



**UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM**

**Autoreferat
przedstawiający opis osiągnięć naukowych w języku polskim**

dr Paweł Paśko

**Zakład Bromatologii
Wydział Farmaceutyczny UJ CM
Kraków 2018**

Spis treści

I.	Informacje osobowe.....	3
II.	Ogólna charakterystyka działalności naukowej.....	4
III.	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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):.....	5
	1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
	2. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
	2.1.Wprowadzenie w tematykę badawczą.....	7
	2.2.Zwierzęce modele uszkodzenia tarczycy.....	13
	3. Szczegółowe omówienie osiągniętych wyników.....	14
	4. Podsumowanie.....	27
IV.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	30
	1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych.....	30
	2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych.....	31
V.	Piśmiennictwo.....	33

I. Informacje osobowe

1. Imię i nazwisko: Paweł Paško (ur. 1 kwietnia 1979 r. w Nowym Targu)

2. Posiadane dyplomy

- dyplom magistra farmacji, 2003, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum. Tytuł pracy: *„Tłuszcze w diecie człowieka – ocena spożycia, czynniki wpływające na ich wybór oraz wiedza na temat aspektów zdrowotnych wśród mieszkańców Małopolski”*
- dyplom doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem, 2009, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum. Tytuł rozprawy: *„Właściwości antyoksydacyjne nasion i kielków szarłatu wyniosłego i komosy ryżowej oraz ich wpływ na wybrane wskaźniki układu antyoksydacyjnego w badaniach in vitro i in vivo”*; promotor: prof. dr hab. Zofia Zachwiejowa; recenzenci: prof. dr hab. Regina Olędzka, prof. dr hab. Zbigniew Janeczko
- prawo wykonywania zawodu Farmaceuty, 2004

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

- 2003-2009 – Zakład Bromatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego; etat naukowo – techniczny
- 2010-2013 - Zakład Bromatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum; etat naukowo – dydaktyczny – asystent
- 2014- do chwili obecnej – Zakład Bromatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum; etat naukowo – dydaktyczny – adiunkt

- 2010-2012 – Instytut Ratownictwa Medycznego, Podhalańska Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Nowym Targu – wykładowca
- 2012-2017 – Zakład Medycyny Ratunkowej, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w Krakowie – adiunkt

II. Ogólna charakterystyka działalności naukowej

Moja działalność naukowa związana jest z szeroko rozumianą rolą żywienia i żywności w profilaktyce i leczeniu schorzeń niezakaźnych, z bardzo istotnym naciskiem na badanie i poszerzanie wiedzy o interakcjach żywności z lekami. Celem nadrzędnym, przyświecającym moim badaniom, jest wprowadzenie na rynek produktów, które można będzie uznać za żywność funkcjonalną o potwierdzonym korzystnym działaniu na organizm i udowodnionym profilu bezpieczeństwa. Z racji interdyscyplinarnego charakteru moich badań, wykorzystywane są w nich metody badawcze stosowane również w farmakognozji, farmakologii, czy biologii molekularnej i biochemii.

Fascynacja produktami naturalnymi i roślinami towarzyszy mi od wczesnej młodości, a bodźcem do szerszego zainteresowania się tymi zagadnieniami były zajęcia z farmakognozji, botaniki farmaceutycznej i bromatologii, które realizowałem studiując na kierunku farmacja w Collegium Medicum UJ w latach 1998-2003. Już w trakcie studiów poszerzałem swoje zainteresowania naukowe w sposób praktyczny, poprzez udział w pracach kół naukowych przy Katedrze Farmakodynamiki UJ CM oraz przy Zakładzie Bromatologii UJ CM, w którym zostałem zatrudniony na etacie technicznym jeszcze podczas studiów. Po obronie pracy magisterskiej, dalszą pracę naukową kontynuowałem pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Zachwiejowej, mojej Mentorki oraz późniejszego promotora przewodu doktorskiego. Moje zainteresowania naukowe skupiały się wtedy głównie na badaniu pseudozbóż, ze szczególnym uwzględnieniem szarlatu wyniosłego (*Amaranthus cruentus*) i komosy ryżowej (*Chenopodium quinoa*), czego efektem był interdyscyplinarny projekt doktorski, wykorzystujący metody *in vitro* i *in vivo*. Zainteresowania moje poszerzałem, angażując się w międzynarodową współpracę naukową pod kierunkiem prof. Sheli Gorinstein z Uniwersytetu w Jerozolimie (Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, School of Pharmacy, The Hebrew University of Jerusalem, Israel). Miało to bardzo istotny wpływ na mój rozwój naukowy i zaowocowało, do dnia dzisiejszego, wieloma ciekawymi projektami naukowymi z pogranicza bromatologii i biochemii, oraz publikacją wyników w renomowanych czasopismach naukowych. W ramach tej współpracy odbyłem również staż naukowy (w roku 2015) we wspomnianej jednostce.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuuję, również we współpracy z innymi jednostkami Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, Wydziału Lekarskiego UJ CM oraz partnerami zagranicznymi (Izrael, Portugalia, Irlandia), czy też przemysłem spożywczym (Uniflora sp. z o o), badania ściśle związane z: (1) różnymi aspektami analizy żywności, ze szczególnym uwzględnieniem składników środków spożywczych wykazujących działanie tyreotoksyczne, cytotoksyczne, antyoksydacyjne, antydrobnoustrojowe, (2) wpływem leków na gospodarkę pierwiastkami (selen, miedź, cynk), (3) fortyfikacją kielków jako jednym z procesów prowadzących do wytworzenia żywności funkcjonalnej.

Od dawna w kręgu moich ścisłych zainteresowań naukowych była też farmakologia kliniczna. Szczególnie pasjonuje mnie farmakoterapia w medycynie ratunkowej, dlatego w 2016 roku rozpocząłem trzyletnie szkolenie specjalizacyjne

z farmakologii w Studium Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Aktualnie mój cały dorobek naukowy obejmuje **74** artykuły oryginalne i przeglądowe, z których **37** to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z impact factorem (IF), **8** to recenzowane prace anglojęzyczne w czasopismach bez IF oraz **29** to artykuły w recenzowanych czasopismach polskojęzycznych. Dodatkowo jestem autorem **71** doniesień i komunikatów zjazdowych, z czego **23** międzynarodowych, a **48** krajowych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF publikacji recenzowanych wynosi **79,435** co odpowiada **1088** punktom w klasyfikacji MNiSW. Całkowita liczba cytowań wynosi **485**, a indeks Hirscha jest równy **11**. Do chwili obecnej brałem udział jako główny wykonawca lub wykonawca łącznie w **18** projektach naukowych, przy czym były to granty zamawiane (3), granty statutowe (6) badania własne (8) oraz badania we współpracy z przemysłem (1).

III. 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Na przedstawione do oceny w ramach postępowania habilitacyjnego osiągnięcie naukowe, zatytułowane „**Związki biologicznie aktywne warzyw kapustnych – krytyczna ocena wpływu na wybrane parametry biochemiczne funkcjonowania tkanek i narządów**” składa się monotematyczny cykl **6** publikacji, o łącznym **IF =14,93** i sumie punktów **MNiSW=175**. We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji:

H-1. Paško, P., Galanty, A., Żmudzki, P., Gdula-Argasińska, J., Zagrodzki P. (2018). Influence of Different Light Conditions and Time of Sprouting on Harmful and Beneficial Aspects of Rutabaga Sprouts in Comparison to Their Roots and Seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018 accepted for publication 31 May 2018 doi: 10.1002/jsfa.9188

IF = 2,463 MNiSW=35

H-2. Pasko, P., Sulkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B., & Zagrodzki, P. (2014). Serotonin, melatonin, and certain indole derivatives profiles in rutabaga and kohlrabi seeds, sprouts, bulbs, and roots. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 740-745.

IF = 2,416 MNiSW=35

H-3. Pasko, P., Bukowska-Strakova, K., Gdula-Argasinska, J., & Tyszka-Czochara, M. (2013). Rutabaga (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*) seeds, roots, and sprouts: a novel kind of food with antioxidant properties and proapoptotic potential in Hep G2 hepatoma cell line. *Journal of Medicinal Food*, 16(8), 749-759.

IF = 1,699 MNiSW=25

H-4. Paško, P., Tyszka-Czochara, M., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Żmudzki, P., Bartoń, H., Zagrodzki P., & Gorinstein, S. (2018). Comparative study of predominant phytochemical compounds and proapoptotic potential of broccoli sprouts and florets. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73:95–100.

IF = 2,368 MNiSW= 35

H-5. Paško, P., Okoń, K., Krośniak, M., Prochownik, E., Żmudzki, P., Kryczyk-Kozioł, J., & Zagrodzki, P. (2018). Interaction between iodine and glucosinolates in rutabaga sprouts and selected biomarkers of thyroid function in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 46, 110-116.

IF = 3,225 MNiSW=20

H-6. Paško, P., Krośniak, M., Prochownik, E., Tyszka-Czochara, M., Fołta, M., Francik, R., Sikora, J., Malinowski, M., & Zagrodzki, P. (2018). Effect of broccoli sprouts on thyroid function, haematological, biochemical, and immunological parameters in rats with thyroid imbalance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 82-90.

IF = 2,759 MNiSW=25

2. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Celem badań, w efekcie których powstał cykl publikacji składający się na moją rozprawę habilitacyjną, była analiza składu chemicznego wybranych kiełków warzyw kapustnych (brukiew i brokuł), ocena ich aktywności biologicznej oraz zbadanie wpływu przewlekłego spożycia tych kiełków na funkcję tarczycy szczurów, zarówno w warunkach prawidłowych, jak i w modelach niedoczynności tarczycy. Dodatkowo przeanalizowano wpływ modyfikacji diety zwierząt na wybrane parametry antyoksydacyjne, hematologiczne, biochemiczne oraz immunologiczne.

Realizując główny cel badań skoncentrowałem się na następujących aspektach szczegółowych:

1. Analiza składu chemicznego
 - a. Opracowanie warunków hodowli (wpływ czasu uprawy oraz dostępu światła) kiełków brukwi

- b. Analiza jakościowa i ilościowa związków siarkowych, flawonoidów, kwasów fenolowych oraz kwasów tłuszczowych w kiełkach brukwi i brokułów
 - c. Dodatkowa analiza składu korzeni brukwi oraz różyczek brokułów
2. Badania biologiczne
- a. Ocena aktywności antyoksydacyjnej badanego materiału roślinnego
 - b. Ocena aktywności cytotoksycznej oraz proapoptotycznej badanego materiału
 - c. Ocena selektywności działania badanego materiału

Dzięki wynikom badań składu chemicznego, a szczególnie zawartości progoitryny, wytypowano rodzaj kiełków brukwi najbardziej odpowiedni do dalszych badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. Natomiast kiełki brokułów, również wykorzystane w eksperymencie z udziałem zwierząt laboratoryjnych, to kiełki komercyjnie dostępne, stanowiące układ porównawczy wobec badań nad kiełkami brukwi, które dotychczas nie były zbadane, i są proponowane jako nowy rodzaj żywności funkcjonalnej.

3. Badania *in vivo*
- a. 8 – tygodniowy eksperyment, w którym zastosowano trzy modele badawcze:
 - model prawidłowy (pasza z jodem w ilości zgodnej z zaleceniami dla zwierząt);
 - model uszkodzenia tarczycy wywołany dietą z niedoborem jodu;
 - model uszkodzenia tarczycy indukowany podaniem sulfadimetoksyny.
 - b. Każdy model został zbadany w dwóch schematach z dodatkiem i bez dodatku kiełków brukwi oraz kiełków brokułów do paszy zwierząt.
 - c. badania dodatkowe: analiza hormonów tarczycy i TSH, analiza histopatologiczna tarczycy (dla kiełków brukwi), ocena parametrów morfologicznych, biochemicznych, immunologicznych i antyoksydacyjnych osocza szczurów po zakończeniu eksperymentu.

2.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą

Tematem mojej rozprawy habilitacyjnej są kiełki roślin krzyżowych, które stanowią przykład żywności funkcjonalnej. Warzywa kapustne zajmują szczególne miejsce w żywieniu człowieka, głównie dzięki potwierdzonemu w wielu metaanalizach działaniu chemoprewencyjnemu. Wykazano, że warzywa te zmniejszają ryzyko zachorowania, szczególnie na nowotwory płuc, gruczołu piersiowego, prostaty czy też trzustki, jak również przewodu pokarmowego, w tym przełyku, żołądka i jelita grubego (1-3).

Do rodziny *Brassicaceae* zalicza się około 3700 gatunków, wśród których znaleźć można wiele warzyw, goszczących na co dzień na naszych stołach. Warzywa kapustne to

zarówno warzywa liściaste (kapusta, jarmuż, rukola), kwiatostany (brokuły, kalafior), korzenie i bulwy (rzepa, brukiew, rzodkiew, kalarepa, chrzan), nasiona (gorczyca), ale również kielki, z których najpopularniejsze są kielki brokułów, kapusty czerwonej, rzeżuchy, czy też jarmużu. Najczęściej spożywanymi warzywami krzyżowymi są: kapusta, brokuły, kalafior i brukselka. Na świecie najwięcej warzyw z tej rodziny spożywają mieszkańcy Azji, a wśród nich Chińczycy (średnio ponad 100 g na dobę). Mieszkańcy Ameryki Północnej włączają do swojej diety około 25-30 g warzyw kapustnych na dobę, natomiast w Europie ich średnia konsumpcja różni się w zależności od regionu (w krajach Europy południowej wynosi mniej niż 15 g na dzień). Równie niskie spożycie roślin kapustnych obserwuje się wśród mieszkańców obszarów subsaharyjskich, krajów Ameryki Południowej oraz Indii (4-7). W Polsce spożycie warzyw kapustnych jest wysokie i dotyczy głównie kapusty (średnio około 25 kg/osobę/rok) co jest spowodowane tradycją naszej kuchni oraz aspektami ekonomicznymi.

