

AUTOREFERAT

Informacje o osiągnięciu naukowym i dorobku naukowo-badawczym

Załącznik 2a

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Skutki oddziaływania związków polifenolowych wyizolowanych z
wybranych roślin z błonami biologicznymi i lipidowymi**

Dr inż. Dorota Bonarska-Kujawa

Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Dorota Barbara Bonarska-Kujawa**.
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.

Magister inżynier fizyki technicznej o specjalności inżynieria biomedyczna i specjalizacji optyka biomedyczna, 25.09.2000, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska. (Tytuł pracy magisterskiej: „Model układu pomiarowego do badania aberracji oka”, promotor dr inż. Marek Zajęc).

Doktor inżynier nauk fizycznych, 07.07.2005, Instytut Fizyki Politechniki Wrocławskiej tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ wybranych związków organicznych fosforu na fizyczne właściwości modelowej błony biologicznej” (Promotor dr hab. Halina Kleszczyńska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, recenzenci: prof. dr hab. Maria Bryszewska, Uniwersytet Łódzki, dr hab. Małgorzata Komorowska, Politechnika Wrocławska)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2001-2005 - asystent w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu,
2001-2005 - studia doktoranckie na Politechnice Wrocławskiej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Instytut Fizyki,
2005-2015 - adiunkt w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Urlopy macierzyńskie i rodzicielskie: 06.02.2012 - 22.07.2012; 17.07.2014 - 15.07.2015.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Skutki oddziaływania związków polifenolowych wyizolowanych z wybranych roślin z błonami biologicznymi i lipidowymi”

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie jednotematycznego cyklu publikacji. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały zawarte w *Załączniku 4a*, a oświadczenia współautorów tych publikacji zawarte są w *Załączniku 4b*.

4b. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 8 publikacji, w tym 7 zamieszczonych w czasopismach znajdujących się obecnie w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi IF16,493 oraz jednej publikacji nieposiadającej IF. Sumaryczna ilość punktów MNiSW z roku wydania publikacji dla wszystkich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 188.

Liczba cytowań tych publikacji według bazy Web of Science na dzień 20.09.2015 wynosi: 44.

1. **Bonarska-Kujawa D.**, Pruchnik H., Oszmiański J., Sarapuk J., Kleszczyńska H. (2011): Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophysics* 6, 58-67. (IF 2.187; 30 pkt MNiSW)
2. **Bonarska-Kujawa D.**, Sarapuk J., Bielecki K., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2012 a): Antioxidant Activity of Extracts from Apple, Chokeberry and Strawberry. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 62 (4), 229-234. (8 pkt MNiSW)
3. **Bonarska-Kujawa D.**, Pruchnik H., Kleszczyńska H. (2012b): Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cellular & Molecular Biology Letters* 17, 289-308. (IF 1.953; 15 pkt MNiSW)
4. **Bonarska-Kujawa D.**, Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014 a): Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum* L.) in Relation to Erythrocyte Membranes. *Biomed Research International (Journal of Biomedicine and Biotechnology)*, Article ID 783059, doi:10.1155/2014/783059. (IF 2.88; 30 pkt MNiSW)
5. **Bonarska-Kujawa D.**, Pruchnik H., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014 b): Biophysical mechanism of the protective effect of the polyphenols extracts from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membranes. *The Journal of Membrane Biology* 247, 611–625. (IF 2.457; 20 pkt MNiSW)
6. Pruchnik H., **Bonarska-Kujawa D.**, Kleszczyńska H. (2014 c): Effect of chlorogenic acid on the phase transition in phospholipid and phospholipid/cholesterol membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 118, 943-950. (IF 2.206; 25 pkt MNiSW)
7. Cyboran S., **Bonarska-Kujawa D.**, Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014 d): Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International* 65, 47-58. (IF 3.050; 40 pkt MNiSW)
8. **Bonarska-Kujawa D.**, Cyboran-Mikołajczyk S., Kleszczyńska H. (2015): Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. *Molecular Membrane Biology* 32(2), 46-54. (IF 1.76; 20 pkt MNiSW)

4c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Głównym celem przeprowadzonych badań biofizycznych zawartych w monotematycznym cyklu publikacji, było określenie skutków oddziaływania wybranych ekstraktów i związków polifenolowych na fizyczne właściwości błony biologicznej i lipidowej. Badania te miały na celu także określenie prawdopodobnego mechanizmu oddziaływania polifenoli z błoną biologiczną.

