego w tym samym czasie, część prac badawczych przeprowadzono kilkietapowo. Pierwsza seria ekstraktów obejmowała frakcje fenolowe z 3 gatunków, tj. *T. scabrum*, *T. pallidum* oraz *T. pratense*, natomiast druga seria ekstraktów zawierała frakcje fenolowe z 6 gatunków koniczyn (*T. alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. resupinatum* var. *majus* oraz *T. resupinatum* var. *resupinatum*). W ostatnim etapie badań oceniano właściwości bogatych w klowamidy (ryc. 1) frakcji, wyekstrahowanych z *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosum*. W części prac przeprowadzono również dodatkowo oznaczenia działania niefrakcjonowanego ekstraktu z *T. pratense* (tzw. *crude extract*). Harmonogram prowadzonych badań i ich zakres zestawiony został w tabeli 3.



Ryc. 1. Klowamidy i ich pochodne, zidentyfikowane we frakcjach klowamidowych, wyizolowanych z *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosum*: *cis*-klowamid (1), *trans*-klowamid (2), *cis*-kawoilo-*N*-tyrozyna (3), *trans*-kawoilo-*N*-tyrozyna (4), *cis*-*p*-kumaroilo-*N*-tyrozyna (5), *trans*-*p*-kumaroilo-*N*-tyrozyna (6) oraz feruloilo-*N*-DOPA (7) (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., J. Pharm. Pharmacol., 2018*).

Tabela 3. Zestawienie tematyki badawczej, badanych ekstraktów oraz publikacji.

Aspekt badań	Praca	Badane ekstrakty	Oznaczone parametry
Aktywność przeciwutleniająca w ochronie płytek krwi	Antioxidative effects of extracts from <i>Trifolium</i> species on blood platelets exposed to oxidative stress. <i>J. Physiol. Biochem.</i> 2013	Frakcje fenolowe z 3 gatunków: <i>T. pallidum</i> , <i>T. scabrum</i> oraz <i>T. pratense</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • poziom biomarkerów stresu oksydacyjnego w płytkach krwi: 3-NT, białkowych grup -SH, nadtlenków lipidów oraz TBARS
	Antioxidant action of six <i>Trifolium</i> species in blood platelet experimental system <i>in vitro</i> . <i>Mol. Cell. Biochem.</i> 2015	Frakcje fenolowe z 6 gatunków: <i>T. alexandrinum</i> , <i>T. fragiferum</i> , <i>T. hybridum</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • na modelu badawczym płytek krwi - poziom biomarkerów stresu oksydacyjnego: 3-NT (ELISA), białkowych grup -SH, nadtlenków lipidów oraz TBARS • na modelu badawczym płytek oraz osocza krwi (uzupełniająco) - immunodetekcja 3-NT met. Western blotting
Aktywność przeciwutleniająca w chemicznych modelach doświadczalnych i w osoczu krwi	Biological activity of clovers - antioxidative action of six <i>Trifolium</i> species in blood plasma <i>in vitro</i> . <i>Pharm. Biol.</i> 2014	Frakcje fenolowe z 6 gatunków: <i>T. alexandrinum</i> , <i>T. fragiferum</i> , <i>T. hybridum</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • w chemicznym układzie doświadczalnym: aktywność redukująca ekstraktów oraz zdolność zmiatania rodników DPPH• i ABTS•+ • w biologicznym ukł. doświadczalnym: pojemność antyoksydacyjna osocza - NEAC, metodami z zastosowaniem rodników ABTS•+ i DPPH• oraz metodą FRAP
	Free radical scavenging actions of three <i>Trifolium</i> species in the protection of blood plasma antioxidant capacity <i>in vitro</i> . <i>Pharm. Biol.</i> 2015	Frakcje fenolowe z 3 gatunków: <i>T. pallidum</i> , <i>T. scabrum</i> , <i>T. pratense</i>	<ul style="list-style-type: none"> • w chemicznym ukł. doświadczalnym: aktywność redukująca ekstraktów oraz zdolność zmiatania rodników DPPH• i ABTS•+ • w biologicznym ukł. doświadczalnym: pojemność antyoksydacyjna osocza - NEAC, metodami z zastosowaniem rodników ABTS•+ i DPPH• oraz metodą FRAP
Działanie przeciwplytkowe	The anti-adhesive and anti-aggregatory effects of phenolics from <i>Trifolium</i> species <i>in vitro</i> . <i>Mol. Cell. Biochem.</i> 2016	Frakcje fenolowe z 9 gatunków: <i>T. alexandrinum</i> , <i>T. fragiferum</i> , <i>T. hybridum</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>T. pallidum</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i> , <i>T. scabrum</i> , <i>T. pratense</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • pomiary adhezji płytek do fibrynogenu (stymulowanych TH lub ADP) • pomiary agregacji w PRP (stymulacja ADP lub kolagenem) • sekrecja płytkowego czynnika 4 (PF-4) w odpowiedzi na różnych agonistów • generowanie dialdehydu malonowego (metabolizm kw. arachidonowego) w płytkach krwi
Właściwości antykoagulacyjne i ocena cytotoksyczności	Phenolic extracts from nine <i>Trifolium</i> species modulate the haemostatic activity of blood plasma proteins <i>in vitro</i> . <i>J. Pharm. Pharmacol.</i> 2018	Frakcje fenolowe z 9 gatunków: <i>T. alexandrinum</i> , <i>T. fragiferum</i> , <i>T. hybridum</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>T. pallidum</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i> , <i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i> , <i>T. scabrum</i> , <i>T. pratense</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • czasy krzepnięcia: PT, TT, APTT • test krzepnięcia i fibrynolizy (CFF) • aktywność hemostatyczna osocza indukowana Daptin'em • aktywność hemostatyczna osocza indukowana Innovin'em • aktywność amidolityczna trombiny • cytotoksyczność ekstraktów wobec płytek krwi – ocena wycieku LDH oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

<p>Aktywność przeciwutleniająca, przeciwplytkowa oraz ocena cytotoksyczności frakcji klowamidowych</p>	<p>Clovamide and clovamide-rich extracts of three <i>Trifolium</i> species as antioxidants and moderate antiplatelet agents <i>in vitro</i>. <i>Phytochemistry</i> 2017</p>	<p>Fracje bogate w klowamidy z 3 gatunków: <i>T. clypeatum</i>, <i>T. obscurum</i>, <i>T. squarrosum</i> oraz klowamid.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • w <i>chemicznym ukl. doświadczalnym</i>: zdolność redukująca ekstraktów, efektywność zmiatania DPPH• i ONOO⁻ • w <i>biologicznym ukl. doświadczalnym osocza lub płytek krwi</i>: • biomarkery stresu oksydacyjnego: 3-NT, białkowe grupy -SH, nadtlarki lipidów oraz TBARS - adhezja płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu - agregacja płytek krwi w PRP (stymulacja ADP lub kolagenem) - wyciek LDH z płytek - cytotoksyczność ekstraktów wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej
<p>przegląd piśmiennictwa</p>	<p><i>Trifolium</i> species-derived substances and extracts - biological activity and prospects for medicinal applications <i>J. Ethnopharmacol.</i> 2012</p>	<p>praca przeglądowa</p>	<p>-</p>
<p>przegląd piśmiennictwa</p>	<p><i>Trifolium</i> species - the latest findings on chemical profile, ethnomedicinal use and pharmacological properties. <i>J. Pharm. Pharmacol.</i> 2016</p>	<p>praca przeglądowa</p>	<p>-</p>

(a) ocena właściwości przeciwutleniających badanych ekstraktów z koniczyn

Wstępna ocena zdolności zmiatania rodników oraz zdolności redukującej badanych ekstraktów (metodami z wykorzystaniem rodników ABTS^{•+} lub/i DPPH[•] oraz metodą FRAP) przeprowadzana była w chemicznych (nie-biologicznych) układach doświadczalnych. Zarówno pomiary zdolności redukującej (met. FRAP), jak badania porównawcze zdolności zmiatania rodników ABTS^{•+}, DPPH[•] w w/w układach doświadczalnych zasugerowały, że spośród badanych 9 ekstraktów fenolowych, frakcja z *T. alexandrinum* charakteryzuje się najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym. Jej działanie znacząco przewyższało efektywność pozostałych ekstraktów (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Pharm. Biol., 2014*). Wartości EC₅₀ uzyskane dla tej frakcji w oznaczeniach dla zmiatania rodników ABTS^{•+}, DPPH[•] wynosiły odpowiednio 5,53 oraz 2,02 µg/ml (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Pharm. Biol., 2015*) i były co najmniej kilkakrotnie niższe od wartości analogicznych parametrów dla pozostałych 8 frakcji fenolowych (Tab. 4), nawet preparatu z *T. scabrum*, o znacznie wyższej całkowitej zawartości polifenoli (Tab. 1). Wprawdzie frakcja z *T. alexandrinum* zawierała mniej związków polifenolowych (52,55 mg/g suchej masy) niż preparat uzyskany z *T. scabrum* (81,09 mg/g suchej masy), ale zawierała klowamidy, a ponadto, charakteryzowała się wyższą zawartością flawonoidów oraz fenolokwasów (Tab. 1). Również w serii doświadczeń dotyczących zdolności zmiatania rodnika DPPH[•] przez ekstrakty klowamidowe z *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosus* zaobserwowano, że wykazują się one znaczącym potencjałem antyoksydacyjnym (EC₅₀<10 µg/ml). Dla porównania, w analogicznych eksperymentach prowadzonych w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ z użyciem troloksu uzyskiwano wartości EC₅₀ <5-7 µg/ml (dla obu rodników). Wyniki z pomiarów zdolności zmiatania rodników przez badane ekstrakty z koniczyn podsumowałam w Tabeli 4.