W ramach projektu habilitacyjnego do badań wybrano dwie rośliny jadalne z rodziny *Brassicaceae*: brukiew oraz brokuły.

Brokiew (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*) jest warzywem interesującym pod względem smakowym i odżywczym, a zarazem przykładem „żywności zapomnianej”. Brokiew (zwana karpielem m.in. na Podhalu) jest odmianą kapusty rzepek, która powstała przez skrzyżowanie rzepy z kapustą warzywną. Od XIX wieku do okresu II wojny światowej była rośliną powszechną w polskiej kuchni, dziś jednak nie cieszy się zbyt dużą popularnością. Nowe trendy w żywieniu, czyli wprowadzanie do codziennego menu żywności typu „slow food”, a także przywracanie starych, zapomnianych gatunków roślin i gotowych produktów spożywczych, zgodnie z założeniami programu odbudowy bioróżnorodności, pozwoliły na docenienie tego warzywa i jego rejestrację w 2011 roku na Liście Produktów Tradycyjnych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Zupa z żółtej brukwi oraz zupa kaszubska figurowały już na tej liście odpowiednio od 2006 i 2007 roku, zaś w 2015 roku dopisano do niej zupę karpiełankę (8).

Korzeń brukwi jest warzywem niskokalorycznym (36 kcal/100 g produktu jadalnego), przy stosunkowo wysokiej zawartości węglowodanów (8,1 g/100 g produktu jadalnego) i umiarkowanej zawartości białka (1,2 g/100 g produktu jadalnego) w porównaniu z innymi warzywami kapustnymi. Warzywo to zawiera foliany (0,3 µg/100 g produktu jadalnego), witaminę C (25 mg/100 g produktu jadalnego), jak również witaminę K1 (21 µg/100 g produktu jadalnego). Dodatkowo, na tle innych warzyw kapustnych, jest dobrym źródłem potasu (337 mg/100 g produktu jadalnego) oraz magnezu (23 mg/100 g produktu jadalnego) (9).

Kielki brukwi nie są znane w przemyśle spożywczym i do tej pory nie stanowiły elementu diety, nie prowadzono także żadnych badań nad sposobami ich uprawy, składem chemicznym czy też aktywnością biologiczną.

Drugim warzywem, będącym przedmiotem mojego projektu habilitacyjnego, był brokuł (*Brassica oleracea* var. *italica*), odmiana kapusty warzywnej, pochodzący

prawdopodobnie z Cypru. W żywieniu człowieka wykorzystywane są kwiatostany (róże, zwane popularnie różyczkami) oraz kiełki brokułów.

Różyczki brokułów są źródłem dużej liczby związków odżywczych. Poza tym, na szczególną uwagę zasługuje niska zawartość tłuszczów i węglowodanów przyswajalnych oraz stosunkowo duża ilość błonnika (2,8 g/100 g części jadalnych), co czyni brokuły produktem niskokalorycznym (27 kcal/100 g części jadalnych). Dodatkowo zawierają 385 mg potasu oraz 23 mg magnezu w 100 g części jadalnych, a także mogą stanowić źródło witaminy C, beta karotenu, witaminy E, których zawartość w 100 g części jadalnych jest równa, odpowiednio, 83 mg, 920 µg, 1,3 mg (10).

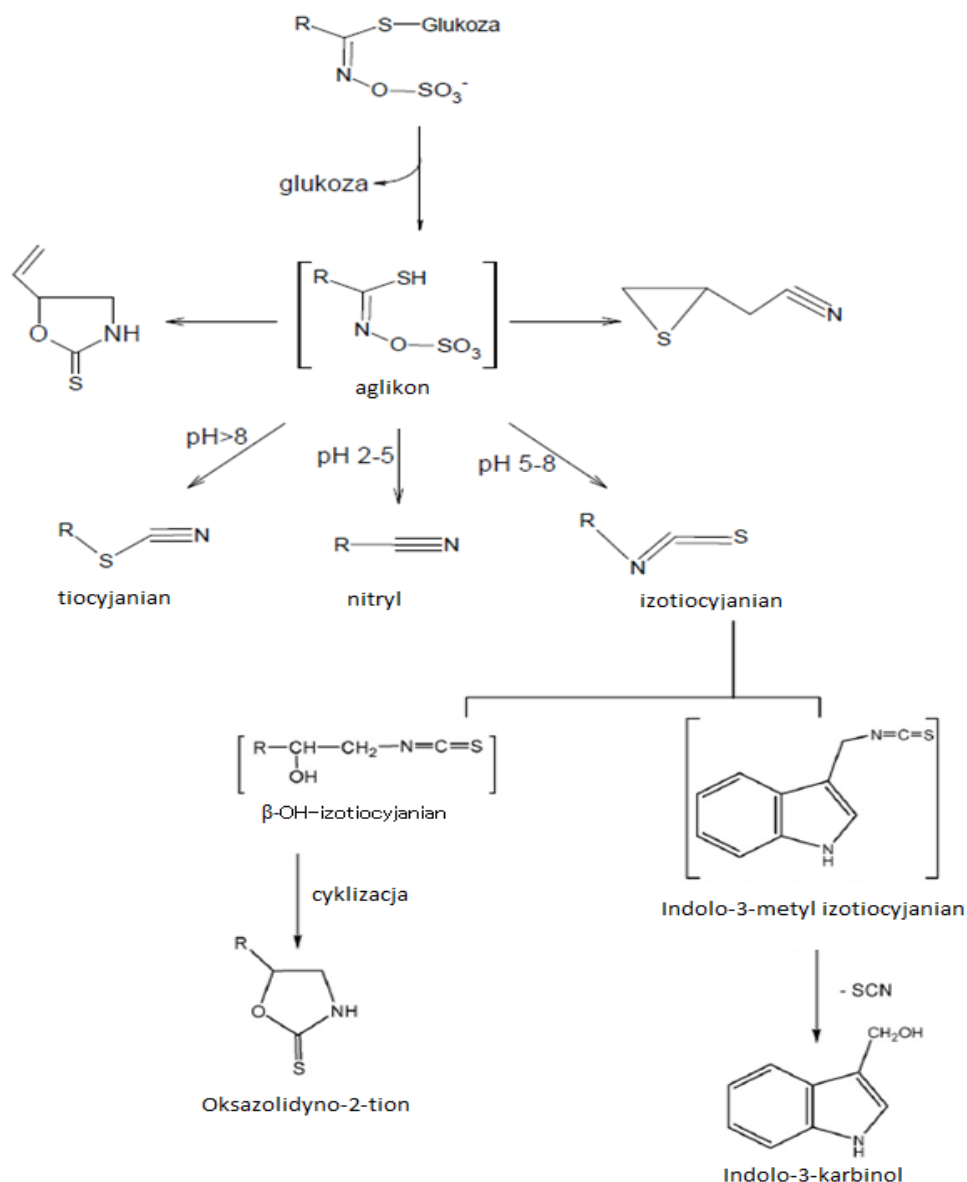
Skład substancji odżywczych w kiełkach brokułów jest znany, gdyż produkt ten jest obecny w żywieniu człowieka od wielu lat. W 100 g kiełków znajduje się 0,3 g tłuszczu, 3,38 g białka i 2,20 g węglowodanów przyswajalnych oraz 3,8 g błonnika. Kielki te są dobrym źródłem składników mineralnych, szczególnie potasu (389 mg/100 g produktu), wapnia (42 mg/100 g produktu) oraz magnezu (23 mg/100 g produktu), a także witamin takich jak witamina C (85 mg/100 g produktu), foliany (61 µg/100 g produktu), czy witamina K1 (177 µg/100 g produktu) (11).

Dodatkowo za efekt biologiczny tych warzyw odpowiadają m.in. flawonoidy, kwasy fenolowe, kwasy tłuszczowe, witaminy i karotenoidy. Dla warzyw kapustnych charakterystyczne są pochodne kemferolu, mirycetyny, izoramnetyny, apigeniny oraz luteoliny. Występują w nich także antocyjany, pochodne cyjanidyny, które odpowiadają za purpurowe zabarwienie czerwonej kapusty, czy też kalarepy oraz rzodkiewki. Z kwasów fenolowych obecne są pochodne kwasu hydroksycynamonowego, kwas p-kumarowy, synapinowy i ferulowy (12-14).

Brokuły są dobrze zbadane pod kątem jakościowej i ilościowej oceny związków fenolowych. Stwierdzono w nich obecność kwasu galusowego, kawowego, p-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, wanilinowego, syringowego, ferulowego, synapinowego, benzoesowego, trans-cynamonowego, kemferolu, kwercetyny, naryngeniny, (+)-katechiny (15), zaś w przypadku badań nad brukwią wyniki ograniczały się jedynie do określenia całkowitej zawartości związków polifenolowych (16).

Glukozynolany to podstawowe substancje aktywne biologicznie w rodzinie *Brassicaceae*. Składają się one z części cukrowej oraz łańcucha bocznego, który jest specyficzny dla konkretnego glukozynolanu. Związki te powstają podczas metabolizmu aminokwasów tj. metioniny, alaniny, waliny, leucyny i izoleucyny (glukozynolany alifatyczne), tryptofanu (glukozynolany indolowe), a także fenyloalaniny i tyrozyny (glukozynolany aryłowe). W największym stopniu za działanie biologiczne warzyw kapustnych odpowiadają produkty rozpadu związków takich jak glukorafanina, glukoerucyna, synigrina, progoitryna, glukonapina, glukoiberyna, oraz glukonasturcyna. Glikozydy siarkowe to związki o stosunkowo niewielkiej aktywności biologicznej, dopiero odpowiednio przekształcone, w procesie hydrolizy enzymatycznej lub nieenzymatycznej, nabywają swą aktywność biologiczną. Dzięki obecności enzymu mirozyny (uwalnianej podczas uszkodzenia tkanki roślinnej ze specjalnych komórek)

glikozydy zostają zhydrolizowane do glukozy oraz części aglikonowej, jonu tiohydroksymo-O-sulfonowego, który jest strukturą niestabilną i ulega (w zależności od pH) przekształceniu do izotiocyjanianów, nitryli lub tiocyjanianów (Ryc. 1). W warunkach pH zasadowego (powyżej 8) wytwarzane są głównie tiocyjaniany, zaś w warunkach niskiego pH (2-5) nitryle. Izotiocyjaniany, które powstają przy pH = 5-8 są niestabilne i podlegają dalszym przemianom z wytworzeniem np. indolo-3-karbinolu. Mirozynaza aktywowana jest między innymi podczas obróbki warzyw kapustnych (cięcie, miażdżenie, gryzienie, żucie), a jej aktywność może być ograniczana np. przez blanszowanie, gotowanie na parze, smażenie, czy pieczenie (17-18). Zahamowanie aktywności mirozynazy, do którego dochodzi m.in. podczas procedur kulinarnych, nie eliminuje możliwości hydrolizy glikozydów siarkowych, gdyż proces ten może być wynikiem działania enzymów obecnych w przewodzie pokarmowym m.in. tioglikozydazy wytwarzanej przez florę bakteryjną jelita grubego.



Rycina 1. Schemat przemiany glukozynolanów (opracowano na podstawie (17) (19) zmodyfikowano przez M. Miąsik).

Przemysł spożywczy nie porzucił jedynie na produkcji świeżych produktów z rodziny *Brassicaceae*, na rynku obecne są również płatki, chipsy czy mąka. Można znaleźć także suplementy diety, zawierające błonnik z warzyw kapustnych, jak również liofilizaty oraz wyizolowane frakcje związków aktywnych, głównie związków siarki.

Wśród najważniejszych i zarazem dominujących związków siarkowych w nasionach brukwi stwierdzono progoitrynę, glukonapinę, 4-hydroksyglukobrassicynę oraz progoitrynę, glukobrassicynę i neoglukobrassicynę w jej liściach (20). Korzeń brukwi nie został dokładnie zbadany pod kątem analizy jakościowej związków siarki, zaś dla kiełków tego warzywa analiza taka została wykonana po raz pierwszy przeze mnie.

W przypadku brokułów dominuje glukorafanina, glukobrassicyna, neoglukobrassicyna, glukoiberyna, a z produktów ich rozpadu najważniejsze są sulforafan, diindolilometan (DIM) oraz indolo 3-karbinol (I3C) (21).

Konsekwencją obecności zarówno związków polifenolowych, jak i siarkowych, jest aktywność antyoksydacyjna i cytotoksyczna warzyw kapustnych. Świeca i wsp. (15) potwierdzili bardzo wysoką zdolność antyoksydacyjną kielków brokułów, która także była obserwowana przez nas w odniesieniu do różyczek brokułów (22). W przypadku brukwi badania aktywności antyoksydacyjnej zostały przeprowadzone tylko dla korzenia spichrzowego, który wykazuje wyższą aktywność od niektórych warzyw kapustnych (rzepa, kalafior, kapusta, rzodkiew), jednak jarmuż, kapusta czerwona oraz brukselka wykazują znacząco wyższą zdolność zmiatania wolnych rodników (23).

