



Wrocław 19.12.2013

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Cyboran pt.

„Aktywność biologiczna ekstraktów z liści wybranych roślin w odniesieniu do błon biologicznych i modeli lipidowych błon”

Rozprawę doktorską stanowią cztery opublikowane prace, z czego trzy w czasopismach z Listy Filadelfijskiej:

1. Sylwia Cyboran, Dorota Bonarska-Kujawa, Ireneusz Kapusta, Jan Oszmiański, Halina Kleszczyńska (2011) Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes, *Current Topics in Biophysics* 34, 15-21 (9 pkt.)
2. Dorota Bonarska-Kujawa, Sylwia Cyboran, Jan Oszmiański, Halina Kleszczyńska (2011) Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants, *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 2339-2347 (15 pkt.)
3. Sylwia Cyboran, Jan Oszmiański, Halina Kleszczyńska (2012) Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane, *Cellular and Molecular Biology Letters* 17, 77-88, (IF 1,953, 15pkt.)
4. Sylwia Cyboran, Jan Oszmiański, Halina Kleszczyńska (2013) Modification of the lipid phase of biological and model membranes by bilberry leaf extract, *Food Biophysics*, DOI 10.1007/s11483-013-9309-0, (IF 1,642, 30pkt.)

W dalszej części recenzji będę się odwoływał do poszczególnych publikacji podając przypisany wyżej kolejny numer.

Wszystkie wymienione prace mają charakter doświadczalny, stanowią zwarty cykl monotematyczny, dotyczący zagadnienia wpływu wybranych ekstraktów roślinnych na własności błon biologicznych i modelowych.

W przedstawionym cyklu artykułów mgr inż. Sylwia Cyboran jest trzy razy wymieniona jako pierwszy autor. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach wynosi: 40%, 30%, 50% oraz 50%.

Na rozprawę doktorską składają się, wymienione już publikacje, ponadto 6 komunikatów konferencyjnych (w tym 4 międzynarodowe), oświadczenia współautorów na temat udziału w poszczególnych pracach. Całości poprzedzona jest poprawnie zredagowanym streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, które zatytułowano podsumowaniem.

Celem rozprawy jest określenie aktywności biologicznej ekstraktów polifenolowych z liści wybranych drzew i krzewów oraz badanie mechanizmów molekularnych oddziaływań składników w nich zawartych z błonami biologicznymi. Podjęty tu problem jest ważny ze względu na prozdrowotne własności związków zawartych w badanych ekstraktach wykazujących między innymi działania przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwwgrzybicze oraz przeciwbakteryjne. Skutki działania na organizm tych związków najczęściej kojarzą się z dietą bogatą w owoce. W ocenianej rozprawie zwrócono także uwagę na możliwość dostarczania organizmowi bezpiecznej ilości tych związków w postaci ekstraktów z liści jabłoni, truskawki, czarnej porzeczki oraz borówki czarnej. Biorąc pod uwagę czasopisma naukowe, które są podstawą rozprawy doktorskiej, w szczególności *Journal of Medical Plant Research* oraz *Food Biophysics*, przedstawione w nich wyniki badań są w zakresie zainteresowań przemysłu spożywczego oraz kosmetycznego ze względu na własności konserwujące jak i prozdrowotne tych ekstraktów. Prace tego typu nie tylko wzbogacają naszą wiedzę ale stanowią także przyczynek do tak pożądanej współpracy nauki z przemysłem.

