

Spis treści

- | | |
|-------------------------------------|----|
| 1. Streszczenie | 2 |
| 2. Streszczenie w języku angielskim | 11 |

Załączniki:

1. Publikacje naukowe stanowiące pracę doktorską
2. Komunikaty konferencyjne
3. Oświadczenia współautorów

1. Streszczenie

Współczesna medycyna boryka się z szeregiem problemów związanych ze skutecznym leczeniem różnych chorób w tym cywilizacyjnych. Badania naukowe wykazują, że przyczyną groźnych chorób, w tym choroby Alzheimera, Parkinsona, nowotworów i innych, jest duże stężenie wolnych rodników w organizmie. Powstają one w procesach fizjologicznych oraz w wyniku działania na organizm czynników fizykochemicznych. Nadmiar wolnych rodników w organizmie jest spowodowany złym funkcjonowaniem naturalnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich usuwanie. W związku z tym prowadzone są intensywne badania nad poszukiwaniem nowych skutecznych zmiataczy wolnych rodników. Prowadzone na całym świecie badania substancji roślinnych, a w szczególności polifenolowych wykazały, że są one skutecznymi zmiataczami wolnych rodników. Aktualna wiedza zatem zwraca uwagę na substancje roślinne które mogą być stosowane w profilaktyce i leczeniu.

Substancje polifenolowe występują w różnych częściach roślin, a ich aktywność biologiczna polegająca na redukcji wolnych rodników zależy od rodzaju tych związków, zatem od rodzaju rośliny i od lokalizacji w roślinie. Głównym źródłem substancji polifenolowych w diecie człowieka są owoce i warzywa, zatem związkom w nich zawartym poświęca się dużo uwagi. Bogatym źródłem substancji polifenolowych są także liście, jednak są one znacznie mniej popularne ze względu na brak możliwości ich bezpośredniego spożycia, w przeciwieństwie do owoców. Prezentowana praca miała na celu określenie aktywności biologicznej substancji polifenolowych zawartych w liściach, które mogą być skuteczne w ochronie i leczeniu organizmów, dostarczane im w postaci ekstraktów stanowiących suplement diety. Ich aktywność antyoksydacyjna może być też wykorzystana w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Badania naukowe dowodzą, że substancje polifenolowe wykazują m.in. działanie przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze, antybakteryjne, przeciwzapalne i inne. Racjonalne ich wykorzystanie w profilaktyce i leczeniu będzie możliwe, jeżeli zostanie poznany molekularny mechanizm oddziaływania tych substancji, odpowiedzialny za skutki ich prozdrowotnego działania.

Prezentowana praca doktorska miała na celu analizę ilościową i jakościową wybranych ekstraktów polifenolowych z liści drzew i krzewów owocowych. Określenie ich aktywności biologicznej, w tym antyoksydacyjnej, a także określenie molekularnego mechanizmu ich oddziaływania z błoną biologiczną na podstawie

zmian parametrów fizycznych błony. Błona biologiczna jest głównym a często jedynym miejscem oddziaływania czynników fizykochemicznych z organizmami. W literaturze światowej niewiele jest prac poświęconych zastosowaniu ekstraktów z liści drzew i krzewów owocowych, mimo że stwierdzono ich prozdrowotne właściwościach. Nie został też dotąd poznany molekularny mechanizm odpowiedzialny za to pozytywne działanie.

Prowadzone badania aktywności biologicznej substancji zawartych w ekstraktach z liści dotyczyły komórek, błon biologicznych oraz lipidowych modeli błon. Erytrocyty traktowano, jako przykład i model komórki a ich błony jako model błony biologicznej. Przedmiotem badań były także liposomy utworzone z lipidów wyekstrahowanych z błony erytrocytów, które stanowiły jednoskładnikowy model błony biologicznej. Uproszczony lipidowy model błony biologicznej, ułatwia interpretację wyników otrzymanych dla złożonego układu białkowo-lipidowego, jakim jest błona biologiczna.

Stosowane wyciągi roślinne, w ramach współpracy naukowej, otrzymywano z Katedry Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie przeprowadzana była analiza ilościowa i jakościowa związków polifenolowych zawartych w ekstraktach, przy użyciu metod chromatografii cieczowej.

Badania aktywności biologicznej ekstraktów dotyczyły ich aktywności hemolitycznej i przeciwutleniającej oraz ich wpływu na właściwości fizyczne błony. Badania aktywności hemolitycznej związków polifenolowych zawartych w ekstraktach przeprowadzono metodą spektrofotometryczną. Celem tych badań było określenie zakresu stężeń, w którym nie wykazują one destrukcyjnego działania na błonę erytrocytów. Aktywność antyoksydacyjną ekstraktów zbadano przy użyciu metod spektrofotometrycznej i fluorymetrycznej, z zastosowaniem dwóch czynników indukujących utlenianie, w odniesieniu do błony erytrocytów i lipidowej. Skutki oddziaływania ekstraktów z błoną określano na podstawie ich wpływu na parametry fizyczne błony, przy użyciu metod mikroskopowych i spektroskopowych. Skutki te w szczególności określano na podstawie: zmiany kształtu i oporności osmotycznej erytrocytów, stopnia uporządkowania główek polarnych lipidów błonowych oraz płynności błony.

