



Wrocław 19.09.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Włoch pt.

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

Podstawą rozprawy doktorskiej jest pięć opublikowanych prac, w tym trzy w czasopiśmie z listy JCR:

1. Włoch A., Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2009) Antioxidative activity of baicalin and extract from Scullcap and their influence on erythrocyte membrane. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Biologii i Hodowli Zwierząt* LVIII, 572, 171-178
2. Włoch A., Oszmiański J., Sarapuk J., Kleszczyńska H. (2012) The effect of *Hypericum perforatum* extract on the properties of erythrocyte membrane. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(21), 3766-3772
3. 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
4. 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(1), 155-170
5. Pruchnik H., Włoch A., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2015) Interaction of skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) extracts with lipid bilayers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 121, 475-484

W czterech z wymienionych prac mgr Aleksandra Włoch jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest dominujący. Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są monotematyczne i bazują na badaniach doświadczalnych, wykonanych w interdyscyplinarnym zespole naukowców. Tematem wiążącym te prace jest wpływ ekstraktów z wybranych roślin na właściwości błon biologicznych i modelowych.

Plac Grunwaldzki 13
Wrocław

adres do korespondencji:
Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

T: +48 (71) 320 65 80
+48 (71) 327 77 27
F: +48 (71) 327 77 27

Na rozprawę doktorską składają się wymienione publikacje wraz ze szczegółowym omówieniem stosowanych materiałów, metod i uzyskanych wyników. Rozprawę kończy 10 szczegółowych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, co pozwala stwierdzić iż cel rozprawy został osiągnięty. Ponadto do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów na temat ich udziału w poszczególnych pracach. Całość poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Godny uwagi jest także dorobek naukowy Doktorantki, na który składa się 9 publikacji naukowych (nie uwzględniając prac stanowiących rozprawę) oraz 33 komunikaty konferencyjne (w tym 6 konferencji zagranicznych).

W ramach rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Włoch przedstawiła cykl publikacji, których tematem przewodnim są badania wpływu ekstraktów z różnych części wybranych roślin, wykazujących znaczące aktywności biologiczne, z których warto wymienić: przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwalergiczne, przeciwnowotworowe oraz regulujące pracę układu pokarmowego, krążenia i moczowego. We wszystkich tych przypadkach badane substancje, zawarte w ekstraktach, w pierwszej kolejności napotykają barierę stanowiącą przez błony cytoplazmatyczne komórek. Zatem, aby ocenić ich aktywność biologiczną, należy zastosować techniki badawcze pozwalające przybliżyć molekularne mechanizmy odpowiedzialne za obserwowane efekty. Ich poznanie powinno prowadzić do lepszego, bardziej optymalnego, skutecznego i racjonalnego zastosowania badanych preparatów.

Rośliny, z których badano ekstrakty, to powszechnie znane: dziurawiec, głóg, gryka czy tarczycza bajkalska. Należy w tym miejscu podkreślić, że materiałem badawczym są tu oprócz wcześniej stosowanych części wymienionych roślin np. kwiaty dziurawca, także te które wcześniej nie stanowiły przedmiotu intensywnych badań, jak: łuski i łodygi gryki czy też kora i liście głogu. Istotne jest również to, że temat którym zajęła się Doktorantka wpisuje się w rozwijane obecnie techniki tworzenia żywności funkcjonalnej, mającej także olbrzymie znaczenie w profilaktyce wielu schorzeń.

Doktorantka pracując w interdyscyplinarnym zespole naukowym zapoznała się z wieloma technikami badawczymi, które zostały wykorzystane w realizacji tematu, będącego przedmiotem niniejszej rozprawy. Przed rozpoczęciem zasadniczych badań należało wyizolować i scharakteryzować uzyskane ekstrakty. Pozwoliło to Doktorantce zapoznać się z metodami izolacji, oczyszczania, oceny jakościowej i ilościowej (wysokowydajna chromatografia cieczowa, chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem masy).

Koncentrując się na technikach pozwalających ocenić efekty biologiczne należy wymienić, zaczynając od mikroskopii optycznej i elektronowej, dzięki którym analizowała zmiany kształtu erytrocytów poddanych działaniu badanych ekstraktów. Ważną techniką stosowaną w Jej badaniach jest spektroskopia w zakresie widzialnym. Tu godny podkreślenia jest szeroki zakres stosowania tej techniki w badaniach: aktywności hemolitycznej oraz oporności osmotycznej erytrocytów (analiza ilości uwolnionej hemoglobiny), aktywności przeciwutleniającej (test TBARS – wykrywający produkty utlenienia lipidów, test z gaszeniem aktywności barwnego kationorodnika ABTS^{•+}),

aktywności przeciwzapalnej (śledzenie aktywności enzymu prozapalnego cyklooksygenazy 2). Badania spektroskopowe w zakresie ultrafioletu pozwoliły śledzić tworzenie dienów sprzężonych będących miarą utleniania lipidów. Ważną techniką stosowaną w badaniach Doktorantki jest także spektroskopia fluorescencyjna, za pomocą której śledziła proces hamowania utleniania lipidów przez ekstrakty roślinne (stosując sondę DPH-PA) oraz płynność i uporządkowanie lipidów tworzących błony (sondy: DPH, TMA-DPH, Laurdan, merocjanina). Listę stosowanych metod spektrofotometrycznych, będących podstawą warsztatu naukowego Doktorantki, domyka spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) pozwalająca badać próbki na poziomie oddziaływań promieniowania z zakresu podczerwieni z określonymi grupami funkcyjnymi. Ważną techniką badawczą, która znalazła także zastosowanie w realizacji tematu rozprawy, jest różnicowa kalorymetria skaningowa. Technika ta pozwoliła zbadać wpływ ekstraktów roślinnych na przejścia fazowe modelowych błon lipidowych.