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

Oceniając rozprawę doktorską Pani mgr inż. Sylwii Cyboran warto omówić jej bogaty warsztat badawczy. Badania prowadzone były na erytrocytach, izolowanych błonach erytrocytów a także na liposomach utworzonych z lipidów izolowanych z erytrocytów. Taki dobór obiektów badań pozwolił ocenić znaczenie samej fazy lipidowej w analizie oddziaływań molekularnych badanych związków polifenolowych z błonami biologicznymi. Badania z użyciem erytrocytów dotyczyły aktywności hemolitycznej składników wspomnianych ekstraktów. Eksperymenty te zostały przeprowadzone w zakresie stężeń (0,01-0,5) mg/ml, znacznie przekraczających stężenia fizjologiczne i nie wykazały destrukcyjnego działania w kontakcie z błonami erytrocytów. Interesującym uzupełnieniem tych badań było sprawdzenie oporności osmotycznej krwinek. Za miarę oporności osmotycznej przyjęto wartość parametru C_{50} , definiowanego poprzez stężenie roztworu NaCl, który indukuje 50% hemolizę erytrocytów. Badania te wykazały, że ekstrakty z liści jabłoni oraz truskawki w stężeniu 0,01 mg/ml (znacznie niższym od maksymalnych stężeń stosowanych w badaniach hemolitycznych) zwiększają oporność osmotyczną erytrocytów, co należy uznać jako jeden z aspektów ich prozdrowotnego znaczenia. Ekstrakty nie tylko nie uszkadzają błon komórek krwi ale zwiększają wytrzymałość błon erytrocytów.

Kolejnym zadaniem badawczym poruszonym przed Doktorantką było określenie zdolności antyoksydacyjnej wspomnianych ekstraktów. Tu należy wspomnieć, że badania te poprzedzone były analizą ilościową i jakościową stosowanych ekstraktów. Wyniki badań z użyciem ekstraktów roślinnych porównywane były z antyoksydacyjną aktywnością standardowego przeciwutleniacza Troloxu®. W badaniach tych zastosowano dwa rodzaje czynników utleniających: chemiczny – AAPH oraz fizyczny – promieniowanie UVC. Wnikliwa analiza uzyskanych rezultatów pozwoliła stwierdzić, że ekstrakt z liści truskawki jest równie skutecznym antyoksydantem jak Trolox®. Interesującym wynikiem jest także odkrycie, że aktywność antyoksydacyjna nie zależy od całkowitej ilości związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z liści truskawki, czarnej porzeczki oraz jabłoni ale od ich rodzaju. Dobrym przykładem jest ekstrakt z liści truskawki, który wykazuje znacznie lepszą aktywność antyoksydacyjną niż ekstrakt z liści jabłoni, który zawiera dwukrotnie więcej związków polifenolowych. Wysoką aktywność antyoksydacyjną ekstraktu z liści czarnej jagody przypisano obecności kwasu chlorogenowego. Ważne, z poznawczego oraz praktycznego punktu widzenia, jest porównanie wyników badań prowadzonych na modelach lipidowych błon z wynikami badań na błonach biologicznych (błonach erytrocytów). Chcąc uzyskać ten sam poziom ochronny błony erytrocytów należy zastosować o około 30% wyższe stężenie ekstraktów, niż w stosunku do błon modelowych.

Uzupełnieniem badań natury biofizycznej były badania mikroskopowe, które pozwoliły wykazać zmiany kształtu erytrocytów potraktowanych ekstraktami. Ekstrakty w użytym zakresie stężeń od 0,01 do 0,1 mg/ml wywoływały zmiany kształtu erytrocytów. W obrazie mikroskopowym dominowały głównie echinocyty, a przy wyższych stężeniach ekstraktów ich formy o wyższych indeksach morfologicznych tj. sferoechinocyty oraz sferocyty. Zgodnie z danymi literaturowymi, zmiany te dowodzą gromadzeniu się cząsteczek modyfikujących błonę cytoplazmatyczną głównie w zewnętrznej monowarstwie.