Tabela. 4. Porównanie efektywności zmiatania rodników ABTS^{•+} i DPPH[•] przez badane ekstrakty z koniczyn (*na podst. Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Pharm. Biol., 2015*).

Badane ekstrakty	EC ₅₀ [µg/ml] dla zmiatania rodnika ABTS ^{•+}	EC ₅₀ [µg/ml] dla zmiatania rodnika DPPH [•]
<i>T. pratense</i>	21,69	12,27
<i>T. pallidum</i>	29,77	30,06
<i>T. scabrum</i>	55,42	86,82
<i>T. alexandrinum</i>	5,53	2,02
<i>T. fragiferum</i>	54,65	37,93
<i>T. hybridum</i>	42,38	47,66
<i>T. incarnatum</i>	48,64	28,76
<i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i>	22,94	15,70
<i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i>	20,27	14,39
<i>T. clypeatum</i>	-	7,9
<i>T. obscurum</i>	-	6,8
<i>T. squarrosum</i>	-	5,9

Kolejnym aspektem oceny aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z koniczyn były doświadczenia z wykorzystaniem modeli badawczych płytek krwi oraz osocza w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego nadtlendioazotynem (ONOO⁻). Nadtlendioazotyn jest jednym z głównych oksydantów generowanych w układzie krążenia *in vivo*. Jego szkodliwe działanie obejmuje zarówno bezpośrednie uszkodzenia biomolekuł (nitrowanie i utlenianie), jak i aktywację metaloproteinaz oraz promowanie odpowiedzi prozapalnej. W układzie krążenia, uszkodzenia oksydacyjne i nitracyjne mogą znacząco wpływać na funkcje śródbłonna ściany naczyń, aktywność hemostatyczną białek układu krzepnięcia i fibrynolizy, a także płytek krwi. Ekspozycja białek na działanie reaktywnych form tlenu (i azotu) może prowadzić do m.in. do nitrowania reszt tyrozyny, tworzenia dityrozyny i utleniania grup tiolowych. Konsekwencją tych uszkodzeń może być osłabienie lub utrata funkcji białek w wyniku modyfikacji aminokwasów w centrum aktywnym enzymów, pęknięcia łańcucha polipeptydowego, zmiany konformacji białka na skutek pojawienia się wiązań krzyżowych w obrębie tego samego lub różnych łańcuchów polipeptydowych, czy tworzenia agregatów białkowych (*np. Speckmann i wsp., 2016; Bartesaghi i Radi, 2018*). Zarówno rodnikowe, jak i nierodnikowe utleniacze mogą powodować peroksydację osoczowych i komórkowych lipidów.

W układzie hemostazy, stres oksydacyjny może modulować aktywność płytek krwi i białek układu krzepnięcia, przyczyniając się do zwiększenia potencjału prokoagulacyjnego osocza krwi. Ponadto, na uszkodzenia oksydacyjne podatne są również białka układu

fibrylizy, co może dodatkowo prowadzić do efektu hipofibrynolitycznego i nasilenia tendencji prozakrzepowych (np. *Kołodziejczyk J., Diagnost. Lab., 2010; Kołodziejczyk i wsp., Ann. Acad. Med. Siles., 2011*). Efektywność działania przeciwutleniającego badanych ekstraktów roślinnych oceniałam poprzez oznaczenia poziomu markerów stresu oksydacyjnego: grup -SH, 3-nitrotyrozyny (3-NT), substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) oraz nadtlenków lipidów. Ponadto, przeprowadziłam badania wpływu obecności ekstraktów z koniczyn na pojemność antyoksydacyjną osocza krwi w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem ONOO⁻. Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza (zależna od nieenzymatycznych przeciwutleniaczy) oceniana była z użyciem rodników ABTS^{•+} i DPPH[•] lub metody FRAP.

Doświadczenia na modelu badawczym osocza i płytek krwi, potwierdziły przesłanki wynikające z badań na modelach chemicznych. Obie serie badań (obejmujące łącznie frakcje fenolowe z 9 gatunków koniczyn) wykazały, że ekstrakty z tych roślin mogą ograniczać oksydacyjne uszkodzenia płytek krwi i osocza. W badaniach porównawczych dotyczących ekstraktów z *T. scabrum*, *T. pallidum* oraz *T. pratense* (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., J. Physiol. Biochem., 2013*), odnotowano statystycznie istotny efekt ochronny wszystkich badanych frakcji, a najefektywniej działała frakcja fenolowa z *T. pratense*. Badania kolejnej serii ekstraktów (6 frakcji fenolowych) (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Mol. Cell Biochem., 2015*), wykazały znaczące różnice w efektywności ich działania ochronnego przeciw utleniającemu i nitrującemu działaniu nadtlenoazotynu na płytki krwi lub osocze. Frakcja uzyskana z *T. alexandrinum* posiadała najsilniejsze właściwości ochronne przeciwko indukowanemu nadtlenoazotynem utlenianiu białkowych grup -SH, nitrowaniu reszt tyrozyny w białkach oraz peroksydacji lipidów w płytkach krwi. Silniejszy efekt antynitracyjny frakcji fenolowej z *T. alexandrinum* potwierdziłam również w dodatkowych immunodetekcjach 3-nitrotyrozyny białkach płytek krwi i osocza, przeprowadzonych techniką Western blotting. Wykazane przeze mnie antynitracyjne właściwości badanych ekstraktów stanowią właściwość bardzo istotną w ochronie fizjologicznej równowagi w układzie hemostazy. Wyniki badań różnych zespołów wskazują bowiem na istotną rolę stresu oksydacyjnego, w tym nitrowania reszt tyrozyny białek płytkowych w modulowaniu ich aktywacji. Zaobserwowano na przykład, że poddanie tych komórek działaniu ONOO⁻ w zakresie stężeń 50-100 μM, z jednoczesną aktywacją płytek kwasem arachidonowym, stymulowało przemianę eikozanoidów i zwiększało tworzenie prostaglandyny H₂ o 30-60% (*Boulus i wsp., 2000*). Wśród białek płytkowych, podatnych na nitrowanie wymienia się m.in. kinazy

p38MAPK oraz Lyn, paksylinę, czy VASP (ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*,, fosfoproteina stymulowana czynnikiem wazodylatacyjnym) (Sabetkar 2002).

Najsłabszy efekt przeciwutleniający (szczególnie w oznaczeniach poziomu grup -SH i TBARS) odnotowałam dla frakcji z *T. hybridum*, *T. fragiferum* oraz *T. resupinatum* var. *resupinatum* (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Mol. Cell Biochem.*, 2015). W badaniach trzeciej serii ekstraktów (bogate w klowamidy frakcje z koniczyn *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosom*) również zaobserwowałam działanie ochronne wobec białek i lipidów osocza krwi w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego ONOO⁻. Badane frakcje klowamidowe charakteryzowały się podobną efektywnością działania antyoksydacyjnego w przeciwdziałaniu utlenianiu osoczowych lipidów, ale w przypadku ochrony białek (pomiar 3-nitrotyrozyny i poziomu białkowych grup -SH, nieco silniejsze działanie odnotowano dla frakcji z *T. clypeatum*.

Ponadto, przeprowadziłam ocenę wpływu obecności badanych ekstraktów na całkowitą pojemność antyoksydacyjną osocza krwi (zależną od nieenzymatycznych przeciwutleniaczy) w warunkach stresu oksydacyjnego, wywołanego nadtlenoazotynem *in vitro* (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Pharm. Biol.*, 2014 oraz Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Pharm. Biol.*, 2015). W pierwszej serii ekstraktów, najefektywniejszym działaniem ochronnym charakteryzowała się frakcja fenolowa izolowana z *T. pratense*. W drugiej serii oznaczeń, działanie 6 pozostałych ekstraktów było porównywalne - chociaż można zauważyć nieznacznie silniejszy efekt antyoksydacyjny *T. alexandrinum*.