Obecnie intensywnie poszukuje się nowych skutecznych substancji działających ochronnie na organizm i wspomagających leczenie wielu groźnych chorób, w tym cywilizacyjnych, wywołanych w dużej mierze stresem oksydacyjnym. Badania dotyczą głównie substancji naturalnych pochodzenia roślinnego oraz syntetycznych posiadających właściwości przeciwutleniające. W wielu procesach fizjologicznych lub w wyniku zewnętrznego działania czynników fizykochemicznych na organizm powstają wolne rodniki, a ich kumulacja, przyczynia się m. in. do utleniania błon komórkowych i ich destrukcji, a w

związku z tym do powstawania zmian patologicznych w organizmie. Utlenienie lipidów przez wolne rodniki zmienia właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej poprzez m.in. obniżenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błony, zmianę organizacji i płynności dwuwarstwy oraz zaburzenie asymetrii lipidów i depolaryzację błony [Hendrich, 2006; Bukowska i in., 2007; Suwalsky i in., 2007, 2008]. W konsekwencji tych zmian oraz utlenienia białek następuje m.in. inhibicja aktywności białek enzymatycznych i transportowych oraz utrata integralności błony prowadząca do śmierci komórki.

W ostatnich latach skutecznych antyoksydantów poszukuje się głównie wśród naturalnych substancji polifenolowych, uważanych za jedne z najlepszych związków redukujących wolne rodniki. Głównym źródłem substancji polifenolowych w diecie człowieka są owoce i warzywa, zatem związkom zawartym w tych roślinach poświęca się obecnie wiele uwagi. Substancje polifenolowe występują w różnych częściach roślin, a ich aktywność biologiczna zależy zarówno od rodzaju rośliny, jak i od miejsca jej występowania. Obecna wiedza pozwala stwierdzić, że substancje polifenolowe, oprócz właściwości antyoksydacyjnych, wykazują szereg pozytywnych działań na organizm jak m.in. działanie przeciwgrzybicze, antybakteryjne i przeciwzapalne [Rice-Evans i in., 1997; Santos-Buelga i in., 2010; Daayf i Lattanzio, 2008]. Niektóre związki polifenolowe i ekstrakty roślinne wykorzystuje się obecnie, jako suplementy diety w profilaktyce lub jako leki w leczeniu chorób nowotworowych, układów krążenia, pokarmowego, moczowego, oddechowego oraz w dermatologii [Benzie, 2003; Kong i in., 2003; Gonzalez-Vallinas i in., 2013]. Racjonalne wykorzystanie prozdrowotnych właściwości wyciągów roślinnych i związków polifenolowych jest możliwe wówczas, gdy zostanie określony ich mechanizm oddziaływania z komórkami.