Analizę ilościową związków polifenolowych zawartych w ekstraktach przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej HPLC-DAD lub UPLC-DAD,

analizę jakościową z wykorzystaniem metody UPLC-ESI-MS. W metodach tych związki zawarte w ekstraktach identyfikowano na podstawie ich właściwości spektralnych tj. czasu retencji i długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji (λ_{\max}), oraz masy cząsteczkowej [1-4].

Aktywność hemolityczną ekstraktów określano na podstawie stopnia hemolizy krwinek modyfikowanych ekstraktami użytymi w szerokim zakresie stężeń. Stopień ten obliczano na podstawie wartości absorbancji supernatantu, zawierającego określone stężenie hemoglobiny uwolnionej z komórki, zmierzonej przy długości fali $\lambda = 540$ nm w odniesieniu do absorbancji supernatantu zawierającego całkowicie uwolnioną z erytrocytów hemoglobinę. Uzyskany stopień hemolizy wyrażano w procentach i porównywano ze stopniem hemolizy krwinek niemodyfikowanych [3,4]. Wzrost stopnia hemolizy krwinek w obecności użytych substancji w stosunku do krwinek niemodyfikowanych świadczy o ich destrukcyjnym działaniu na błonę erytrocytów, w wyniku czego staje się ona przepuszczalna dla hemoglobiny.

Badania *aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów* przeprowadzono dwiema metodami z wykorzystaniem dwóch czynników indukujących utlenianie błon erytrocytów i lipidowych; promieniowaniem UVC i związkiem AAPH. W metodzie spektrofotometrycznej stopień utlenienia lipidów określano po różnych czasach ich naświetlania promieniowaniem UVC, na podstawie stężenia dialdehydu malonowego (MDA), powstającego w procesie peroksydacji lipidów. W wyniku reakcji MDA z kwasem tiobarbitulowym (TBA) powstaje barwny addukt o maximum absorpcji przy długości fali $\lambda = 535$ nm. Zmierzona przy tej długości fali wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia MDA i jest miarą stopnia peroksydacji lipidów. Spadek wartości absorbancji w obecności użytych substancji świadczy o ochronie lipidów błonowych przed utlenieniem indukowanym promieniowaniem UVC. W metodzie fluorymetrycznej wolne rodniki, indukowane przez promieniowanie UVC lub związek AAPH, utleniają sondę DPH-PA zmniejszając emitowaną przez nią fluorescencję. Za miarę stopnia utlenienia błon erytrocytów i lipidowych, przyjęto wartość względnej intensywności fluorescencji tej sondy, którą obliczono jako stosunek intensywności fluorescencji sondy w funkcji czasu jej utleniania w obecności ekstraktów, lub w próbce kontrolnej, względem początkowej wartości jej intensywności fluorescencji. Substancje polifenolowe zawarte w ekstraktach zmiatając wolne rodniki, zmniejszają spadek intensywności fluorescencji sondy DPH-PA. W tych dwóch stosowanych metodach za miarę aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów przyjęto takie stężenie

ekstraktów, które odpowiada za 50 % zahamowanie procesu peroksydacji lipidów (IC_{50}) [1,2,4]. Stężenie to pozwala porównać aktywność antyoksydacyjną różnych ekstraktów.

Przy użyciu metody spektrofotometrycznej określono również *wpływ ekstraktów na oporność osmotyczną erytrocytów*. Na podstawie zmierzonej absorbancji przy długości fali $\lambda = 535$ nm określano stopień hemolizy krwinek w roztworach hipotonicznych chlorku sodu, które potraktowano wcześniej ekstraktami. Mniejsza hemoliza krwinek modyfikowanych badanymi substancjami w stosunku do krwinek niemodyfikowanych, powoduje przesunięcie krzywej hemolitycznej w kierunku niższych stężeń chlorku sodu, co świadczy o wzroście wytrzymałości błony erytrocytów na zmiany ciśnienia osmotycznego środowiska. Wpływ ekstraktów na oporność osmotyczną erytrocytów wyrażano w postaci stężenia NaCl, przy którym 50 % erytrocytów uległo hemolizie (C_{50}) [3,4].

Przy użyciu mikroskopów optycznego i elektronowego zbadano *wpływ związków zawartych w ekstraktach na kształt erytrocytów*. Na podstawie zarejestrowanych zdjęć krwinek modyfikowanych i kontrolnych przeprowadzono klasyfikację kształtów erytrocytów wg skali Bessis'a i Brecher'a, w której określonym kształtom krwinek są przypisane odpowiednie indeksy morfologiczne; zerowy dla dyskocytów, ujemne dla stomatocytów oraz dodatnie dla echinocytów. Na podstawie zdjęć z mikroskopu optycznego określono procentowy udział poszczególnych form erytrocytów w badanej populacji wynoszącej ok. 800 komórek. Powstawanie echinocytów w obecności badanych substancji, zgodnie z teorią Sheetz'a i Singer'a, świadczy o ich koncentracji głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony erytrocytów, natomiast indukowanie stomatocytów świadczy o kumulacji związków głównie w monowarstwie wewnętrznej [3,4].

