

KATEDRA BIOLOGII MEDYCZNEJ
ZAKŁAD BIOLOGII MEDYCZNEJ
85-092 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24
tel. (52) 585-37-37; fax (52) 585-37-42
e-mail: kizbiolog@cm.umk.pl

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

Karolina Szewczyk-Golec

BYDGOSZCZ 2017

1. Imię i Nazwisko:

Karolina Szewczyk-Golec

2. Wykaz posiadanych dyplomów, stopni naukowych/artystycznych – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej - Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum UMK); Bydgoszcz, grudzień 2002 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „SELEN I NIEKTÓRE ANTYOKSYDANTY WE KRWI I W TKANCE NOWOTWOROWEJ CHORYCH Z ŁAGODNYM PRZEROSTEM I Z RAKIEM GRUCZOŁU KROKOWEGO.”

Praca realizowana w ramach studiów doktoranckich (01.11.1998 -11.12.2002) w Katedrze Biochemii Akademii Medycznej w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum UMK).

Promotor: prof. dr hab. Bronisław Zachara

- studia podyplomowe w zakresie analityki medycznej w Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu; ukończone - czerwiec 2017 r.

- magister biologii, specjalność biologia molekularna, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Toruń, lipiec 1998 r.

Tytuł pracy magisterskiej: „EKTOENZYMY BŁON PLAZMATYCZNYCH KOMÓREK KORY MÓZGU ŚWINI UCZESTNICZĄCE W METABOLIZMIE POZAKOMÓRKOWEGO AMP.”

Praca realizowana w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

- 01.02.2016 – nadal:
adiunkt w Katedrze Biologii Medycznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 01.01.2015 – 01.02.2016:
asystent w Katedrze Biologii Medycznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 01.05.2008 – 30.09.2014:
adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 01.03.2003 – 01.05.2008:
asystent w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 ze zm. w Dz. U. 2016 poz. 1311):

4.1. tytuł osiągnięcia naukowego:

OCENA WYKŁADNIKÓW STRESU OKSYDACYJNEGO W PRZEBIEGU PROCESU STARZENIA SIĘ I CHOROÓB CYWILIZACYJNYCH ORAZ PRÓBY JEGO MODYFIKACJI Z ZASTOSOWANIEM EGZOGENNEJ MELATONINY

b) osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem pięciu przedstawionych poniżej prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku IF równym **21.026**.

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

LP.	AUTORZY	TYTUŁ	CZASOPISMO, ROK, VOL., STRONY, DOI	IF
1.	Szewczyk-Golec K., Rajewski P., Gackowski M., Mila-Kierzenkowska C., Wesołowski R., Sutkowy P., Pawłowska M., Woźniak A.	Melatonin supplementation lowers oxidative stress and regulates adipokines in obese patients on a calorie-restricted diet	Oxid. Med. Cell. Longev., 2017, ID 8494107, 1-10, doi: 10.1155/2017/8494107	4.593
2.	Szewczyk-Golec K., Grzelakowski P., Ługowski T., Kędziora J.	The effects of percutaneous transluminal coronary intervention on biomarkers of oxidative stress in the erythrocytes of elderly male patients	Redox Rep., 2016, Nov 20, 1-8, doi: 10.1080/13510002.2016.1257754	2.070
3.	Kędziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Kozakiewicz M., Pawluk H., Czuczejko J., Kornatowski T., Bartosz G., Kędziora J.	Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients	J. Pineal Res., 2009; 46, 333-337, doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00666.x	5.209
4.	Kędziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Czuczejko J., Pawluk H., van Marke de Lumen K., Kozakiewicz M., Bartosz G., Kędziora J.	Antioxidative effect of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients	J. Pineal Res., 2008, 45, 312-317, doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00592.x	5.056
5.	Kędziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Czuczejko J., van Marke de Lumen K., Pawluk H., Motyl J., Karasek M., Kędziora J.	Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects	J. Pineal Res., 2007, 42, 153-158, doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00394.x	4.098
Sumaryczny IF				21.026

- określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie wyżej wymienionych prac znajduje się w Załączniku nr 3
- oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w Załączniku nr 4
- kopie powyższych prac znajdują się z Załączniku nr 5

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

Z wiekiem w organizmie człowieka zachodzą różnorodne zmiany na poziomie biochemicznym i molekularnym, związane z procesem fizjologicznego starzenia. Akumulacja w komórkach i tkankach nieprawidłowych modyfikacji skutkuje upośledzeniem funkcjonowania organizmu i sprzyja rozwojowi chorób związanych z wiekiem podeszłym, ostatecznie prowadząc do śmierci. Na proces starzenia składa się wiele czynników, do których należy obniżenie żywotności i nieodwracalne zmiany kumulujące się w organizmie z wiekiem, ubytki biologiczne oraz procesy zanikowe zachodzące w narządach po zakończeniu procesów wzrostowych, a także zaburzenia homeostazy wynikające ze wzrastającej z wiekiem wrażliwości organizmu na działanie czynników szkodliwych. Liczne teorie próbują wyjaśnić przyczyny i mechanizmy starzenia się oraz patofizjologiczne podłoże chorób wieku podeszłego. Do szczególnie interesujących należy wolnorodnikowa teoria starzenia, zaproponowana w 1954 roku przez Denhama Harmana. Zgodnie z tą teorią, z wiekiem dochodzi w organizmie do zaburzenia homeostazy oksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku nasilenia stresu oksydacyjnego. Nagromadzenie z wiekiem zmian powstających pod wpływem reaktywnych form tlenu (ROS – ang. *reactive oxygen species*) w cząsteczkach białek, lipidów i kwasów nukleinowych skutkuje upośledzeniem funkcji, degeneracją i obumieraniem komórek. Procesy te prowadzą do starzenia się organizmu i rozwoju chorób związanych z wiekiem podeszłym.

Źródłem ROS w organizmie człowieka są procesy zachodzące z udziałem tlenu. Człowiek należy do organizmów aerobowych, które wykorzystują tlen w istotnych procesach metabolicznych, związanych z reakcjami utleniania. Tlen cząsteczkowy jest pobierany z atmosfery i służy głównie do wytwarzania energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Ze względu na swoją specyficzną strukturę (dwa niesparowane elektrony na powłoce elektronowej), tlen cząsteczkowy może zostać zredukowany wskutek przeniesienia tylko jednego elektronu, co prowadzi do powstawania ROS. Do ROS

zaliczamy zarówno wolne rodniki tlenowe, m. in. anionorodnik ponadtlenkowy – $O_2^{\bullet-}$ i rodnik wodorotlenowy – OH^{\bullet} , jak i związki tlenu nie będące wolnymi rodnikami, m. in. nadtlenuk wodoru – H_2O_2 , które są zdolne do przekształcenia się w wolne rodniki tlenowe lub też do ich wytworzenia. ROS spotykane w organizmie człowieka mogą być pochodzenia zarówno endo-, jak i egzogenne. Cząsteczki te charakteryzują się wysoką reaktywnością, dlatego też prowadzą do uszkodzeń makrocząsteczek budujących struktury komórkowe. Wysoka reaktywność wolnych rodników wynika z ich niestabilnej konfiguracji elektronowej. W wyniku oddziaływania z napotkanymi cząsteczkami, łatwo pozbawiają je elektronu, co przekształca te cząsteczki w następne wolne rodniki. Proces ten prowadzi do szeregu takich reakcji łańcuchowych, jak peroksydacja lipidów. Ze względu na opisane powyżej toksyczne skutki działania ROS na struktury komórkowe, rozpatrywany jest ich udział w patogenezie wielu schorzeń, w tym chorób związanych ze stanem zapalnym, sercowo-naczyniowych, neurologicznych, cukrzycy, otyłości i jej powikłań, a także procesów kancerogenezy i starzenia się. Należy jednak pamiętać, że ROS są również niezbędnymi produktami pośrednimi, ważnymi dla prawidłowego funkcjonowania komórek, m. in. uczestnicząc w regulacji procesów naprawczych, ekspresji genów, regulacji metabolizmu czy przekazywaniu sygnałów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych.

Powstawanie wolnych rodników jest procesem nieuniknionym i zachodzącym w warunkach fizjologicznych we wszystkich komórkach. Aby uniknąć toksycznych skutków metabolizmu tlenowego, organizmy aerobowe wykształciły system obrony przed ROS. W skład tego systemu wchodzi zarówno układ enzymatyczny, jak i związki niskocząsteczkowe wykazujące właściwości antyoksydacyjne. Enzymatyczny układ antyoksydacyjny ssaków składa się z szeregu enzymów współdziałających ze sobą w celu zneutralizowania ROS, zapobiegając uszkodzeniom ważnych struktur komórkowych. Do najważniejszych enzymów pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej należą: dysmutazy ponadtlenkowe (SODs; EC 1.15.1.1), katalaza (CAT; EC 1.11.1.6), peroksydazy glutationowe (GPxs; EC 1.11.1.9) i reduktaza glutationowa (GR; EC 1.6.4.2). Do niskocząsteczkowych antyoksydantów zaliczane są związki hydrofilne, jak zredukowany glutation (GSH), kwas askorbinowy i kwas moczowy, związki lipofilne, jak tokoferole i karotenoidy, a także melatonina – wykazująca właściwości zarówno hydro-, jak i lipofilne.

Z wiekiem może dochodzić zarówno do wzmożonej generacji ROS, m. in. wskutek zwiększonej produkcji wolnych rodników przez mitochondria, w których obniżeniu ulega zdolność oksydazy cytochromowej do pełnej, czteroelektronowej redukcji tlenu, jak i do osłabienia obrony antyoksydacyjnej wskutek spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych i poziomu antyoksydantów niskocząsteczkowych. Wynikiem działania tych procesów jest nasilenie stresu oksydacyjnego w starzejącym się organizmie.

