

Lublin, 14 grudnia 2013 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Cyboran pt. „Aktywność biologiczna ekstraktów z liści wybranych roślin w odniesieniu do błon biologicznych i modeli lipidowych błon”

Reaktywne formy tlenu, w tym wolne rodniki, są przedmiotem zainteresowania przedstawicieli wielu obszarów badawczych nauk przyrodniczych, w tym również tych związanych z biofizyką membran biologicznych. Poszukiwanie związków chemicznych o charakterze antyoksydantów, w tym również ochraniających przed destrukcją oksydacyjną składniki membran lipidowych, stanowi istotny element aktywności badawczej na pograniczu farmakologii, nauki o żywieniu oraz badań dedykowanych przemysłowi kosmetycznemu. Wśród popularnych antyoksydantów, których aktywność biologiczna poznana została, między innymi, w oparciu o badania biofizyczne znajdują się karotenolidy, tokoferole oraz polifenole, wśród nich zaś szczególnie flawonoidy. Aktywności antyoksydacyjnej tej ostatniej klasy związków poświęcona została właśnie rozprawa doktorska pani mgr Sylwii Cyboran. O ile, w większości tego typu prac analizowane są owoce, bądź też wyizolowane związki w czystej postaci chemicznej, przedmiotem badań w ramach ocenianej rozprawy stały się ekstrakty z liści popularnych roślin, charakteryzujących się obecnością różnorodnych związków z klasy polifenoli, między innymi z liści jabłoni, truskawki oraz czarnej jagody. Podjęta tematyka badań jest w mojej ocenie interesująca i ważna a samo zastosowane podejście oryginalne oraz

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



wartościowe. Waga podjętych wyzwań badawczych wiąże się bezpośrednio z udokumentowaną aktywnością profilaktyczną oraz leczniczą związków z klasy polifenoli w wielu jednostkach chorobowych, w tym związanych z układem krążenia oraz schorzeniami onkologicznymi.

Praca wykonana została w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pod kierunkiem pani prof. dr hab. Haliny Kleszczyńskiej przy współudziale pani dr inż. Doroty Bonarskiej-Kujawy w charakterze promotora pomocniczego. Ośrodek, w którym przygotowana została rozprawa doktorska, należy do czołowych krajowych centrów, w których prowadzone są badania naukowe w obszarze biofizyki membran biologicznych.

Ocenianą rozprawę doktorską stanowi zestawienie czterech oryginalnych artykułów badawczych, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych, w których udział doktorantki uznać można za istotny. Wniosek ten opieram na stosownych oświadczeniach współautorów załączonych na końcu rozprawy. W ramach rozprawy zamieszczone zostały również kopie komunikatów konferencyjnych, prezentowanych ze współautorstwem Doktorantki. Waga zestawionych w ramach rozprawy prac, jeśli by oceniać ją na podstawie parametrów scientometrycznych, jest zróżnicowana; od czasopism nie znajdujących się na tzw. „Liście Filadelfijskiej”, jak *Current Topics in Biophysics*, do czasopism międzynarodowych o szerszym zasięgu, jak *Cellular and Molecular Biology Letters* (IF=1.953) czy też *Food Biophysics* (IF=1.642). Pomimo formalnego zróżnicowania czasopism wyselekcjonowanych do pierwotnej publikacji wyników przeprowadzonych badań wszystkie prace zawierają, w mojej ocenie, ważne rezultaty badań eksperymentalnych, które zestawione w ramach rozprawy doktorskiej tworzą nawet wartość dodaną, wiążącą się z wieloaspektowym spojrzeniem na problem związany z antyoksydacyjnym efektem ekstraktów z liści bogatych w polifenole. Przeprowadzone badania opierają się, przede wszystkim, na charakterystyce aktywności przeciwutleniającej wybranych ekstraktów z liści, oraz porównawczo, wyizolowanych z nich związków o szczególnie wysokim potencjale antyoksydacyjnym (na przykład kwercetyny). Procesy oksydacyjne generowane były na drodze ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UVC oraz indukowane oddziaływaniem z tzw. generatorem wolnych rodników z fazy wodnej AAPH. Detekcja produktów utleniania, w ramach badań zamieszczonych w rozprawie, opierała się na pomiarach kolorymetrycznych barwnego produktu oddziaływania dialdehydu malonowego z kwasem