Metodą fluorymetryczną przy użyciu sond fluorescencyjnych Laurdan, TMA-DPH i DPH lokujących się na różnych głębokościach dwuwarstwy lipidowej błon określono *wpływ ekstraktów na właściwości hydrofilowego i hydrofobowego obszaru błon*. Wpływ ekstraktów na uporządkowanie fazy hydrofilowej błony erytrocytów i liposomów zbadano przy użyciu sondy Laurdan, której chromofor lokuje się na poziomie glicerolu cząsteczek lipidowych. Parametr uporządkowania był reprezentowany przez wartość uogólnionej polaryzacji (GP) tej sondy, wrażliwej na polarność najbliższego otoczenia. Spadek wartości GP w obecności substancji modyfikujących błony świadczy o wzroście nieuporządkowania główek polarnych

lipidów, natomiast wzrost GP jest spowodowany wzrostem ich uporządkowania. Ponadto, na podstawie zmian wartości anizotropii fluorescencji (A) sond DPH i TMA-DPH określono wpływ ekstraktów na płynność hydrofobowego obszaru błon erytrocytów i liposomów. Sonda TMA-DPH emituje fluorescencję z poziomu czwartego węgla łańcuchów węglowodorowych lipidów, natomiast niespecyficzna sonda DPH lokuje się w różnych miejscach hydrofobowego obszaru błony. Zmiany anizotropii fluorescencji tych sond odzwierciedlają ruchliwość znacznika w błonie, która zależy od płynności łańcuchów alkilowych lipidów [3,4].

Wybrane przez autora badania pozwalają na określenie lokalizacji związków zawartych w ekstraktach w błonie, na podstawie zmian parametrów fizycznych błony, wywołanych w tych obszarach. Jeżeli wyniki tych badań wykażą, że użyte wyciągi posiadają podobne właściwości jak roślinne substancje polifenolowe już stosowane, to można sądzić, że mogą one być również wprowadzone do różnych gałęzi przemysłu.

Analiza ilościowa i jakościowa związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z liści jabłoni, truskawki, czarnej porzeczki i czarnej jagody wykazała, że są one bogatymi źródłami tych substancji. Do głównych składników ekstraktów jak pokazały badania należą pochodne flawonoli, głównie kwercetyny i kempferolu oraz kwasy fenolowe m.in. kwas chlorogenowy [1-4,10]. Wykazano również, że wśród przebadanych ekstraktów, najwięcej związków polifenolowych zawiera ekstrakt z liści czarnej jagody, w którym stanowią one około 50 % wszystkich składników ekstraktu [4]. Ponadto, przeprowadzone badania wskazują, że związki polifenolowe zawarte w liściach i owocach jabłoni, znacząco się różnią, zarówno pod względem typu zidentyfikowanych związków jak i ich ilości [2].

Przeprowadzone badania aktywności hemolitycznej ekstraktów z liści jabłoni, truskawki, czarnej porzeczki i czarnej jagody wykazały, że związki w nich zawarte nie indukują hemolizy krwinek, jej poziom był zbliżony z obserwowanym dla krwinek kontrolnych. Badania te prowadzone w szerokim zakresie stężeń dowodzą, że ekstrakty te nie działają destrukcyjnie na błonę [3,4,6-8]. Oznacza to, że mogą być bezpiecznie stosowane bez ryzyka uszkodzenia struktury błony i zaburzenia jej funkcji.

Badania aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów przeprowadzono w odniesieniu do błony biologicznej [1,2,4,5,7,9,10] i lipidowej [4,10]. Wykazały one, że związki zawarte w ekstraktach w różnym stopniu chronią lipidy błonowe przed

utlenieniem indukowanym czynnikami fizykochemicznymi. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów, jak wykazały badania, zależy od typu stosowanego induktora wolnych rodników tj. promieniowania UVC lub związku AAPH, od stężenia ekstraktów oraz od rodzaju błony. Wykazano także, że zdolność związków polifenolowych zawartych w ekstraktach do zmiatania wolnych rodników zależy od rodzaju związków zawartych w ekstraktach i od ich stężenia [1,2,4]. Wyniki badań wskazują, że wszystkie badane ekstrakty skuteczniej chronią błonę erytrocytów przed wolnymi rodnikami indukowanymi przez AAPH, niż w przypadku wolnych rodników indukowanych przez promieniowanie UVC [1,2,4,5,9,10]. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną wobec tych rodników w zastosowanych metodach wykazuje ekstrakt z liści truskawki (najmniejsza wartość stężenia IC₅₀). Ponadto, aktywność ta była tylko nieznacznie mniejsza od aktywności wzorcowego antyoksydantu, jakim jest Trolox® [1,5,7]. Badania fluorymetryczne, w których wolne rodniki indukowano związkiem AAPH, również wykazały, że najskuteczniejszym antyoksydantem jest ekstrakt z liści truskawki, którego aktywność w stosunku do rodników organicznych jest porównywalna z aktywnością Troloxu® [1,5,7]. Ponadto wykazano, że aktywność antyoksydacyjna związków nie zależy od całkowitej ilości polifenoli zawartych w ekstraktach z liści truskawki, czarnej porzeczki i jabłoni, natomiast zależy od rodzaju tych związków [1]. Wnioski te, zostały potwierdzone również w badaniach aktywności antyoksydacyjnej ekstraktu z liści i owoców jabłoni, które wykazały, że ekstrakt z liści jest skuteczniejszym antyoksydantem, mimo że zawiera on dwukrotnie mniej związków polifenolowych [2]. Ta wyższa aktywność antyoksydacyjna ekstraktu z liści jest bardzo istotna z punktu widzenia możliwości jego praktycznego zastosowania.