W badaniach biofizycznych możemy obserwować skutki oddziaływań tych substancji z organizmem, a w szczególności z błoną biologiczną. Wszelkie substancje biologicznie aktywne działają na organizm żywy w pierwszym rzędzie poprzez interakcję z błoną komórkową, która jest głównym, a czasem jedynym, miejscem działania różnych czynników fizykochemicznych na organizm. Znajomość mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany wywołane w błonie przez związki polifenolowe ma istotne znaczenie z punktu widzenia optymalnego ich wykorzystania. Należy podkreślić, że do chwili obecnej nie został w pełni wyjaśniony mechanizm oddziaływania pojedynczych związków polifenolowych i ekstraktów roślinnych na błonę biologiczną, co skłoniło mnie do podjęcia badań w tym zakresie.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach biofizycznych zostały określone zmiany różnych parametrów fizycznych, będące skutkiem oddziaływania wybranych związków polifenolowych z błoną biologiczną i lipidową. Zmiany te pozwoliły określić aktywność biologiczną, w tym przeciwutleniającą tych substancji polifenolowych, a także wykluczyć ich działanie niepożądane w użytym zakresie stężeń. W literaturze światowej badania biofizyczne nad wpływem roślinnych ekstraktów polifenolowych na układy biologiczne są traktowane marginalnie, ponieważ przy dopuszczaniu ich, jako suplementów diety, takie badania nie są wymagane. O konieczności prowadzenia takich badań świadczą jednak doniesienia naukowe, w których oprócz działań pozytywnych wykazano również szkodliwe działanie niektórych ekstraktów roślinnych na organizm [Myburgh, 2014; Halliwell, 2007; Patel i in., 2013].

Badania zawarte w publikacjach, stanowiących osiągnięcie naukowe, zostały podzielone na trzy etapy. Pierwszy etap obejmował analizę ilościową i jakościową wybranych ekstraktów polifenolowych z owoców i liści drzew oraz krzewów owocowych. W drugim etapie badań określiłam aktywność antyoksydacyjną badanych ekstraktów oraz kilku związków polifenolowych, będących ich głównymi składnikami. W trzecim etapie badań wyznaczyłam aktywność biologiczną badanych substancji na podstawie wielkości zmian parametrów fizycznych różnych błon biologicznych i lipidowych oraz określiłam prawdopodobny mechanizm molekularny odpowiedzialny za te zmiany. Uzyskane przeze

mnie wyniki badań przeprowadzonych w ramach zrealizowanego osiągnięcia naukowego omówiłam poniżej w kolejności poszczególnych etapów badawczych.

Etap badań stanowiących osiągnięcie naukowe

I. Analiza ilościowa i jakościowa wybranych ekstraktów polifenolowych z owoców i liści drzew i krzewów owocowych

W pierwszym etapie badań wodne ekstrakty polifenolowe wykorzystane w badaniach stanowiących osiągnięcie naukowe zostały wyekstrahowane, w ramach współpracy naukowej z zespołem pana prof. dr hab. Jana Oszmiańskiego z Katedry Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Przeprowadzona została również analiza ilościowa i jakościowa frakcji związków polifenolowych zawartych w tych ekstraktach przy użyciu metod chromatografii cieczowej.

Analizę ilościową związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z owoców truskawki, aronii i jabłoni, oraz owoców i liści czarnej porzeczki oraz jagody karczaskiej przeprowadzono metodą wysokosprawnej i ultrasprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD lub UPLC-DAD, a analizę jakościową z wykorzystaniem chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią masową metodami UPLC-ESI-MS i UPLC-PDA-Q/TOF-MS [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2014 a, b; Cyboran i in., 2014]. W metodach tych związki polifenolowe zawarte w ekstraktach zidentyfikowano na podstawie ich właściwości spektralnych tj. czasu retencji i długości fali odpowiadającej maksimum absorbancji (λ_{\max}) oraz masy cząsteczkowej jonów.

Analiza ilościowa i jakościowa ekstraktów wykazała, że są one bogate w związki polifenolowe. Głównymi składnikami polifenolowymi badanych ekstraktów owocowych były antocyjany: pelargonidyno-3-O-glukozyd (ekstrakt z owoców truskawki), cyjanidyno-3-O-galaktozyd (ekstrakt z owoców aronii), cyjanidyno-3-O-rutynozyd i delfinidyno-3-rutynozyd (ekstrakt z owoców czarnej porzeczki), cyjanidyno-3-O-glukozyd (ekstrakt z owoców jagody karczaskiej). Głównym składnikiem ekstraktu z owoców jabłka był kwas chlorogenowy oraz polimeryczne procyjanidyny, a ekstraktów z liści czarnej porzeczki i jagody karczaskiej był kwas chlorogenowy i kwercytno-3-glukozyd.