Melatonina (5-metoksy-N-acetylotryptamina) to należący do indoloamin hormon wydzielany głównie przez szyszynkę zgodnie z okołodobowym rytmem, wykazującym maksymalne stężenia hormonu w godzinach nocnych i niskie w ciągu dnia. Wpływa na regulację okołodobowych i sezonowych cykli, jednocześnie wykazując szereg właściwości plejotropowych, w tym moduluje odpowiedź układu odpornościowego, a także jest bardzo efektywnym antyoksydantem hydro- i lipofilnym. Melatonina oraz jej metabolity w bezpośredniej reakcji neutralizują wiele reaktywnych form tlenu i azotu, jak rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru, tlen singletowy i anion nadtlenoazotynowy. W wielu badaniach *in vitro* wykazano stymulujące działanie fizjologicznych stężeń melatoniny na aktywność oraz syntezę mRNA enzymów antyoksydacyjnych, hormon ten chroni również białka enzymatyczne przed procesami oksydacji, stymuluje syntezę GSH i zwiększa aktywność innych antyoksydantów. Ponadto stwierdzono, że melatonina obniża produkcję ROS działając ochronnie na funkcje mitochondriów, zwiększając wydajność fosforylacji oksydacyjnej w łańcuchu oddechowym, a także hamując aktywność prooksydacyjnej syntazy tlenu azotu.

Z wiekiem amplituda wydzielania melatoniny ulega spłaszczeniu, aż do prawie całkowitego zaniku rytmu dzień-noc u osób w wieku powyżej 65 lat. W badaniach obserwowano obniżone stężenia melatoniny we krwi ludzi starszych. Rozpatrywane są różne teorie dotyczące możliwego wpływu niedoboru melatoniny na procesy starzenia. Niski poziom melatoniny może prowadzić do zaburzenia procesów fizjologicznych wykazujących rytmiczność, jak sen i czuwanie, regulacja wewnętrznej temperatury ciała, czy wydzielanie innych hormonów. Osłabieniu może ulec także funkcjonowanie układu odpornościowego. Niedobór melatoniny obniża też wydolność antyoksydacyjną organizmu, zwiększa ryzyko oksydacyjnych uszkodzeń mitochondriów i nasilonej generacji ROS, co wydaje się szczególnie istotne w aspekcie wolnorodnikowej teorii starzenia. Chociaż w badaniach potwierdzono korelację niskich stężeń melatoniny u

osób starszych z obniżoną obroną antyoksydacyjną, to jednak wpływ niedoboru melatoniny na procesy starzenia w powiązaniu z właściwościami antyoksydacyjnymi hormonu to dziedzina wymagająca dalszych badań. Ponadto, rozpatrywany jest wpływ niedoboru melatoniny w rozwoju chorób cywilizacyjnych, związanych z wiekiem podeszłym, w tym cukrzycy typu II, pierwotnego nadciśnienia tętniczego, chorób krążenia, nowotworów, a także postuluje się rolę zaburzeń w wydzielaniu tego hormonu w rozwoju otyłości. Bardzo obiecująca wydaje się możliwość usprawnienia obrony antyoksydacyjnej u osób starszych poprzez stosowanie melatoniny jako terapii wspomagającej. Wiele badań z zakresu tej tematyki było prowadzonych na modelach zwierzęcych, a tylko nieliczne eksperymenty zostały przeprowadzone u ludzi.

Celem podjętych badań wykazanych jako osiągnięcie naukowe było poszerzenie wiedzy dotyczącej równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u osób starszych zdrowych oraz w przebiegu głównych chorób cywilizacyjnych, często dotyczących wieku podeszłego, to jest cukrzycy typu II, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca, a także otyłości. Rozwój cywilizacyjny spowodował postępujące starzenie się społeczeństwa, a co za tym idzie stworzył potrzebę zrozumienia patogenezy chorób cywilizacyjnych, których częstość występowania nasila się z wiekiem. Ze względu na obserwowany udział stresu oksydacyjnego w procesach starzenia i patogenezie chorób towarzyszących, niezbędne jest szukanie nowych metod profilaktyki w zakresie wzmocnienia obrony organizmu przed negatywnymi skutkami nadmiernej generacji reaktywnych form tlenu. **Kolejnym celem moich badań była weryfikacja hipotezy, że suplementacja melatoniną u osób starszych zdrowych i u pacjentów z wybranymi chorobami cywilizacyjnymi wpłynie na poprawę ich statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego.**

Wpływ procesów fizjologicznego starzenia oraz wybranych chorób cywilizacyjnych na stężenie markerów stresu oksydacyjnego oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych we krwi badanych osób

Zaproponowana przez D. Harmana wolnorodnikowa teoria starzenia znajduje potwierdzenie w wielu eksperymentach prowadzonych na modelach zwierzęcych oraz *in vitro*, a także w badaniach u ludzi. Głównymi źródłami ROS w organizmie ssaków są: mitochondrialny łańcuch oddechowy, układ cytochromu P-450, proces fagocytozy, szlak syntezy prostaglandyn, nieenzymatyczne reakcje zachodzące z udziałem tlenu

cząsteczkowego oraz promieniowanie jonizujące. Z wiekiem dochodzi do upośledzenia funkcji mitochondriów, powodując zwiększony udział jednoelektronowych redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym i wzrost stężenia ilości cząsteczek ROS przenikających do cytoplazmy. Jednocześnie zachodzi kumulacja szkodliwych produktów reakcji wolnych rodników z białkami, kwasami nukleinowymi i lipidami. W badaniach *in vitro* obserwowano wyższy poziom 8-hydroksyguaniny, markera uszkodzeń DNA, w komórkach starych w porównaniu z komórkami młodymi. W miarę starzenia się organizmu upośledzeniu ulegają mechanizmy chroniące komórkę przed działaniem ROS. Skorelowano aktywność podstawowego enzymu obrony antyoksydacyjnej – dysmutazy ponadtlenkowej – z wiekiem: wyższe aktywności SOD korelują dodatnio z dłuższym czasem życia. Potwierdzeniem teorii wolnorodnikowej są też doświadczenia na zwierzętach, w których podawanie związków o działaniu antyoksydacyjnym zwiększało długość życia. Z wiekiem można zaobserwować spadek poziomu związków o działaniu antyoksydacyjnym, w tym stwierdza się niedobory melatoniny. Niektórzy autorzy sugerują, że spadek poziomu melatoniny we krwi może wynikać nie tylko z obniżonej produkcji hormonu przez szyszynkę u osób starszych, ale również ze znacznego zwiększenia jego zużycia w reakcjach z ROS w przypadkach nasilonego stresu oksydacyjnego. Zgodnie z tą tezą, melatonina służąc jako wysoce efektywny antyoksydant pierwszej linii obrony organizmu przeciw uszkodzeniom wywołanym przez ROS, ulega gwałtownemu zużyciu w sytuacji nasilenia procesów prooksydacyjnych w organizmie.

Ze względu na liczne przesłanki wskazujące na zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej z wiekiem, postanowiłam ocenić funkcjonowanie mechanizmów antyoksydacyjnych w erytrocytach osób starszych zdrowych w porównaniu ze zdrowymi osobami młodymi. Wyniki tego badania zostały przedstawione w pracy wykazanej jako osiągnięcie naukowe pod numerem 5. W krwinkach czerwonych osób starszych (średnia wieku 79 lat) stężenie malonyldialdehydu (MDA) było znamienne wyższe, a aktywności cynkowo-miedziowej cytoplazmatycznej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1), GPx oraz GR znamienne niższe niż u młodych dorosłych (średnia wieku 36 lat). Stężenie GSH oraz aktywności CAT i S-transferazy glutationowej (GST) były porównywalne w obu grupach. MDA stanowi istotny marker peroksydacji lipidów, jednego z najważniejszych patologicznych procesów wywoływanych przez wolne rodniki. Wielonienasycone kwasy

tłuszczowe, budujące lipidy błon biologicznych, są bardzo wrażliwe na działanie ROS. Proces peroksydacji, raz zainicjowany, na drodze prolongacji prowadzi do reakcji łańcuchowych, w których powstają ponadtlenki lipidowe. Ponadtlenki lipidowe z kolei ulegają przekształceniu do ponadtlenków cyklicznych, a te są rozkładane do bardzo toksycznych dla komórki produktów końcowych, jak aldehydy (w tym MDA) i rodniki alkoksylowe. Wykazany w pracy numer 5 wzrost stężenia MDA z wiekiem wskazuje na nasilone procesy oksydacyjne zachodzące w starzejącym się organizmie. Również w badaniach innych autorów zaobserwowano podwyższenie poziomu MDA w erytrocytach i w osoczu osób starszych. Peroksydacja lipidów skutkuje obniżeniem płynności błon, wzrostem ich niespecyficzej przepuszczalności oraz inaktywacją niektórych enzymów błonowych, co może wpływać stymulująco na procesy starzenia i rozwój chorób wieku podeszłego. Zaobserwowany spadek aktywności SOD-1, GPx oraz GR dowodzi osłabienia obrony antyoksydacyjnej u osób starszych. Zmianie nie uległa aktywność CAT i GST. Badania prowadzone przez innych autorów potwierdzają modyfikacje w obrębie enzymatycznego układu antyoksydacyjnego, zachodzące podczas starzenia się organizmu. Stwierdzone obniżenie aktywności SOD-1 może być skutkiem niedoboru jonów Zn^{2+} u ludzi w podeszłym wieku. Podobnie, niskie aktywności GPx mogą być związane z deficytem selenu w diecie osób starszych. Postuluje się również możliwość spadku aktywności enzymów wskutek wywołanych przez ROS oksydacyjnych modyfikacji białek. W badaniu nie zaobserwowano zmiany stężenia GSH w erytrocytach z wiekiem. GSH, γ -glutamylcysteinyloglicyna, to tripeptyd ważny dla obrony antyoksydacyjnej organizmu. Dobrym wskaźnikiem jego statusu w organizmie człowieka jest stężenie w krwinkach czerwonych. Inni autorzy uzyskiwali różne wyniki dotyczące zmiany poziomu GSH podczas starzenia się organizmu. W niektórych badaniach nie stwierdzono zależnych od wieku różnic, w innych obserwowano obniżenie poziomu tripeptydu z wiekiem. Brak zmian stężenia GSH u osób starszych może wskazywać na większe znaczenie wzmożonej generacji ROS niż osłabionej obrony antyoksydacyjnej dla procesów starzenia.