Ponadto, badania aktywności przeciwutleniającej ekstraktu z liści czarnej jagody wykazały, że za jego wysoką skuteczność w dużej mierze jest odpowiedzialny kwas chlorogenowy [4,8]. Wyniki badań wskazują również, że w celu uzyskania tego samego poziomu ochrony antyoksydacyjnej błony erytrocytów należy użyć wyższego stężenia ekstraktu niż dla błony lipidowej [4]. Informacja ta jest bardzo istotna i należy mieć ją na uwadze szczególnie gdy komponuje się suplementy diety, na podstawie wyników badań uzyskanych na błonach lipidowych.

Badania wpływu ekstraktów na oporność osmotyczną erytrocytów wykazały, że użyte ekstrakty w różnym stopniu wpływają na poziom hemolizy krwinek zawieszonych w roztworach hipotonicznych chlorku sodu. Powodują one

przesunięcie krzywych hemolitycznych w kierunku niższych stężeń chlorku sodu, co oznacza, że związki w nich zawarte zwiększają wytrzymałość krwinek na zmiany ciśnienia osmotycznego środowiska. Ponadto, przeprowadzone badania wykazały, że największy wzrost oporności osmotycznej błony powodował ekstrakt z liści truskawki [3,6]. Ekstrakt z liści jabłoni wykazywał działanie zbliżone do ekstraktu z liści czarnej jagody [3,4,6,8]. Obserwowane zmiany wytrzymałości błony potwierdzają wyniki badań hemolitycznych o braku toksycznego działania substancji zawartych w ekstraktach i wskazują również, że substancje te wiążąc się z błoną erytrocytów wzmacniają ją.

Badania mikroskopowe kształtów erytrocytów wykazały, że substancje zawarte w ekstraktach zmieniają kształty krwinek czerwonych indukując w zależności od stężenia powstawanie różnych form echinocytów. Przy wyższych stężeniach ekstraktów (0,1 mg/ml) obserwowano zwiększony udział krwinek, którym odpowiadają wyższe indeksy morfologiczne tj. sferoechinocyty (3) i sferocyty (4) [3,4,6,8]. Powstawanie echinocytów dowodzi, że związki polifenolowe, zgodnie z teorią Sheetz'a i Singer'a, kumulują się głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony erytrocytów.

Metodą fluorymetryczną określono wpływ ekstraktów na uporządkowanie i płynność błon erytrocytów i liposomów, utworzonych z lipidów wyekstrahowanych z błon erytrocytów. Wpływ ekstraktów na uporządkowanie hydrofilowego obszaru błony zbadano przy użyciu sondy Laurdan. Przeprowadzone badania wykazały, że substancje zawarte w ekstraktach z liści jabłoni, truskawki i czarnej porzeczki zmniejszają wartość uogólnionej polaryzacji (GP) tej sondy [3,6,7,10]. Spadek GP oznacza, że substancje zawarte w ekstraktach wiążą się z hydrofilowym obszarem dwuwarstwy lipidowej, powodując wzrost nieuporządkowania tego obszaru. Ponadto, wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów zmniejszała się wartość GP. Największe zmiany w hydrofilowym obszarze błony erytrocytów obserwowano w obecności ekstraktu z liści truskawki [3], najlepszego przeciwutleniacza wśród badanych związków [1], co sugeruje, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów jest tym wyższa im w większym stopniu wiążą się one z powierzchnią błony. Podobne wyniki otrzymano dla ekstraktu z liści czarnej jagody, które wykazały korelację między aktywnością antyoksydacyjną a stopniem nieuporządkowania błony [4,8]. Badania płynności błon, wykazały natomiast, że polifenolowy ekstrakt z liści czarnej jagody nie powoduje zmiany wartości anizotropii fluorescencji sondy DPH, a więc nie

zmienia płynności błony erytrocytów w obszarze łańcuchów węglowodorowych lipidów błonowych, w którym sonda DPH się lokuje [4,8]. Podobnie, brak zmian obserwowanych w wartościach anizotropii fluorescencji sondy TMA-DPH, której chromofor lokuje się na poziomie czwartego atomu węgla łańcucha węglowodorowego, wskazuje na brak wpływu badanego związku na płynność błony w tym obszarze [4]. Badania z zastosowaniem tych sond prowadzono również na liposomach utworzonych z lipidów wyekstrahowanych z błon erytrocytów. Potwierdzają one wcześniej uzyskane wyniki. Podobnie jak w przypadku błony erytrocytów, w błonie liposomów również nie stwierdzono istotnych zmian w wartościach anizotropii fluorescencji tych sond [4]. Dla ekstraktów z liści truskawki, czarnej porzeczki i jabłoni uzyskano podobne wyniki. Oznacza to, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach nie zmieniają płynności hydrofobowego obszaru błony, a więc prawdopodobnie nie koncentrują się w tym obszarze.