Badaniami dopełniającymi wiedzę o wpływie składników ekstraktów polifenolowych na własności błon lipidowych jakie zostały wykonane przez Doktorantkę, są pomiary metodą fluorymetryczną. Odpowiednio dobrane sondy fluorescencyjne pozwoliły wnioskować o uporządkowaniu molekularnym błon erytrocytów oraz wcześniej wspomnianych liposomów. Badania te pozwoliły stwierdzić, że substancje zawarte w ekstraktach z liści jabłoni, truskawki oraz czarnej porzeczki, wiążą się z hydrofilową warstwą błony, zmieniając jej uporządkowanie, a konkretnie zmniejszając je. Największe zmiany w uporządkowaniu hydrofilowego obszaru błony zaobserwowano dla ekstraktu z liści truskawki, który wykazał także najlepsze własności antyutleniające. Trafnym uzupełnieniem tych badań były pomiary fluorymetryczne z użyciem innej sondy (DPH), dzięki której można wnioskować o wpływie substancji modyfikujących na właściwości fizyczne hydrofobowego obszaru błony. Badania te nie wykazały znaczących zmian w tym obszarze po modyfikacji błon ekstraktami z liści. Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych na błonach erytrocytów są zgodne z wynikami uzyskanymi dla liposomów. Na podstawie tych obserwacji Doktorantka wnioskuje, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach nie wbudowują się do części hydrofobowej błon ze względu na brak zmian w płynności tej warstwy.

Na szczególną uwagę zasługują techniki badawcze stosowane przez Doktorantkę. W badaniach oceny antyoksydacyjnej stosowała technikę spektroskopową opartą na reakcji kwasu tiobarbiturowego z produktami utlenienia łańcuchów węglowodorowych oraz metodę fluorymetryczną. Ta ostatnia technika, z odpowiednio dobranym zestawem sond, pozwoliły Jej także badać zmiany w uporządkowaniu poszczególnych warstw błon. Wnioskowanie na poziomie molekularnym podparła także wynikami obserwacji mikroskopowych – mikroskopią optyczną oraz mikroskopią elektronową. Wszystkie uzyskane wyniki pomiarowe poddane były także starannej interpretacji statystycznej z wykorzystaniem pakietu Statistica. W trakcie realizacji swej pracy zapoznała się także ze spektroskopią masową, chromatografią cieczową HPLC a także ze sposobami ekstrakcji związków polifenolowych z materiału roślinnego.

Podsumowując, Doktorantka posługując się wieloma technikami badawczymi wykazała wysoką aktywność biologiczną ekstraktów z liści wybranych roślin przy jednoczesnym braku toksyczności w odniesieniu do erytrocytów. Wysoka skuteczność antyoksydacyjna badanych ekstraktów wynika z ich wiązania się w hydrofilowym obszarze błony. Ich obecność w tym obszarze powoduje, że tworzą one barierę, która zabezpiecza błonę przed atakiem wolnych rodników.

Ponadto, wykazała Ona, że w wyniku wiązania się użytych substancji z błoną, następuje wzrost jej wytrzymałości na zmiany ciśnienia osmotycznego w otaczającym ją środowisku.

Należy także podkreślić umiejętny dobór literatury, zarówno we wstępach do poszczególnych artykułów jak i dyskusji własnych wyników badań. Łączna ilość cytowanej literatury nie jest imponująca jak na rozprawę doktorską (razem 147 pozycji) ale jest normą w tego typu publikacjach. Jestem przekonany, że wykonanie wszystkich zadań jakich podjęła się Doktorantka wymagało znacznie głębszych studiów literaturowych.

Analizując poszczególne artykuły stanowiące rozprawę Pani mgr inż. S. Cyboran nasunęło mi się kilka uwag polemicznych oraz pytań. We wszystkich pracach określono zakres stężeń wprowadzanych odpowiednich ekstraktów wyrażony w mg/ml. W pracy nr 4 podano stężenia fizjologiczne do kilkudziesięciu nmol/dm³. Aby ocenić znaczenie badanych ekstraktów warto także oszacować stężenie wybranych związków, wyrażone w tych samych jednostkach.

Do oceny utlenienia lipidów stosowano technikę opartą na założeniu, że miarą utlenienia jest ilość powstałego diladehydu malonowego, który w obecności kwasu tiobarbiturowego tworzy barwny addukt. Warto pamiętać, że ten produkt utlenienia lipidów nie musi występować we wczesnych etapach tego procesu.