W przeprowadzonym badaniu ocenie poddałam również poranne stężenia melatoniny u zdrowych osób młodych i w wieku podeszłym, obserwując znamienne spadki poziomu hormonu u osób starszych. Inni autorzy również stwierdzali obniżoną zawartość melatoniny we krwi ludzi w podeszłym wieku, jakkolwiek w niektórych eksperymentach nie zaobserwowano zależnych od wieku zmian w ilości melatoniny, co

może być związane z różnymi warunkami doświadczenia. **Warto podkreślić, że większość badań dotyczyła stężenia melatoniny mierzonego nocą (maksimum wydzielania hormonu), natomiast w prezentowanej pracy wykazano, że również w ciągu dnia (minimum wydzielania hormonu) poziom melatoniny u zdrowych osób w wieku podeszłym jest o około 35% niższy niż u zdrowych osób dorosłych młodych.** Za główną przyczynę spadku poziomu melatoniny z wiekiem uważa się mniejsze wydzielanie melatoniny przez szyszynkę, przede wszystkim na skutek obniżenia liczby receptorów β -adrenergicznych w błonie pinealocytów, a także niższej aktywności N-acetylotransferazy, kluczowego enzymu szlaku syntezy melatoniny w szyszynce. Spadek wydzielania melatoniny u osób starszych może wiązać się z różnymi konsekwencjami, jak zaburzenie rytmów okołodobowych, zaburzenia snu, osłabienie układu odpornościowego, a także zredukowanie obrony antyoksydacyjnej organizmu.

Nadmierny stres oksydacyjny w starzejącym się organizmie może uczestniczyć w patogenezie cukrzycy typu II. Jest to choroba metaboliczna o złożonej etiologii, wciąż wymagająca dalszych badań. Znaczącą rolę w rozwoju cukrzycy typu II odgrywa zaburzenie homeostazy energetycznej, które może być związane między innymi ze wzmożoną generacją ROS. Ważnym źródłem ROS w cukrzycy jest hiperglikemia z nasiloną autooksydacją glukozy, aktywacja szlaku sorbitolowego, aktywacja kinazy białkowej C oraz nasilony metabolizm kwasu arachidonowego. Wykazano także występowanie upośledzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz wzmożoną produkcję wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które prowadzą do zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej. Sugeruje się, że dodatkowym czynnikiem akcelerującym stres oksydacyjny oprócz hiperglikemii powodującej nasiloną generację ROS może być trwałe uszkodzenie genów kodujących główne enzymy odpowiadające za neutralizację wolnych rodników. **W celu weryfikacji hipotezy, że w przebiegu cukrzycy typu II u osób starszych dochodzi do wzmożonych procesów wolnorodnikowych, celem badań opisanych w pracy numer 3 było oszacowanie nasilenia stresu oksydacyjnego u pacjentów w podeszłym wieku z cukrzycą typu II w porównaniu do zdrowych osób z tej samej grupy wiekowej.** W grupie osób chorych stwierdzono w krwinkach czerwonych zwiększone stężenie MDA i obniżoną aktywność SOD-1 w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej, u pacjentów z cukrzycą typu II zaobserwowano znamienne wzrost osoczowej aktywności ceruloplazminy (Cp), α_2 -glikoproteiny, wykazującej właściwości enzymatyczne oksydazy (E.C.1.16.3.1). Poza

transportem miedzi ceruloplazmina reguluje metabolizm żelaza, a także wykazuje właściwości antyoksydacyjne, zapobiegając powstawaniu anionorodnika ponadtlenkowego. Takie działanie Cp związane jest z jej aktywnością ferroksoydazową, gdzie jony Fe^{2+} zostają utlenione do Fe^{3+} przy całkowitej redukcji tlenu do wody. Wykazano także, że Cp ma zdolność redukcji H_2O_2 i nadtlenków lipidowych. Zwiększona aktywność Cp w przebiegu cukrzycy typu II ma potwierdzenie w literaturze i może wynikać z nasilonej peroksydacji lipidów, stanowiąc mechanizm kompensacyjny wobec obniżonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych u badanych chorych. Ponieważ Cp należy do białek ostrej fazy, należy też uwzględnić nasilony stan zapalny w przebiegu cukrzycy. W przeprowadzonym badaniu wykazano ponadto ponad 2-krotnie niższe stężenia melatoniny w surowicy krwi chorych z cukrzycą typu II w porównaniu ze zdrowymi osobami starszymi. Przyczyną tak niskiego poziomu melatoniny może być jej nadmierne zużycie w reakcjach z ROS, a także obniżona synteza hormonu w szyszynce.

Ze względu na potwierdzony w badaniach na modelach zwierzęcych udział melatoniny w regulacji wydzielania insuliny i homeostazy glukozy, uzyskany rezultat stanowi silną przesłankę wskazującą na rolę niedoboru tego hormonu w patogenezie cukrzycy typu II i rozwoju współistniejących powikłań.

Wyniki badań dotyczące zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u osób starszych zdrowych i chorych z cukrzycą typu II, wzbudziły moje zainteresowanie zagadnieniami stresu oksydacyjnego w przebiegu innych schorzeń, których ryzyko znamienne rośnie z wiekiem. Należy do nich choroba niedokrwienna serca (CAD, ang. *coronary artery disease*), stanowiąca zespół objawów klinicznych związanych z dysproporcją pomiędzy wielkością przepływu w naczyniach wieńcowych, a zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen i związki energetyczne. Jedną z głównych manifestacji klinicznych CAD jest stabilna dławica piersiowa (SAP, ang. *stable angina pectoris*). CAD stanowi dominującą przyczynę śmiertelności w społeczeństwach zachodnich, przy czym ryzyko śmierci z powodu CAD wykazuje zależność od wieku i płci. W 2009 roku w Polsce śmiertelność z powodu CAD u mężczyzn w wieku 35-74 lat była 3,5 razy wyższa niż u kobiet w tej samej grupie wiekowej. W ponad 98% przypadków przyczyną CAD jest miażdżycza naczyń wieńcowych. Miażdżycza, czyli arterioskleroza, to przewlekła, postępująca choroba zapalna obejmująca ogniskowo tętnice dużego i średniego kalibru. Do jej rozwoju prowadzą zaburzenia w interakcjach między komórkami ściany naczyniowej, komórkami krwi i osoczowymi lipoproteinami.

Etiopatogeneza miażdżycy tętnic jest procesem ciągle nie do końca poznany, w którym uczestniczą mechanizmy takie, jak dysfunkcja endotelium, stan zapalny, proliferacja komórek mięśniówki gładkiej, czy neowaskularyzacja. Wiele badań wskazuje na udział reaktywnych form tlenu i azotu w rozwoju arteriosklerozy. Wykazano, że nasilona produkcja ROS jest związana z upośledzeniem funkcji endotelium, a wzmożony stres oksydacyjny w naczyniach krwionośnych zwiększa ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych w przebiegu CAD. Zgodnie z wolnorodnikową teorią miażdżycy, nasilony stres oksydacyjny prowadzi do oksydacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoproteins*), wywołując patologiczną odpowiedź w naczyniu krwionośnym, która prowadzi do rozwoju zmian miażdżycowych. **W celu lepszego zrozumienia udziału procesów wolnorodnikowych w przebiegu choroby niedokrwiennej serca u mężczyzn w wieku podeszłym, postanowiłam oszacować poziom stresu oksydacyjnego w tej grupie chorych w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz zmiany w zakresie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej zachodzące wskutek zastosowania inwazyjnych metod leczenia CAD.** Badania przeprowadziłam na grupie starszych mężczyzn z SAP, zakwalifikowanych do zabiegu przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej (PTCA, ang. *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) w porównaniu z grupą mężczyzn w podobnym przedziale wiekowym, którzy ze względu na objawy niedokrwienia zostali zakwalifikowani do planowej koronarografii bez potrzeby jednoczesowego wykonania PTCA. Wyniki doświadczenia zostały przeanalizowane w pracy numer 2. Wykazano większe upośledzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u pacjentów z SAP, u których w erytrocytach stężenie MDA było wyższe, a aktywności SOD-1, CAT i GPx niższe niż u mężczyzn nie wymagających PTCA. **Wyniki badań sugerują, że pomiar nasilenia stresu oksydacyjnego może stanowić użyteczny niezależny wskaźnik predykcyjny zdarzeń sercowo-naczyniowych.** Ponadto zaobserwowano, że zarówno zabieg PTCA, jak i diagnostyczna koronarografia spowodowały wzmożoną generację ROS i kompensacyjny wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. W analizie zmian w zakresie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnych po zabiegu PTCA należy więc uwzględnić wpływ samej procedury, to jest nakłucia tętnicy udowej, wprowadzenia cewnika do tętnicy wieńcowej i użycia środka kontrastującego. Natomiast wyłącznie w przypadku PTCA stwierdzono spadek stężenia MDA, co pozwala

przypuszczać, że odtworzenie przepływu krwi w zablokowanej tętnicy wieńcowej zmniejszyło liczbę epizodów niedokrwienia mięśnia sercowego.