(b) ocena właściwości przeciwplatek badanych ekstraktów z koniczyn

Ocena wpływu ekstraktów z wybranych gatunków koniczyn na hemostatyczną aktywność płytek krwi obejmowała monitorowanie następujących etapów aktywacji płytek krwi: ich adhezji, agregacji oraz sekrecji zawartości ziarnistości płytkowych w odpowiedzi na działanie różnych agonistów. Zastosowanie różnych agonistów umożliwiło wstępne wskazanie szlaków aktywacji płytek krwi, które mogą być hamowane działaniem badanych ekstraktów roślinnych. Trombina aktywuje płytki krwi działając proteolitycznie na receptory aktywowane przez proteazy - PAR (ang. *protease-activated receptors*): PAR-1 i PAR-4, związane z białkami G (ang. *G protein coupled receptor*, GPCR). Receptor PAR-1 współdziała z 3 białkami G (G₁₂, G_q oraz G_i), podczas gdy PAR-4 związany jest z białkami G₁₂ i G_q (Bijak i wsp., *Kosmos*, 2012; Cunningham i wsp., *Biochem. Soc. Trans.*, 2016; Gardiner i Andrews, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016; Posma i wsp., *J. Thromb. Haemost.*, 2016). Z kolei aktywacja płytek krwi wywołana działaniem ADP przebiega za pośrednictwem

receptorów P2Y1 oraz P2Y12, zasocjowanych odpowiednio z białkami G_q oraz G_{i2/3} (np. Rivera i wsp., *Haematologica*, 2009; Stegner i Nieswandt, *J. Mol. Med.*, 2011; Wijeyeratne i Heptinstall, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2011). Jako główne receptory dla kolagenu wskazuje się receptor $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), glikoproteinę GPVI oraz GPIb-IX-V. $\alpha_2\beta_1$ oraz GPVI są receptorami bezpośrednio wiążącymi kolagen. GPIb-IX-V stanowi pośredni receptor adhezji, tworzący kompleks z czynnikiem von Willebranda, kluczowy dla związania płytek krwi do kolagenu warstwy podśródbłonkowej uszkodzonego naczynia w warunkach przepływu krwi z wysokimi gradientami prędkości w tętnicach ($>600 \text{ s}^{-1}$) (Kralisz i Stasiak, *Post. Biochem.*, 2007; Li i wsp., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010; Prakash Lingam i wsp., *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinf.*, 2011; Nuyttens i wsp., *Thromb. Res.*, 2011).

W badaniach obejmujących frakcje fenolowe z 9 gatunków koniczyn (**Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Moll. Cell Biochem.*, 2016**), ekstrakty z *T. incarnatum*, *T. resupinatum* var. *resupinatum* oraz *T. scabrum* były najsilniejszymi inhibitorami adhezji płytek krwi do fibrynogenu, indukowanej trombiną. Ponieważ badane ekstrakty charakteryzowały się niewielką zdolnością hamowania trombiny, uzyskane wyniki sugerują możliwość modulowania przez nie odpowiedzi płytkowej zależnej od integrynowego receptora dla fibrynogenu $\alpha_{IIb}\beta_3$. Wymienione ekstrakty były również najsilniejszymi inhibitorami aktywacji płytek krwi na etapie ich adhezji indukowanej 10 μM ADP. Proces agregacji płytek krwi indukowanej ADP był natomiast najsilniej hamowany przez ekstrakty z *T. resupinatum* var. *majus*, *T. scabrum* i *T. alexandrinum*. Działanie ekstraktów z *T. fragiferum* i *T. pallidum* było słabsze, natomiast w przypadku ekstraktów z *T. hybridum*, *T. incarnatum* i *T. pratense* nie odnotowano istotnego statystycznie efektu przeci płytkowego. Doświadczenia z zastosowaniem kolagenu jako agonisty, wykazały, że większość z badanych frakcji wykazuje łagodny (ale istotny statystycznie) efekt przeci płytkowy, z wyjątkiem preparatu z *T. alexandrinum*.

Przeprowadzono również ocenę wpływu badanych ekstraktów na przemiany zachodzące w aktywowanych płytkach krwi. Możliwość hamowania kaskady przemian kwasu arachidonowego sprawdzono poprzez oznaczenia generowania dialdehydu malonowego w płytkach krwi stymulowanych trombiną. Wykonane doświadczenia wykazały, że przeci płytkowy efekt ekstraktów z *T. alexandrinum*, *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. pallidum* oraz *T. pratense* może być wynikiem hamowania przemian kwasu arachidonowego. Proces sekrecji zawartości ziarnistości płytkowych (sekrecja czynnika płytkowego 4) hamowały w sposób istotny statystycznie ekstrakty *T. scabrum* oraz *T. pratense*, ale pewien spadek odnotowano również dla płytek poddanych działaniu frakcji fenolowych z *T. pallidum*

i *T. resupinatum* var. *resupinatum* (po stymulacji ADP) oraz *T. resupinatum* var. *resupinatum*, *T. resupinatum* var. *majus*, *T. scabrum* i *T. pratense* (po stymulacji kolagenem).

W trakcie prowadzenia przeze mnie prac badawczych, dostępna literatura dotycząca klowamidów obejmowała 2 prace, sugerujące, że związki te mogą wykazywać właściwości przeciwplatekcyjne. Opisano inhibicję cyklooksygenazy-1 i -2 przez klowamid i jego pochodne wyizolowane z ziaren kakaowca (Park, 2007). Efekt antyplatekcyjny klowamidu odnotowano również w doświadczeniach na myszach (Park i Schoene, 2006). Przeprowadzone przeze mnie badania obejmujące aktywność przeciwplatekcyjną bogatych w klowamidy frakcji z *T. clypeatum*, *T. obscurum* i *T. squarrosus* oraz komercyjnego klowamidu częściowo potwierdziły cytowane obserwacje. Wymienione ekstrakty z 3 koniczyn oraz klowamid wykazywały łagodny efekt przeciwplatekcyjny (w zakresie badanych stężeń 1-5 µg/ml). Zaobserwowałam istotne statystycznie ograniczenie adhezji płytek krwi do fibrynogenu. W przypadku adhezji do kolagenu, istotny efekt odnotowałam tylko dla klowamidu, natomiast nie stwierdziłam hamującego wpływu badanych frakcji lub klowamidu na etapie agregacji płytek krwi (w osoczu bogatopłytkowym, po stymulacji ADP lub kolagenem).

c) badania wpływu badanych ekstraktów na właściwości hemostatyczne osocza krwi - ocena właściwości antykoagulacyjnych

Kardioprotekcyjne właściwości związków roślinnych mogą obejmować nie tylko hamowanie aktywacji płytek krwi, ale także hamujący wpływ na aktywację białek kaskady krzepnięcia krwi (np. inhibicję trombiny), czy nawet efekt pro-fibrynolityczny (Cordier 2012). Dane dotyczące wpływu preparatów z *T. pratense* na potencjał prokoagulacyjny osocza krwi są niespójne. Wiadomo, że ekstrakty z *T. pratense* nie powinny być podawane razem z niektórymi lekami, np. warfaryną, gdyż mogą nasilać działanie terapii przeciwzakrzepowej, choć mechanizm tych interakcji nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniony (np. Ge i wsp., 2014). Ale z innych danych wynika, że stosowanie preparatów zawierających ekstrakt z tej rośliny nie wpływa na właściwości hemostatyczne osocza krwi u osób nieprzyjmujących leków przeciwzakrzepowych (np. Geller i wsp., 2009; Mainini i wsp., 2013).

W przypadku koniczyn innych niż *T. pratense*, ich wpływ na właściwości koagulacyjne osocza krwi jest bardzo słabo poznany, stąd też przeprowadzone przeze mnie badania dostarczyły pierwszych danych dotyczących wpływu większości z badanych gatunków na hemostazę osoczkową. Badane ekstrakty charakteryzowały się łagodnymi właściwościami antykoagulacyjnymi *in vitro* (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., J. Pharm.