Przeprowadzone badania wykazały, że ekstrakty z liści i owoców tej samej rośliny, znacząco różnią się od siebie zawartością polifenoli, dotyczy to zarówno ich rodzaju, jak i ilości. Do głównych składników badanych ekstraktów, jak wykazały analizy, należą antocyjany oraz kwasy fenolowe m.in. kwas chlorogenowy, a także pochodne flawonoli, w szczególności kwercetyny i kempferolu. Najwięcej związków polifenolowych zawierał ekstrakt z owoców truskawki, w którym stanowiły one ponad 75 % wszystkich składników ekstraktu [Bonarska-Kujawa i in., 2011]. Wykazano również, że ekstrakt z owoców czarnej porzeczki zawierał ponad dwukrotnie więcej związków polifenolowych niż liście tej rośliny [Bonarska-Kujawa i in., 2014 a, Cyboran i in., 2014], podczas gdy ekstrakty z liści i owoców jagody karczaskiej zawierały podobną ilość związków polifenolowych, tj. ok. 30 % suchej masy ekstraktu [Bonarska-Kujawa i in., 2014 b].

Badania chromatograficzne identyfikujące główne składniki ekstraktów z chętnie spożywanych owoców, umożliwiły w dalszej części badań interpretację uzyskanych wyników w powiązaniu ze składem ilościowym i jakościowym ekstraktów. W badaniach wykorzystano także obok wyżej wymienionych ekstraktów następujące związki polifenolowe: kwas chlorogenowy oraz pelargonidyno-3-O-glukozyd i cyjanidyno-3-O-galaktozyd, będące głównymi składnikami wybranych ekstraktów. Uzyskane rezultaty badań pozwoliły na zestawienie aktywności wybranych ekstraktów z aktywnością ich głównych składników.

II. Określenie aktywności antyoksydacyjnej badanych ekstraktów oraz wybranych związków polifenolowych

W drugim etapie badań określono aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z owoców jabłka, truskawki, aronii oraz owoców i liści czarnej porzeczki i jagody kamczackiej, a także związków polifenolowych: kwasu chlorogenowego, pelargonidyno-3-O-glukozydu, cyjanidyno-3-O-galaktozydu, w odniesieniu do błon erytrocytów oraz liposomów formowanych z lipidów wyekstrahowanych z błon erytrocytów. Aktywność antyoksydacyjną wszystkich badanych ekstraktów i związków polifenolowych wobec lipidów zawartych w błonach erytrocytów oznaczono z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i przy zastosowaniu dwóch czynników indukujących utlenianie, promieniowania UVC i związku AAPH. Wyniki badań wykazały bardzo dobre lub dobre właściwości antyoksydacyjne użytych ekstraktów i związków polifenolowych, w porównaniu z aktywnością standardowych przeciwutleniaczy, jakimi są Trolox[®], BHT i kwas askorbinowy [Bonarska-Kujawa i in., 2012 a i b, 2014 a i b, 2015; Cyboran i in., 2014].

W metodzie fluorymetrycznej wolne rodniki, indukowane promieniowaniem UVC lub związkiem AAPH, utleniają sondę DPH-PA powodując spadek intensywności jej fluorescencji. Za miarę stopnia utlenienia lipidów, przyjęto wartość względnej intensywności fluorescencji tej sondy, którą obliczano, jako stosunek intensywności fluorescencji sondy po różnych czasach jej utleniania w obecności ekstraktów lub w próbce kontrolnej, do początkowej wartości jej fluorescencji. Substancje polifenolowe zawarte w ekstraktach zmniejszają wolne rodniki, zmniejszając spadek intensywności fluorescencji sondy DPH-PA. W obydwu stosowanych metodach, jako miarę aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów przyjęto takie stężenie ekstraktów lub związków polifenolowych (IC₅₀), które odpowiada za 50 % zahamowanie procesu peroksydacji lipidów.

Badania aktywności antyoksydacyjnej wykazały, że związki zawarte w ekstraktach w różnym stopniu chronią lipidy błonowe przed utlenianiem indukowanym czynnikami fizykochemicznymi. Stopień ochrony lipidów przed szkodliwym działaniem wolnych rodników, zależał od rodzaju stosowanego induktora wolnych rodników (UVC lub AAPH) i od rodzaju substancji polifenolowych zawartych w ekstraktach. Wykazano, że wszystkie badane ekstrakty lepiej chronią błonę erytrocytów przed wolnymi rodnikami indukowanymi związkiem AAPH, w porównaniu z ich ochroną przed wolnymi rodnikami indukowanymi promieniowaniem UVC [Bonarska-Kujawa i in., 2012, 2014 a i b, 2015; Cyboran i in., 2014].

Najwyższą skuteczność wobec wolnych rodników indukowanych promieniowaniem UVC wykazał ekstrakt z liści jagody kamczackiej. Ponadto skuteczność ta była tylko nieznacznie mniejsza od skuteczności wzorcowego antyoksydantu - Troloxu [Bonarska-Kujawa i in., 2014 b]. Związki polifenolowe pelargonidyno-3-O-glukozyd, cyjanidyno-3-O-galaktozyd i kwas chlorogenowy wykazały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż ekstrakty. Ich aktywność antyoksydacyjna w odniesieniu do błony erytrocytów ponadto była porównywalna do Troloxu dla pelargonidyno-3-O-glukozydu i cyjanidyno-3-O-galaktozydu, a wyższa od aktywności Troloxu dla kwasu chlorogenowego [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2012].

Badania fluorymetryczne, w których wolne rodniki indukowane były związkiem AAPH, również wykazały, że najskuteczniejszym antyoksydantem jest ekstrakt z liści i owoców jagody kamczackiej, którego aktywność do zmiatania wolnych rodników jest porównywalna do skuteczności Troloxu [Bonarska-Kujawa i in., 2014 b]. Związek pelargonidyno-3-O-glukozyd posiadał aktywność na poziomie Troloxu, natomiast cyjanidyno-3-O-galaktozyd i kwas chlorogenowy był aktywniejszy od Troloxu. Badane związki polifenolowe były również aktywniejsze niż ekstrakty [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2012].

Badania aktywności przeciwutleniającej wykonane metodami chemicznymi z użyciem kwasu linoleowego oraz na podstawie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TEAC) potwierdziły słabsze od Troloxu właściwości przeciwutleniające ekstraktów z jabłka, truskawki i aronii [Bonarska-Kujawa i in., 2012]. Ekstrakty z owoców i liści czarnej porzeczki wykazały wysoką aktywność przeciwutleniającą wobec błon erytrocytów i błon lipidowych w porównaniu ze standardowymi przeciwutleniaczami takimi jak: Trolox, kwas askorbinowy i BHT [Bonarska-Kujawa i in., 2014 a; Cyboran i in., 2014].

Ponadto nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów a ilością związków polifenolowych w nich występujących. Najwięcej związków polifenolowych zidentyfikowano w ekstrakcie z owoców truskawki (ok. 75 % zawartości suchej masy) a jego aktywność przeciwutleniająca wobec błony erytrocytów była najniższa wśród przebadanych ekstraktów. Ekstrakty z liści i owoców jagody kamczackiej zawierały ok. 30 % polifenoli w suchej masie, ale ich aktywność przeciwutleniająca w porównaniu z ekstraktem z owoców truskawki była ponad dwukrotnie wyższa, przy indukcji utleniania promieniowaniem UVC i blisko dziesięciokrotnie wyższa, przy indukcji utleniania związkiem AAPH.