Wpływ suplementacji melatoniną na wykładniki stresu oksydacyjnego we krwi osób zdrowych i u pacjentów z chorobami cywilizacyjnymi

W badaniach opisanych powyżej, przedstawionych w pracach numer 2, 3 i 5, potwierdzono zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w organizmie zachodzące z wiekiem, a także w przebiegu wybranych chorób cywilizacyjnych. Wyniki te, a także badania innych autorów pozwalają sugerować, że terapie wzmacniające obronę antyoksydacyjną organizmu będą wysoce korzystne dla opóźnienia procesów starzenia i rozwoju chorób towarzyszących starości. Dobrym kandydatem dla takiej farmakoterapii wydaje się melatonina, wykazująca silne właściwości antyoksydacyjne, a jednocześnie charakteryzująca się bezpiecznym profilem działania. Stwierdzono, że podaż zdrowym kobietom dawki 300 mg dziennie przez okres 4 miesięcy nie powodował żadnych negatywnych skutków ubocznych. Poza działaniem antyoksydacyjnym, melatonina wykazuje inne właściwości ważne dla zapobiegania starzeniu i chorobom cywilizacyjnym, jak przywrócenie prawidłowych rytmów okołodobowych i sezonowych organizmu, modulowanie funkcjonowania układu odpornościowego, koordynowanie przemian metabolicznych i wydzielania innych hormonów, jak insulina czy kortyzol. Badania na modelach zwierzęcych wskazują na celowość suplementacji melatoniną, natomiast niewiele jest doniesień badających wpływ egzogennej melatoniny u ludzi w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Ze względu na fakt, że Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych dopuścił w Polsce do obrotu melatoninę jako środek farmaceutyczny w zaburzeniach snu w dawce 5 mg dziennie, w eksperymentach opisanych w pracach numer 3 – 5 zastosowano taką dawkę melatoniny, podawaną uczestnikom badania przez okres 30 dni codziennie na 1 godzinę przed snem.

Cykl eksperymentów dotyczących prób modyfikacji stresu oksydacyjnego z zastosowaniem egzogennej melatoniny został zainicjowany przez określenie wpływu podaży indoloaminy na wykładniki stresu oksydacyjnego we krwi zdrowych osób młodych (średnia wieku 36 lat) oraz w wieku podeszłym (średnia wieku 79 lat). Doświadczenie to zostało przedstawione w pracy wykazanej jako osiągnięcie naukowe pod numerem 5. Po pierwsze, zaobserwowano, że w obu badanych grupach wiekowych

po miesiącu suplementacji melatoniną, wartości porannych stężeń tego hormonu w surowicy krwi wzrosły ponad dwukrotnie. **Ze względu na krótki okres półtrwania melatoniny w organizmie (30 – 50 minut), należy wnioskować, że egzogeny hormon mógł wpłynąć stymulująco na endogeny szlak syntezy melatoniny. Taki wpływ suplementacji może być szczególnie istotny dla osób starszych, u których szlak syntezy melatoniny w szyszynce jest upośledzony.** Należy uznać ten wynik za cenne spostrzeżenie, potwierdzone w badaniach na modelach zwierzęcych, w których obserwowano stymulację enzymów uczestniczących w syntezie melatoniny w pinealocytach pod wpływem egzogenego hormonu. Wśród przyczyn wyższych porannych stężeń hormonu można też rozpatrywać wpływu egzogennej indoloaminy na przemiany kataboliczne, w tym mniejsze zużycie endogennej melatoniny w reakcjach wolnorodnikowych. Wykazano ponadto, że suplementacja melatoniną wywołała znaczący korzystny wpływ na procesy oksydacyjno-antyoksydacyjne w krwinkach czerwonych zarówno u młodych, jak i starszych osób zdrowych. Przede wszystkim, w obu badanych grupach zaobserwowano obniżenie procesów peroksydacji lipidów – stężenia MDA w erytrocytach były znamienne niższe po 30 dniach suplementacji. Wyniki te są zgodne z badaniami na modelach zwierzęcych i *in vitro*, w których potwierdzono hamujący wpływ melatoniny na peroksydację lipidów. Jakkolwiek wykazano, że melatonina nie reaguje z ponadtlenkami lipidowymi i nie może działać jako czynnik przerywający łańcuch peroksydacji, to jej działanie protekcyjne można wiązać z neutralizowaniem wolnych rodników zdolnych do inicjacji procesu peroksydacji lub stymulacją innych elementów obrony antyoksydacyjnej. W zakresie układu antyoksydacyjnego, w eksperymencie stwierdzono wzrost aktywności SOD-1 i GR w krwinkach czerwonych po suplementacji melatoniną zarówno u ludzi młodych, jak i starszych, nie zmieniły się natomiast aktywności CAT, GPx, GST oraz stężenie GSH. Podsumowując, w pracy numer 5 wykazano, że suplementacja melatoniną u ludzi zdrowych pozwala na usprawnienie obrony antyoksydacyjnej organizmu, co może wpłynąć na opóźnienie procesów starzenia i osłabienie procesów patologicznych związanych z rozwojem chorób wieku podeszłego.

Do chorób tych zaliczamy pierwotne nadciśnienie tętnicze, które występuje u około 65% starszych osób. Patogeneza pierwotnego nadciśnienia tętniczego jest procesem złożonym i wieloczynnikowym. Ważną rolę odgrywają uwarunkowania genetyczne i środowiskowe. Za jedną z najważniejszych przyczyn rozwoju nadciśnienia uznaje się

zachodzące z wiekiem zmiany inwolucyjne w układzie sercowo-naczyniowym i upośledzenie funkcji śródbłonna naczyniowego. Dochodzi do nich poprzez zwiększone unieczynnianie tlenku azotu (NO) lub poprzez bezpośrednie uszkodzenie endotelium. Rozpatrywany jest udział stresu oksydacyjnego w tych procesach, m. in. poprzez udział ROS w inaktywacji NO czy też w indukcji wczesnej fazy rozwoju miażdżycy tętnic poprzez oksydacyjną modyfikację LDL w obszarze podśródbłonkowym. Wiele badań wskazuje na udział melatoniny w regulacji ciśnienia krwi. Mechanizm hipotensyjnego działania melatoniny jest wieloczynnikowy. Receptory MT1 i MT2 dla tego hormonu zostały zlokalizowane w tętnicach wieńcowych. Hormon wykazuje dwojakie działanie na naczynia, zależnie od aktywacji odpowiedniego receptora. Efekt wazokonstrukcyjny ujawnia się po aktywacji receptora MT1, natomiast wazorelaksacyjny po aktywacji MT2. Sposób działania jest uzależniony od wpływu melatoniny na układ współczulny i dostępności NO. Uważa się ponadto, że hipotensyjne działanie hormonu może wiązać się z jego antyoksydacyjnymi właściwościami. **Ze względu na możliwy wpływ niedoboru melatoniny w patogenezie nadciśnienia tętniczego u ludzi starszych, postanowiłam określić wpływ 15- i 30-dniowej podaży melatoniny u pacjentów w podeszłym wieku z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym na wybrane parametry stresu oksydacyjnego.** Eksperyment ten został opisany w pracy numer 4. Stwierdzono, że już po 15 dniach suplementacji melatoniną poranne stężenia hormonu we krwi pacjentów zwiększyły się ponad 2,5-krotnie i efekt ten utrzymywał się po 30 dniach eksperymentu. Wzrost stężenia melatoniny w organizmie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w podeszłym wieku może mieć istotne znaczenie terapeutyczne w tej grupie chorych.

Grupa badawcza była złożona z pacjentów, u których nadciśnienie tętnicze normalizowano przez monoterapię indapamidem, lekiem należącym do diuretyków, które w przeciwieństwie do wielu innych leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi, nie wykazują właściwości antyoksydacyjnych. Wskutek podaży melatoniny, u chorych znamienne zmniejszyło się stężenie MDA, a zwiększyła aktywność SOD-1 i CAT w erytrocytach, podczas gdy zmianom nie uległy stężenie GSH i aktywność GPx w krwinkach czerwonych, a także stężenia markerów stresu oksydacyjnego w osoczu: grup karbonylowych białek (wykładnik oksydacyjnych uszkodzeń białek) i azotanów/azotynów (marker biodostępności NO). Wśród mechanizmów, które mogą wyjaśnić dodatni wpływ melatoniny na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w

krwinkach czerwonych, należy rozważyć stymulację ich syntezy w erytrocytarnych komórkach prekursorowych oraz obniżone tempo inaktywacji w krążących erytrocytach. Brak istotnych zmian w przypadku parametrów mierzonych w osoczu krwi wskazuje, że bezpośrednie działanie antyoksydacyjne melatoniny w płynach krążących może mieć mniejsze znaczenie niż jej pośredni wpływ poprzez stymulację syntezy wewnątrzkomórkowych enzymów układu antyoksydacyjnego.

Przeprowadzony eksperyment pozwala na rekomendowanie suplementacji melatoniną jako terapii wspomagającej u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, zapobiegającej możliwym powikłaniom i spowalniającej komórkowe efekty starzenia.