W rozdziale poświęconym hemolizie i oporności osmotycznej erytrocytów, w pracy nr 3, opisano przygotowanie erytrocytów do dalszych eksperymentów. Nie jest oczywiste dlaczego do badań hemolitycznych erytrocyty przemywano czterokrotnie buforem fosforanowym a do badań oporności osmotycznej tylko trzy razy. Ponadto, w badaniach hemolitycznych erytrocyty inkubowane były w temperaturze 37°C w czasie 0,5 godziny, natomiast w badaniach oporności osmotycznej dwa razy dłużej.

Badania techniką fluorymetryczną z użyciem sondy Laurdan pozwoliły zmierzyć zmiany uporządkowania główek polarnych lipidów tworzących membrany, indukowane ekstraktami z wybranych liści (truskawki i jabłoni). Na podstawie tych badań Doktorantka wnioskuje o spadku uporządkowania hydrofilowego obszaru błon modyfikowanych wspomnianymi ekstraktami. Warto mieć na uwadze to, że aktywna część sondy Laurdan lokuje się w obszarze glicerolu cząsteczek lipidowych tworzących membrany. Zmniejszenie uporządkowania molekularnego na „wysokości” glicerolu powinno skutkować także zmianami potencjału elektrycznego wynikającego z rozkładu ładunków części polarnych cząsteczek lipidowych. Zmiany te mogą mieć istotne znaczenie w procesie transportu wielu substancji obdarzonych ładunkiem elektrycznym, dlatego warto zasugerować dalsze badania tego zjawiska (np. wyznaczenie potencjału zeta).

W pracy nr 3, na rysunku 3 nie zaznaczono udziału sferocytów (4). Oprócz tego ilość echinocytów (2) modyfikowanych ekstraktem z liści jabłoni o stężeniu 0,1mg/ml jest około dwa razy większa w porównaniu do ich ilości obserwowanych przy stężeniu 0,01 mg/ml. W przypadku dyskocytów (0) obserwujemy odwrotną tendencję, natomiast ilość dyskoechinocytów (1) nie zależy od stężenia ekstraktu. Czy wyjaśnienie tego faktu można oprzeć tylko na podstawie preferencyjnego wbudowywania się związków polifenolowych do zewnętrznej warstwy błony erytrocytów? (znaczenie białek cytoszkieletu).

Z biologicznego punktu widzenia trudno się zgodzić z cytowanym fragmentem, pochodzącym ze wstępu pracy nr.4: ...”Erythrocytes were treated as an examle and model of the cell and their membranes as a model of the biological membrane. Liposomes were a one-component model membrane created from lipids extracted from the erythrocytes membrane”. Erytrocyty są komórkami biologicznymi (aczkolwiek znacząco różnymi od innych komórek człowieka) a ich błona jest zbudowana z wielu rodzajów lipidów, zatem liposomy z nich utworzone nie mogą być jedno-składnikowe.

W pracy nr 4 we wstępie umieszczono tabelę 1 opisującą procentowy udział poszczególnych składników w ekstrakcie z liści borówki czarnej oraz wiele danych związanych ze spektroskopią masową, które nie mają znaczenia dla tej pracy.

Z uwagi na to, że rozprawę doktorską stanowią wszystkie cztery publikacje, wymienione uchybienia, które zapewne umknęły uwadze recenzentów czasopism, nie obniżają wysokiej jakości całości.

Doktorantka wykazała umiejętność poprawnego przedstawienia uzyskanych wyników i ich interpretacji. Zadania wynikające ze wstępów poszczególnych artykułów zostały prawidłowo wykonane, z właściwym doбором metod i technik badawczych. Cenne jest także potencjalne znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników w przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym

Uważam, że rozprawa przewyższa warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Sylwii Cyboran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, dnia 25 listopada 2013

dr hab. Krystian Kubica