Warzywa kapustne wykazują wysoki potencjał chemoprewencyjny, a za działanie przeciwnowotworowe odpowiedzialne są głównie izotiocyaniany (24). Efekt taki może być wynikiem złożonych mechanizmów, na które składa się m.in. inhibicja enzymów I fazy, indukcja enzymów fazy II (m.in. reduktazy chinonowej, glutationo-S-transferazy), gdzie najsilniejszymi induktorami są sulforafan, iberyna i erucyna, a także indukcja apoptozy komórek nowotworowych oraz modulacja metabolizmu estrogenów (21,25,26).

Od lat 40-tych ubiegłego stulecia warzywom kapustnym (kapusta, rzepa, rzepak) przypisuje się negatywne działanie na gruczoł tarczowy (27). Znalazło to swoje odzwierciedlenie również we współczesnych rekomendacjach żywieniowych, które wskazują na wysokie spożycie warzyw kapustnych jako czynnik zwiększający ryzyko rozwoju niedoczynności tarczycy. Z racji, że przeprowadzone w przeszłości badania dotyczyły wyłącznie zwierząt hodowlanych (świnie, drób, bydło, owce) oraz laboratoryjnych (szczury, myszy) i związane były z zastosowaniem nasion roślin krzyżowych, głównie rzepaku, zalecenia takie powinny zostać poddane weryfikacji. Badań, w których u zwierząt stosowano inne części roślin, niż nasiona czy kiszonki, jest bardzo mało i dotyczyły one jedynie rzodkwi (28). Dodatkowo, za negatywne działanie nasion roślin krzyżowych odpowiada, oprócz związków siarki, również kwas erukowy, który wykazuje m.in. działanie kardi toksyczne i hepatotoksyczne (29). Należy zauważyć, że wśród nasion roślin kapustnych do spożycia przez ludzi przeznaczone są głównie nasiona gorczycy, zaś współcześnie uprawiane nasiona rzepaku, wykorzystywane do produkcji pasz dla zwierząt, są odmianami o niskiej zawartości potencjalnych związków toksycznych, czy antyodżywczych (jak kwas erukowy, czy glukozynolany, a szczególnie goitryna).

Działanie goitrogenne związków siarkowych w dużej mierze zależy od zawartości jodu w diecie i jest tym silniejsze, im bardziej dieta pozbawiona jest tego pierwiastka. Wg Dżugan (30) stosunek $SCN^-/I^- > 500$ może zwiększać ryzyko przerostu gruczołu tarczowego. Aby uzyskać taką proporcję tiocyanianów do jodków należy spożyć ponad 0,5 kg warzyw kapustnych dziennie o zawartości powyżej 50 mg tiocyanianów, przy równoczesnej podaży jodu mieszczącej się w granicach obowiązujących norm (około 100 $\mu\text{g}/\text{dobę}$). Jako że w codziennej, przeciętnej diecie trudno jest przekroczyć wspomnianą powyżej ilość warzyw kapustnych, oraz biorąc pod uwagę powszechne stosowanie soli jodowanej, rzeczywiste ryzyko

działania negatywnego jest niewielkie. Czynnikiem zwiększającym możliwość goitrogennego działania tej grupy warzyw może być dieta wegetariańska, wegańska oraz kapuściana. Podczas stosowania tego rodzaju diet eliminacyjnych zawartość tych warzyw w codziennym jadłospisie znacząco wzrasta.

Przesłanką do podjęcia przeze mnie badań dotyczących wpływu warzyw kapustnych na funkcję tarczycy, ze szczególnym uwzględnieniem ich kielków, były nieliczne prace (powstałe głównie w latach 70-, 80- i 90-dziesiątych zeszłego stulecia), które pokazały, że nasiona roślin kapustnych, w przeciwieństwie do ich pozostałych jadalnych części, mają działanie tyreotoksyczne. Wykazano to w badaniach Lo i wsp., (31) gdzie odnotowano ponad czterokrotny spadek stężenia T4 pod wpływem paszy zawierającej 42% nasion rzepaku. Także Vermorel i wsp. (32), karmiąc szczury paszą zawierającą rzepak o różnej całkowitej zawartości glukozynolanów, stwierdzili obniżenie o 50% stężenia T4 i T3 przy zastosowaniu diet o niskiej zawartości glukozynolanów, zaś dla diet bardzo bogatych w te związki poziom T4 obniżył się o 80%, a T3 o 70%. Podwyższenie poziomu TSH oraz obniżenie T3 i T4, typowe dla niedoczynności tarczycy, wykazano także pod wpływem spożywania innych roślin kapustnych, przy czym, co chciałbym podkreślić, był to efekt głównie podaży nasion, a nie części zielonych, kwiatostanów czy też korzeni. Należy tu wspomnieć badania Haery i wsp. (33), z wykorzystaniem paszy zawierającej nasiona kapusty białej, czy też Barry i wsp. (34), gdzie owcom podawano kiszonki z jarmużem, a następnie oceniano poziom hormonów i zmiany w strukturze tarczycy. Pattanaika i wsp. (35) udowodnili, że suplementacja jodem u kóz karmionych ciastkami z gorczycą sarepską korzystnie wpływa na normalizację poziomu hormonów tarczycy. Jest to dowód na to, że rośliny bogate w glukozynolany nie hamują całkowicie syntezy hormonów tarczycy, lecz osłabiają ją, przez współzawodnictwo z wychwytem jodku przez tarczycę. Wynika stąd, że zwiększenie ilości jodu w diecie może skutecznie zapobiegać rozwojowi niedoczynności gruczołu tarczowego.

2.2. Zwierzęce modele uszkodzenia tarczycy

W moich badaniach wykorzystałem dwa modele uszkodzenia tarczycy (deficyt jodu lub podanie sulfadimetoksyny) oraz zastosowałem dodatek do diety w postaci kielków brukwi i brokułów, zawierających związki o potencjalnym działaniu uszkadzającym tarczycę. Wszystkie eksperymenty trwały 8 tygodni, a ponieważ, standardowo w większości badań stosowano modele 5 tygodniowe (36), można uznać ten model za długoterminowy.

Model z deficytem jodu

Synteza hormonów tarczycy zaczyna się od nieorganicznego jodku, który, do tego celu, musi przejść przez kilka etapów różnych przemian. Dlatego jednym z najbardziej popularnych modeli uszkodzenia tarczycy jest drastyczne ograniczenie zawartości tego pierwiastka w diecie zwierząt laboratoryjnych. W tym celu w badaniach zastosowano specjalną paszę całkowicie pozbawioną jodu (36, 37).

Model z sulfadimetoksyną

Podczas syntezy hormonów tarczycy jodek zostaje utleniony do I^+ . W reakcji tej uczestniczy peroksydaza tarczycowa. Inhibitorami tego enzymu są m.in. produkty rozpadu

glukozynolanów czy sulfonamidy. Sulfadimetoksyna, substancja z grupy sulfonamidów, hamuje syntezę hormonów tarczycy poprzez blokowanie peroksydazy tarczycowej, która przekształca jodki w utleniony jod, oraz monoiodotyrozynę (MIT) i diiodotyrozynę (DIT) do T3 i T4. Szczury w tym modelu otrzymywały paszę bez jodu, zaś sulfadimetoksyna dodawana była do wody do picia (0,025%).

Produkty rozpadu glukozynolanów

Goitryna, która powstaje z progoitryny pod wpływem m.in. aktywności mirozynazy, wpływa negatywnie na syntezę hormonów tarczycy w złożonym mechanizmie. Jednym z jego elementów jest hamowanie organifikacji jodu. Wiązanie jodków do tyrozyny wymaga utlenienia nieorganicznych jodków do reaktywnego jodu (I^+) przez peroksydazę tarczycową, obecną w błonie komórki pęcherzykowej i w przyległym koloidzie. Enzym ten ulega zahamowaniu m.in. przez goitrynę (38). Izotiocyjaniany konkurują również z jodem o wychwyty przez tarczycę, w związku z tym ich działanie negatywne zależy od ilości jodu w diecie (39). Wymienione substancje działają na zasadzie współzawodnictwa z jodem o wiązanie do symportera sodowo-jodowego (NIS), co skutkuje hamowaniem wychwyty jodu przez tarczycę. Izotiocyjaniany są silnymi inhibitorami transportu jodków oraz substratem kompetycyjnym dla peroksydazy tarczycowej, ale nie kumulują się w tarczycy. Blokada mechanizmu wychwyty jodu ma, podobny do niedoboru jodu, rozregulowujący wpływ na oś tarczycza – przysadka. W efekcie poziom T4 i T3 we krwi obniża się, wpływając na kompensacyjny wzrost uwalniania TSH przez przysadkę. Hipertrofia i hiperplazja komórek pęcherzykowych, na skutek długotrwałego narażenia na te składniki w diecie, skutkuje zwiększoną masą tarczycy i rozwojem wola (40).

Biorąc pod uwagę wzrastające zainteresowanie i spożycie kiełków warzyw kapustnych oraz fakt, że w piśmiennictwie światowym nie ma badań dotyczących ich oddziaływania na tarczycę, postanowiłem ustalić, jaki jest wpływ kiełków warzyw kapustnych na funkcję tarczycy oraz wybrane parametry morfologiczne, biochemiczne i immunologiczne. Aby ocenić ewentualny efekt tyreotoksyczny wybrałem roślinę jadalną, której nasiona cechują się najwyższą zawartością progoitryny - brukiew, natomiast dodatkowo wytypowałem kiełki brokułów, jako najbardziej znane i spożywane kiełki z rodziny *Brassicaceae*.

3. Szczegółowe omówienie osiągniętych wyników.

Na niniejszą rozprawę habilitacyjną składa się monotematyczny cykl publikacji, w którym zgodnie ze sformułowanym w p. 2 celem, można wyróżnić trzy obszary badań:

1. Jakościowa i ilościowa analiza składu chemicznego: publikacje H1, H2, H3
2. Badania biologiczne: publikacje H3, H4
3. Badania na zwierzętach: publikacje H5, H6

H-1. Influence of Different Light Conditions and Time of Sprouting on Harmful and Beneficial Aspects of Rutabaga Sprouts in Comparison to Their Roots and Seeds
Journal of the Science of Food and Agriculture 2018 doi: 10.1002/jsfa.9188

Publikacja ta zawiera wyniki analizy składu chemicznego kiełków, korzeni i nasion brukwi. Opisano w niej również dokładny sposób hodowli kiełków brukwi.

Kiełki uprawiano w trzech różnych wariantach czasowych, przez 8, 10 i 12 dni, w warunkach naturalnego dostępu światła oraz w całkowitej ciemności. Wśród ocenianych grup substancji bioaktywnych były glukozytolany, kwasy tłuszczowe, flawonoidy i kwasy fenolowe.

Wykorzystując metodę UPLC-MS/MS (we współpracy z dr Żmudzkim z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM) określono zawartość czterech glukozytolanów (progoitryny, sinigriny, glucoiberyny, glucoerucyny). Metoda została zwalidowana a dokładne parametry walidacji są zamieszczone w aneksie do publikacji **H-1**. W toku przygotowań do eksperymentu, poprzedzonym gruntowną analizą piśmiennictwa dotyczącą różnych roślin jadalnych z rodziny kapustowatych, stwierdzono, że brukiew zawiera największą ilość progoitryny (41). Dlatego szczególną uwagę zwrócono na zmiany zawartości tego związku w kiełkach, ponieważ to on w największym stopniu powoduje wystąpienie uszkodzeń gruczołu tarczowego. W badanych nasionach brukwi stwierdzono bardzo wysoką zawartość progoitryny ($804,07 \pm 60,89$ mg/100 g sm), co w znaczący sposób rzutowało również na jej stężenie w kiełkach, w których związek ten występował w szerokich granicach stężeń od $73,67 \pm 9,59$ do $3730,3 \pm 286,6$ mg/100 g sm. Najwyższą zawartość progoitryny stwierdzono w kiełkach 8-dniowych ($3730,3 \pm 286,6$ mg/100 g sm), jednak wraz z czasem uprawy ilość progoitryny malała istotnie statystycznie, odpowiednio do $317,6 \pm 15,96$ mg/100 g sm dla 10-dniowych, i $90,12 \pm 13,23$ mg/100 g sm dla 12-dniowych kiełków brukwi. Dodatkowo zauważono, że hodowla w całkowitej ciemności (8 - i 10-dniowa) powodowała istotne ograniczenie syntezy progoitryny.

Jak wspomniano wcześniej, dla przemian glukozytolanów niezbędna jest aktywność enzymu mirozyny, który powoduje hydrolizę glukozydów do izotiocyanianów. Ponieważ na aktywność tego enzymu może mieć wpływ obecność światła podczas hodowli (42), w kolejnym etapie eksperymentu postanowiono przeprowadzić hydrolizę glikozydów siarkowych w kiełkach brukwi i zbadać efektywność tego procesu. Stwierdzono, że brak światła istotnie zwiększał aktywność enzymu tylko w kiełkach 8-dniowych, zaś w przypadku 10- i 12-dniowych upraw zmiana aktywności enzymu nie była znamienna. Vale i wsp. (43) sugerują, że kiełki powinny być badane zwłaszcza pod tym kątem, dlatego, że aktywność mirozyny jest czynnikiem determinującym zarówno korzystną aktywność biologiczną tych związków (np. działanie chemoprewencyjne), jak i potencjalnie ograniczającym ilość związków antyodżywczych (goitryna), co wydaje się być istotne zarówno dla konsumentów jak i producentów kiełków, którzy traktują kiełki jako żywność funkcjonalną.

Ciekawą obserwacją było stwierdzenie bardzo niskiego stężenia progoitryny ($0,28 \pm 0,06$ mg/100 g sm) w korzeniu brukwi, który dodatkowo zawierał jeszcze glucoerucynę

(82,20±16,53 mg/100 g sm). Związek ten był obecny również w nasionach, wykazujących największą różnorodność glukozyolanów spośród badanych produktów.