Kolejną chorobą cywilizacyjną, w której, jak opisano powyżej, rozpatrywany jest udział stresu oksydacyjnego zarówno w etiopatogenezie, jak i w powstawaniu powikłań, jest cukrzyca typu II. Ze względu na rolę melatoniny w regulacji metabolizmu glukozy, należy również upatrywać udział jej niedoboru w rozwoju cukrzycy typu II. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono pozytywny wpływ melatoniny na prawidłową syntezę, wydzielanie i działanie insuliny, a co za tym idzie na homeostazę glukozy. Receptory MT1 i MT2 są obecne w błonie komórek β Langerhansa, działając hamująco na wydzielanie insuliny, na pinealocytach natomiast występują receptory insulinowe. U myszy pozbawionych receptorów MT1 obserwowano insulinooporność, a podaż melatoniny przywracała homeostazę glukozy. Fizjologiczne hamowanie wydzielania insuliny w godzinach nocnych przez melatoninę może być mechanizmem pozwalającym na odpoczynek komórek β , co wydłuża żywotność wysepek Langerhansa. Możliwe zależności między melatoniną a rozwojem cukrzycy były tematem wielu badań na modelach zwierzęcych i *in vitro*, ale nielicznych prowadzonych u ludzi. Dlatego w badaniu przedstawionym w pracy nr 3 grupie pacjentów w podeszłym wieku z cukrzycą typu II podawano 5 mg melatoniny dziennie na 1 godzinę przed snem przez okres 30 dni. Podobnie jak w wyżej opisanych eksperymentach, egzogenna melatonina wpłynęła na około 1,7-krotny wzrost porannych osoczowych stężeń tego hormonu, ponownie wskazując na stymulujące działanie suplementacji na szlak syntezy w pinealocytach. Podaż melatoniny u pacjentów z cukrzycą typu II obniżyła poziom peroksydacji lipidów i zwiększyła aktywność SOD-1 w erytrocytach. Stwierdzono również znamienne statystycznie spadki oksydacyjnej aktywności Cp w osoczu krwi po 30 dniach suplementacji, co wskazuje na poprawę równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, ale

może wynikać też z redukcji stanu zapalnego. **Podsumowując, wyniki badania pozwalają sugerować terapię wspomagającą z użyciem melatoniny u starszych pacjentów z cukrzycą typu II.**

Zarówno pierwotne nadciśnienie tętnicze, jak i cukrzyca typu II należą do charakterystycznych powikłań kolejnej choroby cywilizacyjnej – otyłości, która jest jednym z największych problemów zdrowotnych w krajach wysokorozwiniętych, w tym również w Polsce. Epidemia otyłości dotyczy obu płci i wszystkich grup wiekowych. Chociaż za główne przyczyny otyłości uważa się zbyt dużą podaż pokarmów i niewielką aktywność fizyczną, ostatnio zwrócono uwagę na możliwy wpływ niedoboru snu, charakterystycznego dla wysoko rozwiniętych cywilizacji. W ciągu ostatnich 100 lat długość i jakość snu uległy znaczącemu pogorszeniu we wszystkich grupach wiekowych. Badania epidemiologiczne ujawniają związek między zaburzeniami snu, a wzrostem masy ciała. Zaburzenia snu wiążą się między innymi z zaburzeniami w wydzielaniu melatoniny. Wydłużenie okresu czuwania, używanie sztucznego oświetlenia, oraz telewizorów, monitorów komputerowych i innych źródeł światła niebieskiego (o długości fali 460-480 nm) hamują syntezę tego związku.

W szeregu badań na zwierzęcych modelach otyłości potwierdzono pozytywny wpływ egzogennej melatoniny na utrzymanie prawidłowej bądź obniżenie nadmiernej masy ciała, poprawę parametrów metabolicznych oraz na zmniejszenie ryzyka rozwoju powikłań towarzyszących otyłości u badanych zwierząt. Opisany efekt podaży hormonu może opierać się na różnych mechanizmach jego działania. Jednym z opisanych skutków niedoboru snu jest insulinooporność, związana z rozwojem otyłości. Ze względu na wykazany pozytywny wpływ melatoniny na wydzielanie insuliny i homeostazę glukozy w organizmie, można rozpatrywać udział tego mechanizmu w protekcyjnym działaniu hormonu w przebiegu otyłości. U osób otyłych stwierdza się nasilony stres oksydacyjny, który może uczestniczyć w patogenezie powikłań otyłości. Nadmierna synteza ROS i upośledzona obrona antyoksydacyjna organizmu sprzyjają rozwojowi insulinooporności i zespołu metabolicznego, poprzez deregulację wydzielania adipokin i prozapalnych cytokin. W związku z tym w aspekcie ochronnego działania melatoniny przeciw negatywnym skutkom otyłości, rozpatrywane są również antyoksydacyjne właściwości tego związku.

Istotne są także właściwości melatoniny w regulacji funkcjonowania układu odpornościowego. Otyłość jest związana z przewlekłym stanem zapalnym białej tkanki

tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa u osób otyłych charakteryzuje się zwiększoną produkcją i wydzielaniem cytokin prozapalnych. Potwierdzono, że zaburzenia w działaniu układu odpornościowego i nadmierna produkcja cytokin prozapalnych należą również do skutków niedoboru snu. Wykazano, że melatonina redukuje wydzielanie przez adipocyty cytokin prozapalnych do osocza krwi. Melatonina może również działać poprzez wzrost zużycia energii przez organizm, stymulując proces tzw. „brązowienia” białej tkanki tłuszczowej do brunatnej tkanki tłuszczowej (BAT) oraz indukcję termogenicznej aktywności BAT. Co więcej, melatonina reguluje zapotrzebowanie i zużycie energii w rytmie okołodobowym, wpływając na dobową intensywność procesów metabolicznych oraz podział doby na fazę aktywności - pobierania pokarmu (wysoka wrażliwość na insulinę) i fazę odpoczynku - niepobierania pokarmu (brak wrażliwości na insulinę).

Pomimo licznych wysiłków, aby ograniczyć epidemię otyłości poprzez promowanie zdrowej diety, wysiłku fizycznego i stosowanie różnych środków farmakologicznych, skala problemu wciąż rośnie, nie tylko u dorosłych, ale i wśród dzieci. Wielu badaczy jest zgodnych, że badania *in vitro* i na modelach zwierzęcych bezspornie potwierdzają pozytywny wpływ melatoniny na zapobieganie otyłości i jej powikłaniom, jednakże tylko nieliczne badania dotyczyły podaży melatoniny u ludzi otyłych. **Z uwagi na fakt, że melatonina, dzięki swoim właściwościom, mogłaby być bardzo skutecznym i bezpiecznym suplementem wspierającym kontrolę masy ciała i zapobiegającym powikłaniom otyłości, postanowiłam ocenić wpływ egzogennej melatoniny na stres oksydacyjny, sekrecję adipokin ważnych dla metabolizmu energetycznego i statusu antyoksydacyjnego organizmu oraz na redukcję masy ciała u zdrowych osób z otyłością prostą typu I i II, którym jednocześnie zalecono dietę o obniżonej kaloryczności.** Wyniki tego eksperymentu zostały przedstawione w pracy wykazanej jako osiągnięcie naukowe pod numerem 1. Było to badanie z podwójnie ślepą próbą, randomizowane, kontrolowane placebo. Uczestnicy eksperymentu zostali w sposób losowy podzieleni na dwie równoliczne grupy: grupę spożywającą melatoninę (10 mg melatoniny) oraz grupę spożywającą placebo (laktoza). Preparat był spożywany na ok. 1 godz. przed snem przez 30 dni. Uczestnicy stosowali dietę redukcyjną – kobiety spożywały 1000-1200 kcal, a mężczyźni – 1400-1600 kcal dziennie. Należy podkreślić, że dawka podawanego hormonu była wyższa niż w dotychczas przeprowadzonych badaniach dotyczących podaży melatoniny

u osób otyłych; nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych. W pracy wykazano, że w grupie suplementującej melatoninę spadek masy ciała był większy niż w grupie przyjmującej placebo, co pozwala na rekomendowanie melatoniny jako preparatu wspomagającego regulację masy ciała. U osób na diecie redukcyjnej zaobserwowano wzmożony stres oksydacyjny i nasiloną peroksydację lipidów, natomiast podaż melatoniny pozwoliła na wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej. Otyłość jest stanem, w którym stwierdza się nasilony stres oksydacyjny i w wielu pracach potwierdzono poprawę statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego w wyniku normalizacji masy ciała. Należy jednak pamiętać, że podczas utraty nadmiernej masy ciała wraz z mobilizacją lipidów zgromadzonych w tkance tłuszczowej, z adipocytów mogą być uwalniane potencjalnie szkodliwe związki lipofilne, jak insektycydy, które indukują produkcję ROS. Taką nadmierną generację wolnych rodników wykazano w przeprowadzonym eksperymencie, obserwując wysokie stężenie 4-hydroksynonenalu (4-HNE), należącego do produktów peroksydacji lipidów, po 30 dniach stosowania diety redukcyjnej. Suplementacja melatoniną zahamowała ten proces, obniżając poziomy 4-HNE i MDA, co również wskazuje na protekcyjne działanie podaży tego hormonu podczas stosowania diety o obniżonej kaloryczności. Podczas stosowania takiej diety może też dochodzić do niewystarczającej podaży związków o działaniu antyoksydacyjnym, co mogło mieć znaczenie dla uzyskanych wyników.