tiobarbiturowym (tzw. detekcja TBARS, tiobarbituric acid reactive species) oraz zaniku sygnału fluorescencji sond umieszczanych w fazie lipidowej (TMA-DPH). Metoda ta opiera się na oksydacyjnym przerwaniu układu podwójnych wiązań sprzężonych fluoroforu. Badania powyższe prowadzone były w oparciu o błony erytrocytów, tzw. „ghosts”. Bardzo ważną częścią rozprawy jest również próba znalezienia odpowiedzi na pytanie: jakie mechanizmy na poziomie molekularnym odpowiedzialne są za obserwowaną aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z liści? Badania w ramach tej części pracy doktorskiej przeprowadzone zostały w oparciu o układy modelowe jakimi były membrany erytrocytów oraz dodatkowo liposomy. Podejścia eksperymentalne opierały się na analizach mikroskopowych badanych obiektów, pomiarach hydrolizy erytrocytów oraz analizach przeprowadzonych w oparciu o spektroskopię fluorescencyjną z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych, między innymi Laurdanu. Przedmiotem tych ostatnich analiz był parametr anizotropii fluorescencji oraz parametr uogólnionej polaryzacji.

Jako tzw. „zszywka” rozprawa nie zostawia wiele pola doktorantowi do wykazania się talentem edytorskim. Zaznaczyć jednak chciałbym, że części formalne rozprawy, których jest ona jedynym miejscem publikacji (chodzi tu głównie o streszczenia w języku polskim oraz angielskim), zredagowane zostały bardzo starannie oraz klarownie. Zaproponować mógłbym jedynie pojedyncze korekty:

1. Str. 4., 2. wiersz od góry (oraz odpowiednio na str. 13. w wersji anglojęzycznej streszczenia), czas retencji nie jest własnością spektralną, proponuję więc przeredagować, np. „na podstawie czasów retencji oraz właściwości spektralnych...”,
2. Str. 4., 14. wiersz od dołu, zamiast „tiobarbitulowym” powinno być „tiobarbiturowym”,
3. Str. 12., 9. wiersz od góry, zamiast „studies” raczej „studied”.

W pełni podzielam zdanie Doktorantki co do wskazania najważniejszych wyników rozprawy, mające wyraz w krótkiej dyskusji zawartej w ramach siedmiostronicowego streszczenia. Osobiście za szczególnie istotne osiągnięcie w ramach rozprawy uważam udokumentowanie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów liści w stosunku do błon



biologicznych, wskazanie które składniki tych ekstraktów mogą odpowiadać za zaobserwowane efekty oraz zaproponowanie mechanizmów molekularnych, opierających się na modyfikacji własności strukturalnych dwuwarstw lipidowych, na drodze których realizowana być może opisana aktywność antyoksydacyjna.

Tak zaawansowane i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Sylwii Cyboran, pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem może być sformułowanie następujących problemów oraz pytań:

1. Efekt obniżenia parametru polaryzacji uogólnionej (GP), związany z obecnością polifenoli w błonach lipidowych, zinterpretowany został jako wyrażający modyfikację własności strukturalnych dwuwarstwy lipidowej, polegający na dezorganizacji rejonu głów polarnych. Z drugiej strony, obserwuje się ograniczenie ataku AAPH oraz wolnych rodników z fazy wodnej do wnętrza błony. Czy możliwe jest, że obniżenie GP nie odzwierciedla dezorganizacji rejonu głów polarnych ale związane jest z obecnością większej ilości cząsteczek wody w tym rejonie, związanych wiązaniami wodorowymi z cząsteczkami zakotwiczonych w membranie polifenoli? Cząsteczki te mogłyby nawet tworzyć dodatkową sieć wiązań wodorowych wzmacniających strukturę dwuwarstwy. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat.
2. Czy możliwe jest, że inne niż polifenole związki obecne w ekstraktach z liści, w tym szczególnie barwniki ksantofilowe jak luteina, mogły by być współodpowiedzialne za obserwowane efekty strukturalne oraz antyoksydacyjne w stosunku do membran?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Sylwia Cyboran przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu biofizyki oraz również umiejętności praktycznych z zakresu preparatyki



biochemicznej. Wyniki prac badawczych, uzyskane w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane, wnosząc do nauki światowej z obszaru biofizyki oraz naukowych podstaw żywienia i farmakologii wiele nowych i cennych informacji. W mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania. Uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie pani mgr Sylwii Cyboran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki