

Spis treści

1. Imię i Nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych. ....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r.....	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego: .....	3
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: .....	4
4.3.1. Wprowadzenie .....	5
4.3.2. Wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na aktywność płytek krwi oraz wybrane elementy układu krzepnięcia i fibrynolizy. ....	8
4.3.3. Wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na stężenie lipidów, markery stresu oksydacyjnego oraz ciśnienie tętnicze i aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE I). ....	13
4.3.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji .....	15
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.....	16
5.1. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora .....	16
5.2. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych .....	18
5.3. Podsumowanie.....	21

1. Imię i Nazwisko.

**Joanna Marta Sikora**

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

- 2007-2011            Specjalizacja z Laboratoryjnej Toksykologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
uzyskany tytuł: specjalista w dziedzinie laboratoryjnej toksykologii medycznej (2011)
- 2007-2008            Studia podyplomowe – „Analityka w ochronie środowiska”, Wydział Chemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu; praca dyplomowa pt.: „Oznaczanie antocyjanów Aronii czarnoowocowej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w materiale biologicznym.”, opiekun dr Michał Szumski, promotor prof. dr hab. Bogusław Buszewski
- 2000-2004            Specjalizacja I stopnia z Analityki Klinicznej, uzyskany tytuł – analityk kliniczny (2004)
- 2003                    Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (nr 07788)
- 1999-2003            Stacjonarne Studium Doktoranckie, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, praca doktorska pt.: „**Zastosowanie wybranych testów hemostazy do opracowania modelu oceny działania nowych leków**” – przewód doktorski zakończony wyróżnieniem;  
promotor prof. dr hab. Barbara Kostka,  
recenzenci: prof. dr hab. Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Uniwersytet Medyczny w Łodzi oraz prof. dr hab. Elżbieta Kostka-Trąbka,

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie;  
uzyskany tytuł - doktor nauk farmaceutycznych (2003), specjalność  
biochemia farmaceutyczna

1994-1999 Oddział Analityki Medycznej, Akademia Medyczna w Łodzi,  
uzyskany tytuł – magister analityki medycznej (1999 r.)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2006-obecnie adiunkt w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków  
i Radiofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
2005-2006 asystent w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
2003-2005 starszy referent techniczny w Zakładzie Farmakologii i Terapii  
Monitorowanej z Oddziałem Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet  
Medyczny w Łodzi

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.):

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Przedstawionym do oceny osiągnięciem jest jednotematyczny cykl 5 publikacji  
opublikowanych w latach 2009-2014 o łącznym IF wynoszącym 12,029  
(116 pkt. MNiSW) zatytułowany:

**„Plejotropowe właściwości ekstraktu z Aronii czarnoowocowej w badaniach  
*in vitro* i *in vivo*”**

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

**(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),**

- 1. Joanna Sikora**, Marlena Broncel, Elżbieta Mikiciuk-Olasik. *Aronia melanocarpa* reduces the activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) – *in vitro* and *ex vivo* studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014; DOI: 10.1155/2014/739721

**IF 3,393; 25 p MNiSW**
- 2. Joanna Sikora**, Magdalena Markowicz, Marlena Broncel, Elżbieta Mikiciuk-Olasik. Extract of *Aronia melanocarpa* modified hemostasis - *in vitro* studies. *European Journal of Nutrition* 2014; DOI: 10.1007/s00394-014-0653

**IF<sub>(2013)</sub> 3,840; 30 p. MNiSW**
- 3. Joanna Sikora**, Marlena Broncel, Magdalena Markowicz, Maciej Chałubiński, Katarzyna Wojdan, Elżbieta Mikiciuk-Olasik. Short-term supplementation with *Aronia melanocarpa* extract improves platelet aggregation, clotting, and fibrinolysis in patients with metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition* 2012; 51: 549-556; DOI 10.1007/s00394-011-0238-8

**IF 3,127; 35 p. MNiSW**
- 4. Marlena Broncel**, Marzena Koziróg, Piotr Duchnowicz, Maria Koter-Michalak, **Joanna Sikora**, Julita Chojnowska-Jeziarska. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Medical Science Monitor* 2010; 16(1): CR28-34.

**IF 1,699; 20 p. MNiSW**
- 5. Joanna Sikora**, Marlena Broncel, Marzena Koziróg, Barbara Kostka, Elżbieta Mikiciuk-Olasik. Wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na agregację płytek krwi u pacjentów z zespołem metabolicznym. *Problemy Terapii Monitorowanej* 2009; 20 (1): 11-16.

**6 p. MNiSW**

W załączniku 5 zawarto oświadczenia wszystkich współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

### **4.3 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Celem prowadzonych przeze mnie badań, będących podstawą przedstawionego do oceny jednotematycznego cyklu publikacji, było poszukiwanie nowych, plejotropowych właściwości polifenoli aroniowych. W badaniach *in vitro* i *in vivo* oceniłam wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na wybrane parametry hemostazy osoczowej, adhezji i agregacji płytek krwi, stresu oksydacyjnego, a także aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE I) u ludzi zdrowych oraz z zespołem metabolicznym.

Omówienie podstaw teoretycznych osiągnięcia naukowego zostało przygotowane w oparciu o przegląd literatury wykorzystany w powyższych publikacjach oraz trzech pracach przeglądowych dotyczących tej tematyki, których jestem współautorem, tj.:

1. **Joanna Sikora**, Magdalena Markowicz, Elżbieta Mikiciuk-Olasik. Rola i właściwości lecznicze aronii czarnoowocowej w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*. - XLII, 2009,1:10-17;
2. **Joanna Sikora**, Magdalena Markowicz. Właściwości związków biologicznie aktywnych zawartych w owocach Aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa Elliot*). *Farmacja Polska* 2008, 64 (17): 780-785
3. **Joanna Sikora**. Oznaczanie antocyjanów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w płynach biologicznych. *Problemy Terapii Monitorowanej* 2008, 19 (3): 241-249