Będące przedmiotem badań zawartych w tej pracy polifenolowe ekstrakty z liści drzew i krzewów owocowych wykazują aktywność w odniesieniu do błony biologicznej. Posiadają wysoką aktywność antyoksydacyjną chroniąc skutecznie błony przed utlenieniem indukowanym przez czynniki fizykochemiczne. Nie są toksyczne dla błony erytrocytów (nie indukują hemolizy) i jak można sądzić dla innych błon biologicznych, a wręcz ją wzmacniają (zwiększając jej oporność osmotyczną). Uzyskane wyniki badań pozwalają przypuszczać, że związki polifenolowe wiążą się z częścią hydrofilową błony biologicznej, powodując wzrost nieuporządkowania główek polarnych lipidów (spadek GP sondy Laurdan). Ich obecność w tej części błony powoduje, że stanowią one swoista barierę, zabezpieczającą błonę przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Te sugestie znajdują potwierdzenie w badaniach fluorymetrycznych z użyciem sond DPH i TMA-DPH, które wykazały, że związki te nie koncentrują się w hydrofobowym obszarze błon, ponieważ nie zmieniają ich płynności. Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że ekstrakty z liści drzew i krzewów owocowych posiadają wysoką aktywność antyoksydacyjną, przy braku działań ubocznych na układy biologiczne. W związku z tym mogą być z powodzeniem stosowane jako bezpieczne, łatwo dostępne źródła substancji polifenolowych w profilaktyce i leczeniu organizmów, a także w tych gałęziach przemysłu w których przeciwutleniacze znajdują zastosowanie.

Podziękowania

Badania zawarte w pracy były finansowane ze środków na naukę MNiSW w latach 2008-2011 jako projekt badawczy nr N N305 337034 oraz w latach 2011-2014 jako projekty badawcze nr N N304 173840 oraz nr N N312 422340.

Literatura

1. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Kapusta I., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011) *Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes*. Current Topics in Biophysics. 34: 15-21.
2. Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011) *Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants*. Journal of Medical Plant Research 5 (11): 2339-2347.
3. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2012) *Interaction between plant polyphenols and erythrocytes membrane*. Cellular & Molecular Biology Letters, 17 (1), 77-88.
4. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2013) *Modification of the lipid phase of biological and model membranes by bilberry leaf extract*. Food Biophysics, DOI 10.1007/s11483-013-9309-0.
5. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2010) *Antioxidant potency of extracts from leaves of fruit trees and bushes*. Abstract of the XIV Conference of Polish Biophysics Society. Łódź, Poland, September 28-30, 2010, Current Topics in Biophysics, 33 (Suppl. B), 23.
6. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011) *Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane*. 18th Meeting European Association for Red Cell Research, Wrocław-Piechowice, Poland, May 12-15, 2011, Book of Abstracts, 51-52.
7. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., (2011) *Biological activity of strawberry leaf extract*. 8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, August 23rd – 27th, 2011, European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 40 (Suppl. 1), P-603
8. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., (2011) *The mechanism of the action of bilberry leaf extract on biological and lipid membranes*. 5th International Conference on Polyphenols and Health, Sitges-Bracelona, Portugal, October 17-20, 2011, Book of Abstract, P-483.
9. Cyboran. S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., (2012) *Ekstrakty z liści wybranych krzewów owocowych jako zmiatacze wolnych rodników*. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa Oxygenalia „Tlen pierwiastkiem życia”, Poznań, Październik 26, 2012, Materiały konferencyjne, 113.
10. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H., (2013) *Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves*, 7th ISANH Congress on Polyphenols Applications, Bonn-University, Germany, June 6-7, 2013, Book of Abstracts, 50.

2. Summary

Modern medicine is struggling with a number of issues related to the effective treatment of various diseases, the civilization ones including. Research indicates that serious diseases, including Alzheimer's, Parkinson's, cancers and others, are caused by large concentration of free radicals in the organism, which are created in the course of physiological processes and as a result of physicochemical factors on the organism. An excess of free radicals in the body is due to bad functioning of the natural mechanisms responsible for their removal. In this regard, intensive studies are conducted in search for new efficient scavengers of free radicals. Worldwide research on vegetable substances, and in particular the polyphenolic ones, showed that they are effective scavengers of free radicals. Current knowledge therefore draws attention to plant substances which may be used in prevention and treatment.

Polyphenolic substances are present in various parts of the plant and their biological activity, consisting in free radicals reduction, depends on the nature of these compounds and the type of plant and the location in the plant. The main source of polyphenolic substances in human diet are fruits and vegetables, so to the substances contained in them is given a lot of attention. A rich source of polyphenolic substances are also leaves, but they are much less popular due to the fact that they are not fit for direct consumption, in contrast to the fruit. The aim of this work was to determine the biological activity of polyphenolic substances contained in the leaves, which can be effective in the protection and treatment when delivered to the organism in the form of extracts as a dietary supplement. Their antioxidant activity may also be used in the food industry and cosmetics. Scientific studies prove that polyphenolic substances exhibit anticancer, antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, and other activities. Rational use in prevention and treatment will be possible if it is understood the mechanism of the molecular interaction of these substances, responsible for the effects of their healthy action.

This PhD thesis aimed to quantitative and qualitative analysis of selected polyphenolic extracts from the leaves of fruit trees and bushes, and to determine their biological activity, including the antioxidative one, as well as the molecular mechanism of their interaction with biological membranes on the basis of changes in the physical parameters of the membrane. The biological membrane is the primary and often the only place of impact of physicochemical factors on the organisms. In

the literature there are few works dedicated to the application of extracts from the leaves of fruit trees and shrubs, despite the fact that their salubrious properties were found. It has not yet been discovered the molecular mechanism responsible for that positive action.