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorantka realizując temat swojej rozprawy doktorskiej znacznie wzbogaciła swój warsztat badawczy co bardzo dobrze rokuje na dalszą Jej działalność naukową.

Analizując rozprawę doktorską Pani mgr A. Włoch nasunęło mi się kilka uwag. W opisie rozprawy w języku polskim można znaleźć kilka, powszechnie stosowanych skrótów myślowych, które z języka naukowego powinny być eliminowane, np. „spadek całkowitego cholesterolu..”, „emitująca fluorescencję...” , „Intensywności fluorescencji emitowane...” czy „...ich aktywność zależy od czynnika indukującego utlenianie jak i metody badawczej.”

Ocena ochrony lipidów przed utlenieniem za pomocą ekstraktu z tarczycy bajkalskiej, przeprowadzona została za pomocą reakcji produktów utlenienia z kwasem tiobarbiturowym (TBA). Miarą utlenienia jest wzrost absorbancji światła o długości fali 535nm. Wielu autorów, w tym i Doktorantka wskazuje na reakcję dialdehydu malonowego z kwasem TBA. W tym miejscu chciałbym się podzielić uwagą na temat produktów utlenienia kwasu linolowego. Po 24 godzinach naświetlania promieniowaniem UVA+UVB próbki kwasu linolowego nie wykryto (techniką HPLC) finalnego produktu utlenienia jakim jest dialdehyd malonowy (nie mniej jednak w miarę upływu czasu utleniania przybywało produktu reakcji TBA z którymś z produktów utlenienia). Proces utleniania lipidów jest złożony i wieloetapowy. Może warto przeprowadzić badania wyjaśniające to zagadnienie. W związku z powyższym, chciałbym zachęcić Doktorantkę do zapoznania się z innymi metodami chemii analitycznej śledzenia produktów utleniania lipidów. Tu, jednak należy podkreślić, że Doktorantka doskonale opanowała spektroskopowe metody badania tego procesu zarówno poprzez produkty utlenienia kwasu linolowego (pomiar stężenia dienów sprzężonych) jak i pośrednio, oznaczając spadek aktywności chemicznych czynników utleniających w obecności ekstraktów roślinnych (gaszenie kationorodnika ABTS^{•+} oraz zmiana aktywności rodników alkilowych powstałych z AAPH).

Aktywność przeciwzapalną badanych ekstraktów Doktorantka zbadała poprzez zmiany aktywności enzymu cyklooksygenazy 2 w obecności wyekstrahowanych związków. Twierdzi, że enzym ten uczestniczy w syntezie mediatorów odpowiedzi zapalnej: prostaglandyn i leukotrienów. Miarą aktywności tego enzymu jest zmiana absorbancji fali o długości 611nm. Jednakże brakuje informacji, który ze składników mieszaniny inkubacyjnej wykazuje charakterystyczną absorbancję.

Badania kalorymetryczne prowadzone były na liposomach utworzonych z DMPC (14 atomów węgla). Co stanowiło podstawę wyboru tego lipidu? Temperatura głównego przejścia fazowego błony utworzonej z DMPC jest istotnie niższa od temperatury fizjologicznej człowieka.

Badane ekstrakty zawierają mieszaninę wielu związków, wśród których dominują związki polifenolowe. Uzasadnione jest zatem prowadzenie wstępnych badań aktywności biologicznej tych mieszanin, jednakże w przypadku pozytywnych rezultatów, następnym krokiem powinna być próba wyizolowania poszczególnych składników (lub użycie syntetycznych analogów), aby określić ich oddziaływania na poziomie molekularnym. Czy w przypadku badanych ekstraktów jest to możliwe, czy też istnieją jakieś ograniczenia i trudności?

Aby w pełni ocenić znaczenie prozdrowotne badanych ekstraktów, ważna jest ocena stężenia tych związków w badaniach *in vivo*. W tym momencie chciałbym zapytać Doktorantkę o ocenę możliwości prowadzenia tego typu badań? Jakie ilości ekstraktów należy spożyć aby uzyskać ich stężenia w osoczu krwi zbliżone do zakresu stężeń stosowanych w badaniach *in vitro*?

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa zawiera ważne aspekty poznawcze a uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz spożywczym.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia warunki zawarte w art. 16 i 17 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (14.03.2003; Dz. U. nr 65 z późniejszymi zmianami) dlatego wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Włoch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, dnia 16 września 2016

dr hab. Krystian Kubica