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

Owoce jagodowe, a przede wszystkim zawarte w nich substancje aktywne, od lat są obiektem badań naukowych, głównie z powodu swoich właściwości antyoksydacyjnych, polegających na inaktywowaniu wolnych rodników. Same reaktywne formy tlenu czy azotu pełnią ważną rolę w przebiegu wielu procesów fizjologicznych. Niestety, w przypadku niewystarczającej ilości endogennych systemów neutralizujących wolne

rodniki stają się przyczyną tzw.: „stresu oksydacyjnego”. Obecnie wiadomo, że stres oksydacyjny ma istotny udział w patogenezie wielu chorób, w tym układu sercowo-naczyniowego, nowotworów, chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych, otyłości, insulinooporności oraz procesu starzenia się. Dlatego w ostatnich latach kładzie się coraz większy nacisk na zdrowotne, w tym i antyoksydacyjne, właściwości codziennej diety. Dzięki odpowiedniej ilości owoców, warzyw, soków czy innych produktów bogatych w polifenole, pożywienie nie tylko dostarcza podstawowych składników odżywczych, ale posiada także dodatkowe korzystne właściwości, jak zapobieganie lub opóźnianie wystąpienia chorób przewlekłych. W profilaktyce tzw. „chorób stylu życia”, określanych również mianem „chorób cywilizacyjnych” istotną rolę odgrywają różnego rodzaju suplementy. Szacuje się, że ok. 35% preparatów leczniczych stosowanych w Europie, jest pochodzenia roślinnego, aczkolwiek leki te otrzymywane są tylko z ok. 0,1% znanych gatunków roślin. Stąd też ciągle poszukiwane są nowe aktywne preparaty roślinne. Jedną z takich roślin wykazujących ogromny potencjał leczniczy jest Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa Elliot*) należąca do rodziny różowatych (*Rosaceae*). Surowcem spożywczym oraz farmaceutycznym są dojrzałe owoce i liście. Mimo dość cierpkiego smaku jagód, zainteresowanie aronią wciąż wzrasta, przede wszystkim ze względu na właściwości prozdrowotne, ale także dlatego, że jest to roślina wyjątkowo łatwa w uprawie. Ma małe wymagania odnośnie gleby, jest odporna na mróz, do tego nie wymaga oprysków przeciw szkodnikom i chorobom. W związku z tym owoce aronii są wolne od pestycydów, ponadto, nie kumulują metali ciężkich. Za farmakologiczne właściwości aronii odpowiada cały szereg substancji aktywnych, jak: związki z grupy polifenoli, w tym: antocyjany, flawonoidy oraz fenolokwasy. Antocyjany – jedne z ważniejszych barwników w świecie roślinnym reprezentowane są przez cztery pochodne cyjanidyny: 3-*O*-galaktozyd cyjanidyny (64,5%), 3-*O*-arabinozyd cyjanidyny (28,9%), 3-*O*-ksylozyd cyjanidyny (4,2%) oraz 3-*O*-glukozyd cyjanidyny (2,4%). Natomiast najliczniejszą grupą flawonoidów występujących w owocach aronii są flawonole. Należą do nich: 3-*O*-wiscjanozyd kwercetyny, 3-*O*-robinobiozyd kwercetyny oraz inne glikozydy kwercetyny. Biologicznie aktywnymi przedstawicielami związków z grupy fenolokwasów są kwas chlorogenowy, neochlorogenowy, kawowy oraz felurowy. Ponadto, owoce aronii zawierają duże ilości garbników, witamin, kwasów organicznych, karotenoidów oraz pierwiastków śladowych.

Czarne owoce aronii, zanim przywędrowały do Europy, były używane przez Amerykanów jako źródło pokarmu oraz jako środek leczniczy stosowany w przeziębieniu.

W literaturze jest wiele danych pochodzących zarówno z badań *in vitro*, jak i *in vivo*, potwierdzających także inne prozdrowotne działania produktów z tych owoców. Opisywane są przede wszystkim ich silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Istnieją doniesienia, że antocyjany zawarte w owocach aronii pobudzają w komórkach śródbłonna syntezę tlenu azotu, wykazują również właściwości kardioprotekcyjne oraz ograniczają rozwój glikemii, a także uwrażliwiają komórki na działanie insuliny. Również otrzymane przeze mnie wyniki badań przeprowadzonych we współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej (kierowaną przez dr hab. Marlenę Broncel, prof. nadzw. UM) oraz Katedrą Biofizyki Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (kierowaną przez prof. dr hab. Marię Koter-Michalak), wykazały szereg innych wielokierunkowych działań polifenolowego preparatu z aronii. O ile mechanizm działania antyoksydacyjnego owoców jagodowych jest stosunkowo dobrze poznany, to inne efekty wciąż wymagają pogłębionych badań biochemicznych. Pomimo to, uważa się, że dzięki plejotropowym właściwościom zarówno owoce jak i produkty zawierające w swoim składzie ekstrakt z aronii czarnoowocowej mogą stać się ważnym narzędziem w profilaktyce i leczeniu wielu tzw. „chorób cywilizacyjnych”.

W naszych badaniach *in vivo* brali udział pacjenci ze stwierdzonym zespołem metabolicznym (ZM). Osoby zakwalifikowane do badań przez zespół lekarzy pod kierunkiem dr hab. Marleny Broncel stosowały ekstrakt z Aronii czarnoowocowej (Aronox, Agropharm SA) w dawce 3 x 100 mg przez okres od 4 do 8 tygodni.

Zespół metaboliczny, nazywany również zespołem X lub zespołem oporności na insulinę, stanowi połączenie najbardziej niebezpiecznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, takich jak otyłość centralna, zaburzenia lipidowe o typie aterogennej dyslipidemii, upośledzona tolerancja glukozy oraz podwyższone ciśnienie tętnicze. Często określany jest mianem epidemii naszego wieku. Patomechanizm ZM jest złożony, wśród głównych przyczyn jego rozwoju wymienia się dysfunkcję śródbłonna naczyniowego, stan prozapalny oraz prozakrzepowy. Za twórcę nowoczesnej koncepcji ZM został uznany Gerry Reaven, który opisał zależność między występowaniem oporności na insulinę i nadciśnienia tętniczego, zaburzeń lipidowych oraz wtórnych zaburzeń układu sercowo – naczyniowego. Pierwotnie ZM definiowano jako stan związany z występowaniem otyłości, nieprawidłowego metabolizmu glukozy, nadciśnienia, oporności na insulinę oraz zaburzeń lipidowych i mikroalbuminurii. Na przestrzeni lat kryteria rozpoznania ZM podlegały modyfikacjom aż do obecnie obowiązujących, w których jako najważniejsze uznano otyłość brzuszną i ściśle z nią związaną

insulinooporność oraz konsekwencje metaboliczne i neurohormonalne. Zwiększenie częstości występowania schorzeń związanych z otyłością zmusza badaczy do poszukiwania nowych metod prewencji oraz leczenia takich chorób, jak nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia czy cukrzyca. Badania epidemiologiczne wskazują, że codzienne spożywanie polifenoli roślinnych może redukować ryzyko rozwoju miażdżycy poprzez korzystny wpływ na profil lipidowy, stężenie glukozy we krwi, obniżenie ciśnienia, zmniejszenie skłonności do zakrzepicy oraz działanie antyoksydacyjne.

#### **4.3.2. Wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na aktywność płytek krwi oraz wybrane elementy układu krzepnięcia i fibrynolizy.**

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań *in vitro* i *in vivo*, dotyczących wpływu polifenoli aroniowych na wybrane parametry hemostazy, zostały opublikowane w trzech pracach będących częścią omawianego osiągnięcia naukowego (załącznik 3, pkt I. B, poz. 2, 3 i 5).

Już wstępne obserwacje wykazały, że 4-tygodniowa suplementacja ekstraktem z aronii może mieć korzystny wpływ na agregację płytek krwi indukowaną ADP oraz profil lipidowy u pacjentów cierpiących na zespół metaboliczny. W grupie badanych pacjentów z ZM (n=25) stwierdzono takie czynniki ryzyka miażdżycy, jak: aterogenna dyslipidemia, BMI powyżej 30 – świadczące o istniejącej otyłości – oraz zwiększoną aktywność płytek krwi i stężenie fibrynogenu w porównaniu z osobami zdrowymi. Po 4-tygodniowym stosowaniu bogatego w polifenole ekstraktu z Aronii czarnoowocowej stwierdzono statystycznie znamienne obniżenie stężenia lipidów w osoczu. Niestety, mimo korzystnych modyfikacji stężeń parametrów lipidowych, nadal pozostawały one wyższe niż w grupie kontrolnej. Odnotowano natomiast korzystną modyfikację parametrów agregacji płytek krwi. Zaobserwowano nie tylko zmniejszenie maksimum agregacji (Amax), ale także ogólne spowolnienie tego procesu (zmniejszenie prędkości początkowej  $v_0$  oraz wydłużenie czasu trwania procesu Tmax). Co ciekawe, wartości tych parametrów, po 4-tygodniowym stosowaniu ekstraktu z aronii, nie różniły się znacząco od tych otrzymanych w grupie osób zdrowych (załącznik 3, pkt B, poz. 5). Obiecujące wyniki badań wstępnych zachęciły nasz zespół do ich kontynuacji, z udziałem większej liczby pacjentów oraz poszerzonym panelem badań hemostazy.

W opublikowanej w European Journal of Nutrition pracy (załącznik 3, pkt I. B, poz. 3) przedstawiono wyniki 8-tygodniowej obserwacji wpływu suplementacji ekstraktem



z aronii na agregację płytek krwi, ogólny potencjał formowania skrzepu i fibrynolizy oraz ogólny potencjał krzepnięcia osocza. W badaniu wzięły udział 52 osoby, które podzielono na dwie grupy. Do grupy badanej włączono pacjentów z zespołem metabolicznym (n=38) suplementowanych przez 8 tygodni ekstraktem z aronii (Aronox, Agropharm SA). Grupę kontrolną stanowiło 14 zdrowych ochotników nie różniących się od grupy badanej pod względem wieku i płci. W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym przeprowadzono trzy kontrolne badania: przed rozpoczęciem suplementacji, po 4 i po 8 tygodniach stosowania Aronoxu. Przedmiotowe i podmiotowe badania lekarskie zostały przeprowadzone w Klinice Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej. Badania hemostazy wykonałam przy użyciu opracowanego w ramach pracy doktorskiej modelu doświadczalnego, pozwalającego ocenić wybrane parametry agregacji płytek krwi, układu krzepnięcia i fibrynolizy.

W literaturze przeciwpłytkowa aktywność polifenoli aroniowych oraz ich wpływ na niektóre parametry krzepnięcia zostały opisane w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* ale tylko przeprowadzonych na zwierzętach. Jak dotąd nie opublikowano danych weryfikujących to działanie w badaniach z udziałem ludzi. Wiele obserwacji klinicznych wskazuje, że inne owoce jagodowe bogate w polifenole korzystnie modyfikują aktywność hemostatyczną płytek krwi. Nasze badania potwierdziły, że również ekstrakt z aronii posiada tę cenną właściwość. Wykazały one, że 1-miesięczna suplementacja ekstraktem aroniowym istotnie hamuje agregację płytek krwi indukowaną ADP. Stwierdzono nie tylko 30-procentowe zmniejszenie agregacji (Amax), ale także ponad 35-procentowe spowolnienie tego procesu. Obserwowany efekt może mieć korzystne znaczenie w prewencji zdarzeń sercowo-naczyniowych związanych z hiperaktywnością płytek często towarzyszącą ZM. Po dwóch miesiącach stosowania ekstraktu średnie wartości parametrów kinetycznych agregacji były tylko nieznacznie niższe od wartości wyjściowych. Stosowanie ekstraktu nie wpłynęło natomiast na ogólną liczbę płytek we krwi badanych osób.

Do oceny hemostazy osoczowej zastosowano wcześniej opracowany CL-test sprzężony z własnym programem komputerowym (załącznik 3 pkt. II A, poz. 7). Ten wieloparametryczny model umożliwia ocenę ogólnego procesu krzepnięcia ( $C_{AUC}$ ) oraz ogólnego potencjału tworzenia skrzepu fibrynowego, fazy jego stabilizacji i fibrynolizy ( $CL_{AUC}$ ) poprzez spektrofotometryczny pomiar transmitancji. W celu otrzymania krzywej tworzenia skrzepu i fibrynolizy ( $CL_{AUC}$ ) do osocza dodawana jest duża dawka trombiny (stężenie w próbie 0,5 IU/mL) oraz tkankowy aktywator plazminogenu t-PA (60 ng/mL próby badanej). Dodanie niewielkiej ilości trombiny (0,025 IU/mL) wraz z chlorkiem