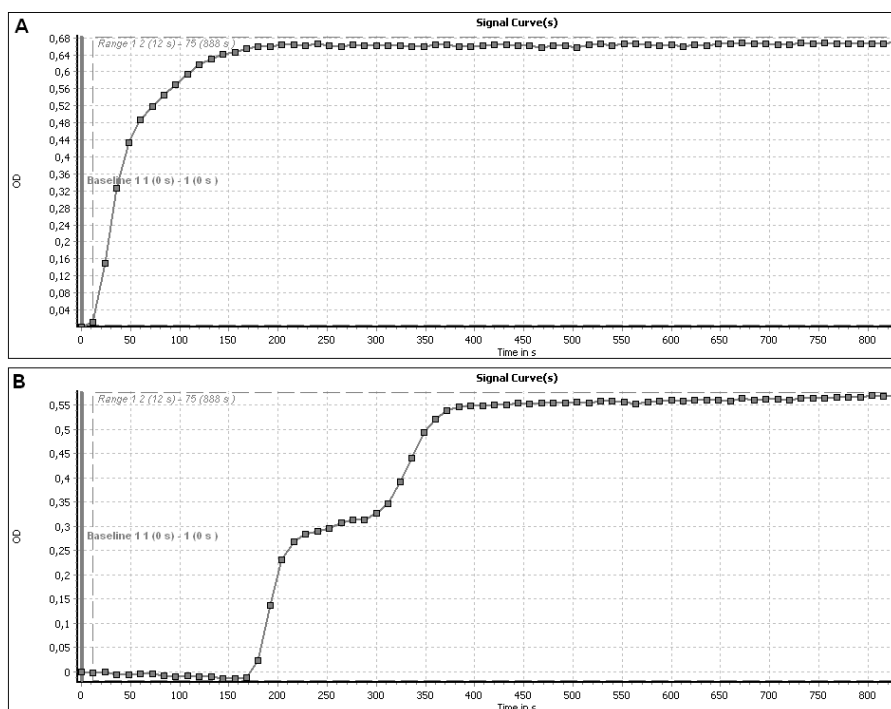
Pharmacol., 2018). Zastosowałam różne układy badawcze, umożliwiające ocenę wpływu ekstraktów na właściwości hemostatyczne osocza krwi, w tym proces krzepnięcia indukowany różnymi mechanizmami. Wykonane zostały pomiary czasów krzepnięcia oraz aktywności amidolitycznej trombiny. Nie odnotowałam wpływu badanych ekstraktów na czasy krzepnięcia krwi, tj. czas trombinowy (TT), czas protrombinowy (PT), czas kaolinowo-kefalinowy (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji - APTT). Ponieważ warunki pomiarów czasów krzepnięcia (czas pomiaru poniżej minuty) nie pozwalają na dokładniejsze prześledzenie wpływu ekstraktów na właściwości hemostatyczne osocza krwi, wykonana została seria doświadczeń umożliwiających śledzenie przebiegu wykrzepiania osocza i analizę kinetyki polimeryzacji w wydłużonym czasie. W ramach tych badań wykonane zostały doświadczenia obejmujące aktywację wykrzepiania osocza poprzez czynnik tkankowy (tzw. zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia – *zastosowano preparat Innovin*) lub szlak zależny od czynników kontaktu (tzw. wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia – *przy zastosowaniu preparatu Daptin*). Przeprowadzono także pomiary wpływu ekstraktów z koniczyn na wykrzepianie osocza indukowane trombiną i fibrylizę (*clot formation and fibrinolysis (CFF) assay*). Jako główne parametry zastosowano:

- *lag time* - parametr odpowiadający fazie enzymatycznej polimeryzacji fibrynogenu (odsłonięcie miejsc polimeryzacyjnych),
- *szybkość maksymalną polimeryzacji (V_{max})* - wskaźnik charakteryzujący proces asocjacji protofibrili tworzonych przez polimeryzujący fibrynogen (faza polimeryzacyjna),
- *absorbancję maksymalną (A_{max})* – wskaźnik grubości włókien i stopnia usieciowania powstałej fibryny (faza stabilizacji włókienka),
- *czas połowicznej lizy włókienka ($T_{1/2}$)* - w pomiarach metodą CFF.

Opisywany etap doświadczeń obejmował badania właściwości 9 frakcji fenolowych, pochodzących z *T. alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. pratense*, *T. resupinatum* var. *majus*, *T. resupinatum* var. *resupinatum*, *T. scabrum* oraz *T. pallidum*. Analizy wpływu badanych ekstraktów na proces krzepnięcia i fibrylizy (met. CFF) wykazały istotny statystycznie spadek V_{max} polimeryzacji (efekt antykoagulacyjny) w przypadku oznaczeń z użyciem 3 ekstraktów (z 9 badanych frakcji fenolowych), tj. preparatów z *T. fragiferum*, *T. incarnatum* oraz *T. pallidum*. Badane ekstrakty nie wpływały na aktywność fibrynolityczną osocza.

Wykonano oznaczenia wpływu ekstraktów na proces polimeryzacji fibrynogenu w osoczu, zależny od różnych szlaków krzepnięcia. Odmiennie mechanizmy aktywacji krzepnięcia odzwierciedlone były w przebiegu krzywych polimeryzacyjnych (ryc. 2AB). Kinetyka

polimeryzacji fibrynogenu w osoczu, indukowanej Dapttin'em (wewnątrzpochodny szlaku krzepnięcia), charakteryzowała się 2-etapowym przebiegiem fazy polimeryzacyjnej (ryc. 2B). W oznaczeniach polimeryzacji indukowanej czynnikiem tkankowym (preparat Innovin – aktywacja szlaku zewnątrzpochodnego) nie odnotowano istotnego statystycznie wpływu badanych 9 frakcji fenolowych na polimeryzację fibrynogenu, na żadnym z badanych etapów tego procesu. Natomiast aktywacja krzepnięcia na drodze wewnątrzpochodnej (preparat Dapttin) ujawniła hamujący wpływ części ekstraktów na proces polimeryzacji fibrynogenu w osoczu krwi. Istotny statystycznie efekt antykoagulacyjny wykazywały frakcje z *T. alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. incarnatum*, *T. pallidum*, *T. resupinatum* var. *resupinatum*, *T. resupinatum* var. *majus* oraz *T. scabrum*. Wymienione ekstrakty wpływały hamująco na proces wykrzepiania osocza krwi na etapie polimeryzacji, co przekładało się na spadek V_{max} polimeryzacji.



Ryc. 2. Przykładowa krzywa polimeryzacji fibrynogenu w osoczu krwi, uzyskiwana w oznaczeniach z zastosowaniem odczynników *Innovin* (aktywacja zależna od czynnika tkankowego/zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia – ryc. 1A) oraz *Dapttin* (aktywacja wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia – ryc. 1B) (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., J. Pharm. Pharmacol., 2018*).

Doświadczenia dotyczące wpływu badanych ekstraktów na aktywność amidolityczną trombiny wykazały, że badane ekstrakty hamują aktywność trombiny w niewielkim stopniu (do 20%). W przypadku frakcji z *T. pratense* nie zaobserwowałam efektu hamującego. Nie stwierdziłam efektu prokoagulacyjnego. Na podstawie wykonanych pomiarów aktywności

trombiny oraz oznaczeń polimeryzacji różnymi metodami, można przypuszczać, że obserwowany łagodny efekt antykoagulacyjny jest w niewielkim stopniu wynikiem hamowania tego enzymu. Prawdopodobne są interakcje składników obecnych w badanych ekstraktach z innymi białkami kaskady krzepnięcia krwi. Analizy fitochemiczne wykazały, że fawone fenolowe z 2 gatunków o najsilniejszym efekcie antykoagulacyjnym zawierają różnorodne związki bioaktywne o możliwym działaniu kardioprotekcyjnym, m.in. kemferol, kwercetynę, medikarpinę (*T. fragiferum*), czy apigeninę, luteolinę, diosmetynę i medikarpinę (*T. incarnatum*). Przypuszczalnie, ich obecność może odpowiadać więc za obserwowany efekt antykoagulacyjny badanych ekstraktów. Według danych literaturowych, wykazano na przykład hamowanie aktywności trombiny i czynnika Xa krzepnięcia przez luteolinę *in vitro* oraz *in vivo* (Choi i wsp., 2015).

d) ocena cytotoksyczności badanych ekstraktów

Ocena cytotoksyczności badanych ekstraktów *in vitro* przeprowadzana była z zastosowaniem 2 modeli komórkowych – płytek krwi oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Phytochemistry* 2017; Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *J. Pharm. Pharmacology* 2018). Do doświadczeń wybrałam zakres stężeń badanych ekstraktów ≤ 10 $\mu\text{g/ml}$, najbardziej odpowiadających fizjologicznemu poziomowi substancji pochodzenia roślinnego lub ich metabolitów, jaki rejestrowany jest osoczu krwi.

Ze względu na wysoką reaktywność, przejawiającą się szybką odpowiedzią na bodźce, w tym czynniki uszkodzające, płytki krwi stanowią bardzo dobry model doświadczalny do oznaczeń cytotoksyczności. Wykonane doświadczenia opierały się na pomiarze wycieku dehydrogenazy mleczanowej i wykazały, że badane ekstrakty nie wpływają na integralność błony płytkowej. Ocenę cytotoksyczności wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej przeprowadzałam natomiast metodą fluorymetryczną w oparciu o barwienie jodkiem propidyny. Również w tych doświadczeniach nie stwierdziłam efektu cytotoksycznego badanych ekstraktów z 12 gatunków koniczyn (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Phytochemistry* 2017; *Kołodziejczyk-Czepas i wsp., J. Pharm. Pharmacology* 2018).

e) Perspektywy dalszych badań i wykorzystania uzyskanych wyników

Prezentowane badania dotyczą zagadnień związanych z poszukiwaniem naturalnych - roślinnych źródeł bioaktywnych substancji o potencjalnym działaniu profilaktycznym i/lub leczniczym. Przeprowadzona przeze mnie ocena właściwości biologicznych może stanowić podstawę do dalszego oszacowania potencjału prozdrowotnego lub leczniczego ekstraktów z

różnych gatunków *Trifolium*. Badania te wpisują się również w aktualne kierunki badawcze i interdyscyplinarne spojrzenie, obecne w naukach biomedycznych i farmaceutycznych. Poszukując substancji biologicznie czynnych, pomocnych w ochronie układu krążenia zwraca się bowiem uwagę na znalezienie gatunków posiadających różnorodne korzystne właściwości biologiczne (w tym antyoksydacyjne, antypłytkowe i antykoagulacyjne). Ważną kwestią jest również dostępność materiału badawczego, jak również aspekty ekonomiczne, tj. minimalizowanie kosztów uzyskania materiału roślinnego (ekstraktu), który może w przyszłości być podstawą do dalszych badań nad opracowaniem suplementu diety lub środka medycznego. Popularność koniczyn w rolnictwie wynika ze stosunkowo niskich kosztów uprawy, ponieważ koniczyny korzystają z azotu atmosferycznego asymilowanego dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi, zasiedlające korzenie tych roślin. Dlatego też koniczyny nie wymagają intensywnego nawożenia.