Analizę kwasów tłuszczowych wykonano z użyciem chromatografii gazowej (we współpracy z dr hab. Joanną Gdulą Argasińską z Zakładu Radioligandów UJ CM). Spośród substancji o działaniu antyodżywczym, kwas erukowy wymaga szczególnej oceny pod kątem bezpieczeństwa wprowadzanych na rynek spożywczy nowych produktów. Kwas ten może powodować stłuszczenie narządów mięsnych oraz uszkodzenie mięśnia sercowego, głównie przez zablokowanie utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach (29). W przypadku nasion brukwi 42,44±1,71% kwasów tłuszczowych stanowił kwas erukowy, zaś w kiełkach nastąpiło drastyczne ograniczenie jego ilości do 1,79±0,12 –7,00±2,46%, przy ponownym wzroście do wartości 30,54±0,17% w korzeniu. W zależności od dnia kiełkowania, wśród nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas linolowy, kwas linolenowy, kwas erukowy) zaobserwowano istotny spadek ich stężeń wraz z wydłużaniem okresu uprawy, zaś w przypadku kwasu oleinowego zauważono istotny wzrost zawartości. Światło miało istotny wpływ na syntezę kwasu oleinowego, linolowego i behenowego, szczególnie w kiełkach 8-dniowych.

Analiza związków z grupy polifenoli tj. kwasów fenolowych i flawonoidów, została wykonana metodą HPLC (we współpracy z dr Galantą z Katedry Farmakognozji UJ CM). Walidacja metody została opisana w jednej z wcześniejszych prac (44). Wykazano, że nasiona brukwi są potencjalnym źródłem kwasów fenolowych, z dominującym kwasem kawowym (374,61±88,75 mg/100 g sm), synapinowym (150,23±1,68 mg/100g sm), i chlorogenowym (44,29±2,59 mg/100g sm), zaś w kiełkach stwierdzono głównie kwas gentyzynowy (217,24±14,24–1016,86±157,75 mg/100 g sm), którego stężenie istotnie zmniejszyło się pod wpływem braku światła, oraz kwas chlorogenowy w przypadku kiełków 8-dniowych. Spośród związków flawonoidowych w nasionach dominowała robinina i izokwercytryna, zaobserwowano także śladowe ilości moryny, mirycetyny, apigeniny, kemferolu i kwercetyny.

Dzięki otrzymanym wynikom, można było sformułować następujące wnioski:

- czas trwania hodowli oraz dostęp światła istotnie wpływały na stężenie związków aktywnych w kiełkach brukwi,
- czas trwania kiełkowania oraz uprawa kiełków w ciemności powodowały istotne obniżenie stężenia progoitryny w badanym materiale,
- kiełki brukwi charakteryzowały się istotnie niższą zawartością kwasu erukowego w porównaniu do nasion i korzeni,
- sposób uprawy i czas hodowli kiełków może istotnie zredukować ilość substancji antyodżywczych.

Aspekt nowości:

Przeprowadzenie optymalizacji uprawy kiełków brukwi; opisany po raz pierwszy skład jakościowy i ilościowy - najważniejszych w ujęciu bromatologicznym - związków aktywnych biologicznie oraz związków o działaniu antyodżywczym.

H-2. Pasko, P., Sulkowska-Ziaja, K., Muszynska, B., & Zagrodzki, P. (2014). Serotonin, melatonin, and certain indole derivatives profiles in rutabaga and kohlrabi seeds, sprouts, bulbs, and roots. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 740-745.

W następnym etapie pracy, podjąłem we współpracy z dr Sułkowską – Ziają z Katedry Botaniki Farmaceutycznej UJ CM) badania, mające na celu ustalenie zawartości związków indolowych (melatoniny i serotoniny) oraz ich pochodnych w kielkach brukwi, a także w jej nasionach i korzeniach spichrzowych, z wykorzystaniem metody HPLC. Dodatkowo w eksperymencie przebadano kielki, nasiona i bulwy kalarepy.

Analiza korzenia brukwi wykazała obecność L-tryptofanu, tryptaminy, melatoniny, serotoniny oraz metylotryptaminy w ilościach odpowiednio $3,04 \pm 0,95$; $1,80 \pm 0,20$; $0,56 \pm 0,09$; $0,16 \pm 0,06$ i $0,98 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/100$ g świeżej masy (śm). Nasiona brukwi zawierały głównie serotoninę ($0,36 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/100$ g śm) i L-tryptofan ($21,97 \pm 1,07$ $\mu\text{g}/100$ g śm). W kielkach brukwi stwierdzono obecność tryptaminy ($1,42$ - $2,25$ $\mu\text{g}/100$ g śm), melatoniny ($0,44$ - $0,59$ $\mu\text{g}/100$ g śm) oraz serotoniny ($0,10$ - $0,38$ $\mu\text{g}/100$ g śm), przy czym, co ciekawe, melatonina i tryptamina pojawiły się w dopiero w momencie kiełkowania nasion.

W pracy **H-2** dodatkowo dokonano porównania zawartości melatoniny i serotoniny z innymi produktami spożywczymi, ze szczególnym uwzględnieniem kielków. Otrzymane wyniki przeliczano na 100 g świeżej masy, odpowiadającej średniej porcji kielków. Analiza taka ujawniła, że badane kielki brukwi, jak również kalarepy, charakteryzowały się znacznie wyższą zawartością melatoniny w porównaniu z kielkami rzepaku, czerwonej kapusty, a także z kielkami z innych rodzin botanicznych jak alfa – alfa, cykoria, czy też słonecznik. Korzeń brukwi zawierał śladowe ilości serotoniny, w porównaniu do innych warzyw, takich jak cykoria, szpinak, sałata, pomidory czy papryka. Zawartość L-tryptofanu w korzeniach brukwi była zbliżona do ilości w pomidorach, zaś istotnie niższa niż w przypadku groszku, ciecierzycy, czy soczewicy.

Z powodu wysokiej aktywności antyoksydacyjnej związków indolowych i korzystnych efektów wywieranych przez te związki, a szczególnie przez melatoninę, produkty bogate w nie mogą w przyszłości stanowić element diety w prewencji chorób nowotworowych, cukrzycy, czy też schorzeń neurodegeneracyjnych.

Dzięki otrzymanym wynikom można sformułować następujące wnioski:

- kielki brukwi, jak również jej korzenie stanowią mogą ważne źródło związków indolowych w codziennej diecie,
- badania związków indolowych w diecie stanowią ważny element nowej dziedziny nauk żywieniowych jaką jest chronożywnienie, zwłaszcza w kontekście zaleceń co do pory spożywania produktów bogatych w melatoninę i inne związki z tej grupy.

Aspekt nowości:

Analiza jakościowa i ilościowa związków indolowych w nasionach, korzeniu oraz kiełkach - w zależności od czasu trwania i warunków hodowli.

Drugim istotnym zamierzeniem badawczym, było określenie aktywności biologicznej kiełków, będących przedmiotem projektu habilitacyjnego. W tym celu określiłem potencjał antyoksydacyjny badanych kiełków, jak również ich aktywność cytotoksyczną. Większość klasycznych badań nad cytotoksycznością ekstraktów roślinnych często nie uwzględnia aspektu selektywności ich działania. Dlatego w moich badaniach porównałem ich wpływ na komórki prawidłowe oraz nowotworowe. Dodatkowo, starałem się znaleźć odpowiedź na pytanie o mechanizm śmierci komórek.

H-3. Pasko, P., Bukowska-Strakova, K., Gdula-Argasinska, J., & Tyszka-Czochara, M. (2013). Rutabaga (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*) seeds, roots, and sprouts: a novel kind of food with antioxidant properties and proapoptotic potential in Hep G2 hepatoma cell line. *Journal of Medicinal Food*, 16(8), 749-759.

Uzupełnieniem oceny składu jakościowego i ilościowego kiełków brukwi, nowego przykładu żywności funkcjonalnej, było przeprowadzenie badań aktywności biologicznej tego produktu spożywczego. Analizę taką wykonano również dla nasion i korzenia spichrzowego brukwi. W tym celu wyhodowano materiał w takich samych warunkach jak opisane w pracy **H-1 i H-2**.

Analizę aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono metodą FRAP i DPPH, oceniono również całkowitą zawartość związków polifenolowych i flawonoidów. Wykazano, że aktywność antyoksydacyjna kiełków rośnie wraz z czasem kiełkowania, przy równoczesnym wzroście stężenia związków polifenolowych. Dodatkowo, kiełki brukwi charakteryzowała istotnie wyższa aktywność antyoksydacyjna i całkowita zawartość związków polifenolowych niż stwierdzona w nasionach, czy też korzeniach. Porównując aktywność antyoksydacyjną (metoda FRAP) korzeni z innymi warzywami należy stwierdzić, że była ona wyższa niż aktywność rzepy, kalafiora, kapusty, ogórków, czy ziemniaków. Wartości zdolności przeciwutleniającej zbliżone do brukwi posiadały: rzodkiew, brokuły i por, zaś znacząco wyższą aktywność miały brukselki, jarmuż, czerwona kapusta, szpinak, czy też buraki.

Otrzymane wyniki wskazały, że kiełki hodowane przez 12 dni w warunkach naturalnych miały najlepsze parametry antyoksydacyjne, dlatego właśnie te produkty powinno się wybrać jako dodatek do paszy zwierząt w dalszych planowanych badaniach *in vivo*, gdyby ich celem było ustalenie tylko efektów prozdrowotnych kiełków. Celem potwierdzenia takiego wniosku przeprowadzono dodatkowo określenie aktywności cytotoksycznej oraz selektywności działania badanych kiełków.

Ekstrakty wspomnianych powyżej produktów z brukwi wykorzystano do określenia aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworu wątroby (Hep G2) oraz komórek prawidłowych jajnika (CHO-K1), z wykorzystaniem testu żywotności MTT. Dodatkowo zbadano również proliferację komórek, za pomocą mikroskopowego obrazowania gęstości kolonii, a także mechanizm śmierci komórki i integralność błony komórkowej z użyciem cytometru przepływowego, metody Western blot oraz metody pomiaru luminescencji ToxiLightBioassay.

W badaniach cytotoksyczności wykazano, że wyciągi ze wszystkich badanych kielków hamowały żywotność komórek nowotworowych, w sposób zależny od dawki, przy wyraźnie mniejszym wpływie na komórki prawidłowe. Spośród badanych kielków, 8-dniowe kielki, hodowane w warunkach naturalnego dostępu światła, działały najbardziej efektywnie, zmniejszając w stężeniu 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ żywotność komórek nowotworowych HepG2 o ponad 40%, przy minimalnym toksycznym wpływie na komórki prawidłowe. Dla pozostałych rodzajów kielków oraz dla nasion i korzeni brukwi wyniki nie były tak zadowalające, ekstrakty z nasion hamowały żywotność komórek nowotworowych o około 20%, zaś z korzeni poniżej 20%.

Wyciągi z kielków, korzeni i nasion brukwi wpływały nie tylko na przeżywalność, ale również na proliferację badanych komórek nowotworowych HepG2. Wykazano, że największy efekt na zmianę morfologii komórek oraz ich zdolności do wzrostu i tworzenia kolonii wykazały wyciągi z kielków, natomiast wyciągi z nasion i korzeni brukwi miały wpływ znacznie mniejszy. Wyniki z tej części eksperymentu również wskazały, że kielki 8-dniowe, hodowane w warunkach naturalnych, najsilniej hamowały proliferację komórek nowotworowych.

W celu wstępnego określenia mechanizmu działania badanych ekstraktów, w pierwszym etapie określano ich wpływ na stopień dezintegracji błon komórek HepG2 i CHO-K1. Wykazano, że w stężeniach 5 i 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nie stwierdzono istotnych zmian w integralności błony komórkowej dla komórek prawidłowych, zaś w przypadku komórek nowotworowych nastąpiła znacząca dezintegracja błon komórkowych, szczególnie w przypadku 8- i 12-dniowych kielków brukwi.

Następnym krokiem w ocenie mechanizmu działania badanych wyciągów było określenie, czy badane wyciągi, w stężeniu 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, wpływają na stymulację apoptozy w badanych komórkach. Stwierdzono, że wyciągi z nasion brukwi powodowały apoptozę w 90% komórek CHO-K1, a tylko około w 48% komórek Hep G2, zaś 25% komórek nowotworowych było w stanie nekrozy. Podobny efekt zaobserwowano dla korzeni, powodujących apoptozę ponad 50% komórek nowotworowych, niestety przy równoczesnym silnym wpływie proapoptotycznym na komórki prawidłowe (60% wczesnej i 25% późnej apoptozy). W przypadku wyciągów z kielków, najkorzystniejsze wyniki zaobserwowano ponownie w przypadku 8-dniowych kielków brukwi, uprawianych przy naturalnym dostępie światła. Powodowały one stymulację procesu apoptozy w ponad 60% komórek Hep G2, bez większego wpływu na komórki prawidłowe.

Dla potwierdzenia proapoptotycznego wpływu badanych wyciągów na komórki nowotworowe HepG2 została wykorzystana analiza Western blot, która wykazała uwolnienie cytochromu C do cytoplazmy z mitochondriów pod wpływem badanych substancji. Świadczy to o

wprowadzeniu komórek HepG2 w stan śmierci apoptotycznej na drodze wewnątrzpochodnej pod wpływem badanych wyciągów.