wapnia (0,01 mmol/L) nie spowoduje, jak poprzednio, natychmiastowego tworzenia skrzepu, ale zapoczątkuje zwrotną kaskadę reakcji prowadzącą do wygenerowania endogennej trombiny, która zainicjuje proces formowania skrzepu (test  $C_{AUC}$ ). Generowane krzywe są zapisywane w sposób ciągły przy użyciu spektrofotometru i programu komputerowego, dzięki któremu można ocenić 15 parametrów kinetycznych badanych procesów. Należy podkreślić odrębność pozornie jednakowych parametrów kinetycznych I fazy  $CL_{AUC}$  i ogólnego potencjału krzepnięcia  $C_{AUC}$ . Ponieważ w teście  $CL_{AUC}$  tworzenie fibryny indukowane jest egzogenną trombiną, obserwowane zmiany parametrów wynikają przede wszystkim ze zmian zachodzących w obrębie cząsteczki fibrynogenu, które wpływają na strukturę wytworzonego skrzepu. W literaturze potwierdzone zostało, że modyfikacje cząsteczek fibrynogenu i fibryny, np. w wyniku glikacji, powodują powstanie sieci fibryny o zaburzonej strukturze. Dlatego zastosowanie tych dwóch testów umożliwia dokładniejszą ocenę zarówno generacji endogennej trombiny, jak i tworzenia skrzepu oraz jego lizy.

W naszych badaniach u pacjentów z ZM stwierdzono wyjściowo statystycznie znamienne wyższe wartości ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy ( $CL_{AUC}$ ) oraz ogólnego potencjału krzepnięcia ( $C_{AUC}$ ), a także stężenia fibrynogenu w porównaniu z grupą kontrolną. Interesujące okazały się różnice w poszczególnych parametrach kinetycznych  $CL_{AUC}$  obserwowane pomiędzy pacjentami z ZM, a grupą kontrolną. W grupie kontrolnej statystycznie istotnie szybciej tworzone są włókna fibryny pod wpływem egzogennej trombiny (wyższa wartość prędkości początkowej ( $F_{vo}$ ) i skrócony czas tworzenia skrzepu ( $T_f$ )) oraz znacznie szybciej rozpoczyna się liza wytworzonego skrzepu (skrócony czas stabilizacji  $T_c$ ), i mimo że w kinetyce fibrynolizy nie obserwuje się istotnych różnic, to globalnie badany proces przebiega znacznie sprawniej u osób zdrowych. Tego typu zmiany mogą świadczyć o istnieniu zwiększonego ryzyka zakrzepowego u pacjentów z ZM. Po jednym miesiącu suplementacji ekstraktem aroniowym zaobserwowano korzystne zmniejszenie ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy ( $CL_{AUC}$ ). Zmiana ta obserwowana była dla pola pod krzywą wszystkich trzech faz procesu (tworzenia skrzepu -  $S_f$ , stabilizacji skrzepu -  $S_c$  oraz fibrynolizy -  $S_l$ ). Fakt ten może wskazywać na modyfikację wielu czynników hemostazy poprzez suplementację polifenolowego ekstraktu z aronii. Po dwóch miesiącach suplementacji, mimo że kierunek zmian  $CL_{AUC}$ ,  $S_f$ ,  $S_c$ ,  $S_l$  został zachowany i badane parametry wciąż pozostawały średnio o 11% niższe niż wartości wyjściowe, to jednak były to różnice statystycznie nieistotne. W przypadku ogólnego potencjału krzepnięcia  $C_{AUC}$ ,

porównywalny, korzystny wpływ był obserwowany zarówno po jednym, jak i dwóch miesiącach stosowania Aronoxu.

Mimo licznych badań potwierdzających wpływ polifenoli na różne etapy hemostazy, niestety nadal nieznany jest dokładny mechanizm tego zjawiska. W utrzymaniu równowagi w układzie krzepnięcia i fibrynolizy uczestniczy wiele czynników, jak śródbłonek naczyniowy, komórki krwi (przede wszystkim płytki, ale także krwinki białe) oraz czynniki krzepnięcia - rozpuszczalne białka osocza, przede wszystkim proteazy serynowe.

Kolejnym etapem moich badań było przeprowadzenie pogłębionych badań *in vitro* oceniających wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na wybrane parametry hemostazy. W badaniach wykorzystano materiał biologiczny pochodzący od pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym zespołem metabolicznym (załącznik 3, pkt B, poz. 2). Oceniono wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na adhezję i agregację płytek krwi, ogólny potencjał krzepnięcia ( $C_{AUC}$ ), ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy ( $CL_{AUC}$ ) oraz aktywność trombiny, generację oraz aktywność plazminy.

Adhezję spontaniczną i aktywowaną ADP oceniłam przy użyciu własnej modyfikacji metody Bellavite, przystosowanej do badań *in vitro* nowych związków (załącznik 3, pkt II A, poz. 9). Spontanicznej adhezji do powierzchni opłaszczanej fibrynogenem wyjściowo ulegało ok.  $5.6 \pm 0.9\%$  płytek krwi. Po inkubacji z różnymi stężeniami polifenolowego ekstraktu z aronii (0,5-100  $\mu\text{g/mL}$ ), ilość spontanicznie adherujących płytek zmniejszyła się statystycznie istotnie do  $3.9 \pm 0.4\%$  przy zastosowaniu 10  $\mu\text{g/mL}$  i poniżej 2 % przy stężeniach powyżej 20  $\mu\text{g/mL}$ . W próbach kontrolnych stymulowanych ADP średnio  $14.2 \pm 1.5\%$  płytek krwi wprowadzonych do studzienki ulegało adhezji. Po inkubacji z ekstraktem z aronii zaobserwowano statystycznie znamienne, zależną od stężenia, inhibicję ADP-indukowanej adhezji. W porównaniu z adhezją spontaniczną, efektywne działanie wykazano już przy stężeniu 10-krotnie niższym, czyli 1  $\mu\text{g/mL}$ . Nasze badania *in vitro* wykazały, że ekstrakt z aronii także istotnie hamuje agregację płytek indukowaną ADP. Może wskazywać to na zdolność polifenolowych preparatów do bezpośredniego blokowania szlaku aktywacji płytek zależnego od ADP. Wykazano, że zastosowanie skrajnie wysokiego stężenia (100  $\mu\text{g/mL}$ ) powoduje niemal całkowite zahamowanie tworzenia agregatów. Otrzymane przez nas rezultaty działania polifenoli na aktywność płytek *in vitro* potwierdziły nasze wcześniejsze obserwacje w badaniach z udziałem ludzi.