Jak dotąd, pomimo rosnącego zainteresowania różnorodnymi gatunkami roślin, jako źródłem substancji o działaniu kardioprotekcyjnym, koniczyny - choć popularne w rolnictwie, pozostawały w większości niezbadane (nawet w zakresie badań podstawowych) pod względem zawartości substancji biologicznie czynnych i ich efektu fizjologicznego. W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie aktywnością biologiczną tych roślin, ich właściwościami prozdrowotnymi, a także możliwością wykorzystania koniczyn jako źródła bioaktywnych substancji, przydatnych w profilaktyce lub terapii różnych zaburzeń. Postęp prac badawczych nad aktywnością biologiczną ekstraktów z koniczyn oraz poszerzenie wiedzy w tym zakresie zestawiałam w pracy przeglądowej „*Trifolium species – the latest findings on chemical profile, ethnomedicinal use and pharmacological properties* (Kołodziejczyk-Czepas, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2016). Dane źródłowe stanowiło ponad 80 najnowszych prac, pochodzących z ponad 3-letniego okresu badań prowadzonych w różnych regionach świata.

W przeprowadzonych badaniach, objętych *wskazany osiągnięciem, wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)* wykazałam, że badane gatunki koniczyn posiadają właściwości przeciwutleniające i/lub przeciwpłytkowe oraz antykoagulacyjne. W przypadku większości z badanych przeze mnie gatunków, były to pierwsze prace badawcze dotyczące działania antyoksydacyjnego w biologicznych układach doświadczalnych osocza i płytek krwi oraz wpływu ekstraktów z tych roślin na funkcje płytek krwi. Dla większości badanych gatunków koniczyn (z wyj. *T. pratense*) są to również

pierwsze badania dotyczące ich wpływu na proces krzepnięcia osocza krwi, w tym aktywność enzymatyczną trombiny oraz aktywność fibrynolityczną osocza krwi.

W przeprowadzonych badaniach, po raz pierwszy:

- wykazano przeciwutleniające właściwości ekstraktów z 5 gatunków: *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. clypeatum*, *T. obscurum* oraz *T. squarrosum* (w literaturze brak było jakichkolwiek danych na ten temat) stosując chemiczne i biologiczne układy doświadczalne. W przypadku badań aktywności biologicznej ekstraktów z *T. pallidum* oraz *T. scabrum*, przeprowadzone przeze mnie badania wstępne – niewchodzące w skład osiągnięcia (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *J. Thromb. Thrombol.*, 2013) również stanowiły pierwsze doniesienia na temat działania substancji obecnych w tych roślinach.
- przeprowadzono ocenę właściwości przeciwplatek i antyoksydacyjnych ekstraktów *T. clypeatum*, *T. obscurum* i *T. squarrosum*,
- wykonano wstępną ocenę cytotoksyczności ekstraktów z *T. alexandrinum*, *T. fragiferum*, *T. hybridum*, *T. incarnatum*, *T. clypeatum*, *T. obscurum*, *T. pallidum*, *T. resupinatum* var. *majus*, *T. resupinatum* var. *resupinatum*, *T. scabrum* oraz *T. squarrosum*,
- przeprowadzono analizę aktywności biologicznej ekstraktów z *T. obscurum* oraz *T. squarrosum*.

Jako główne wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań, należy wskazać następujące obserwacje:

- najsilniejsze właściwości przeciwutleniające wykazywała frakcja fenolowa z *T. alexandrinum*, w nieco mniejszym stopniu frakcje z *T. incarnatum* i *T. pratense*,
- najsilniejszy efekt przeciwplatekowy frakcje fenolowe z *T. incarnatum* oraz *T. scabrum*,
- wyraźny efekt antykoagulacyjny odnotowano głównie dla frakcji fenolowych z *T. fragiferum*, *T. incarnatum* oraz *T. pallidum*,
- frakcje klowamidowe z *T. clypeatum*, *T. obscurum* i *T. squarrosum* wykazywały łagodny efekt przeciwplatekowy i antyoksydacyjny,
- badane ekstrakty nie wpływały na aktywność fibrynolityczną osocza krwi,
- nie stwierdzono cytotoksyczności badanych 12 ekstraktów wobec płytek krwi oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.

Przeprowadzone badania właściwości biologicznych dotyczyły ekstraktów zarówno z popularnych gatunków uprawnych (w tym znanych w ziołolecznictwie), ale i mniej znanych koniczyn (np. *T. pallidum*). Uzyskane wyniki poszerzyły aktualny stan wiedzy dotyczący właściwości biologicznych ekstraktów koniczyn. Jednocześnie, zwracają uwagę na to, że różne gatunki koniczyn mogą stanowić cenne (choć dopiero poznawane) źródło substancji biologicznie czynnych, przydatnych nie tylko w celach profilaktycznych, ale posiadających również potencjalną aktywność farmakologiczną. Niezbędne są jednak dalsze badania *in vivo*.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

1. Działalność naukowa i dydaktyczna przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Osiągnięcia badawcze

W roku 2001, w ramach wykonywania pracy magisterskiej, rozpoczęłam prace badawcze dotyczące wpływu nadtlenoazotynu na aktywność enzymatyczną plazminy. Badania te stały się wstępem do podjęcia tematyki udziału stresu oksydacyjnego w zaburzeniach funkcji białek układu hemostazy, a w szczególności wpływu modyfikacji oksydacyjnych na aktywność układu fibrynolizy. Wyżej wspomniane zagadnienia stanowiły przedmiot mojej pracy doktorskiej „*Wpływ nadtlenoazotynu na układ fibrynolizy*”, którą obroniłam w roku 2006. Za najważniejsze osiągnięcia moich badań z tego okresu uważam potwierdzenie podatności plazminy na uszkodzenia oksydacyjne, w tym nitrujące działanie ONOO⁻. W połączeniu z poprzednimi badaniami, prowadzonymi w Katedrze, uzyskane moje obserwacje stanowiły jedne z pierwszych doniesień dotyczących możliwości hamowania fibrynolizy w warunkach stresu oksydacyjnego. Wcześniej przypuszczano bowiem, że ze względu na swoją zwartą, kringlową strukturę, plazminogen i plazmina nie są podatne na uszkodzenia oksydacyjne. Ponadto, wykazałam, że za hamowanie aktywności enzymatycznej plazminy przez ONOO⁻ może odpowiadać nitrowanie reszt tyrozyny w tych białkach.

Opracowałam również metodę immunoenzymatyczną (ELISA kompetycyjna) do ilościowego oznaczania 3-nitrotyrozyny w materiale biologicznym (osocze, lizat komórkowy) w oparciu o fibrynogen jako antygen wzorcowy. W badaniach nad uszkodzeniami oksydacyjnymi białek uznanym markerem jest obecność 3-nitrotyrozyny, ponieważ nitrowanie tyrozyny w białkach ma nie tylko wartość wskaźnikową, także odgrywa znaczącą rolę w zmianach funkcji niektórych białek (*Kołodziejczyk, Diag. Lab., 2010*). Oznaczanie poziomu 3-nitrotyrozyny jest jednym z głównych biomarkerów stresu oksydacyjnego. Opracowaną przeze mnie metodę zastosowaliśmy w Katedrze do szeregu oznaczeń uszkodzeń białek w warunkach stresu

oksydacyjnego oraz oceny efektywności działania badanych antyoksydantów (naturalnych i syntetycznych). Poza badaniami układu fibrynolizy, istotnym zagadnieniem prowadzonych przeze mnie badań była ocena zmian w funkcjonowaniu elementów układu hemostazy (białek krzepnięcia oraz płytek krwi) oraz badania różnorodnych związków jako potencjalnych przeciwutleniaczy. Uzyskane przeze mnie wyniki przedstawiane były w ramach ustnych i posterowych komunikatów konferencyjnych. Zostały one również opublikowane w kilku pracach oryginalnych (np. *Nowak i wsp., Cell. Mol. Biol. Lett., 2006; Saluk-Juszczak i wsp., Curr. Microbiol., 2006; Nowak i wsp., Thromb. Res., 2007*).