This research on biological activity of substances contained in the extracts from leaves was concerned with cells, biological membranes and the lipid membrane models. Erythrocytes were treated as an example and a model of the cell and their membrane as a model of the biological membrane. Liposomes formed from lipids extracted from the membranes of red blood cells were also studied, which constituted a one-component model of the biological membrane. A simplified, lipid model of the membrane facilitates the interpretation of the results obtained for the complex protein-lipid system, which is the biological membrane.

The plant extracts, used in the framework of scientific cooperation, were obtained from the Department of Fruit, Vegetable and Cereal Technology of the University of Environmental and Life Sciences in Wrocław, where qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds contained in the extracts was carried out, using liquid chromatography methods.

The study of biological activity of extracts were concerned with hemolytic activity and antioxidant of the extracts and their effect on the physical properties of the membrane. Hemolytic activity of polyphenolic compounds contained in the extracts was investigated using a spectrophotometric method. The objective of these studies was to determine the range of concentrations where there is no destructive action on the erythrocyte membrane. The antioxidant activity of the extracts was tested using spectrophotometric and fluorimetric methods, with two factors inducing oxidation, both in the erythrocyte and lipid membrane. The effects of the extracts on membranes were determined on the basis of their impact on physical parameters of membranes using spectroscopic and microscopic methods. These effects, in particular, were determined on the basis of changes in shape and osmotic resistance of erythrocytes, the degree of packing order of the lipid polar heads and the fluidity of the membrane.

Quantitative analysis of polyphenolic compounds contained in the extracts was carried out with the HPLC-DAD or UPLC-DAD liquid chromatography method, while *qualitative analysis* with the use of the UPLC-ESI-MS method. By these methods, the

compounds were identified on the basis of their spectral properties, i.e. retention time, maximum absorption wavelength (λ_{\max}), and molecular weight [1-4].

Hemolytic activity of the extracts was determined based on extent of hemolysis of red blood cells modified by the extracts used in a wide range of concentrations. The degree of hemolysis was calculated based on the values of absorbance of the supernatant containing hemoglobin released from cells, measured at wavelength $\lambda = 540$ nm, relative to the absorbance of the supernatant containing hemoglobin completely released from erythrocytes. The resulting degree of hemolysis was expressed in percentage and compared with the degree of hemolysis of unmodified blood cells [3,4]. Increased degree of blood cell hemolysis in the presence of the extract substances in relation to unmodified cells is an evidence for a destructive effect on the membrane of red blood cells that makes it permeable for hemoglobin.

The *antioxidant activity of the extracts* was tested using two methods and two factors inducing oxidation of erythrocyte and lipid membranes: UVC radiation and the AAPH compound. In spectrophotometric method, lipid oxidation was determined at different times of their exposure to UVC radiation, based on the concentration of malonic dialdehyde (MDA), emerging in the process of lipid peroxidation. From MDA reaction with thiobarbituric acid (TBA) a colored adjunct arises with maximum absorption at a wavelength of $\lambda = 535$ nm. Measured at that wavelength absorbance value is proportional to the concentration of MDA and is a measure of the degree of peroxidation of lipids. Decline in value of absorbance in the presence of the substances indicates protection of membrane lipids against oxidation induced by UVC radiation. In the fluorimetric method, free radicals induced by UVC radiation or AAPH oxidize the DPH-PA probe, thus reducing its emitted fluorescence. As a measure of the degree of oxidation of erythrocyte and lipid membranes was assumed the relative fluorescence intensity of that probe, which was calculated as the ratio of the fluorescence intensity of the probe, as a function of time of its oxidation in the presence of extracts, or in the control sample, to the initial value of its fluorescence intensity. Polyphenolic substances contained in the extracts when sweeping away free radicals, reduce the decrease in intensity of DPH-PA probe fluorescence. In the two methods used, for a measure of antioxidant activity was assumed such a concentration of extracts which is responsible for 50% inhibition of the process of

lipid peroxidation (IC_{50}) [1,2,4]. This concentration allows to compare the antioxidant activity of different extracts.

Using the spectrophotometric method it was also determined the influence of the extracts on osmotic resistance of red blood cells. On the basis of the measured absorbance at a wavelength of $\lambda = 533$ nm was determined the degree of hemolysis of red blood cells in hypotonic solutions of sodium chloride after treatment with the extracts. Reduced hemolysis of blood cells modified with substances of concern in relation to the unmodified cells, resulting in a shift of the curve in the direction of lower hemolytic concentrations of sodium chloride, testifies to an increase in the strength of the erythrocyte membrane with regard to osmotic pressure. The effect of the extracts on erythrocyte osmotic resistance is expressed as NaCl concentration at which 50% of the erythrocytes has been hemolyzed (C_{50}) [3,4].

Using optical and electron microscopes the *impact of the compounds contained in the extracts on the shape of red blood cells* was examined. On the basis of modified and control blood cells pictures registered a classification of erythrocyte shape was carried out according to the scale of Bessis and Brecher, in which particular shapes of blood cells are assigned appropriate morphological indexes; null for discocytes, negative for stomatocytes and positive for echinocytes. On the basis of images from an optical microscope was specified the percentage contribution of different forms of red blood cells in the population of ca. 800 cells. The formation of echinocytes in the presence of the substances tested, according to the theory of Sheetz and Singer, testifies that they are concentrating mainly in the outer lipid monolayer of the erythrocyte membrane, while the induction of stomatocytes testifies to the accumulation of the substances in the inner monolayer [3,4].