W dalszej części badań, oceniliśmy wpływ polifenolowego ekstraktu na ogólny potencjał tworzenia skrzepu pod wpływem dużych dawek egzogennej trombiny oraz fibrynolizy tego skrzepu. Ponadto oceniliśmy proces generacji endogennej trombiny, jak również aktywność amidolityczną trombiny i plazminy. Oceniając wpływ aronii na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy, intrygujący okazał się fakt zależnego od stężenia przyspieszania procesu tworzenia skrzepu pod wpływem dużych dawek egzogennej trombiny. Zaobserwowano znamienne skrócenie Tt, czyli czasu mierzonego od momentu dodania trombiny do rozpoczęcia formowania włókien fibrynowych oraz znamienne zwiększenie prędkości początkowej tworzenia skrzepu (Fvo). Z drugiej strony, ekstrakt z aronii spowalniał proces generacji endogennej trombiny. Zbadaliśmy również wpływ 9 różnych stężeń (z zakresu 0.5 – 100 µg/mL) ekstraktu na aktywność amidolityczną endogennie generowanej trombiny. Mimo że obserwowaliśmy statystycznie znamienne hamowanie aktywności trombiny, był to efekt niezależny od stężenia o stosunkowo niskim stopniu inhibicji (5-25%). Otrzymany przez nas wynik świadczy o bardziej skomplikowanym efekcie ekstraktu na proces generacji i aktywność trombiny niż się dotychczas wydawało. Ponadto może wskazywać na bezpośrednie reakcje składników preparatu z fibrynogenem, jak również protekcyjne działanie innych białek osocza.

W literaturze brak badań oceniających wpływ polifenoli na proces fibrynolizy. Jak wynika z naszych obserwacji, inkubacja osocza z aronią powoduje zmiany w tym układzie. Obserwowany efekt może być rezultatem zarówno zmian ilościowych - zmniejszenie aktywności enzymów proteolitycznych, jak i jakościowych zmian produktów rozpadu fibryny. W naszych badaniach wykazano zależne od stężenia działanie polifenoli na aktywność amidolityczną plazminy – kluczowego enzymu odpowiedzialnego za lizę fibryny. Oceniano aktywność plazminy generowanej w osoczu pod wpływem dwóch aktywatorów plazminogenu – tkankowego (t-PA) i urokinazowego (u-PA). Już w próbach kontrolnych zaobserwowano różnicę w aktywności wygenerowanej trombiny. Różnice te wynikają z mechanizmów aktywacji plazminogenu przez te związki. Podsumowując, przeprowadzone przez nas badania *in vitro* wskazują na złożony mechanizm działania polifenoli z aronii na aktywność płytek krwi oraz ogólny potencjał krzepnięcia i lizy. Ekstrakt z aronii bezpośrednio hamuje agregację i adhezję zależną od aktywacji ADP, jak również adhezję spontaniczną. Co nie wyklucza obecnych w piśmiennictwie hipotez, że korzystny efekt polifenoli obserwowany *in vivo* wiąże się również z modulacją metabolizmu tlenu azotu oraz działaniem antyoksydacyjnym. Natomiast z całą pewnością wpływ na osoczowe czynniki krzepnięcia i lizy zależy od wielu czynników i powiązań

między nimi. Potwierdzono, że aronia hamuje aktywność amidolityczną trombiny. Po raz pierwszy wykazano, że polifenole aronii hamują także aktywność amidolityczną innej proteazy serynowej, tj. plazminy. Nasze badania zwracają również uwagę na istotny udział innych składników osocza wraz z fibrynogenem w modulacji przez polifenole hemostazy.

#### **4.3.3. Wpływ ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na stężenie lipidów, markery stresu oksydacyjnego oraz ciśnienie tętnicze i aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE I).**

Przeciwmiażdżycowe efekty stosowania ekstraktu z aronii przez pacjentów z zespołem metabolicznym zostały opisane w Medical Science Monitor (załącznik 3, pkt I. B, poz. 4). Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej oraz Katedrą Biofizyki Skażeń Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Często ZM uważany jest za chroniczny stan zapalny organizmu, któremu towarzyszy podwyższone stężenie mediatorów zapalnych np.: białka C-reaktywnego (CRP), fibrynogenu czy endoteliny 1 (ET-1). Ponadto u pacjentów tych rozwija się patologiczny stan stresu oksydacyjnego, w którym z powodu wyczerpania, dochodzi do obniżenia poziomu enzymów antyoksydacyjnych oraz niepożądanego peroksydacji lipidów. Wszystko to może stać się przyczyną rozwoju miażdżycy.

U pacjentów włączonych do naszych badań stwierdzono występowanie licznych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy, jak: otyłość, podwyższone ciśnienie tętnicze, aterogenną dyslipidemię, a także szereg niekorzystnych zmian w parametrach biochemicznych erytrocytów i osocza, świadczących o występowaniu stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. W erytrocytach osób z ZM stwierdzono zwiększony poziom peroksydacji lipidów oraz zmniejszoną aktywność dwóch istotnych enzymów biorących udział w obronie organizmu przed stresem oksydacyjnym, tj.: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx). Odnotowano także statystycznie wyższe stężenia ET-1 i fibrynogenu u osób z ZM w porównaniu z grupą kontrolną. Brak było natomiast różnicy statystycznej pomiędzy tymi grupami w stężeniu CRP oraz aktywności katalazy (CAT). Już po pierwszym miesiącu stosowania ekstraktu z aronii zaobserwowano korzystny kierunek zmian w wartościach oznaczanych parametrów. U osób z ZM statystycznie istotnie obniżyło się ciśnienie skurczowe krwi, stężenie cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL-cholesterolu i triglicerydów. Równie korzystne zmiany

obserwowano w przypadku ET-1 oraz markerów stresu oksydacyjnego. W erytrocytach pacjentów z ZM odnotowano obniżenie peroksydacji lipidów, zmniejszenie aktywności CAT, przy jednoczesnym wzroście aktywności SOD i GPx. Po dwóch miesiącach obserwowano dalszą poprawę wartości badanych parametrów. Jednak nie osiągnęły one poziomu, jaki stwierdzono w grupie kontrolnej. Nie odnotowano natomiast istotnych zmian w stężeniu CRP.