Praca dydaktyczna oraz inne osiągnięcia

W trakcie studiów doktoranckich moja praca dydaktyczna obejmowała prowadzenie zajęć laboratoryjnych z biochemii oraz pracowni specjalistycznej dla studentów kierunku biologia. Aktywnie uczestniczyłam w kilku konferencjach i warsztatach naukowych (wykaz w **załączniku 4**). W roku 2004, byłam także uczestnikiem II Międzynarodowej Szkoły Letniej „*Biomedical applications of carbon surfaces*” Centrum Doskonałości NANODIAM (Politechnika Łódzka). W 2005 roku włączyłam się w prace związane z organizacją IX Konferencji Biologii Komórki (Łódź, 2005), a rok później przygotowywałam i przeprowadzałam prezentacje i spotkania informacyjne z uczniami szkół średnich w ramach Drzwi Otwartych na Wydziale BiOŚ UŁ.

II. Aktywność naukowa i dydaktyczna po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Osiągnięcia badawcze

Pracę zawodową na stanowisku asystenta w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ rozpoczęłam w lutym 2006 roku, jako doktorantka. Po obronie pracy doktorskiej, od grudnia 2006 roku rozpoczęłam pracę adiunkta w tej samej Katedrze. Początkowo zaangażowałam się w bieżące prace badawcze. Opracowaną przez siebie metodę immunodetekcji 3-nitrotyrozyny zastosowałam do oznaczeń efektywności działania różnych antyoksydantów, w tym związków pochodzenia roślinnego, a także oceny wpływu stresu oksydacyjnego na składniki krwi w warunkach *in vitro*.

Zarówno zakończone, jak i obecnie prowadzone przeze mnie badania koncentrują się na ocenie zmian morfotycznych i osoczowych składników krwi (w tym białek układu hemostazy) w warunkach stresu oksydacyjnego w układach doświadczalnych *in vitro* oraz w warunkach *in vivo* - w różnorodnych jednostkach chorobowych. Ponadto, prowadzę prace badawcze mające na celu poszukiwanie i wstępną ocenę naturalnych substancji o

potencjalnym działaniu kardioprotekcyjnym, obejmującym efekt przeciwutleniający, przeciwpłytkowy i antykoagulacyjny, a także działanie przeciwzapalne. Badania te wykonywane są w aspekcie oceny możliwości zastosowania tych substancji w profilaktyce lub terapii chorób cywilizacyjnych, przede wszystkim dotyczących układu sercowo-naczyniowego.

Jako **wykonawca w projekcie WroVASC**, przeprowadzałam badania wchodzące skład jednego z zadań realizowanych we współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodkiem Badawczo-Rozwojowym. Badania te dotyczyły właściwości biologicznych preparatów roślinnych (glikokoniugaty polisacharydowo-polifenolowe), wyizolowanych z kilku gatunków roślin leczniczych, należących do rodzin *Asteraceae* oraz *Rosaceae* i wykazały m.in., że rośliny te mogą być źródłem substancji o działaniu przeciwutleniającym (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., Int. J. Biol. Macromol., 2015*).

Od roku 2008 uczestniczę także w badaniach w badaniach mających na celu ocenę działania przeciwutleniającego różnorodnych naturalnych substancji i ekstraktów roślinnych uzyskiwanych w ramach współpracy z Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowym Instytutem Badawczym (IUNG-PIB) w Puławach. W 2009 roku włączyłam się w badania prowadzone we współpracy z Uniwersytetem w Salerno (Włochy) dotyczące aktywności biologicznej substancji izolowanych z *Garcinia cambogia*. W tym czasie zainteresowałam się również aktywnością biologiczną substancji zawartych w koniczynach. Ekstrakty otrzymałam z IUNG-PIB w Puławach, a pierwszy etap prac badawczych dotyczących koniczyn stanowiły badania wstępne, obejmujące głównie ocenę właściwości przeciwutleniających frakcji fenolowych z 2 gatunków koniczyn – *T. pallidum* oraz *T. scabrum*. Część wstępnych prac badawczych wykonałam w ramach uzyskanej przeze mnie dotacji na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz studiów doktoranckich (rozporządzenie MNiSW z 5 listopada 2010 - Uniwersytet Łódzki, dofinansowanie nr 545/217, 545/464 oraz 545/741). Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały na wysoki potencjał antyoksydacyjny badanych gatunków i stały się podstawą m.in. publikacji w *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* (*Kołodziejczyk-Czepas i wsp., 2013*). Po wykonaniu badań wstępnych oraz analizie danych literaturowych i wyników analiz fitochemicznych przeprowadzonych w IUNG-PIB, dokonałam wyboru gatunków koniczyn stanowiących przedmiot mojej pracy badawczej w ramach *osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)*.

Współpraca z IUNG-PIB w Puławach zaowocowała również złożeniem wspólnych wniosków grantowych i współpracą w ramach 3 projektów badawczych, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

W latach 2014-2015, byłam **głównym wykonawcą w projekcie „Substancje swoiste korzeni *Kalanchoe daigremontiana* i ich aktywność biologiczna”** finansowanego w ramach konkursu Narodowego Centrum Nauki (NCN). W prowadzonych badaniach skupiliśmy się na właściwościach frakcji fenolowej, bogatej w bufadienolidy - związki podobne do kardenolidów, i podobnie jak one, wykazujące aktywność glikozydów nasercowych. Wyniki uzyskane w tych badaniach stanowią pierwsze doniesienie wskazujące na aktywność antyoksydacyjną frakcji uzyskanej z korzeni żyworódki pierzastej (*K. daigremontiana*) (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Pharm. Biol.*, 2016). Stosując układy doświadczalne *in vitro* oraz metody bioinformatyczne, po raz pierwszy wykazaliśmy również, że zawarte we frakcji substancje mogą być inhibitorami proteaz serynowych układu hemostazy (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., *Int. J. Biol.Macromol.*, 2017). Jak dotąd, bufadienolidy (podobnie jak kardenolidy) badane były bowiem przede wszystkim pod kątem ich wpływu na funkcje kardiomiocytów oraz właściwości przeciwnowotworowych.

Kolejny z w/w projektów „Metabolity wtórne części nadziemnych *Pulmonaria officinalis* L. i ich aktywność biologiczna”, realizowany jest w formie konsorcjum naukowego IUNG-PIB w Puławach (Lider) i Uniwersytetu Łódzkiego (Partner). Jako **wykonawca i koordynator ze strony UŁ**, od 2015 roku współprowadzę badania właściwości przeciwutleniających, przeciwplatekcyjnych oraz antyokagulacyjnych ekstraktów i substancji wyizolowanych z różnych gatunków miodunek (*Pulmonaria*).

Obecnie, we współpracy z Instytutem w Puławach realizowane są również badania objęte **kierowanym przeze mnie projektem „Biochemiczne podstawy działania roślin leczniczych - wstępna ocena właściwości przeciwzapalnych i przeciwutleniających ekstraktów z polonicznika (*Herniaria L.*)”**, finansowanym ze środków NCN, w ramach konkursu MINIATURA 1.

Ponadto, w ramach współpracy naukowej z Zakładem Psychiatrii Biologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi byłam **wykonawcą w ramach grantu „Wpływ atypowych leków przeciwpsychotycznych na procesy prooksydacyjne, antyoksydacyjne i apoptozę - badania w elementach morfotycznych krwi, osoczu i hodowlach linii komórkowych”**. Łącznie, byłam wykonawcą lub głównym wykonawcą w 4 projektach badawczych, a obecnie kieruję 1 projektem finansowanym ze środków NCN.

Badania właściwości substancji i ekstraktów roślinnych prowadzę również w ramach współpracy naukowej z Zakładem Farmakognozji, Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Obejmują one ocenę aktywności biologicznej i cytotoksyczności ekstraktów z wybranych gatunków roślin, m.in. z rodzaju *Cotoneaster* (irga), *Prunus* (śliwa) oraz *Sorbus* (jarząb) w układach doświadczalnych *in vitro*. Część wyników z tych prac badawczych zawarta została w 2 pracach, opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR (*Marchelak i wsp., Front. Pharmacol., 2017; Matczak i wsp., J. Funct. Foods, 2017*).

We współpracy z Kliniką Chirurgii Onkologicznej, Katedry Onkologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi) prowadzę prace badawcze objęte tematem *"Ocena wybranych biomarkerów stresu oksydacyjnego u pacjentów ze stwierdzoną chorobą nowotworową żołądka"*.

Osiągnięcia dydaktyczne

Prowadziłam zajęcia dla studentów kierunku biologia, biotechnologia, ochrona środowiska oraz chemia. Obejmowały one ćwiczenia laboratoryjne (ćwiczenia z biochemii, ćwiczenia „*Wstęp do analizy biochemicznej*”, ćwiczenia laboratoryjne „*Biochemia hemostazy*”, ćwiczenia z enzymologii oraz różne rodzaje pracowni laboratoryjnych) a także zajęcia seminaryjne i konwersatoryjne.