Na podstawie otrzymanych wyników należy uznać, że:

- Kielki brukwi posiadają znacząco wyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do nasion i korzeni,
- Najkorzystniejsze parametry antyoksydacyjne mają 12-dniowe kiełki brukwi hodowane w warunkach naturalnych,
- Najlepsze właściwości cytotoksyczne, antyproliferacyjne i proapoptotyczne wykazują 8-dniowe kiełki brukwi, hodowane w warunkach naturalnego dostępu światła; działanie takie nie zostało potwierdzone dla kiełków 12-dniowych.

Aspekt nowości:

Wykazanie selektywnego działania cytotoksycznego 8-dniowych kiełków brukwi wobec komórek nowotworowych HepG2 oraz określenie mechanizmu działania cytotoksycznego (dezintegracja błony komórkowej, apoptoza na drodze wewnątrzpochodnej).

Głównie na podstawie wyników pracy **H-1**, oraz w mniejszym stopniu **H-2 i H-3**, do dalszych badań z udziałem zwierząt laboratoryjnych wytypowałem 8-dniowe kiełki brukwi hodowane w naturalnych warunkach dostępu światła. Cechowały się one najwyższym stężeniem progoitryny, co w planowanym eksperymencie, mającym na celu ocenę potencjalnego działania tyreotoksycznego, było bardzo istotne. W celu pozyskania większej ilości materiału do badań podjęto współpracę z firmą Uniflora sp. zo.o., która nieodpłatnie wyhodowała 80 kg kiełków brukwi (w opisanych powyżej warunkach), następnie zliofilizowanych i wykorzystanych do produkcji pasz dla szczurów.

H-4. Paśko, P., Tyszka-Czochara, M., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Żmudzki, P., Bartoń, H., Zagrodzki P., & Gorinstein, S. (2018). Comparative Study of Predominant Phytochemical Compounds and Proapoptotic Potential of Broccoli Sprouts and Florets. Plant Foods for Human Nutrition, 1-6. doi.org/10.1007/s11130-018-0665-2

Na materiał porównawczy w prezentowanych badaniach wybrano kiełki brokułów, produkt dostępny na rynku spożywczym od wielu lat i jeden z najpopularniejszych przykładów żywności funkcjonalnej. W celu dokładnego określenia składu jakościowego i ilościowego związków biologicznie aktywnych w kiełkach brokułów wykorzystano metodę UPLC-MS/MS, chromatografię gazową oraz HPLC, a ocenie poddano zawartość: sulforafanu, głównego związku z grupy izotiocyanianów; kwasów tłuszczowych oraz flawonoidów i kwasów fenolowych. Ponieważ kiełki brokułów stanowiły jedynie materiał odniesienia, nie przeprowadzono porównania wpływu warunków hodowli na profil i stężenie związków aktywnych. Przeprowadzono natomiast porównanie kiełków i różyczek brokułów, podobnie jak w pracach **H-1, H-2, H-3**, gdzie badano zarówno kiełki, jak i korzeń brukwi. Zbadano kiełki 4-dniowe, takie jakie są dostępne w sprzedaży – materiał został dostarczony przez firmę

Uniflora sp. z o.o., natomiast różyczki wyhodowano samodzielnie w Krościenku nad Dunajcem w Pieninach.

Analiza jakościowa związków polifenolowych w kiełkach ujawniła obecność kwasu chlorogenowego, p-kumarowego, ferulowego, gentyzynowego, synapinowego, jak również robininy oraz śladowe ilości mirycetyny, luteoliny kwercetyny i apigeniny. W różyczkach stwierdzono tylko kwas kawowy, izochlorogenowy oraz synapinowy i śladowe ilości mirycetyny. W kiełkach dominujący ilościowo był kwas synapinowy ($140,53 \pm 3,17$ mg/100 g sm), gentyzynowy ($80,80 \pm 4,79$ mg/100 g sm) oraz ferulowy ($73,85 \pm 4,50$ mg/100 g sm), zaś w różyczkach – izochlorogenowy ($59,85 \pm 2,56$ mg/100 g sm).

W celu oceny zawartości sulforafanu, najbardziej aktywnego biologicznie związku, powstającego na skutek rozpadu glukorafaniny, próbki poddano wcześniejszej hydrolizie i wykazano znaczącą różnicę pomiędzy kiełkami ($113,33 \pm 12,58$ mg/100 g sm), a różyczkami ($46,46 \pm 7,50$ mg/100 g sm) brokułów.

Nasycone kwasy tłuszczowe w kiełkach brokułów stanowiły tylko około 10% całkowitej puli kwasów, z dominującym kwasem palmitynowym oraz stearynowym, zaś w różyczkach było ich ponad 70% i przeważał kwas kapronowy, a następnie, w znacznie mniejszych ilościach, obserwowany był kwas stearynowy i palmitynowy.

W przypadku nienasyconych kwasów tłuszczowych, w kiełkach 45,5% ich puli stanowił kwas oleinowy, 20,8% kwas linolowy oraz 17% kwas alfa-linolenowy. W różyczkach brokułów również najwięcej było kwasu oleinowego (12,4%), ale w znacząco mniejszej ilości. Bardzo istotną obserwacją było stwierdzenie, że zarówno kiełki, jak i różyczki brokułów cechowały się bardzo niską zawartością (odpowiednio 0,5 i 2%) szkodliwego dla organizmu kwasu erukowego, który w nasionach brokułów obecny był aż w 38%.

Dodatkowym istotnym elementem, przebadanym w pracy **H-4**, było działanie cytotoksyczne oraz proapoptotyczne ekstraktów z kiełków oraz różyczek brokułów na prawidłowe fibroblasty skóry (linia BJ) oraz komórki nowotworów wątroby (linia HepG2) i jelita grubego (SW480).

Zarówno ekstrakty kiełków, jak i różyczek, testowane w zakresie stężeń 0,25 – 2,5 mg/ml, wykazywały istotną aktywność cytotoksyczną wobec nowotworowych linii komórkowych SW480 i HepG2, przy czym, co jest warte podkreślenia, różyczki wykazywały silniejszą aktywność niż kiełki. W przypadku kiełków brokułów obserwowana była większa selektywność wobec komórek patologicznych (nowotworowych) niż prawidłowych (BJ), zaś różyczki działały nieselektywnie, powodując również spadek żywotności fibroblastów.

Następnym krokiem eksperymentu było określenie mechanizmu śmierci komórek pod wpływem badanych ekstraktów (2,5 mg/ml), za pomocą cytometrii przepływowej. Opisany powyżej silny hamujący wpływ ekstraktów z różyczek brokułów na żywotność komórek nowotworowych jelita grubego związany był z wywołaniem zarówno nekrozy (45% komórek) jak i apoptozy (33% komórek). W przypadku linii nowotworu wątroby i komórek prawidłowych (BJ) relacja ta była odwrócona i w ponad 50% komórek obserwowano apoptozę. Dla kiełków brokułów obserwowane efekty wpływu na komórki nowotworowe wydają się być

korzystniejsze, gdyż ekstrakty te głównie stymulują apoptozę, szczególnie w komórkach SW480, przy niewielkim działaniu proapoptotycznym (20%) na komórki prawidłowe.

Różnice w aktywności biologicznej pomiędzy kiełkami a różyczkami wynikają z różnic w składzie jakościowym i ilościowym związków polifenolowych, kwasów tłuszczowych i sulforafanu, co zostało również potwierdzone dzięki wynikom statystycznej analizy wielowymiarowej PCA, omówionej dokładnie w publikacji **H-4**.

Na podstawie otrzymanych wyników należy uznać, że:

- Kiełki brokułów są bogatszym źródłem różnorodnych substancji bioaktywnych niż różyczki, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości sulforafanu,
- Zarówno kiełki, jak i różyczki brokułów wykazują minimalną zawartość kwasu erukowego, potencjalnie toksycznego kwasu tłuszczowego obecnego w żywności,
- Kiełki, w odróżnieniu do różyczek brokułów charakteryzują się istotną i selektywną aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych jelita grubego (SW480), bez znaczącego negatywnego wpływu na komórki prawidłowe (BJ),
- Dodatkowym argumentem przemawiającym za uznaniem kiełków brokułów za przykład żywności funkcjonalnej jest ich potwierdzone działanie proapoptotyczne, czego nie stwierdzono dla różyczek brokułów.

Aspekt nowości:

Wykazanie, że: (1) zarówno kiełki jak i różyczki brokułów cechowały się bardzo niską zawartością niekorzystnego dla zdrowia kwasu erukowego; (2) kiełki brokułów posiadały większą selektywność niż różyczki wobec komórek nowotworowych jelita grubego, bez znaczącego negatywnego wpływu na komórki prawidłowe.

H-5. Paśko, P., Okoń, K., Krośniak, M., Prochownik, E., Żmudzki, P., Kryczyk-Koziół, J., & Zagrodzki, P. (2018). Interaction between iodine and glucosinolates in rutabaga sprouts and selected biomarkers of thyroid function in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 46, 110-116.

Analiza składu chemicznego kiełków, przedstawiona w publikacji **H1**, pozwoliła na wytypowanie 8-dniowych kiełków brukwi wyhodowanych w warunkach naturalnych jako optymalnego materiału do dalszych badań. Materiał ten zliofilizowano i zlecono wykonanie następujących 6 rodzajów odpowiednich pasz dla szczurów:

- Pasza kontrolna z prawidłową ilością jodu (C)
- Pasza kontrolna z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brukwi (R)
- Pasza z deficytem jodu (DI)
- Pasza z deficytem jodu i z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brukwi (RDI)
- Pasza kontrolna z prawidłową ilością jodu i sulfadimetoksyną w stężeniu 0,025% w postaci roztworu do picia (S)
- Pasza kontrolna z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brukwi i sulfadimetoksyną w stężeniu 0,025% w postaci roztworu do picia (RS)

Na przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych uzyskałem stosowną zgodę Komisji Etycznej Nr. 105/2012. W badaniach wykorzystano 72 czterotygodniowe samce szczurów (Fischer, F344/DuCrI; Charles River, Niemcy) przeznaczone m. in. do badań żywieniowych, o średniej masie 123 ± 9 g. Badania przeprowadzono w Zwierzętarńi Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Każda badana grupa liczyła 12 osobników, eksperyment trwał 8 tygodni. Z racji badań wpływu kiełków na funkcje tarczycy, wykonano dodatkową analizę zawartości związków siarki w wykorzystanych kiełkach oraz określono w nich zawartość jodu (metodą spektrofotometryczną). W trakcie eksperymentu monitorowano spożycie paszy oraz wody, jak również masę ciała zwierząt i ich dobrostan.

Po zakończeniu eksperymentu w pobranym materiale (osocze) zbadano następujące parametry: stężenie wolnych frakcji hormonów tarczycy fT3, fT4 oraz TSH, aktywność peroksydazy glutationowej (GPX3), katalazy, aktywność antyoksydacyjna osocza (FRAP). W gruczole tarczowym oznaczono aktywność peroksydazy glutationowej (GPX1), a także reduktazy tioredoksynowej (TR). Dodatkowo wykonano analizę histopatologiczną pobranych tarczyc, za którą odpowiedzialny był prof. dr hab. Krzysztof Okoń z Katedry Patomorfologii UJ CM.

Wyniki badań jednoznacznie wykazały, że kiełki brukwi, spożywane przez szczury przez okres ośmiu tygodni, w grupie kontrolnej, w której nie było uszkodzenia tarczycy, nie spowodowały działania tyreotoksycznego, na co wskazywał brak zmian w wartościach stężeń hormonów tarczycy oraz TSH i dodatkowo brak negatywnych zmian w obrazie histopatologicznym tarczycy.

W przypadku zastosowanych modeli uszkodzenia tarczycy dowiedziono, że w modelu z dietą z deficytem jodu, dodatek kiełków brukwi do paszy powodował jedynie wystąpienie tendencji wzrostowej w poziomie TSH (bez istotności statystycznej), zaś istotnie obniżyło się stężenie wolnej frakcji hormonów T3. Brak istotnych różnic w wartościach fT4 oraz TSH tłumaczony jest zdolnościami adaptacyjnymi zwierząt, co potwierdzają badania innych autorów na modelach 10-tygodniowych. Parametr TSH jest uznawany za wczesny marker niedoczynności tarczycy, co pozwala obserwować najbardziej widoczne zmiany już w eksperymentach 5-tygodniowych (36), jednak w pracy **H-5** przeprowadzono eksperyment dłuższy.

Drugi model, gdzie uszkodzenie tarczycy indukowano sulfadimetoksyną, powodował istotne podwyższenie wartości TSH, przy zarysowaniu jedynie pewnej tendencji w obniżaniu wartości fT3 i fT4.

Wyniki badań przedstawione w pracy **H-5** dokumentują pierwsze opublikowane dane, prezentujące wpływ przewlekłego spożycia kiełków warzyw kapustnych na tarczycę. W zależności od modelu uszkodzenia tego narządu, gdy szczury albo otrzymywały dietę z deficytem jodu, albo niedoczynność wywołana była przez sulfadimetoksynę, dodatek kiełków brukwi odmiennie wpływał na profil hormonów tarczycy i TSH. W przypadku modelu z deficytem jodu, dodatek kiełków brukwi nie nasilał negatywnych zmian, a wręcz je niwelował, co można tłumaczyć tym, że kiełki same mogą być źródłem jodu ($6,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ śm),

obniżając poziom TSH. Jednak w obrazie histopatologicznym tarczycy widoczne były negatywne zmiany w postaci formujących się brodawek, czy też agregacji limfocytów.