Wyniki te wskazują, że stosowanie polifenoli aroniowych może korzystnie modyfikować czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy występujące u pacjentów z ZM.

W kolejnym etapie badań oceniona została, w badaniach *in vitro* i *in vivo*, aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE I) u pacjentów z ZM przed oraz po dwóch miesiącach stosowania ekstraktu z aronii (załącznik 3, pkt I. B, poz. 1).

Aktywność ACE odgrywa istotną fizjologiczną rolę w regulowaniu ciśnienia krwi w układzie renina-angiotensyna oraz poprzez dezaktywację bradykininy, która jest silnym czynnikiem rozszerzającym naczynia. Tak więc enzym ten podwyższa ciśnienie tętnicze w dwojaki sposób. Wiele syntetycznych inhibitorów ACE, do których należy m.in. kaptopril, lisinopril, enalapril, jest obecnie stosowanych w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Z uwagi na teratogenne działanie inhibitorów ACE, są one przeciwwskazane u kobiet w ciąży. Mogą przenikać do kobiecego pokarmu, dlatego u matek karmiących piersią należy również zachować szczególną ostrożność w ich podawaniu. Jest to jedna z przyczyn rosnącego zainteresowania lekarzy i naukowców alternatywnymi ACE inhibitorami otrzymywanymi na bazie surowców naturalnych.

Osoby zakwalifikowane do naszego badania (70) podzielono na trzy grupy: I – pacjenci z ZM, którym podawano ekstrakt z aronii; II – osoby zdrowe, III – pacjenci z ZM leczeni inhibitorami ACE. Aktywność ACE u pacjentów z ZM była istotnie wyższa w porównaniu z grupą osób zdrowych (II) oraz już leczonych syntetycznymi inhibitorami ACE (III). Po jednym miesiącu stosowania preparatu przez pacjentów z ZM zaobserwowano 25-procentowy (8-53%), zaś po dwóch miesiącach 30-procentowy (4-80%) spadek aktywności ACE. Towarzyszyło temu oczekiwane istotne obniżenie ciśnienia tętniczego. Stwierdzono także występowanie dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością ACE, a skurczowym ciśnieniem (0.459;  $p=0.048$ ) oraz rozkurczowym ciśnieniem krwi (0.603;  $p=0.005$ ), stężeniem CRP przed leczeniem (0.492;  $p=0.023$ ) i po jednym miesiącu (0.507;  $p=0.027$ ), a także z BMI (0.461;  $p=0.030$ ) po dwóch miesiącach stosowania ekstraktu z aronii. Oceniono również zależności pomiędzy aktywnością ACE,



a stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL i HDL, jednak w tym przypadku nie stwierdzono występowania korelacji.

W badaniach *in vitro* wyznaczono wartości stężenia hamującego w 50 % aktywność ACE (IC<sub>50</sub>) przez polifenole aroniowe. Średnia wartości IC<sub>50</sub> dla ekstraktu z aronii wyznaczona z zastosowaniem osocza pochodzącego od zdrowych ochotników wyniosła 155.4 ± 12.1 µg/mL (n=6) i okazała się relatywnie wysoka w porównaniu z IC<sub>50</sub> dla wzorcowego ACE-inhibitora, czyli kaptoprilu (n=5), która wynosi 0.52±0.18 µg/mL. Wynik ten świadczy o stosunkowo słabej inhibicji ACE przez ekstrakt z aronii. Jednak jak wynika z naszych obserwacji klinicznych, badań *in vitro* oraz wykazanych korelacji, korzystny efekt hipotensyjny polifenoli aroniowych może być wypadkową ich działania hamującego aktywność ACE oraz innych plejotropowych, jak działania antyoksydacyjnego czy przeciwzapalnego.

#### **4.3.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji**

Przedstawione wyniki badań *in vitro* i *in vivo* potwierdzają wielokierunkowe efekty działania ekstraktu z Aronii czarnoowocowej. Na ich podstawie można stwierdzić, że stosowanie polifenoli aroniowych korzystnie modyfikuje niektóre czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy występujące u osób z zespołem metabolicznym. Podsumowując:

1. Ekstrakt z Aronii czarnoowocowej zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* zmniejsza aktywność płytek krwi.
2. Stosowanie ekstraktu aroniowego przez 1 i 2 miesiące normalizuje niektóre parametry hemostazy osoczowej u pacjentów z zespołem metabolicznym. W grupie badanych osób z ZM udowodniono korzystne zmiany ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy oraz ogólnego potencjału krzepnięcia.
3. W badaniach *in vitro* wykazano złożony mechanizm wpływu polifenoli aroniowych na ogólny potencjał hemostatyczny, wskazując jednocześnie na istotny udział fibrynogenu i innych białek osocza w zachodzących interakcjach w procesie tworzenia skrzepu i fibrynolizy.

4. Potwierdzono w badaniach *in vitro*, że ekstrakt z Aronii czarnoowocowej umiarkowanie hamuje aktywność amidolityczną trombiny.
5. Po raz pierwszy wykazano w badaniach *in vitro*, że ekstrakt z Aronii czarnoowocowej hamuje aktywność amidolityczną innej proteazy serynowej, tj. plazminy, która jest głównym enzymem fibrynolitycznym osocza.
6. Wykazano, że stosowanie ekstraktu z aronii u pacjentów z ZM obniża ciśnienie tętnicze krwi oraz hamuje aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE I).
7. Stosowanie ekstraktu z aronii u pacjentów z ZM poprawia profil lipidowy oraz korzystnie modyfikuje niektóre markery stanu zapalnego (ET-1) i stresu oksydacyjnego.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.**

### **5.1. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora**

Jestem absolwentką Oddziału Medycyny Laboratoryjnej na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Łodzi. Studia ukończyłam w 1999 roku uzyskując tytuł magistra analityki medycznej. Moja praca magisterska pt.: „Zastosowanie testu agregacji płytek krwi ludzkiej do badań klinicznych”, została opublikowana w branżowym czasopiśmie Diagnostyka Laboratoryjna (załącznik 3, pkt II. D, poz. 12).

Od 1996 roku byłam członkiem Studenckiego Koła Naukowego działającego w Zakładzie Biochemii Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy (późniejszego Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UM). Zarówno w trakcie pracy w kole naukowym, jak i przygotowania pracy magisterskiej, badania prowadziłam pod opieką prof. dr hab. Barbary Kostki, która wprowadziła mnie w tajniki pracy badawczej, nauczyła solidnej i rzetelnej pracy laboratoryjnej, a wreszcie zachęciła do kontynuowania pracy naukowo-badawczej.