Using the fluorimetric method with fluorescent probes Laurdan, TMA-DPH and DPH that locate at different depths within the membrane lipid bilayer, the *effect of the extracts on the properties of the hydrophilic and hydrophobic regions of the membrane* was determined. The effect of extracts on the packing order of the hydrophilic region of the erythrocyte and liposome membrane was examined using the Laurdan probe, whose chromofore locates at the level of glycerol in lipid molecules. The order parameter was represented by value of generalized polarization (GP) of this probe, which is sensitive to its immediate vicinity. A fall in GP value in the presence of modifying substances indicates decreased order of the polar heads of lipids, while increased GP indicates increased order. In addition, on the

basis of changes in fluorescence anisotropy (A) of probes DPH and TMA-DPH the effect of extracts on fluidity of the hydrophobic region of erythrocyte and liposome membranes was determined. The TMA-DPH probe emits fluorescence from the 4th carbon level of the lipid hydrocarbon chains, while the unspecific probe DPH locates in various places of the hydrophobic membrane region. Changes in fluorescence anisotropy of the probes reflect mobility of the label in the membrane, which depends on the fluidity of the lipid alkyl chains [3,4].

The conducted studies enable us to determine the location of the extract compounds within the membrane on the basis of changes they cause in the physical parameters of membranes. In case the results of the study show that the extracts have properties similar to those known for plant polyphenols, one may expect them to be fit for use in various branches of the industry.

Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds contained in the extracts from the leaves of apples, strawberries, blackcurrants and bilberries has shown that they are rich sources of these substances. The main components of the extracts, as shown by research, include derivatives of flavonols, mainly quercetin and kempferolu, and phenolic acids e.g. chlorogenic acid [1-4,10]. It has also been shown that among tested extracts the most polyphenolic compounds contains bilberry leaf extract, where they represent approximately 50% of all the constituents of the extract [4]. In addition, studies indicate that polyphenols contained in the leaves and fruits of apple vary considerably, both in terms of type of identified compounds and their quantities [2].

The hemolytic activity survey of the extracts from leaves of apples, strawberries, blackcurrants and bilberries have shown that compounds contained therein do not induce hemolysis of blood cells, its level was similar to the observed for control blood cells. This research conducted in a wide range of concentrations indicate that these extracts do not act destructively on the membrane [3, 4, 6-8]. This means that they can be safely used without risk of damage to the membrane structure and its function.

Studies on antioxidant activity of the extracts were carried out with biological [1,2,4,5,7,9,10] and lipid [4,10] membranes. They showed that compounds contained in the extracts protect the membrane lipids against oxidation induced by physicochemical agents to a varying degree. The antioxidant activity of the extracts depends on the type of free-radicals inducer used, i.e. UVC radiation or the AAPH

compound, on concentration of the extracts and the kind of membrane. It was also shown that the ability of extract polyphenols to scavenge free radicals depends on the kind of compounds and their concentration [1,2,4]. Results of the research indicate that all the tested extracts more effectively protect the red blood cells against free radicals induced by AAPH than in the case of free radicals induced by UVC radiation [1,2,4,5,9,10]. The highest antioxidant activity against these radicals in the methods used show strawberry leaf extract (the smallest concentration IC_{50}). In addition, this activity was only slightly smaller than the activity of the standard antioxidant Trolox® [1,5,7]. Fluorimetric studies, in which free radicals were induced with AAPH, also showed that the most effective antioxidant is strawberry leaf extract, whose activity in relation to organic radicals is comparable to the activity of Trolox® [1,5,7]. In addition, it has been shown that the antioxidant activity of compounds does not depend on the total amount of polyphenols contained in the extracts from the leaves of strawberry, blackcurrant and apple, but depends on the nature of these compounds [1]. These findings have been confirmed in studies on antioxidant activity of extract from the leaves and fruit of apple, which showed that the leaf extract is an effective antioxidant, although it contains twice less polyphenolic compounds [2]. That higher antioxidant activity of the extract from leaves is very important from the point of view of its practical application.

Moreover, studies of antioxidant activity of extract from the leaves of bilberries found that for its high efficiency is largely responsible chlorogenic acid [3]. It was also found that, in order to obtain the same level of antioxidant protection, a higher concentration of the extract must be used for the erythrocyte membrane than for the lipid membrane [4]. This information is very important and one should keep it in mind especially when composing dietary supplements on the basis of the results of tests obtained on lipid membranes.

Studies of the effect of the extracts on osmotic resistance of erythrocytes showed that the extracts in varying degree influence the level of hemolysis of blood cells suspended in hypotonic solutions of sodium chloride. The hemolytic curves get shifted in the direction of lower concentrations of sodium chloride, which indicates that the extract compounds increase the strength of the blood cells to changes in osmotic pressure. Studies also showed that the largest increase in the osmotic resistance of the membrane caused strawberry leaf extract [3,6]. Apple leaf extract showed activity similar to the extract from the leaves of bilberries [3,4,6,8]. The

observed changes in the strength of the membrane confirm the absence of toxic effect of the extracts and also indicate that these substances bind to the erythrocyte membrane reinforcing it.