Co więcej, stwierdzono stymulujący wpływ egzogenego hormonu na wydzielanie przez tkankę tłuszczową dwóch istotnych dla metabolizmu energetycznego adipokin – adiponektyny i omentyny-1. W pracach innych autorów wykazywano antyoksydacyjne właściwości tych adipokin. Adiponektyna to hormon związany z regulacją metabolizmu węglowodanów i lipidów. Zwiększa insulinowrażliwość, reguluje pobieranie i zużywanie energii, wywiera działanie przeciwzapalne, antyproliferacyjne i antyapoptotyczne. Zgodnie z wynikami badań innych autorów, w pracy numer 1 wykazano ujemną korelację między masą ciała i poziomem adiponektyny. Adipokina ta wykazuje charakterystyczny dobowy rytm wydzielania, który jest zaburzony u osób z nadmierną masą ciała. Podobnie do wyników opisanych w pracy numer 1, badania na modelach zwierzęcych również wskazują na stymulujący wpływ melatoniny na stężenia krążącej adiponektyny. Wśród mechanizmów, które mogą wyjaśniać pozytywny wpływ melatoniny na sekrecję adiponektyny, należy rozważyć wpływ indoloaminy na szlaki regulacji wydzielania tej adipokiny, poprawę funkcji mitochondriów, działanie

przeciwzapalne i antyoksydacyjne, a także zmiany w sekrecji innych adipokin. Omentyna-1 jest także adipokiną przeciwzapalną, o działaniu zwiększającym insulinowrażliwość tkanek. Obserwowano obniżone poziomy tej adipokiny w przebiegu otyłości. Jednakże eksperyment opisany w pracy numer 1 jest pierwszym, w którym badano wpływ melatoniny na wydzielanie omentyny-1 i wykazano stymulujące działanie egzogennej indoloaminy na sekrecję tej adipokiny. Nie stwierdzono natomiast wpływu 30-dniowej suplementacji melatoniną na wydzielanie adipokin, które w innych badaniach powiązano dodatnio z otyłością i jej powikłaniami, a mianowicie leptyną i rezystyną. Zaobserwowano natomiast dodatnią korelację między leptyną i BMI, a ujemną korelację między leptyną a omentyną-1, co wskazało na istnienie wzajemnych zależności regulacyjnych między syntezą i wydzielaniem tych adipokin. **Konkludując, wykazano pozytywny wpływ egzogennej melatoniny na obniżenie masy ciała, redukcję stresu oksydacyjnego oraz regulację wydzielania adipokin koordynujących homeostazę energetyczną organizmu i działających antyoksydacyjnie u zdrowych osób z otyłością prostą I i II stopnia stosujących dietę o ograniczonej kaloryczności. Badania te wskazują, że suplementacja melatoniną może stanowić skuteczną terapię wspierającą i ułatwiającą poprawę stanu zdrowia w leczeniu otyłości i w profilaktyce jej powikłań.**

Współczesne społeczeństwa szybko się starzeją, a długość życia ciągle wzrasta. W Polsce od 2000 roku długość życia kobiet rośnie przeciętnie co roku o ponad 2 miesiące, a mężczyzn o niespełna 2 miesiące. Z danych Głównego Urzędu Statystycznego wynika, że w 2016 roku mężczyźni w Polsce żyli przeciętnie 73,9 lat, natomiast kobiety 81,9 lat. Z wiekiem rośnie ryzyko rozwoju chorób cywilizacyjnych, które urastają w wysoce rozwiniętych krajach do rozmiarów epidemii. Badania umożliwiające pełniejsze zrozumienie patofizjologii procesów zachodzących w starzejącym się organizmie są kluczowe dla opracowania nowych, skutecznych terapii zarówno leczniczych, jak i profilaktycznych, zapobiegających szczególnie niebezpiecznym powikłaniom i poprawiających jakość życia osób starszych. Potwierdzenie hipotez o udziale procesów wolnorodnikowych w procesach starzenia i w rozwoju chorób cywilizacyjnych zwraca uwagę na znaczenie terapii poprawiających obronę antyoksydacyjną organizmu w profilaktyce i prewencji chorób przewlekłych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań pozwoliły na lepsze poznanie odpowiedzi organizmu człowieka na podaż

melatoniny wskazując, że suplementacja tym hormonem może być szczególnie polecaną terapią wspomagającą dla osób starszych. Związek ten jest bezpieczny dla organizmu człowieka, ma bezpieczny profil działania, a jego niedobór w przebiegu starzenia i chorób cywilizacyjnych został potwierdzony w przedstawionych doświadczeniach. Co ważne, badania te wskazały na bezsporny pozytywny wpływ egzogennej melatoniny na obronę antyoksydacyjną we krwi badanych osób, zarówno zdrowych w różnych przedziałach wiekowych, jak i pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą typu II i otyłością. W przypadku pacjentów otyłych, istotne było również wykazanie wpływu suplementacji melatoniną na regulację endokrynnych funkcji tkanki tłuszczowej i utratę masy ciała. Egzogenna melatonina może znacznie poprawić przebieg i skuteczność terapii mających na celu redukcję masy ciała, jednocześnie chroniąc organizm przed możliwymi skutkami generowanego stresu oksydacyjnego.

Podsumowując można stwierdzić, że opisany cykl publikacji stanowiący szczególne osiągnięcie naukowe znacząco przyczynił się do lepszego poznania zmian w układzie oksydacyjno-antyoksydacyjnym w przebiegu procesu starzenia się organizmu i rozwoju chorób cywilizacyjnych, a także dostarczył nowych informacji naukowych na temat wpływu egzogennej melatoniny na zjawiska wolnorodnikowe zachodzące w organizmie człowieka w stanach fizjologicznych i patologicznych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza omówionym powyżej cyklem 5 publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, w skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi także 39 innych publikacji naukowych, w tym: 18 prac oryginalnych, 4 prace pogładowe, 4 prace popularno-naukowe, współautorstwo 2 podręczników i 11 rozdziałów w podręcznikach. Sumaryczny *Impact Factor* tych publikacji wynosi 23.270 (258 pkt wg MniSW), w tym 11.275 IF jako pierwszy autor prac.

Charakterystykę pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, jakie uzyskałam w okresie mojej pracy zawodowej przedstawiam poniżej.

Studia na kierunku biologia, specjalizacja biologia molekularna, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu rozpoczęłam w roku 1993. Badania stanowiące podstawę mojej pracy magisterskiej prowadziłam w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Michała Komoszyńskiego. W pracowni magisterskiej miałam okazję poznać szerokie spektrum analitycznych metod biochemicznych związanych z izolacją i oczyszczaniem białek oraz badaniem ich właściwości fizyko-chemicznych i kinetycznych, w tym metody chromatografii adsorpcyjnej powinowactwa, chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), metody wyznaczania masy cząsteczkowej białek przy użyciu elektroforezy poliakrylamidowej z użyciem dodecylosiarczanu sodu (SDS) oraz filtracji żelowej, a także preparatykę z użyciem ultrawirowania w gradiencie stężeń sacharozy. Celem moich badań była identyfikacja enzymów uczestniczących w przemianach adenozy-5'-monofosforanu (AMP) w synapsach kory mózgu ssaków (na modelu *Sus scrofa* f. *domestica*), opracowanie metody ich izolacji i oczyszczania, a także opisanie właściwości fizyko-chemicznych i kinetycznych. Wynikiem mojej pracy było opracowanie wysoce wydajnej procedury izolacji z kory mózgu *Sus scrofa* f. *domestica* synaptosomów o wysokiej czystości, a także opracowanie metody izolacji z synaptosomów białka o aktywności 5'-nukleotyduazy. W moich badaniach wykazałam, że 5'-nukleotyduaza z synaptosomów jest glikoproteiną obecną w szczelinie synaptycznej, hamowaną przez ATP, ADP i jony metali ciężkich, a aktywowaną jonami wapnia. Ponadto wykryłam w synaptosomach aktywność deaminazy adenozy-5' i brak aktywności deaminazy adenylianowej. Uzyskane badania dały podstawę do przedstawienia najbardziej prawdopodobnego szlaku przemian ektopuryn w szczelinie synaptycznej kory mózgu świni domowej (apiraza – 5'-nukleotyduaza – deaminaza adenozy-5'). Wyniki przeprowadzonych badań zostały przeze mnie opisane w pracy magisterskiej, którą obroniłam w czerwcu 1998 roku.

Po ukończeniu studiów, pragnęłam nadal rozwijać swoje zainteresowania naukowe, szczególnie w zakresie nauk biochemicznych. W listopadzie 1998 roku zostałam przyjęta na studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu

Mikołaja Kopernika w Toruniu). Studia w w/w Jednostce umożliwiły mi poszerzenie swojego warsztatu badawczego o znajomość preparatyki materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego (krew, tkanki), fluorymetrycznej metody oznaczania selenu, metod spektrofotometrycznych wykorzystywanych do oznaczania stężeń produktów peroksydacji lipidów i antyoksydantów niskocząsteczkowych oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Uczyłam się również planowania i realizacji badań z udziałem ludzi, analizowania wyników, metod statystycznych i pisanie prac naukowych.

