



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biofizyki Skazań Środowiska
Ul. Pomorska 141/143, 90-001 Łódź

Łódź, dnia 13 września 2016 r.

Dr hab. Jaromir Michałowicz, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biofizyki Skazań Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Włoch

***„Wpływ ekstraktów z wybranych gatunków roślin na właściwości
modelowych błon biologicznych”***

Związki polifenolowe są jedną z najbardziej rozpowszechnionych, biologicznie czynnych grup substancji organicznych występujących w środowisku przyrodniczym. Ze względu na obecność grup hydroksylowych oraz znaczne zróżnicowanie strukturalne tych związków, m.in. zmienną liczbę pierścieni aromatycznych oraz obecność różnych grup funkcyjnych, substancje te wykazują szerokie spektrum działania w tym przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwmikrobiologiczne czy przeciwmutagenne. Bogactwo polifenoli stwarza ogromne możliwości ich potencjalnego wykorzystania w postaci pojedynczych substancji oraz ich mieszanin (ekstraktów) w leczeniu lub wspomaganiu leczenia różnych schorzeń, a także umożliwia ich zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i innych.

Niezależnie od niekwestionowanego korzystnego wpływu różnych polifenoli oraz naturalnych mieszanin tych związków na organizm człowieka, nie można wykluczyć, iż niektóre z nich, szczególnie zastosowane w wysokich stężeniach, będą powodować niekorzystne efekty zdrowotne, co wymaga zbadania i w razie konieczności uwzględnienia podczas ich zastosowania.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Włoch „*Wpływ ekstraktów z wybranych gatunków roślin na właściwości modelowych błon biologicznych*” została wykonana w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Halina Kleszczyńska, a promotorem pomocniczym dr Hanna Pruchnik. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej były finansowane ze środków dwóch projektów MNiSW (N N305 337034 i N N304 173840), pt. „*Ochrona organizmów żywych przed wolnymi rodnikami przez naturalne substancje polifenolowe*” oraz „*Ochronny wpływ ekstraktów roślinnych na układy biologiczne narażone na promieniowanie UV*”

Rozprawę doktorską stanowi cykl pięciu spójnych tematycznie prac doświadczalnych, przy czym trzy z nich opublikowane zostały w czasopiśmie z listy JCR. Jest to zgodne z obowiązującymi aktami prawnymi, tj.: Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

Włoch A., Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2009) Antioxidative activity of baicalin and extract from Scullap and their influence on erythrocytes membrane. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Biologia i Hodowla Zwierząt LVIII, 527, 171-178.

Włoch A., Oszmiański J., Sarapuk J., Kleszczyńska H. (2012) The effect of *Hypericum perforatum* extract on the properties of erythrocytes membrane. Journal of Medicinal Plants Research 6, 3766-3772.

Włoch A., Kapusta I., Bielecki K., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2013) Activity of hawthorn leaf and bark extracts in relation to biological membrane. *Journal of Membrane Biology* 246, 545-556.

Włoch A., Strugała P., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2015) Physical effects of buckwheat extract on biological membrane *in vitro* and its protective properties. *Journal of Membrane Biology* 249, 155-170.

Pruchnik H., Włoch A., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2015) Interactions of skullap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) extracts with lipid bilayers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 121, 475-484.

Całkowita wartość współczynnika oddziaływania publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej wynosi 6,977, natomiast łączna liczba punktów prac według listy czasopism punktowanych MNiSW wynosi 81.

Poza spisem i kopiami powyżej wymienionych publikacji, Doktorantka dołączyła obszerny autoreferat, w którym zawarła streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, objaśnienia stosowanych skrótów, wstęp, stosowane metody, wyniki i wnioski pracy doktorskiej, literaturę i Jej dorobek naukowy.

Do pracy doktorskiej został dołączony również załącznik w postaci oświadczeń współautorów o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach. Z załączonych oświadczeń współautorów oraz informacji dotyczących pracy wykonanej przez każdego z nich w zakresie realizacji badań i tworzeniu publikacji, jednoznacznie wynika, iż udział Pani mgr Aleksandry Włoch w powstaniu doktoratu był wiodący. Potwierdza to również fakt, iż w czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w piątej drugim autorem. Brakuje mi jedynie pisemnego oświadczenia Doktorantki, które w sposób formalny porządkowałoby informację o Jej udziale procentowym w powstaniu poszczególnych publikacji.

Celem pracy doktorskiej była analiza ilościowa, jak i jakościowa polifenoli obecnych w ekstraktach uzyskanych z różnych części wybranych gatunków roślin (dziurawiec, głóg, gryka, tarczycza bajkalska) oraz określenie ich wpływu na właściwości wybranych błon biologicznych w tym błonę erytrocytu (w pełni

funkcjonalnej komórki oraz jej tzw. cienia), liposomów utworzonych z lipidów błonowych oraz liposomów utworzonych z jednego rodzaju lipidów syntetycznych – dimirystoilofosfatydylocholiny. Użycie powyżej wymienionych modeli błon umożliwiło dokładną ocenę oddziaływania związków fenolowych na obszar hydrofilowy i hydrofobowy błony, a w szczególności ich wpływu na dynamikę i uporządkowanie lipidów. Co bardzo istotne, dobór modeli badawczych pozwolił także ocenić znaczenie fazy lipidowej w oddziaływaniach molekularnych polifenoli z błonami biologicznymi.

Materiał badawczy stanowiły ekstrakty polifenolowe pozyskane z kwiatów dziurawca (*Hypericum perforatum*), kory i liści głogu (*Crataegus oxycantha*), łusek i łodyg gryki (*Fagopyrum esculentum* Moench) oraz tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis* Georgi) pochodzących z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Metody badawcze zostały umiejętnie dobrane, umożliwiając przeprowadzenie analiz niezbędnych do uzyskania wyników dających odpowiedź na postawiony cel pracy. W pracy wykorzystano techniki chromatograficzne, spektroskopii UV-ViS, mikroskopii optycznej i elektronowej, fluorymetrii, różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni. Na uznanie zasługuje liczba i różnorodność użytych metod, co niewątpliwie świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

W opisie metody dotyczącej oznaczania stopnia peroksydacji lipidów (3.1.1. *Test TBARS*) oraz w pracy, pt. „*Aktywność przeciwutleniająca bajkaliny i ekstraktu tarczycy bajkalskiej oraz ich wpływ na błonę erytrocytu*” odnalazłem pewną nieścisłość. Doktorantka pisze, iż *miarą stopnia utleniania lipidów błonowych było stężenie dialdehydu malonowego*. W rzeczywistości w metodzie tej oznaczano absorbancję różnych produktów peroksydacji lipidów w tym dialdehydu malonowego (MDA), natomiast stopień utleniania lipidów przeliczany był przy zastosowaniu molowego współczynnika absorpcji dla MDA.

Na podstawie uzyskanych wyników, Pani mgr Aleksandra Włoch formułuje liczne wnioski: (1) Analiza ilościowa i jakościowa wybranych ekstraktów wykazała, że są one bogatym źródłem związków polifenolowych, jednak największą ilość związków polifenolowych posiada ekstrakt z tarczycy bajkalskiej, (2) Użyte ekstrakty są aktywnymi przeciwutleniaczami, ponieważ skutecznie chronią lipidy błonowe

przed utlenieniem, jednak ich aktywność zależy od czynnika indukującego utlenienie jak i metody badawczej. Niektóre ekstrakty posiadają wyższą aktywność niż Trolox[®], (3) Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych zależy nie tylko od zawartości związków polifenolowych, ale również od ich rodzaju, (4) Badane ekstrakty nie indukują hemolizy krwinek czerwonych przy stężeniach stosowanych w badaniach, czyli nie działają destrukcyjnie na błonę erytrocytów, (5) Badane ekstrakty powodują wzrost oporności osmotycznej krwinek czerwonych w roztworach hipotonicznych chlorku sodu, (6) Użyte ekstrakty indukują powstawanie echinocytów, co wskazuje, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach lokują się głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony erytrocytów, (7) Ekstrakty gryki wykazują aktywność przeciwzapalną, hamując aktywność enzymu cyklooksygenazy (COX-2), (8) Związki polifenolowe zawarte w ekstraktach wiążą się z częścią hydrofilową błony erytrocytów, powodując wzrost nieuporządkowania główek polarnych lipidów, o czym świadczy zmiana wartości uogólnionej polaryzacji (GP) oraz współczynnika dichroizmu (R) i parametru uporządkowania (S), (9) Związki polifenolowe zawarte w ekstraktach z gryki nie wnikają do obszaru hydrofobowego dwuwarstwy, o czym świadczy brak zmian anizotropii fluorescencji (A), w przeciwieństwie do ekstraktu z dziurawca, który powodował wzrost płynności błony, (10) Ekstrakty z tarczycy bajkalskiej oraz z łusek i łodyg gryki praktycznie nie powodują zmian temperatury głównego przejścia fazowego liposomów uformowanych z DMAC, co potwierdza ich lokalizację w obszarze hydrofilowym dwuwarstwy lipidowej jak wskazywały na to wyniki uzyskane innymi metodami.

We wniosku dotyczącym hemolitycznego wpływu ekstraktów na erytrocyty, Doktorantka pisze, iż *badane ekstrakty nie indukują hemolizy krwinek czerwonych przy stężeniach stosowanych w badaniach, czyli nie działają destrukcyjnie na błonę erytrocytów*. Uważam, że drugą część wniosku należałoby pominąć, jest ona, bowiem zbyt ogólna i może nie być zgodna z rzeczywistością w odniesieniu do ekstraktów polifenolowych o wyższych stężeniach niż te, które stosowano w pracy.

Mam również pytanie do Doktorantki. Na stronie 35 swojego autoreferatu, pisze Ona, iż: *Wpływ ekstraktów na błonę biologiczną wykazał, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach lokują się głównie w części hydrofilowej błony. Można, zatem sądzić, że ich obecność w tym obszarze stanowi swoistą barierę chroniącą błony biologiczne przed wolnymi rodnikami ograniczając ich dyfuzję do*

wnętrza błony. Ta niewątpliwie korzystna właściwość polifenoli mogłaby mieć teoretycznie również inne implikacje chociażby ze względu na potencjalne oddziaływanie tych substancji ze związkami pożądanymi dla komórki, np. substancjami pokarmowymi czy sygnalizacyjnymi, które są transportowane do wnętrza erytrocytu lub z powodu wpływu polifenoli na aktywność enzymów błonowych w tym ATPazy i acetylocholinoesterazy. Czy według Doktorantki, istnieje taka możliwość, jaki mógłby być kierunek takich interakcji i czy tego typu badania w ogóle były dotychczas realizowane?

Reasumując, należy podkreślić, iż mgr Aleksandra Włoch podjęła się realizacji interesującego i ważnego tematu, zaś uzyskane wyniki mogą w przyszłości stanowić podstawę do praktycznego wykorzystania badanych ekstraktów polifenolowych w medycynie, farmakologii, przemyśle spożywczym czy kosmetologii.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia tym samym wymogi określone w art. 16 i 17. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy mgr Aleksandry Włoch i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Jaromir Michałowicz, prof. nadzw. UŁ