W przypadku modelu z sulfadimetoksyną, kielki działały synergistycznie, zwiększając efekt sulfonamidu przez podwyższenie TSH, przy równoczesnym istotnym obniżeniu poziomu fT3 i fT4. Statystyczna analiza korespondencji, wykorzystana w tej pracy, jednoznacznie wykazała istotne zależności pomiędzy zmianami w obrazie histopatologicznym (formowanie brodawek, agregację limfocytów), a modelem uszkodzenia tarczycy i wpływem dodatku kielków brukwi do paszy.

Dla utrzymania homeostazy tarczycy istotna jest również aktywność enzymów antyoksydacyjnych, które pośrednio uczestniczą m.in. w organifikacji jodu, a hormony tarczycy zaangażowane są w procesach, w których mogą powstawać wolne rodniki w organizmie. Dlatego oceniono aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych i wykazano, że aktywność GPX1 w tarczycy, a także GPX3 i katalazy w osoczu malała istotnie u zwierząt z deficytem jodu lub traktowanych sulfadimetoksyną i spożywających równocześnie kielki brukwi. W przypadku aktywności TR nie wykazano istotnych zmian.

Analizując wyniki badań biochemicznych, przedstawione w pracy **H-5**, za pomocą analizy składowych głównych wykazano, że odsetki wyników prawdziwie pozytywnych w poszczególnych skupieniach zwierząt (na płaszczyźnie wyznaczonej przez dwie pierwsze składowe główne) wynoszą 79%, 100%, 100%, 88% i 100% odpowiednio dla grupy C, R, RDI, S i RS. Jedyne wyniki badań zwierząt z grupy DI nie formowały osobnego skupienia. Wynik taki wskazuje na wyraźne różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt w wielowymiarowej przestrzeni parametrów, użytych do ich biochemicznej charakterystyki.

Na podstawie otrzymanych wyników należy uznać, że:

- Kielki brukwi nie spowodowały negatywnych zmian w obrazie tarczycy i poziomie hormonów, co wskazuje na brak działania tyreotoksycznego.
- Uszkodzenie tarczycy, zaindukowane deficytem jodu w diecie, było ograniczane przez spożycie kielków brukwi, prawdopodobnie na skutek obecności jodu w materiale roślinnym, przy czym ten korzystny efekt nie został potwierdzony w badaniu histopatologicznym.
- Uszkodzenie tarczycy, wywołane zastosowaniem sulfadimetoksyny, było nasilane przez dodatek kielków brukwi, co potwierdzały wyniki analizy histopatologicznej oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Aspekt nowości:

Po raz pierwszy wykazano, że kielki brukwi, wyhodowane z nasion o najwyższym stężeniu tyreotoksycznej progoitryny spośród jadalnych nasion roślin z rodziny *Brassicaceae*, nie uszkadzały tarczycy. Nowym jest także spostrzeżenie, że kielki te mogą wykazywać synergistyczne działanie z innymi czynnikami mogącymi uszkadzać tarczycę. Po raz pierwszy

zastosowano statystyczną analizę korespondencji do wykazania zależności pomiędzy zmianami w obrazie histopatologicznym tarczycy a modelem uszkodzenia tego narządu.

H-6. Paśko, P., Krośniak, M., Prochownik, E., Tyszka-Czochara, M., Foltta, M., Francik, R., Sikora, J., Malinowski, M., & Zagrodzki, P. (2018). Effect of broccoli sprouts on thyroid function, haematological, biochemical, and immunological parameters in rats with thyroid imbalance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 82-90.

Przeprowadzono analizę wpływu najbardziej popularnych kiełków, czyli kiełków brokułów na funkcję tarczycy. Model ten potraktowano jako model odniesienia dla wcześniej opisanych, i proponowanych do wprowadzenia na rynek spożywczy, kiełków brukwi. Po badaniach *in vitro* kiełków brokułów będących w ogólnej sprzedaży, przedstawionych w publikacji **H4**, materiał zliofilizowano i zlecono wykonanie 6 rodzajów odpowiednich pasz dla szczurów:

- Pasza kontrolna z prawidłową ilością jodu (C)
- Pasza kontrolna z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brokułów (B)
- Pasza z deficytem jodu (DI)
- Pasza z deficytem jodu i z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brokułów (BDI)
- Pasza kontrolna z prawidłową ilością jodu i sulfadimetoksyną w stężeniu 0,025% w postaci roztworu do picia (S)
- Pasza kontrolna z dodatkiem 7% liofilizowanych kiełków brokułów i sulfadimetoksyną w stężeniu 0,025% w postaci roztworu do picia (BS)

Na przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych uzyskałem stosowaną zgodę Komisji Etycznej Nr 76/2014. W badaniach wykorzystano 72 czterotygodniowe samce szczurów Wistar, o średniej masie 249.5 ± 9.1 g. Badania przeprowadzono

w Zwierzętarńi Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Każda grupa badana liczyła 12 osobników, eksperyment trwał 8 tygodni. W trakcie eksperymentu monitorowano spożycie paszy oraz wody, jak również masę ciała zwierząt i ich dobrostan.

Po zakończeniu eksperymentu w pobranym materiale (osocze) zbadano następujące parametry: stężenie wolnych frakcji hormonów tarczycy fT3, fT4 oraz TSH, aktywność GPX3, katalazy, i FRAP. W gruczole tarczowym oznaczono aktywność GPX1, a także TR. Dodatkowo wykonano analizę parametrów morfologicznych krwi, parametrów biochemicznych oraz wybranych markerów immunologicznych (IL-6, IL-10).

W przeprowadzonym badaniu, zaobserwowano istotne zmiany w parametrach tarczycowych w modelu indukcji niedoczynności tarczycy wywołanej przez sulfadimetoksynę.

Kiełki brokułów, dodane do paszy, nie spowodowały żadnych istotnych zmian stężenia hormonów tarczycy i TSH u badanych zwierząt. Podobnie jak w przypadku kiełków brukwi,

kiełki brokułów w modelu z deficytem jodu nie spowodowały zmian w homeostazie tarczycy. W modelu z sulfadimetoksyną dodatek kiełków brokułów niwelował negatywne efekty zarówno w odniesieniu do TSH, jak i fT3, co jest wynikiem zaskakującym i odmiennym od efektu obserwowanego w eksperymencie z kiełkami brukwi. Można to tłumaczyć różnicą w składzie jakościowym i ilościowym związków o aktywności biologicznej, gdyż w kiełkach brokułów dominuje sulforafan, podczas gdy w kiełkach brukwi goitryna.

W przypadku analizy statusu antyoksydacyjnego w badanym eksperymencie ciekawą obserwacją był wzrost aktywności TR na skutek dodania do diety kiełków brokułów, co potwierdza, że w modelach z uszkodzoną tarczycą kiełki brokułów poprawiały funkcjonowanie tarczycy.

Kiełki brokułów u szczurów z grupy kontrolnej, a więc w modelu prawidłowym, spowodowały istotne obniżenie ilości białych krwinek oraz trombocytów. Dodatkowo u zwierząt tych zaobserwowano istotny wzrost aktywności ALAT, co prawdopodobnie jest wynikiem indukcji cytochromów przez związki siarki, głównie glukorafaninę, będącą prekursorem sulforafanu, obecną w kiełkach (45). W przypadku parametrów lipidowych, odnotowano głównie istotne zmiany stężenia triglicerydów, które były skorelowane ze zmianami stężenia fT3. Nadmiar związków siarki, o udowodnionym działaniu toksycznym, przyjmowanych przewlekłe, może być przyczyną niekorzystnych zmian metabolicznych oraz hematologicznych (46-49), które zaobserwowano także w tym eksperymencie.

Kiełki brokułów, same jak i w połączeniu z deficytem jodu, czy też sulfadimetoksyną, nie spowodowały negatywnych zmian wartości parametrów opisujących krwinki czerwone, zmian stężenia glukozy, czy też zaburzeń w funkcji nerek.

W przypadku parametrów immunologicznych nie zaobserwowano zmian stężenia IL-10, zaś w przypadku IL-6, kiełki brokułów spowodowały obniżenie stężenia tej cytokiny w porównaniu z grupą, gdzie zastosowano dietę z deficytem jodu.

Analizując wyniki badań biochemicznych, przedstawione w pracy **H-6**, za pomocą analizy składowych głównych wykazano, że odsetki wyników prawdziwie pozytywnych w poszczególnych skupieniach zwierząt (na płaszczyźnie wyznaczonej przez dwie pierwsze składowe główne) wynoszą 45%, 82%, 50% i 58% odpowiednio dla grupy C, DI, BDI, S. Jedynie wyniki badań zwierząt z grupy B i BS nie formowały osobnego skupienia.

Na podstawie otrzymanych wyników należy uznać, że:

- Kiełki brokułów nie miały szkodliwego wpływu na funkcję tarczycy
- W modelach uszkodzenia tarczycy, niezależnie od mechanizmu, kiełki brokułów nie nasilały dysfunkcji tego gruczołu, a wręcz działały korzystnie na profil hormonów osi – przysadka – tarczyca. Tę tezę w pewnym stopniu wspomagają wyniki analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych.
- Zaobserwowano negatywny wpływ przewlekłego spożycia kiełków brokułów na ilość białych krwinek oraz trombocytów, jak również na aktywność ALAT.

Aspekt nowości:

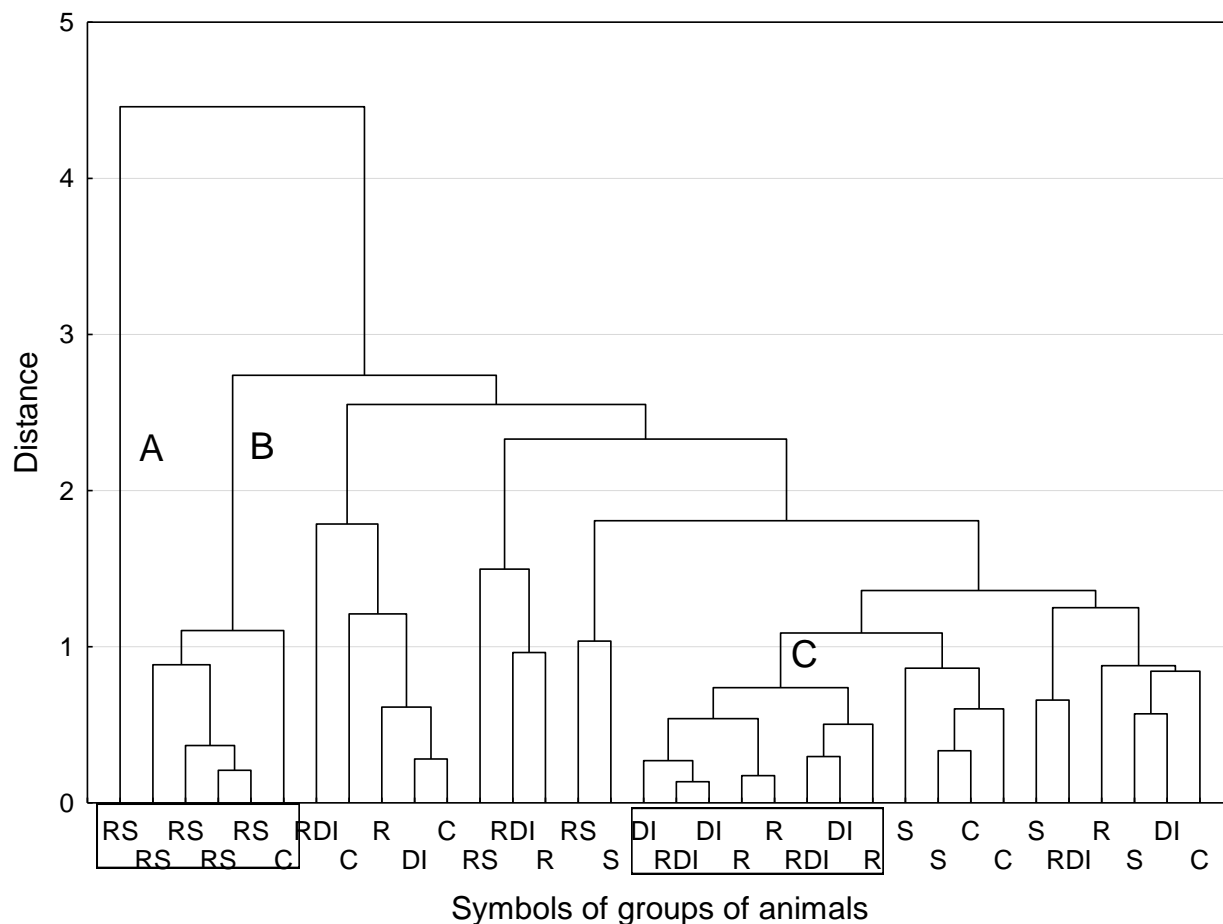
Po raz pierwszy zbadano wpływ kiełków brokułów na funkcję tarczycy oraz ich potencjalnie korzystny – hamujący wpływ na rozwój niedoczynności tarczycy, nawet w sytuacji, gdy w organizmie są sprzyjające czynniki do rozwoju tego schorzenia.

4. Podsumowanie

Dopełnieniem projektu habilitacyjnego są wyniki opisujące wpływ kiełków brukwi, stosowanych w modelach uszkodzenia tarczycy, na parametry morfologiczne, biochemiczne oraz immunologiczne szczurów. Jest to kontynuacja badania przedstawionego w pracy **H-5**, a wyniki te były prezentowane przeze mnie podczas międzynarodowej konferencji ASEAN Food Conference w Ho Chi Minh City w Wietnamie w 2017 roku i są aktualnie w trakcie recenzowania w czasopiśmie *Biological Trace Element Research*.

Wyniki tych analiz potwierdziły, że kiełki brukwi nie powodują żadnych istotnych zmian wartości parametrów morfologicznych, biochemicznych i immunologicznych, co jest kolejnym argumentem wskazującym na bezpieczeństwo spożywania kiełków brukwi w warunkach prawidłowych. Jednak w modelach uszkodzenia tarczycy kiełki te powodują nasilenie zmian negatywnych. W przypadku uszkodzenia tarczycy, wywołanego deficytem jodu, doszło, na skutek działania kiełków, do wzrostu liczby krwinek białych i stężenia triglicerydów, zaś w przypadku szczurów, u których za niedoczynność odpowiadała sulfadimetoksyna, zaobserwowano wzrost stężenia kreatyniny, triglicerydów oraz TNF-alfa, przy równoczesnym obniżeniu ilości trombocytów.

Badania parametrów immunologicznych w eksperymencie opisanym w pracy **H-5** wymagają dalszych analiz i stanowią wyzwanie na przyszłość. Ponieważ niedoczynność tarczycy może być związana z zaburzeniami odpowiedzi humoralnej, zbadanie zależności pomiędzy markerami uszkodzenia gruczołu tarczowego, a stężeniem cytokin pro- i przeciwzapalnych może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu progresji chorób tarczycy i zmian metabolicznych obserwowanych w modelach jej uszkodzenia (50-52). Analiza skupień wyników badań dotyczących zmian wartości stężeń IL-6, TNF-alfa i IL-10 wykazała kilka skupień (A, B, C) (Ryc. 2). Skupienia A i B traktowane łącznie były najbardziej jednorodnie i obejmowały tylko zwierzęta z grupy RS i jednego osobnika z grupy kontrolnej. Ponieważ skupienia A + B były najbardziej odległe od wszystkich pozostałych, można stwierdzić, że zastosowanie sulfadimetoksyny zmieniło najsilniej parametry immunologiczne u szczurów. W przeciwieństwie do tego, dieta z deficytem jodu, dodatek do paszy kiełków brukwi lub połączenie tych dwóch czynników spowodowało bardzo podobne zmiany u niektórych szczurów, ponieważ uformowały jedno skupienie C zawierające zwierzęta z grup DI, RDI i R. Pozostałe zwierzęta z różnych grup eksperymentalnych były rozmieszczone w różnych, niehomogenicznych skupieniach. Wywnioskowano więc, że warunki eksperymentalne nie zmieniają znacząco parametrów immunologicznych z wyjątkiem zwierząt, u których uszkodzenie tarczycy wywołano za pomocą sulfadimetoksyny.



Rycina 2. Analiza skupień parametrów immunologicznych u szczurów z dietą prawidłową, z uszkodzeniem tarczycy wywołanym zastosowaniem diety z deficytem jodu lub sulfadimetoksyną, oraz spożywających w diecie kiełki brukwi.

Wyniki badań będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej były przedstawiane przeze mnie na konferencjach międzynarodowych w Hiszpanii, Singapurze, Chinach i w Wietnamie w latach 2011 – 2017, i spotykały się z znacznym zainteresowaniem, gdyż spożycie warzyw kapustnych przez mieszkańców tych państw jest duże, natomiast problem potencjalnego działania tyreotoksycznego kiełków tych warzyw, szczególnie w Azji, nie jest powszechnie znany.

Konkluzje

- Zarówno czas, jak i sposób uprawy kiełków brukwi ma wpływ na zawartość związków o potencjalnym działaniu antyodżywcym.
- Kiełki brukwi oraz kiełki brokułów wykazują istotną selektywność działania wobec badanych komórek nowotworowych, i jest to działanie proapoptotyczne.
- Przedstawione wyniki rozprawy habilitacyjnej są pierwszym opublikowanym doniesieniem o wpływie kiełków warzyw kapustnych na funkcje tarczycy.

- Kiełki badanych warzyw kapustnych nie powodują negatywnego działania na tarczycę u zdrowych zwierząt.
- Zastosowane modele uszkodzenia tarczycy mogą być z powodzeniem stosowane w innych badaniach bromatologicznych nad działaniem tyreotoksycznym żywności, szczególnie z wykorzystaniem szczurów rasy Fischer (F344/DuCrI).
- Kiełki brukwi i brokułów mają odmienne działanie na funkcję tarczycy w modelach uszkodzenia tego narządu.
- Zastosowanie zaawansowanych wielowymiarowych metod statystycznych w analizie bromatologicznej, w badaniach na modelach *in vitro* oraz *in vivo*, daje możliwość pokazania struktury korelacji pomiędzy badanymi parametrami, a także ujawnienia możliwych różnic pomiędzy badanymi zwierzętami.
- Wyniki badań dotyczące komórek krwi wskazują na potrzebę oceny ewentualnego toksycznego działania kiełków warzyw kapustnych stosowanych przez dłuższy okres w dużych dawkach.

Badania będące przedmiotem rozprawy habilitacyjnej mogą stanowić istotny wkład w poszerzenie i uzupełnienie informacji dotyczących zaleceń żywieniowych roślin z rodziny *Brassicaceae*. Wydaje się to szczególnie ważne zwłaszcza w kontekście reorganizacji struktury piramidy żywieniowej i umieszczenia warzyw i owoców u jej podstawy, jak również w odniesieniu do wytycznych o spożyciu 5 porcji warzyw (szczególnie zielonych) i owoców dziennie. Jednak należy mieć na uwadze, że pomimo, iż wykazano bezpieczeństwo stosowania badanych kiełków na funkcje tarczycy, nie ma dostatecznych podstaw do przenoszenia tych informacji na organizm człowieka. Badania te są ważnym przyczynkiem do podjęcia dalszej analizy problemu wpływu wysokiego spożycia warzyw kapustnych i w ogóle diety na funkcjonowanie tarczycy, zwłaszcza w odniesieniu do zwiększającej się liczby osób ze schorzeniami tego narządu.

Dodatkowo czynnikiem, który zachęca do dalszych badań w tym zakresie jest zainteresowanie i chęć produkcji oraz wprowadzania na rynek spożywczy nowych produktów żywności funkcjonalnej przez polskich producentów. Szczególnie cenne w tej inicjatywie wydają się być zatem badania nad bezpieczeństwem takich produktów, prowadzone we współpracy pomiędzy przemysłem a jednostkami naukowymi.

IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych

W okresie do uzyskania tytułu doktora mój dorobek naukowy obejmował **21** artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których **4** to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z impact factorem (IF), **1** recenzowaną pracę anglojęzyczną w czasopismach bez IF oraz **16** artykułów w recenzowanych czasopismach polskojęzycznych. Dodatkowo jestem autorem **30** doniesień komunikatów zajazdowych, z czego **9** dotyczy konferencji międzynarodowych, a **21** konferencji krajowych. Suma IF za ten okres to **4,95**, zaś wartość punktów MNiSW = **126**.

Przed uzyskaniem stopnia doktora, równoległe do badań prowadzonych w ramach doktoratu, głównymi kierunkami w sferze moich zainteresowań były następujące tematy badawcze:

Analiza kwasów owocowych

Analiza kwasów organicznych (kwas cytrynowy, kwas winowy, kwas jabłkowy itd.) w sokach owocowych z wykorzystaniem nowej aparatury i nowej metody analitycznej (izotachoforezy), które posłużyły do oceny jakościowej soków i napojów oraz pozwoliły na analizę markerów starzenia. (publikacje P24, P25)

Kielki i nasiona pseudozbóż

Nowatorskim osiągnięciem było opracowanie warunków hodowli kiełków pseudozbóż – amarantusa i komosy. Dodatkowo, nasiona tych roślin wykorzystano w badaniach na zwierzętach, u których wyindukowano stres oksydacyjny. Nasiona pseudozbóż dodane do paszy tych zwierząt zmniejszyły działania niepożądane na poziomie metabolicznym, wywołane nadmierną generacją wolnych rodników. (publikacje A22, A23, A25, A26, A27, A28, A29, D8, P18, P20, P22, P23)

Modele zwierzęce stresu oksydacyjnego

Uczestniczyłem w kilku dużych eksperymentach mających na celu: (1) opracowanie modeli indukcji stresu oksydacyjnego oraz cukrzycy u zwierząt laboratoryjnych; stres ten był wywoływany za pomocą różnych dawek fruktozy, (2) obserwację zmian profilu lipidowego w osoczu szczurów poprzez zmianę zawartości smalcu w paszach zwierząt oraz (3) zbadanie w tych modelach wpływu dodatku do diety m.in. ziaren i kiełków gryki, soku aroniowego, ekstraktów żyta i fasoli czerwonej. Badania te były w części przedmiotem grantu KBN, o którym mowa w pkt załącznika I (publikacje A31, D3, D4, P15, P16)

Ankiety żywieniowe

Dodatkowym zadaniem realizowanym w okresie poprzedzającym otrzymanie tytułu doktora nauk farmaceutycznych było wykonywanie oraz analiza ankiet żywieniowych, przeprowadzanych głównie wśród studentów różnych uczelni. (publikacje P19, P26, P27, P28, P29)

Immunożywienie

Bardzo ciekawym elementem mojego rozwoju naukowego był udział w badaniach wpływu spożycia soków owocowych na różne parametry biochemiczne, w tym także parametry immunologiczne u ludzi. W ramach tego projektu analizowane były parametry immunologiczne, biochemiczne oraz morfologiczne we krwi, a także aktywność antyoksydacyjna osocza i aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak peroksydaza glutationowa, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa.

2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych

W okresie po uzyskaniu tytułu doktora mój dorobek naukowy z wyłączeniem artykułów włączonych w rozprawę habilitacyjną obejmował **47** artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których **27** to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z impact factorem (IF), **7** recenzowanych prac anglojęzycznych w czasopismach bez IF oraz **13** artykułów w recenzowanych czasopismach polskojęzycznych. Dodatkowo jestem autorem **8** rozdziałów w książkach, **43** doniesień komunikatów zajazdowych, z czego **13** dotyczy konferencji międzynarodowych, a **30** konferencji krajowych. Suma IF za ten okres to **59,555**, zaś wartość punktów MNiSW = **806**.

Po uzyskaniu stopnia doktora równoległe do badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej, głównymi kierunkami, będącymi w sferze moich zainteresowań były następujące tematy badawcze.

Interakcje leków z pożywieniem

Podczas stypendium naukowego w Jerozolimie zainteresowałem się tematem wpływu składników pożywienia na transportery lekowe: BCRP – *Breast Cancer Resistance Protein*, OATP – *Organic Anion Transporting Polypeptide*, MRP – *Multidrug Resistance Related Proteins*, NTCP – *Na⁺ - Taurocholate Cotransporting Polypeptide*, PEPT-1 – *Peptide Transporter 1*. Uczestniczyłem także w badaniach, dotyczących stopnia wiązania związków aktywnych, obecnych w owocach, z białkami osocza, przy wykorzystaniu zaawansowanych metod fluorymetrycznych. Dzięki temu doświadczeniu poszerzam nadal moją wiedzę w zakresie interakcji leków z pożywieniem i produktami naturalnymi o mechanizmy, jakie odpowiadają za modyfikacje działania transporterów leków przez aktywne biologicznie składniki owoców i warzyw oraz ich ingerencję w metabolizm leków. Dodatkowo zajmuję się również (we współpracy z prof. dr hab. Małgorzatą Zwolińską – Wcisło z Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych UJ CM) określanie wpływu długo- i krótkoterminowej terapii inhibitorami pompy protonowej oraz leków biologicznych (przeciwciała monoklonalne–infliksymb, adalimumab) na zasoby selenu, cynku, miedzi i żelaza u pacjentów ze schorzeniami przewodu pokarmowego. (publikacja A4, A6, A11, A12, A17, M1, M2, M3, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P14, P17)

Fortyfikacja oraz wpływ różnych rodzajów światła na aktywność biologiczną kiełków

Wykorzystując moje dotychczasowe doświadczenie w badaniach kiełków jako przykładu żywności funkcjonalnej, prowadzę badania nad fortyfikacją roślin jadalnych różnymi pierwiastkami, ze szczególnym uwzględnieniem jodu i selenu, oraz skutkami naświetlania światłem o różnych długościach fal. Wyhodowane kiełki badane są następnie w kierunku aktywności: przeciwzapalnej (linie RAW, stężenia IL-6), cytotoksycznej (linie HepG2, SW480, BJ, CHO-K, HTB-35), przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i antyoksydacyjnej. Dodatkowo określany jest mechanizm śmierci komórki (apoptoza, nekroza). Badania te prowadzę we współpracy m.in. z ośrodkiem badawczym w Irlandii (School of Biotechnology, Dublin City University). (publikacja A3, A13, A14)

Pseudozboża w żywieniu i w medycynie

Kontynuuję także tematykę badawczą związaną z analizą pseudozboż (amarantus, komosa ryżowa), którą rozpocząłem podczas pracy doktorskiej. Badania te są prowadzone we współpracy z międzynarodowym zespołem (Izrael, Polska, Meksyk, Chile) pod kierunkiem prof. Sheli Gorinstein, światowej klasy eksperta w dziedzinie pseudozboż, i dotyczą głównie charakterystyki białek oraz ich aktywności biologicznej i wpływu na ekspresję genów. Ponadto prowadzona jest analiza bromatologiczna produktów spożywczych, wytworzonych z pseudozboż (różne rodzaje chleba, mąka, płatki, popping, ciastka, chrupki). (publikacje A1, A2, A21). Tę aktywność badawczą dodatkowo poszerzam, będąc aktywnym członkiem Europejskiego Towarzystwa Badań nad Amarantusem.