Moje osiągnięcia dydaktyczne obejmują także kierowanie przygotowaniem 4 prac magisterskich (3 ukończone oraz 1 w trakcie realizacji) i bezpośrednią opiekę nad wykonaniem wykonania 15 prac magisterskich (14 ukończonych, 1 w trakcie przygotowania), realizowanych w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. Kierowałam 11 ukończonymi pracami licencjackimi, recenzowałam 1 pracę magisterską, a funkcję recenzenta prac licencjackich pełniłam 8 razy. Dwukrotnie byłam także opiekunem uczestników praktyk odbywanych w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ, przez studentów po II roku studiów I° (kierunek - biologia) i po I roku studiów I° (kierunek - biotechnologia) na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ. W 2008 roku, w ramach udziału w międzynarodowym programie praktyk IAESTE (*The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience*), sprawowałam także opiekę naukową nad studentem z zagranicy.

Obecnie, jestem również **wykonawcą w międzynarodowym projekcie dydaktycznym, zakwalifikowanym do finansowania w ramach konkursu Komisji Europejskiej „*Implementation of the EU CBRN Action Plan, the EU Action Plan on enhancing the security of explosives and the European programme for critical infrastructure protection*”**. W/w projekt obejmuje przygotowanie i przeprowadzenie

międzynarodowych studiów podyplomowych “*Support for European Union action in the field of CBRN security managers education*” (lata realizacji 2016-2018).

Osiągnięcia w zakresie działalności organizacyjnej i popularyzacji nauki

Angażuję się w bieżące sprawy organizacyjne w Katedrze. Moja aktywność organizacyjna oraz działania w zakresie popularyzacji nauki obejmują współtworzenie i przeprowadzenie prezentacji podczas spotkań informacyjnych z uczniami szkół średnich w ramach Drzwi Otwartych na Wydziale BiOŚ UŁ (w roku 2006 i 2007), promocję Wydziału BiOŚ UŁ na XI Łódzkich Targach Edukacyjnych (2008), opiekę nad Biblioteką Instytutu Biochemii UŁ (2009-2013). Ponadto, byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej na stacjonarne studia na Wydziale BiOŚ UŁ (2008). Brałam udział w prezentacji Wydziału BiOŚ UŁ (prezentacja tematyki badawczej, dydaktycznej i pracowni KBO UŁ) dla uczniów szkół ogólnokształcących (2012). Uczestniczyłam także w pracach organizacyjnych związanych z przebiegiem obchodów 70-lecia UŁ (2015). W 2017 roku byłam członkiem komisji oceniającej w finale konkursu „*Team laboratoryjny kreujący naszą technologiczną przyszłość*”, odbywającego się w Szkole Podstawowej Nr 13 w Zduńskiej Woli. Na zaproszenie redakcji przygotowałam artykuł popularnonaukowy „*Koniczyny – niepozorne rośliny o dobroczynnych właściwościach*”, który ukazał się we wrześniowym numerze miesięcznika „*Ekonatura*” (2017). Byłam także członkiem komitetu naukowego konferencji naukowej *TRENDS IN DIETETICS 2017*, organizowanej przez Polskie Stowarzyszenie Dietetyków, na której wygłaszałam wykład „*Astaksantyna w ochronie układu krążenia: aktywność biologiczna i perspektywy zastosowania w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*”. Prowadziłam również sesję 2 na w/w konferencji.

Pozostałe osiągnięcia

Od 2012 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Recenzowałam łącznie 33 publikacje w czasopismach międzynarodowych i krajowych (o 5-letnim wskaźniku IF w zakresie od 0,719 do 6,705 - pełny wykaz tych czasopism zamieszczony został w **załączniku**) oraz 1 rozdział w monografii angielskojęzycznej. Na zaproszenie amerykańskiego wydawnictwa American Herbal Pharmacopoeia byłam jednym z recenzentów monografii „*Red clover flowering tops, aerial parts, and dry extract (Trifolium pratense L.)*” (2017; ISSN: 1538-0297; ISBN: 1-929425-38-4).

W trakcie pracy zawodowej odbyłam 2 krajowe staże naukowe:

- 2012 (4 tygodnie) - *Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, Puławy. Prace wykonywane przeze mnie podczas stażu obejmowały izolację frakcji fenolowych z 2 gatunków *Trifolium*, w tym izolację ekstraktów z materiału roślinnego, zagęszczanie, oczyszczanie do fazy stałej oraz zastosowanie technik chromatografii w układzie faz odwróconych, chromatografii cienkowarstwowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).*
- 2013 (3 tygodnie) - *Pracownia Patobiochemii Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Podczas stażu zapoznałam się z metodyką izolacji wybranych białek i ich analizą metodą HPLC.*

Ponadto, uczestniczyłam łącznie w kilkunastu ogólnokrajowych lub międzynarodowych szkoleniach, seminariach, kursach doskonalących lub warsztatach naukowych (pełny wykaz wymienionych aktywności został zawarty w **załączniku 4**). Osiągnięcia te obejmowały m.in. zakwalifikowanie się i udział w cyklu kształcącym w ramach projektu „*Kobieta Matką Wynalazków*” (13.10 - 19.11.2012) - ogólnopolskiego projektu współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej (Europejski Fundusz Społeczny). Szkolenia obejmowały zarówno wykłady, jak i zajęcia praktyczne/warsztaty z zakresu komercjalizacji badań naukowych, pozyskiwania źródeł finansowania badań naukowych, technik marketingu naukowego, transferu technologii do biznesu oraz ochrony własności intelektualnej.

Odbyłam także serię teoretycznych i praktycznych kursów dotyczących zagadnień biologii molekularnej, organizowanych w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie:

- 20.04-22.04.2016 - kurs praktyczny „*Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE metoda i zastosowanie*”,
- 19.01.2017 - kurs doskonalący „*Przepływ informacji genetycznej od genu do białka*”,
- 08.03-10.03.2017 kurs praktyczny „*Techniki rozdziału i immunodetekcji białek*”
- 14.03.2017 kurs doskonalący „*Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia*”
- 16.03.2018 kurs doskonalący „*Wybrane zagadnienia z molekularnych podstaw onkogenezy*”.

Otrzymałam następujące nagrody za działalność naukową:

- 2007 - Nagroda Indywidualna Rektora UŁ za cykl publikacji związanych z pracą doktorską (III stopnia),
- 2017 - Nagroda Zespołowa Rektora UŁ (II stopnia) za osiągnięcia związane z pracami badawczymi: „*Modyfikacje oksydacyjne i trombogenne zmiany funkcji hemostatycznych osoczowych i morfotycznych składników krwi – ochronna rola naturalnych związków fenolowych*”,
- 2018 - Nagroda Indywidualna Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ (II stopnia) za osiągnięcia publikacyjne w roku 2017

Literatura

Aggarwal M., Aggarwal B., Rao J. Integrative medicine for cardiovascular disease and prevention. *Med. Clin. North Am.* 2017;101(5):895-923.

Almeida Rezende B., Pereira A.C., Cortes S.F., Lemos V.S. Vascular effects of flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 2016;23(1):87-102.

Asgary S., Moshtaghian J., Naderi G., Fatahi Z., Hosseini M., Dashti G., Adibi S. Effects of dietary red clover on blood factors and cardiovascular fatty streak formation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytother Res.* 2007; 21(8):768-770.

Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018;14:618-625.

Bijak M., Ponczek M.B., Nowak P. Komórkowa odpowiedź na działanie trombiny, *Kosmos* 2012; 3:445-454

Bijak M., Saluk J., Szelenberger R., Nowak P. Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs. *Chem. Biol. Interact.* 2016;257:35-45.

Boulos C, Jiang H, Balazy M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293(1):222-9.

Choi JH, Kim YS, Shin CH, Lee HJ, Kim S. Antithrombotic activities of luteolin *in vitro* and *in vivo*. *J Biochem Mol Toxicol* 2015; 29: 552-558

Cordier W., Steenkamp V. Herbal remedies affecting coagulation: a review. *Pharm. Biol.* 2012; 50: 443-452.

Cunningham M., McIntosh K., Bushell T., Sloan G., Plevin R. Proteinase-activated receptors (PARs) as targets for antiplatelet therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 2016;44(2):606-12.

El-On J., Ozer L., Gopas J., Sneir R., Enav H., Luft N., Davidov G., Golan-Goldhirsh A. Antileishmanial activity in Israeli plants. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2009; 103(4), 297-306.

Fabricant D.S., Farnsworth N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 2001;109:69-75.

Gardiner E.E., Andrews R.K. Structure and function of platelet receptors initiating blood clotting. *Adv Exp Med Biol.* 2014;844:263-75.

Ge B., Zhang Z., Zuo Z. Updates on the clinical evidenced herb-warfarin interactions. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014; 2014:957362. doi: 10.1155/2014/957362.