Microscopic examinations of shapes of erythrocytes showed that substances contained in the extracts change shapes of red blood cells depending on the concentration by forcing the emergence of various forms of echinocytes. At higher concentrations of the extracts (0.1 mg/ml) it was observed an increased share of blood cell shapes which correspond to higher morphological indexes, i.e. spherocytocytes (3) and spherocytes (4) [3,4,6,8]. The formation of echinocytes shows that the polyphenolic compounds, according to the theory of Sheetz and Singer, accumulate mainly in the outer lipid monolayer of the erythrocyte membrane.

By using the fluorimetric method, it was determined the effect of the extracts on the fluidity and order parameter of erythrocyte membranes and liposomes formed of lipids extracted from erythrocyte membranes. The effect of the extracts on the packing order of the hydrophilic membrane area was examined using the Laurdan probe. The results have shown that the substances contained in the extracts from the leaves of apple, strawberry and blackcurrant reduce the value of the generalized polarization (GP) of the probe [3,6,7,10]. GP drop means that the substances contained in the extracts bind to the hydrophilic area of the lipid bilayer, resulting in an increase in the disorder of the area. In addition, with increasing concentrations of the extracts, the value of the GP decreased. The biggest changes in the erythrocyte membrane hydrophilic area were observed in the presence of an extract from the leaves of strawberries [3], the best antioxidant among the tested substances [1], which suggests that the antioxidant activity of the extracts is the higher the more they are associated with the surface of the membrane. Similar results were obtained for the extract from the leaves of bilberries, which showed a correlation between antioxidant activity and degree of membrane disorder [4,8]. Studies on the fluidity of membranes showed that the polyphenolic bilberry leaf extract does not change the value of the fluorescence anisotropy of probe DPH, and so it does not alter fluidity in the area of the lipid hydrocarbon chains of the erythrocyte membrane where the DPH probe locates [4,8]. Similarly, the lack of observed changes in fluorescence anisotropy of probe TMA-DPH, which chromophore is located at the fourth carbon atom of a hydrocarbon chain, indicates a lack of impact of the tested extract on fluidity of the membrane in this area [4]. Investigations with these probes were also

conducted on liposomes created from lipids extracted from erythrocyte membranes. They confirm results obtained earlier. As in the case of the erythrocyte membrane, for the liposome membrane there were also no significant changes in the fluorescence anisotropy values of TMA-DPH and DPH probes [4]. For extracts from the leaves of strawberry, blackcurrant and apple, similar results were obtained. This means that the polyphenolic compounds contained in the extracts do not alter the fluidity of the hydrophobic membrane area, and so probably do not concentrate in this area.

The polyphenolic extracts from the leaves of fruit trees and shrubs, the subject of the research contained in this work, show activity in relation to the biological membrane. They have a high antioxidant activity, effectively protecting the membranes against oxidation induced by physical and chemical factors. They are not toxic to the erythrocyte membrane (do not induce hemolysis) and, as expected for other biological membranes, they even strengthen it (increasing its osmotic resistance). The obtained results lead to the conclusion that polyphenolic compounds associate with the hydrophilic part of the biological membrane, causing an increase in the disorder of its lipid polar heads (a drop in GP of Laurdan probe). Their presence in this part of membrane results in a kind of barrier which protects the membrane against the harmful effects of free radicals. These suggestions find confirmation in the fluorimetric studies, which showed that these compounds do not concentrate in the membrane hydrophobic area because they do not change the fluidity there. The results allow to conclude that the extracts from the leaves of fruit trees and shrubs have a high antioxidant activity, in the absence of side effects on biological systems. Therefore, they can be successfully used as a safe, easily accessible source of polyphenolic substances in the prevention and treatment of illnesses, as well as in the industries where antioxidants find application.

References

1. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Kapusta I., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011) *Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes*. Current Topics in Biophysics. 34: 15-21.
2. Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011) *Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants*. Journal of Medical Plant Research 5 (11): 2339-2347.

3. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2012) *Interaction between plant polyphenols and erythrocyte membranes*. Cellular & Molecular Biology Letters, 17 (1), 77-88.
4. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2013) *Modification of the lipid phase of biological and model membranes by bilberry leaf extract*. Food Biophysics, DOI 10.1007/s11483-013-9309-0.
5. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. *Antioxidant potency of extracts from leaves of fruit trees and bushes*. Abstract of the XIV Conference of Polish Biophysics Society. Łódź, Poland, September 28-30, 2010, Current Topics in Biophysics, 33 (Suppl. B), 23.
6. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. *Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane*. 18th Meeting European Association for Red Cell Research, Wrocław-Piechowice, Poland, May 12-15, 2011, Book of Abstracts, 51-52.
7. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., *Biological activity of strawberry leaf extract*. 8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, August 23rd – 27th, 2011, European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 40 (Suppl. 1), P-603
8. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., *The mechanism of the action of bilberry leaf extract on biological and lipid membranes*. 5th International Conference on Polyphenols and Health, Sitges-Bracelona, Portugal, October 17-20, 2011, Book of Abstract, P-483.
9. Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H., *Ekstrakty z liści wybranych krzewów owocowych jako zmiatacze wolnych rodników*. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa Oxygenalia „Tlen pierwiastkiem życia”, Poznań, Październik 26, 2012, Materiały konferencyjne, 113.
10. Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H., *Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves*, 7th ISANH Congress on Polyphenols Applications, Bonn-University, Germany, June 6-7, 2013, Book of Abstracts, 50.