Owoce tropikalne (duriany, kiwi) – potencjalne modulatory metabolizmu

We współpracy z jednostkami naukowymi z Izraela, Tajlandii i Korei Południowej uczestniczę w zadaniu badawczym dotyczącym działania owoców duriana (*Durio zibethinus*) oraz kiwi (*Actinidia sp.*) w modelach *in vitro* (linie komórkowe trzustki i wątroby) oraz *in vivo* (szczury z wyindukowaną cukrzycą). Projekt ten jest realizowany również z udziałem dr Małgorzaty Tyszki – Czochary z Zakładu Bromatologii UJ CM. (publikacja A7, A24, A30)

Opieka farmaceutyczna – aspekty bromatologiczne

W ramach zadań farmaceuty w obszarze opieki farmaceutycznej realizuję wspólny projekt wraz z Kliniką Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych UJ CM, dotyczący opieki nad pacjentem hepatologicznym w zakresie modyfikacji sposobu żywienia, stosowania leków oraz suplementów diety, jak również potencjalnych interakcji leków przeciwwirusowych z pożywieniem. Pacjent, u którego zdiagnozowano dysfunkcję wątroby, jest pacjentem wymagającym specjalistycznej opieki medycznej i farmaceutycznej, poszerzonej znacząco o elementy wiedzy bromatologicznej, dlatego w procesie leczenia należy podkreślać rolę farmaceuty. Dodatkowo, często angażuję się we wszelkie inicjatywy mające na celu rozszerzenie roli bromatologii w opiece farmaceutycznej. Uczestniczę między innymi jako wykładowca w cyklu konferencji "Opieka Farmaceutyczna od Zaraz", byłem także współorganizatorem konkursu opieki farmaceutycznej, przeprowadzonego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM w marcu 2017. (publikacja P10, P13)

Etnomedycyna i etnożywienie

W 2009 roku uczestniczyłem w ekspedycji naukowej nad Jezioro Bajkał, zorganizowanej przez Katedrę Farmakognozji UJ CM. W efekcie, poza poszerzeniem wiedzy o nawykach żywieniowych w rejonie Syberii, zainteresowałem się zagadnieniami etnomedycyny i etnofarmakologii oraz etnożywienia. Dzięki tej wyprawie nawiązałem także ścisłą współpracę z dr Agnieszką Galantą z tejże Katedry w zakresie badań profilu związków aktywnych w roślinach jadalnych oraz ich cytotoksyczności. Poszerzając te zainteresowania, nawiązałem dodatkowo współpracę międzynarodową z prof. Isabel Saraiva de Carvalho (Food Science Laboratory, Universidade do Algarve, Portugalia), dotyczącą badań nad roślinami leczniczymi Portugalii oraz z Katedrą Botaniki Farmaceutycznej UJ CM w zakresie badań jadalnych gatunków grzybów krajowych. (publikacje A5, A8, A16, A20, D5, D6)

Analiza warzyw kapustnych pod kątem ich metabolitów w organizmie człowieka

Mój najnowszy projekt badawczy stanowi kontynuację prac nad warzywami kapustnymi i związany jest z badaniem u zdrowych ludzi metabolitów związków siarkowych (glukozynolanów). Metabolity te są badane zarówno w formie wolnych izotiocyjanianów, jak i ich sprzężonych form, koniugatów (w kale i w moczu) oraz lotnych związków siarki (w wydychanym powietrzu oraz uwalnianych przez skórę). Na podstawie badań składu związków siarki w produktach spożywanych przez uczestników badania określone są struktury chemiczne prawdopodobnych metabolitów, które następnie są syntetyzowane, gdyż nie wszystkie substancje wzorcowe są dostępne komercyjnie. Dodatkowo badane są szlaki metabolizmu poszczególnych związków przez układ cytochromu P450 oraz wpływ diety na stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Badania mają charakter pilotażowy i realizowane są we współpracy z dr Moniką Marcinkowską z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM oraz z Instytutem Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. (publikacja A10)

Osiągnięcia dydaktyczne oraz w zakresie popularyzacji nauki zostały przedstawione w załączniku numer 4.



V. Piśmiennictwo

1. Herr, I., & Büchler, M. W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36(5), 377-383.
2. Steevens, J., Schouten, L. J., Goldbohm, R. A., & van den Brandt, P. A. (2011). Vegetables and fruits consumption and risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *International Journal of Cancer*, 129(11), 2681-2693.

3. Wu, Q. J., Yang, Y., Vogtmann, E., Wang, J., Han, L. H., Li, H. L., & Xiang, Y. B. (2012). Cruciferous vegetables intake and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *Annals of Oncology*, 24(4), 1079-1087.
4. Chiu, B. C., Ji, B. T., Dai, Q., Gridley, G., McLaughlin, J. K., Gao, Y. T., ... & Chow, W. H. (2003). Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(3), 201-208.
5. Pacin, A., Martínez, E., de Portela Martín, M. L., & Neira, M. S. (1999). Food consumption and intake of several nutrients in a population of the University of Luján, Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(1), 31-39.
6. Rajkumar, T., Sridhar, H., Balaram, P., Vaccarella, S., Gajalakshmi, V., Nandakumar, A., ... & Franceschi, S. (2003). Oral cancer in Southern India: the influence of body size, diet, infections and sexual practices. *European Journal of Cancer Prevention*, 12(2), 135-143.
7. Nel, J. H., & Casey, A. (2003). Secondary data analyses of dietary surveys undertaken in South Africa to determine usual food consumption of the population. *Public Health Nutrition*, 6(7), 631-644.
8. <http://www.minrol.gov.pl>
9. www.nutritiondata.com
10. Kunachowicz H, (2005), Tabele składu i wartości odżywczej żywności. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa ISBN 83-200-3112-5
11. Usda National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2879?manu=&fgcd>
12. Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2010). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251-280.
13. Huang, Z., Wang, B., Eaves, D. H., Shikany, J. M., & Pace, R. D. (2007). Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry*, 103(4), 1395-1402.
14. Podśędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
15. Świeca M., i in., (2012), Kielki brokułu jako źródło potencjalnie bioprzyswajalnych antyoksydantów. *Bromat. Chem. Toksykol*, 45(3), 488-493.
16. Baardseth, P., Bjerke, F., Martinsen, B. K., & Skrede, G. (2010). Vitamin C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1245-1255.
17. Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55(3), 224-236.
18. Kwiatkowska, E., & Sa'eed, B. (2007). Glukozynolany w profilaktyce chorób nowotworowych–mechanizmy działania. *Roczniki PZH*, 58(1), 7-13.

19. Śmiechowska, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2008). Przeciwrakotwórcze właściwości glukozynolanów zawartych w kapuście (*Brassica oleracea* var. *capitata*) oraz produktów ich rozpadu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 62, 125-140.
20. Velasco, P., Soengas, P., Vilar, M., Cartea, M. E., & del Rio, M. (2008). Comparison of glucosinolate profiles in leaf and seed tissues of different *Brassica napus* crops. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(4), 551-558.
21. Szwejdą-Grzybowska, J. (2011). Antykancerogenne składniki warzyw kapustnych i ich znaczenie w profilaktyce chorób nowotworowych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 44(4).
22. Paśko, P., Prochownik, E., Galanty, A., Bartoń, H., Tyszka – Czochara M., Zagrodzki, P., Zachwieja Z. (2018). Porównanie aktywności antyoksydacyjnej i całkowitej zawartości polifenoli w kiełkach i różyczkach brokułów. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* (praca zaakceptowana do druku).
23. Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., ... & Moskaug, Ø. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471.
24. Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A., & Jeffery, E. H. (1999). Variation of Glucosinolates in Vegetable Crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1541-1548.
25. Cartea, M. E., Rodríguez, V. M., de Haro, A., Velasco, P., & Ordás, A. (2008). Variation of glucosinolates and nutritional value in nabicol (*Brassica napus pabularia* group). *Euphytica*, 159(1-2), 111-122.
26. Razis, A. F. A., Bagatta, M., De Nicola, G. R., Iori, R., & Ioannides, C. (2011). Up-regulation of cytochrome P450 and phase II enzyme systems in rat precision-cut rat lung slices by the intact glucosinolates, glucoraphanin and glucoerucin. *Lung cancer*, 71(3), 298-305.
27. Astwood, E. B., Greer, M. A., & Ettliger, M. G. (1949). 1-5-Vinyl-2-thioxazolidone, an antithyroid compound from yellow turnip and from brassica seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 181, 121-130.
28. Chandra, A. K., Mukhopadhyay, S., Ghosh, D., & Tripathy, S. (2006). Effect of radish (*Raphanus sativus* Linn.) on thyroid status under conditions of varying iodine intake in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(8):653-61.
29. Knutsen, H. K., Alexander, J., BarregAard, L., Bignami, M., Brüscheiler, B., Ceccatelli, S., ... & Hoogenboom, L. R. (2016). Erucic acid in feed and food. *EFSA Journal*, 14(11).
30. Dżugan M.. (2007) Znaczenie warzyw kapustnych w profilaktyce nowotworów, *Zdrowie Publiczne*, 117 (3), 397-401.
31. Lo, M. T., & Hill, D. C. (1971). Effect of feeding a high level of rapeseed meal on weight gains and thyroid function of rats. *The Journal of Nutrition*, 101(8), 975-980.
32. Vermorel, M., Davicco, M. J., Evrard, J., Anglaret, Y., Genest, M., Leoty, C., ... & Souchet, R. (1987). Valorization of rapeseed meal. 3. Effects of glucosinolate content on food intake, weight gain, liver weight and plasma thyroid hormone levels in growing rats. *Reproduction Nutrition Développement*, 27(1A), 57-66.

33. Haery, A., Afsharypuor, S., Taher, M. A., & Khodarahmi, G. A. (1992). Anti-Thyroid Effect of White Cabbage Glucosinolates. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 5(4), 286-289.
34. Barry, T. N., Duncan, S. J., Sadler, W. A., Millar, K. R., & Sheppard, A. D. (1983). Iodine metabolism and thyroid hormone relationships in growing sheep fed on kale (*Brassica oleracea*) and ryegrass (*Lolium perenne*)–clover (*Trifolium repens*) fresh-forage diets. *British Journal of Nutrition*, 49(2), 241-253.
35. Pattanaik, A. K., Khan, S. A., Varshney, V. P., & Bedi, S. P. S. (2001). Effect of iodine level in mustard (*Brassica juncea*) cake-based concentrate supplement on nutrient utilisation and serum thyroid hormones of goats. *Small Ruminant Research*, 41(1), 51-59.
36. Ikeda, T., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kimura, S., & Hirose, M. (2000). Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the development of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis*, 21(4), 707-713.
37. Son, H. Y., Nishikawa, A., Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S., & Hirose, M. (2001). Lack of Effect of Soy Isoflavone on Thyroid Hyperplasia in Rats Receiving an Iodine-deficient Diet. *Cancer Science*, 92(2), 103-108.
38. Crofton, K. M. (2008). Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *International Journal of Andrology*, 31(2), 209-223.
39. De Groef, B., Decallonne, B. R., Van der Geyten, S., Darras, V. M., & Bouillon, R. (2006). Perchlorate versus other environmental sodium/iodide symporter inhibitors: potential thyroid-related health effects. *European Journal of Endocrinology*, 155(1), 17-25.
40. Capen, C. C., & Martin, S. L. (1989). The effects of xenobiotics on the structure and function of thyroid follicular and C-cells. *Toxicologic Pathology*, 17(2), 266-293.
41. Mullin, W. J., & Sahas-Rabudhe, M. R. (1977). Glucosinolate content of cruciferous vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(4), 1227-1230.
42. Yuan, G., Wang, X., Guo, R., & Wang, Q. (2010). Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry*, 121(4), 1014-1019.
43. Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V., Fernandes, D., Rosa, E., & Oliveira, M. B. P. (2015). Evaluating the impact of sprouting conditions on the glucosinolate content of *Brassica oleracea* sprouts. *Phytochemistry*, 115, 252-260.
44. Makowska-Wąs, J., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Tyszka-Czochara, M., Szewczyk, A., Nunes, R., ... & Paśko, P. (2017). Identification of predominant phytochemical compounds and cytotoxic activity of wild olive leaves (*Olea europaea* L. ssp. *sylvestris*) harvested in south Portugal. *Chemistry & Biodiversity*, 14(3).
45. Perocco, P., Bronzetti, G., Canistro, D., Valgimigli, L., Sapone, A., Affatato, A., ... & Barillari, J. (2006). Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 595(1), 125-136.
46. El Hendy, H.A.R. & Al-Gemeai, H.A.R.O. (2014). Effect of broccoli intake on antioxidant in the liver and kidney tissues of hyperglycemic rats. *Integr. Food Nutr. Metab.* 1(1) 83-86.

47. Okulicz, M., Hertig, I., & Chichlowska, J. (2010). In vivo metabolic and antioxidative effects of sulphoraphane derived from broccoli in water-and ethanol drinking rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(3).
48. Jayakumar, T., Chen, W. F., Lu, W. J., Chou, D. S., Hsiao, G., Hsu, C. Y., ... & Hsieh, C. Y. (2013). A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: ex vivo and in vivo studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(6), 1086-1095.
49. Trepanier, L. A. (2004). Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(3), 129-138.
50. Degertekin CK, YilmazBA, Toruner FB, Kalkanci A, Iyidir OT, Fidan I, Yesilyurt E, Cakir N, Kustimur S, Arslan M (2016) Circulating Th17 cytokine levels are altered in Hashimoto's thyroiditis. *Cytokine* 80:13-17.
51. Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, Egwuagu CE (2007) T H 17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature Med* 13(6):711.
52. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M (2005) IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67(4):1216-1233.