Badania stanowiące tematykę mojej pracy doktorskiej przeprowadzałam w latach 1998-2002 pod opieką Pana Prof. dr hab. Bronisława A. Zachary. W pracy wykazałam, że zarówno pacjenci z gruczolakorakiem gruczołu krokowego (PC), jak i z łagodnym przerostem gruczołu (BPH) charakteryzują się obniżonym statusem selenowym, co mogło wskazywać na zaburzone wchłanianie, metabolizm i wydalanie tego pierwiastka w chorobach stercza. Niskie stężenia Se korelowały ze stopniem złośliwości nowotworu wg Gleasona, niski status selenowy był więc raczej skutkiem, a nie przyczyną choroby nowotworowej. Ponadto również u zdrowych mężczyzn województwa kujawsko-pomorskiego zaobserwowałam niskie stężenia Se we krwi, co świadczyło o niedostatecznej podaży tego mikroelementu w diecie mieszkańców tego regionu. Badania te mogły stanowić wskazanie do suplementacji selenu w w/w województwie. Zarówno u chorych z PC, jak i pacjentów z BPH, stwierdziłam zaburzoną obronę antyoksydacyjną w krwinkach czerwonych. W badaniach związanych z pracą doktorską zajmowałam się również stężeniem selenu i obroną antyoksydacyjną w komórkach zdrowej i zmienionej nowotworowo tkanki stercza. Wykazałam, że komórki gruczolakoraka stercza, podobnie do innych nowotworów, akumulują selen w stopniu wyższym niż tkanka prawidłowa i akumulacja ta nasila się ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu. Pierwiastek ten mógł być w komórkach rakowych gruczołu krokowego wbudowywany do selenobiałek, takich jak reduktaza tioredoksyny lub specyficzne dla stercza białko 15-kDa. Jednocześnie wykazałam obniżoną enzymatyczną obronę antyoksydacyjną w komórkach gruczolakoraka stercza w zakresie układu glutationozależnego. Podczas studiów doktoranckich przygotowałam dwie publikacje poglądowe dotyczące tematyki mojej pracy badawczej (część II.D.b. wykazu, poz. 1 i 2). Miałam również możliwość prezentowania wstępnych wyników mojej pracy w formie ustnego referatu na międzynarodowej konferencji w Jenie, Niemcy (II.K.1), a formą

pisemną prezentacji była pełnotekstowa praca oryginalna opublikowana w materiałach zjazdowych w/w konferencji (II.D.a.1).

Pracę doktorską pt. „Selen i niektóre antyoksydanty we krwi i w tkance nowotworowej chorych z łagodnym przerostem i z rakiem gruczołu krokowego” obroniłam w listopadzie 2002 roku. Moja rozprawa doktorska otrzymała wyróżnienie nadane przez Akademię Medyczną im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski, w uznaniu jej szczególnych wartości. Wyniki pracy zostały przedstawione w dwóch artykułach opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (II.A. 2 i 3). W marcu 2003 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Biochemii ówczesnej Akademii Medycznej w Bydgoszczy, a w roku 2008 na stanowisku adiunkta w tej samej jednostce.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych z zakresu biologii medycznej moje zainteresowania naukowe zogniskowały się na zagadnieniach stresu oksydacyjnego w przebiegu procesów fizjologicznego starzenia się i chorób przewlekłych towarzyszących starzeniu. Kontynuowałam między innymi badania dotyczące obrony antyoksydacyjnej we krwi pacjentów w podeszłym wieku z gruczolakorakiem stercza i z łagodnym przerostem tego gruczołu. Stwierdziłam osłabienie mechanizmów antyoksydacyjnych zarówno u chorych z gruczolakorakiem, jak i z łagodnym przerostem gruczołu krokowego, jednakże wzorzec zaobserwowanych zaburzeń był odmienny, co pozwoliło mi na wskazanie, że obu schorzeń nie łączy związek przyczynowo-skutkowy (II.A.9). Uczestniczyłam również w szeregu badań związanych ze stresem oksydacyjnym u osób w podeszłym wieku we współpracy z Katedrą i Kliniką Geriatrii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badania te dotyczyły między innymi wykładników stresu oksydacyjnego u ludzi w wieku podeszłym z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. W przeprowadzonych doświadczeniach potwierdzono, że pierwotne nadciśnienie tętnicze u osób starszych jest związane z wyższym poziomem oksydacyjnych uszkodzeń białek i peroksydacji lipidów, a także z zaburzonym statusem antyoksydacyjnym (II.A.a.1). Co więcej, w pracy wykazano, że biodostępność wazodylatacyjnego tlenu azotu jest obniżona nie tylko w grupie pacjentów w podeszłym wieku z nadciśnieniem tętniczym, ale również u normotensyjnych osób starszych. Badania te znalazły potwierdzenie w kolejnym eksperymencie, mającym na celu porównanie wpływu terapii hipotensyjnej przy użyciu diuretyków i leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny na

wykładniki stresu oksydacyjnego u starszych pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (II.A.a.4). Zaobserwowano, że obie terapie są skuteczne w regulacji ciśnienia tętniczego i poprawie funkcji śródbłonna naczyń, natomiast tylko zastosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny skutkowało wzmocnieniem mechanizmów antyoksydacyjnych. Ponadto, w innych pracach z moim udziałem (II.A.a. 7 i 8) wykazano udział antyoksydacyjnego układu glutationozależnego w regulacji ciśnienia tętniczego krwi oraz rolę zaburzeń funkcjonowania tego układu w patogenezie pierwotnego nadciśnienia tętniczego u pacjentów w wieku powyżej 60 roku życia. Kontynuując tematykę wraz z zespołem zaobserwowaliśmy również zaburzoną równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną u chorych w wieku podeszłym z cukrzycą typu II (II.D.a. 3 i 7) oraz obniżoną zdolność neutrofilii do odpowiedzi immunologicznej przez upośledzenie wybuchu tlenowego u starszych pacjentów zarówno w przypadku pierwotnego nadciśnienia tętniczego, jak i cukrzycy typu II (II. D.a.4).

Moje zainteresowanie fizjopatologicznymi aspektami procesu starzenia się zaowocowało współuczestnictwem w projekcie badawczym zamawianym Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego zatytułowanym „Aspekty medyczne, psychologiczne, socjologiczne i ekonomiczne starzenia się ludzi w Polsce – Program PolSenior”. Razem ze współpracownikami z Katedry i Zakładu Biochemii byliśmy współwykonawcami tego projektu, przygotowując wspólnie z Katedrą Geriatrii Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu wniosek do projektu, a także przeprowadzając oznaczenie parametrów biochemicznych (wykładniki stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego) i analizę statystyczną tych wyników. Badania przeprowadzone na populacji osób w podeszłym wieku pozwoliły na stwierdzenie ujemnej korelacji między stężeniem podstawowych enzymów antyoksydacyjnych w krwinkach czerwonych, a wiekiem badanych osób, potwierdzając upośledzenie mechanizmów antyoksydacyjnych w przebiegu procesu starzenia się (III.B. 19 i 25). Zaobserwowaliśmy również znamienne obniżenie z wiekiem stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu – IGF-1 oraz białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu - IGFBP-3, co wskazywało na zaburzenie osi hormon wzrostu – insulinopodobny czynnik wzrostu w podeszłym wieku, podczas gdy poziom melatoniny w grupach osób w wieku 55-60, 66–80, 81-90 oraz powyżej 90 lat był porównywalny (III.B.14).

Następnym celem badawczym stała się dla mnie analiza układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego u pacjentów w podeszłym wieku w przebiegu

choroby niedokrwiennej serca i jej terapii przy użyciu metody angioplastyki tętnic wieńcowych. We współpracy z Kliniką Kardiologii i Kardiochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką SP ZOZ w Bydgoszczy przygotowałam koncepcję i plan badań projektu pt. „Wybrane parametry układu pro- i antyoksydacyjnego we krwi pacjentów z chorobą wieńcową leczonych metodą angioplastyki wieńcowej”, którego realizację rozpoczęłam w 2006 roku. W ramach tego projektu przeprowadziłam analizę aktywności enzymów antyoksydacyjnych, stężenia melatoniny, zredukowanego glutationu oraz produktów peroksydacji lipidów i białka C-reaktywnego u chorych ze stabilną dławicą piersiową w przebiegu leczenia metodą angioplastyki wieńcowej oraz u pacjentów bez zwężenia naczyń wieńcowych w ocenie koronarograficznej. Najważniejsze wyniki tego eksperymentu opisane zostały w publikacji wskazanej jako szczególne osiągnięcie naukowe (praca numer 2) w części 4 tego autoreferatu. Wykazałam ponadto, że u pacjentów z potwierdzoną koronarograficznie chorobą wieńcową serca występuje zwiększony stres oksydacyjny, a stężenie melatoniny jest znamienne niższe niż u pacjentów bez zmian w obrębie naczyń wieńcowych (III.B. 17 i 23). Zaobserwowałam również modyfikacje w poziomie melatoniny i stresu oksydacyjnego w zależności od liczby naczyń wieńcowych zajętych zmianami miażdżycowymi, przedstawione w kolejnych pracach wysłanych do druku.

Poszukując nowych możliwości oceny równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu, zaangażowałam się we wdrożenie metod immunoenzymatycznych w Katedrze i Zakładzie Biochemii, aktywnie uczestnicząc m. in. w opracowaniu szczegółowej metodyki oznaczania melatoniny w naszym laboratorium. Wprowadzone metody pozwoliły na poszerzenie prowadzonych badań o nowe wykładniki stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego.

W kolejnych latach pracy badawczej skoncentrowałam się na próbach poprawy statusu antyoksydacyjnego przez zastosowanie suplementów o znanych właściwościach neutralizowania reaktywnych form tlenowych. Szczególne zainteresowanie naszego zespołu wzbudziła możliwość interwencji przy użyciu melatoniny, hormonu wykazującego silne właściwości antyoksydanta zarówno hydro-, jak i lipofilnego. Uczestniczyłam w zaprojektowaniu i przeprowadzeniu serii eksperymentów, w których suplementacją melatoniną objęto zarówno zdrowych ludzi młodych, zdrowych osób w podeszłym wieku, jak i ludzi starszych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą typu II. Badania te zostały szczegółowo

przedstawione w trzech publikacjach wskazanych jako główne osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (publikacje numer 3, 4 i 5). Wyniki te stały się również podstawą do napisania kolejnych publikacji dotyczących wpływu czasu suplementacji melatoniną na równowagę pro- i antyoksydacyjną u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą typu II (II.A.a 5 oraz II.D.a. 2 i 5). Kontynuując tematykę wraz z zespołem przeprowadziliśmy również eksperyment dotyczący wpływu suplementacji koenzymem Q10 na procesy oksydacyjno-antyoksydacyjne u osób starszych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą typu II (II.A.a.6 i II.D.a.6). W pracach tych stwierdzono stymulujący wpływ egzogenego CoQ na aktywność enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej w badanych grupach pacjentów.