Geller S.E., Shulman L.P., van Breemen R.B., Banuvar S., Zhou Y., Epstein G., Hedayat S., Nikolic D., Krause E.C., Piersen C.E., Bolton J.L., Pauli G.F., Farnsworth N.R. Safety and efficacy of black cohosh and red clover for the management of vasomotor symptoms: a randomized controlled trial. *Menopause* 2009; 16(6):1156-1166.

Hao P., Jiang F., Cheng J., Ma L., Zhang Y., Zhao Y. Traditional Chinese medicine for cardiovascular disease: evidence and potential mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017;69(24):2952-2966.

Kołodziejczyk J. 3-nitrotyrozyna - marker stresu oksydacyjnego *in vitro* i *in vivo*. *Diagnost. Lab.* 2010; 2:141-145.

Kołodziejczyk J., Saluk J., Wachowicz B. Stres oksydacyjny – reaktywne formy tlenu i azotu w patogenezie zaburzeń układu krążenia. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2011;4:63-69.

Kołodziejczyk-Czepas J. *Trifolium* species - the latest findings on chemical profile, ethnomedicinal use and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2016; 68(7): 845-861.

Kołodziejczyk-Czepas J. *Trifolium* species-derived substances and extracts - biological activity and prospects for medicinal applications. *J. Ethnopharmacol.* 2012; 143:14-23.

Kołodziejczyk-Czepas J., Bijak M., Saluk J., Ponczek M.B., Żbikowska H.M., Nowak P., Tsigotis-Maniecka M., Pawlaczyk I. Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 72:1152-115.

Kołodziejczyk-Czepas J., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Sieradzka M., Nowak P., Stochmal A. Clovamide and clovamide-rich extracts of three *Trifolium* species as antioxidants and moderate antiplatelet agents *in vitro*. *Phytochemistry* 2017; 143:54-63.

Kołodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Kowalska I., Stochmal A. Antioxidant action of six *Trifolium* species in blood platelet experimental system *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.* 2015; 410:229-237.

Kołodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Stochmal A. Free radical scavenging actions of three *Trifolium* species in the protection of blood plasma antioxidant capacity *in vitro*. *Pharm. Biol.* 2015; 53(9):1277-84.

Kołodziejczyk-Czepas J., Olas B., Malinowska J., Wachowicz B., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Oleszek W., Stochmal A. *Trifolium pallidum* and *Trifolium scabrum* extracts in the protection of human plasma components. *J. Thromb. Thrombol.* 2013; 35:193-199

Kołodziejczyk-Czepas J., Sieradzka M., Moniuszko-Szajwaj B., Nowak P., Oleszek W., Stochmal A. Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma *in vitro* without cytotoxicity towards blood cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 2018; 70: 413-425.

Kołodziejczyk-Czepas J., Sieradzka M., Moniuszko-Szajwaj B., Pecio Ł., Ponczek M.B., Nowak P., Stochmal A. Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors – *in vitro* and *in silico* study. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017; 99: 141-150.

Kołodziejczyk-Czepas J., Sieradzka M., Wachowicz B., Nowak P., Oleszek W., Stochmal A. The anti-adhesive and anti-aggregatory effects of phenolics from *Trifolium* species *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.* 2016; 412:155-164.

Kołodziejczyk-Czepas J., Stochmal A. Klowamid i jego pochodne jako bioaktywne roślinne związki fenolowe. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość;* 2015, 6(103), 33-40.

Kołodziejczyk-Czepas J., Wachowicz B., Moniuszko-Szajwaj B., Kowalska I., Oleszek W., Stochmal A. Antioxidative effects of extracts from *Trifolium* species on blood platelets exposed to oxidative stress. *J. Physiol. Biochem.* 2013; 69: 879-887.

Kołodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Kowalska, I., Stochmal, A. Biological activity of clovers - free radical scavenging ability and antioxidant action of six *Trifolium* species. *Pharm. Biol.* 2014; 52(10), 1308-1314.

Kralisz U, Stasiak M. Udział receptorów kolagenu płytek krwi w hemostazie pierwotnej. *Post. Biochem.* 2007; 53 (4): 344-355

Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(12):2341-9.

Liperoti R., Vetrano D.L., Bernabei R., Onder G. Herbal medications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017;69(9):1188-1199.

Loffredo L., Perri L., Nocella C., Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017; 83(1):96-102.

Mainini G., Torella M., Di Donna M.C., Esposito E., Ercolano S., Correa R., Cucinella G., Stradella L., Luisi A., Basso A., Cerreto F.V., Cicatiello R., Matteo M., De Francis P. Nonhormonal management of postmenopausal women: effects of a red clover based isoflavones supplementation on climacteric syndrome and cardiovascular risk serum profile. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2013; 40(3):337-41.

Marchelak A., Owczarek A., Matczak M., Pawlak A., **Kołodziejczyk-Czepas J.,** Nowak P., Olszewska M.A. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro*. *Front. Pharmacol.* 2017; 8:680. doi: 10.3389/fphar.2017

Matczak M., Marchelak A., Michel P., Owczarek A., Piszczan A., **Kołodziejczyk-Czepas J.,** Nowak P., Olszewska M.A. *Sorbus domestica* L. leaf extracts as functional products: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro* and *ex vivo*. *J. Funct. Foods* 2017; <https://doi.org/10.1016/j.jf.2017.10.046>

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

- Nowak P., Żbikowska H.M., Ponczek M., **Kołodziejczyk J.**, Wachowicz B. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences. *Thromb. Res.* 2007; 121, 163-174
- Nuyttens B.P., Thijs T., Deckmyn H., Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb. Res.* 2011; 127: 12:26-9.
- Oleszek W., Stochmal A., Janda B. Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(20): 8095-8100.
- Park J.B. Caffeodymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selectin. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(6): 2171-2175.
- Park J.B., Schoene N., Clovamide-type phenylpropenoic acid amides, N-coumaroyldopamine and N-caffeoyldopamine, inhibit platelet-leukocyte interactions via suppressing P-selectin expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 317(2): 813-819.
- Posma J.J., Posthuma J.J., Spronk H.M. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14(10):1908-1916.
- Prakash Lingam K.M., Venugopal K.R., Patnaik L.M. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinf.* 2011; 3:184-191.
- Rao T.P., Htay H.H., Yasuda N.K., Sugino H., Ohkubo, Hayashi T., Okamoto T., Suzuki K. Antioxidant and anti-thrombotic properties of selected plant extracts of Asia. *Austin. J. Nutr. Metab.* 2014; 1(1): 6.
- Rastogi S, Pandey MM2, Rawat AK. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine.* 2016; 23(11):1082-9.
- Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Núñez L., Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009; 94:700-711.
- Sabetkar M, Low SY, Naseem KM, Bruckdorfer KR. The nitration of proteins in platelets: significance in platelet function. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(6):728-36.
- Saluk-Juszczak J., Olas B., Nowak P., **Kołodziejczyk J.**, Wachowicz B., Zgirski A. The effect of lipopolysaccharide from *Proteus mirabilis* on the level of the stable end metabolic products of nitric oxide in blood platelets. *Curr. Microbiol.* 2007; 54(1):27-30.
- Simoncini T., Fornari L., Mannella P., Caruso A., Garibaldi S., Baldacci C., Genazzani A.R.. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. *Menopause* 2005; 12: 69-77.
- Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T., Klotz L.O. Peroxynitrite: from interception to signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016; 595: 153-60.
- Stegner D., Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J. Mol. Med.* 2011; 89:109-121.
- Szajwaj B., Moldoch J., Masullo M., Piacente S., Oleszek W., Stochmal A. Amides and esters of phenylpropenoic acids from the aerial parts of *Trifolium pallidum*. *Nat. Prod. Commun.* 2011; 6(9):1293-1296.
- Wijeyeratne Y.D., Heptinstall S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011; 72: 647-657.
- Cheng YC, Sheen JM, Hu WL, Hung YC. Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; doi: 10.1155/2017/8526438.
- Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008; 5: 338-349.
- Pastori D, Carnevale R, Pignatelli P. Is there a clinical role for oxidative stress biomarkers in atherosclerotic diseases? *Intern. Emerg. Med.* 2014;9(2):123-31.
- Tinkel J, Hassanain H, Khouri SJ. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. *Cardiol Rev.* 2012;20(2):77-83.

Zestawienie parametryczne dorobku naukowego

	Liczba publikacji	Sumaryczna lista punktów MNiSW (2016)	Sumaryczny IF (zgodnie z rokiem opublikowania prac)
Lista A MNiSW (2016)	41	1080	89,77
Lista B MNiSW (2016)	21	187	-
Rozdziały w monografiach	5	-	-
Komunikaty na konferencjach naukowych	43	-	-
Pozostałe publikacje naukowe	3	-	-
Łączna liczba publikacji	111	1267	-
Referaty konferencyjne	1		
Liczba cytowań (WoS, bez autocytowań)	349	-	-
Indeks Hirscha	13	-	-

Łódź, 22.03.2018

Joanna Kotodziejczyk - Crepus