W 1999 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod opieką profesor Barbary



Kostki. W trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej prowadziłam badania mające na celu opracowanie zespołu metod do oceny aktywności biologicznej nowych związków chemicznych w oparciu o wybrane testy hemostazy. Założeniem naszym było, aby opracowany model doświadczalny mógł znaleźć zastosowanie do badań przesiewowych nowych leków *in vitro* i w próbach klinicznych *ex vivo*.

Do badań zastosowano żywe komórki płytek krwi (PK), które są łatwo dostępne i nie wymagają hodowli oraz osocze krwi ludzkiej. W pierwszym etapie pracy doktorskiej, opracowano własną modyfikację testu oceny agregacji PK opartej na pomiarze ich liczby z zastosowaniem analizatora hematologicznego. Badania te przeprowadziłam w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi, kierowanym przez prof. dr hab. Marka Paradowskiego. Opracowana metoda jest prosta, tania w wykonaniu, umożliwia szybką, wstępną ocenę agregacji w laboratorium hematologicznym nie posiadającym agregometru (możliwość wykorzystania tego samego materiału, który służy do oceny morfologii krwi). Natomiast zastosowanie krwi cytrynianowej uprościło metodykę badań i umożliwiło wydłużenie czasu przydatności próbki krwi do oznaczeń nawet do 4 godzin po pobraniu. Dzięki czemu może ona służyć m.in. do monitorowania terapii przeciwplatekowej.

Kolejnym etapem pracy doktorskiej było opracowanie układu modelowego opartego na testach hemostazy oraz programach komputerowych do badań aktywności biologicznej nowych leków i do badań klinicznych. Do rejestracji oceny i archiwizacji parametrów kinetycznych wybranych do badań testów hemostazy, opracowano odpowiednie programy komputerowe. Przygotowano programy oceniające:

- 1 – zmianę kształtu płytek krwi
- 2 – agregację i dezagregację płytek krwi
- 3 – ogólny potencjał krzepnięcia osocza i fibrynolizy

W skład opracowanego modelu wchodziła także spektrofotometryczna metoda ocena adhezji PK (załącznik 3, pkt. II A, poz. 9). Doświadczenia związane z opracowaniem zespołu metod do badań przesiewowych nowych leków były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt. „Zastosowanie wybranych testów hemostazy do opracowania modelu oceny działania nowych leków”, którą obroniłam z wyróżnieniem w 2003 r otrzymując stopień doktora nauk farmaceutycznych o specjalności biochemii farmaceutycznej. Praca została także wyróżniona indywidualną Nagrodą Rektora (2004 r).

W 2003 roku zostałam wpisana na „Listę diagnostów laboratoryjnych” otrzymując tym samym prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego. W 2004 roku

zakończyłam czteroletnią specjalizację I stopnia z Analityki Klinicznej i uzyskałam tytuł analityka klinicznego.

## 5.2. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W 2003 roku rozpoczęłam pracę w laboratorium Kliniki Farmakologii i Terapii Monitorowanej z Oddziałem Chorób Wewnętrznych, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W tym okresie wykonywałam laboratoryjne badania diagnostyczne z zakresu terapii monitorowanej u pacjentów Oddziału Chorób Wewnętrznych i Kliniki Kardiologii, Wojewódzkiego Szpitala im. Wł. Biegańskiego w Łodzi. Klinika kierowana przez profesor dr hab. Julitę Chojnowską-Jeziorską była w owym czasie wiodącym łódzkim ośrodkiem zajmującym się problematyką terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi.

Od jesieni 2005 roku pracuję w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków (obecnie Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji) UM w Łodzi kierowanym przez prof. dr hab. Elżbietę Mikiciuk-Olasik. Dzięki umożliwieniu mi stworzenia własnego warsztatu badawczego mogę kontynuować i rozwijać swoje badania naukowe.

Od uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych kontynuuję badania z wykorzystaniem opracowanego w pracy doktorskiej modelu badawczego, zarówno do oceny aktywności znanych leków, jak i nowych związków w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Na przestrzeni ostatnich 10 lat model został rozszerzony o kolejne metody oceny hemostazy oraz uległ pewnym modyfikacjom (załącznik 3, pkt II.A, poz. 7 i 8).

Model ten wykorzystano w badaniach *in vitro* do oceny aktywności cisplatyny oraz jej kilku nowych pochodnych o działaniu cytostatycznym (załącznik 3, pkt II. D, poz. 7) a także nowych organicznych azotanów (załącznik 3, pkt II. A, poz. 7 oraz pkt II. D, poz. 3), lizynianu acetylosalicylowego (aspisol) i aspiryny (załącznik 3, pkt II. A, poz. 8 oraz pkt. II. D, poz. 4).

Od 2003 roku prowadzę badania w ramach współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej (kierowaną przez dr hab. Marlenę Broncel, prof. nadzw. UM) oraz Katedrą Biofizyki Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (kierowaną przez prof. dr hab. Marię Koter-Michalak) w zakresie wpływu statyn, fenofibratów, polifenoli roślinnych oraz melatoniny na funkcję płytek krwi, wybrane parametry hemostazy oraz markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego u chorych z hiperlipidemią oraz zespołem metabolicznym. Wyniki tych badań zostały opublikowane

w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (4 prace, załącznik 3, pkt. II. A. poz. 2, 3, 5 i 6) oraz czasopiśmie krajowych (5 prac, załącznik 3, pkt II.D. poz. 2, 5, 6, 8, 9). Obecnie opracowuję wyniki dotyczące wpływu melatoniny w badaniach *in vitro* i *in vivo* na aktywność enzymu konwertującego angiotensynę oraz wybrane parametry hemostazy.