Nowym kierunkiem badawczym, który wzbudził moje zainteresowanie, były badania dotyczące efektów suplementacji melatoniną na organizm osób zdrowych, poddanych wybranym czynnikom stresogennym. Badania te dotyczyły między innymi skutków suplementacji melatoniną u osób uprawiających sport wyczynowy. Stwierdzono stymulujący wpływ egzogenego hormonu na glutationozależny antyoksydacyjny układ enzymatyczny, a także obniżenie poziomu peroksydacji lipidów i stanu zapalnego u osób poddanych intensywnemu wysiłkowi fizycznemu (III.B.26). Uczestniczyłam też w badaniach dotyczących stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego u zawodowych nurków pod wpływem powietrznych ekspozycji hiperbarycznych oraz wpływu suplementacji melatoniną na w/w parametry (III.B. 16, 18 i 20).

Kolejnym czynnikiem stresogennym, który wzbudził moje zainteresowanie, był wpływ niskiej temperatury na organizm człowieka. W roku 2014 podjęłam współpracę naukową z Katedrą Biologii Medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w zakresie badań nad wpływem immersji w zimnej wodzie na wykładniki stresu oksydacyjnego u osób zdrowych. Wynikiem tej współpracy było między innymi współautorstwo rozdziału w monografii (II.D.d.11), a także publikacja naukowa (II.D.a.8). W pracy tej wykazano, że u osób regularnie korzystających z kąpeli zimowych system antyoksydacyjny wykazuje wzmożoną obronę przed niekorzystnym działaniem reaktywnych form tlenu podczas ekspozycji na zmiany temperatury otoczenia, co zapobiega uszkodzeniom na poziomie komórkowym. Zaobserwowano ponadto, że stosowanie sauny po zanurzeniu w zimnej

wodzie może stanowić dodatkowe źródło stresu oksydacyjnego, poddając dyskusji zasadność rozgrzewania ciała w saunie bezpośrednio po kąpieli zimowej.

W Katedrze Biologii Medycznej zostałam zatrudniona w styczniu 2015 roku na stanowisku asystenta, a w lutym 2016 roku – na stanowisku adiunkta. Na stanowisku tym pracuję do dziś. **W w/w Jednostce kontynuowałam swoje badania dotyczące możliwości modyfikacji stresu oksydacyjnego w przebiegu chorób cywilizacyjnych poprzez suplementację melatoniną.** Moje szczególne zainteresowanie wzbudziła możliwość zastosowania tego hormonu w terapii osób otyłych, czego efektem jest jedna z prac stanowiących cykl publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (publikacja numer 1). Kwerenda bibliograficzna i pogłębiona analiza wyników dotychczasowych badań na modelach zwierzęcych i z udziałem ludzi pozwoliła na przygotowanie pracy pogładowej (II.A.b.2) dotyczącej wzajemnych zależności między melatoniną, a głównymi adipokinami kontrolującymi metabolizm energetyczny organizmu – leptyny i adiponektyny, która powstała we współpracy z Panem Prof. Russelem J. Reiterem z University of Texas Health Science Center w San Antonio, USA. Szczególnie cennym wnioskiem zawartym w tej publikacji było wykazanie, że pozytywny wpływ podaży melatoniny na normalizację masy ciała i sekrecję adipokin zależy od wzorca suplementacji, który powinien zachowywać naturalny rytm wydzielania tego hormonu. W Katedrze Biologii Medycznej zorganizowałam pracownię badań immunoenzymatycznych, co umożliwiło naszemu zespołowi rozszerzenie prowadzonych eksperymentów o oznaczanie stężeń wykładników stresu zapalnego, jak cytokiny pro- i przeciwzapalne, wybranych hormonów, czy adipokin wydzielanych przez tkankę tłuszczową. W celu poszerzenia swojej wiedzy i praktycznych umiejętności laboratoryjnych, w 2016 roku rozpoczęłam studia podyplomowe z zakresu analityki medycznej na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, które ukończyłam w czerwcu 2017 roku, uzyskując tytuł zawodowy diagnosty laboratoryjnego.

Równolegle do prowadzonych badań eksperymentalnych wchodzących w zakres moich głównych zainteresowań naukowych w ostatnich latach aktywnie uczestniczyłam też w innych pracach badawczych. Wspólnie z Kliniką Foniatrii i Audiologii oraz Katedrą i Zakładem Laseroterapii i Fizjoterapii prowadziłam badania związane z możliwością identyfikacji zmian przednowotworowych i nowotworowych głowy i szyi przy użyciu

metod diagnostyki autofluorescencyjnej. Owoce tej współpracy jest publikacja w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (II.A.a.10), w której wykazano, że metody autofluorescencyjne mogą być użyteczne w diagnostyce różnicowej zmian patologicznych w obrębie nabłonka gardła i krtani. Zaobserwowano różnice zarówno w intensywności autofluorescencji, jak i w kształcie widma emisji po wzbudzeniu falą o długości 290 nm dla różnych zmian patologicznych nabłonka gardła i krtani, co wskazuje, że wybrana długość fali jest odpowiednia dla celów diagnostycznych.

Ze współpracownikami w Katedrze Biologii Medycznej zainicjowaliśmy również badania naukowe z zakresu parazytologii. Utworzyliśmy laboratorium diagnostyki parazytologicznej, celem prowadzenia badań stanowiących poszerzenie i pogłębienie wiedzy w zakresie aktualnej sytuacji epidemiologicznej chorób pasożytniczych w województwie kujawsko-pomorskim. Badania te dotyczą między innymi kontaminacji jajami i larwami pasożytów terenów rekreacyjnych na terenie miasta Bydgoszczy przy użyciu systemu ParaSys™ i diagnostyki mikroskopowej. Przeprowadziliśmy również eksperyment dotyczący prewalencji nużeńca ludzkiego u młodych ludzi dorosłych regionu kujawsko-pomorskiego (III.B.28). Planujemy także badania dotyczące wpływu wybranych parazytoz na układ pro- i antyoksydacyjny we krwi osób chorych. W tym celu nawiązaliśmy współpracę z Uniwersyteckim Centrum Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, której celem jest ocena stresu oksydacyjnego we krwi pacjentów z malarią oraz jego zmian w przebiegu leczenia malarii. W ramach przygotowań merytorycznych do przeprowadzenia tego eksperymentu, uczestniczyłam w opracowaniu publikacji pogładowej dotyczącej jednego z mniej poznanych gatunków zarodźca malarii - *Plasmodium knowlesi* (II.A.b.1).

W najbliższej przyszłości planuję jednakże przede wszystkim kontynuować badania dotyczące stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz funkcji endokrynnej tkanki tłuszczowej w przebiegu otyłości i jej powikłań, jak cukrzyca typu II i niealkoholowe stłuszczenie wątroby. Zamierzam przeanalizować wpływ suplementacji melatoniną na insulinooporność i poziom wybranych cytokin pro- i przeciwzapalnych u osób z otyłością prostą stosujących dietę redukcyjną. Moją uwagę zwróciły również badania wskazujące, że z chronicznymi schorzeniami takimi, jak cukrzyca typu 2, powikłania sercowo-naczyniowe i miażdżyca, może korelować niedobór witaminy D. W tkance tłuszczowej osób otyłych dochodzi do sekwestracji witaminy D, co wiąże się z jej upośledzoną biodostępnością. Ze względu na fakt, że

synteza zarówno melatoniny, jak i 25-hydroksycholekalcyferolu jest zależna od światła słonecznego, a także ich analogiczne działanie immunomodulujące i antyoksydacyjne, sugeruje się, że sekrecja i działanie obu hormonów może podlegać wspólnym mechanizmom regulacyjnym. W literaturze brakuje danych potwierdzających te powiązania. Dlatego zamierzam oszacować wzajemne zależności między poziomem melatoniny i 25-hydroksycholekalcyferolu u osób zdrowych o prawidłowej masie ciała oraz u osób z otyłością i jej powikłaniami. Chciałabym przeprowadzić badania umożliwiające określenie korelacji między witaminą D, melatoniną, a wykładnikami stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, a także sekrecją adipokin kluczowych dla metabolizmu energetycznego. Nieprawidłowa funkcja endokryjna tkanki tłuszczowej, przewlekły stan zapalny i wzmożony stres oksydacyjny są rozważane w patofizjologii powikłań otyłości. Wyjaśnienie roli witaminy D i melatoniny, oraz ich współdziałania w modulacji tych procesów uważam za cenne w aspekcie ich protekcyjnej suplementacji. Badania te zamierzam przeprowadzić głównie wykorzystując metody immunoenzymatyczne ELISA, wysokosprawną chromatografię cieczową – HPLC, a także kinetyczne metody spektrofotometryczne. W związku z planami badawczymi nawiązałam współpracę z Kliniką Endokrynologii i Diabetologii Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, aby przeprowadzić cykl badań dotyczących możliwych zależności między stężeniem melatoniny i witaminy D, a wybranymi adipokinami u chorych z wyrównaną cukrzycą typu II. Planuję również badania związane z poziomem wybranych adipokin, melatoniną, 25-hydroksycholekalcyferolem i stresem oksydacyjnym u pacjentów z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby, w tym u pacjentów pediatrycznych.

Karolina Szewczyk-Golec