Od 2009 roku współpracuję z dr. hab. Pawłem Szymańskim z naszego Zakładu, w zakresie analizy aktywności nowo syntetyzowanych przez niego związków, będących inhibitorami ludzkiej erytrocytarnej acetylocholinoesterazy o potencjalnym znaczeniu w leczeniu i diagnostyce choroby Alzheimera. Do tego celu opracowany został przesiewowy test *in vitro* oceniający inhibitory acetylocholinoesterazy w oparciu o referencyjną metodę Ellmana z późniejszymi modyfikacjami. Zastosowane przez nas modyfikacje umożliwiły łatwą i szybką ocenę aktywności enzymatycznej dzięki pomiarowi szybkości zachodzącej reakcji, a program komputerowy do oceny kinetyki pozwala na pomiar ciągły oraz archiwizację danych (załącznik 3, pkt. II. D. poz. 1). Opracowana metoda została wykorzystana w badaniach aktywności biologicznej związków, które są w trakcie procedury patentowej oraz jednego już opatentowanego o potencjalnym zastosowaniu do wczesnej diagnostyki choroby Alzheimera.

W latach 2009-2010 współpracowałam z dr. Tomaszem Przygockim z Zakładu Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Nauk Biomedycznych UM. W ramach współpracy przystosowałam i zwalidowałam metodę oceny ogólnego potencjału krzepnięcia i fibrynolizy (CL-test) do oceny aktywności hemostatycznej osocza szczurzego. Opracowaną metodę wykorzystywałam do oceny wpływu 1-metylnikotynamidu (MNA) na ogólny potencjał krzepnięcia i fibrynolizy u szczurów z cukrzycą. Mimo że w badaniach nie wykazano spektakularnego wpływu MNA na hemostazę, to odnotowano ciekawe różnice pomiędzy parametrami hemostazy szczurów kontrolnych i z cukrzycą. Zaobserwowano m.in. znaczący spadek prędkości krzepnięcia w zwierząt z hiperglikemią. Efekt ten można przypisać potranslacyjnej modyfikacji fibrynogenu i produktów jego rozpadu na drodze glikacji. Również proces fibrynolizy u zwierząt z cukrzycą był upośledzony w stosunku do zdrowych zwierząt (załącznik 3, pkt 2.A., poz. 4).

Rozpoczęłam również współpracę z Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w zakresie analizy aktywności biologicznej substancji pochodzących z roślin transformowanych. Praca, której jestem współautorem, pt.: "Taxodione and extracts from *Salvia austriaca* roots as a human acetylcholinesterase inhibitors" jest w trakcie recenzji w „Die Pharmazie”.

Obecnie we współpracy z dr n. farm. Magdaleną Markowicz-Piasecką prowadzimy badania oceniające biogodność dendrymerów poliamidoaminowych drugiej, trzeciej i czwartej generacji (PAMAM G2, G3, G4) oraz gadolinowych kompleksów z nowo zsyntetyzowanymi pochodnymi kwasu imidooctowego.

Dendrymery to stosunkowo nowa grupa nanocząsteczek polimerowych, które ze względu na swoje unikalne właściwości stały się obiektem zainteresowań wielu dziedzin nauki, w tym biotechnologii, farmacji i medycyny. Jednym z zastosowań dendrymerów w medycynie jest ich wykorzystanie, jako nośniki substancji leczniczych. Badania dowodzą, że połączenia leków z dendrymerami wykazują szereg korzystnych właściwości farmakologicznych i farmakokinetycznych. Prowadzone są także badania dotyczące wykorzystania dendrymerów, jako nośniki: materiału genetycznego, czynników kontrastujących w badaniach rezonansem magnetycznym oraz samodzielnie, jako związki przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. W naszych badaniach oceniliśmy wpływ dendrymerów PAMAM G1-G4 na parametry kinetyczne procesu tworzenia skrzepu, fazy stabilizacji i fibrynolizy, ogólny potencjał krzepnięcia oraz aktywność amidolityczną trombiny. W kolejnym etapie naszych badań oceniony został wpływ dendrymerów na integralność ludzkich aortalnych komórek śródbłonna naczyniowego (HAEC), co może mieć istotne znaczenie w przypadku donaczyniowego podania tych nanocząsteczek. Wyniki badań zostały opublikowane w *International Journal of Pharmaceutics* (załącznik 3, pkt. II.A, poz. 1).

W kolejnym etapie badań oceniony został wpływ czterech nowo zsyntetyzowanych pochodnych kwasu iminodioctowego oraz mebrofeniny na hemostazę i stabilność błony komórkowej erytrocytów ludzkich. Pochodne kwasu iminodioctowego, w tym technetowe kompleksy mebrofeniny wykorzystywane są w diagnostyce obrazowej jako środki kontrastujące o wysokim powinowactwie do hepatocytów. Wprowadzenie nowego środka cieniującego do użytku klinicznego zależy przede wszystkim od bezpieczeństwa jego stosowania. Przed przeprowadzeniem badań *in vivo* na zwierzętach, konieczne jest określenie toksyczności i biogodność nowych związków ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na składniki krwi. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań zostały opisane w pracy „Biocompatibility of iminodiacetic acid derivatives. Studies of coagulation, fibrinolysis and hemolysis of red blood cells”, która jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Pharmacological Reports*.

W trakcie całej pracy zawodowej staram się systematycznie podnosić swoje umiejętności praktyczne oraz dydaktyczne. Po uzyskaniu stopnia doktora ukończyłam studia podyplomowe na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz uzyskałam specjalizację z Laboratoryjnej Toksykologii Medycznej. Brałam też udział w licznych kursach i szkoleniach (załącznik 3, pkt 3. Q.). Odbyłam staże w laboratoriach klinicznych: Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej oraz Pracowni Diagnostyki Toksykologicznej Ostkich Zatruc, Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. Niezwykle cenne były również zajęcia praktyczne prowadzone w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie.

### **5.3. Podsumowanie**

Na mój całkowity dorobek naukowy składa się 26 oryginalnych prac doświadczalnych: 13 z nich opublikowanych zostało w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznej punktacji IF 29,961 (w tym po doktoracie ukazało się 12 prac – IF 29,463) oraz 13 prac doświadczalnych (10 opublikowanych po doktoracie), które ukazały się w czasopismach z listy B MNISW o łącznej punktacji 56 pkt KBN/MNISW. Jestem także współautorem 6 prac przeglądowych (26 pkt. MNISW). Łączna punktacja, wg. list z roku publikacji, wynosi 374 punkty KBN/MNISW.

Jestem także autorem 11 prac przeglądowych opublikowanych w branżowych czasopismach dla farmaceutów spoza listy MNISW. Wyniki swoich badań przedstawiłam na 7 zjazdach międzynarodowych oraz 18 krajowych.