Wykazano natomiast, że ekstrakty z owoców jabłka oraz liści jagody kamczackiej i czarnej porzeczki, których dominującym składnikiem jest kwas chlorogenowy miały porównywalną z Troloxem aktywność przeciwutleniającą w odniesieniu do błony erytrocytów. Aktywność przeciwutleniająca tych ekstraktów wobec błony biologicznej okazała się jednak mniejsza niż kwasu chlorogenowego [Bonarska-Kujawa i in., 2011], który był lepszym antyutleniaczem niż Trolox.

Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktów w odniesieniu do błony biologicznej zależy przede wszystkim od aktywności przeciwutleniającej dominujących w nich składników. Większe znaczenie ma, zatem jakościowy skład polifenolowy ekstraktów niż procentowa zawartość polifenoli w ekstrakcie.

Oryginalność i nowatorstwo przeprowadzonych badań antyoksydacyjnych dotyczy oprócz aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów w odniesieniu do błony erytrocytów, traktowanej często, jako przykład i model błony biologicznej, określenia jej także w odniesieniu do lipidów wyekstrahowanych z błony erytrocytów. W literaturze światowej takie badania aktywności antyoksydacyjnej są często przeprowadzane w odniesieniu do modeli lipidowych błon, utworzonych z jednego rodzaju lipidów syntetycznych np. z DPPC, DMPC czy nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Przeprowadzone badania wskazują, więc że w celu uzyskania podobnego poziomu ochrony antyoksydacyjnej lipidów zawartych w błonie erytrocytów i błonie modelowej, należy zastosować wyższe stężenia ekstraktu niż jego dominującego związku polifenolowego. Wysoka aktywność przeciwutleniająca pojedynczych polifenoli, a także niektórych ekstraktów, względem błony biologicznej zachęca do stosowania ich, jako skutecznych antyoksydantów, w tym składników żywności. Ochronny wpływ polifenoli na organizm może być zapewniony również przez suplementy diety bogate w te związki lub przez zawierające je kosmetyki.

III. Określenie aktywności biologicznej ekstraktów i związków polifenolowych na podstawie wielkości zmian parametrów fizycznych błon biologicznych

Znajomość składu polifenolowego ekstraktów oraz ich bardzo dobre właściwości przeciwutleniające zachęciła mnie do rozszerzenia badań nad wpływem tych substancji na błonę biologiczną. W trzecim etapie badań przeprowadzone zostały badania parametrów fizycznych błon biologicznych modyfikowanych badanymi ekstraktami i związkami polifenolowymi. Obserwowane zmiany właściwości fizycznych modeli błon oraz erytrocytów

pozwołyły określić lokalizację związków polifenolowych w błonie oraz wyjaśnić molekularny mechanizm ich ochronnego działania na błonę komórkową.

W przeprowadzonych badaniach biofizycznych zastosowano różne modele błon, które ułatwiły interpretację otrzymanych wyników badań oddziaływania związków i ekstraktów polifenolowych zarówno z błoną biologiczną, jak i z jej fazą lipidową. Badania aktywności biologicznej przeprowadzono w odniesieniu do erytrocytów, wyizolowanej błony erytrocytów (cieni erytrocytów) oraz błon lipidowych. Erytrocyty traktowano, jako przykład i model komórki a ich błony, jako przykład i model błony biologicznej. Liposomy i płaskie błony lipidowe stanowiły modele błony utworzone z jednego rodzaju lipidów syntetycznych (DPPC, DMPC, EPC) oraz z różnego rodzaju lipidów wyekstrahowanych z błon erytrocytów (RBCL).

Oddziaływania ekstraktów z błonami określano na podstawie zmian parametrów fizycznych błon stosując następujące techniki badawcze: mikroskopię optyczną i elektronową, spektrofotometrię w zakresie UV-Vis i IR (FTIR), fluorymetrię, kalorymetrię (DSC), oraz metodę elektryczną w odniesieniu do płaskich błon lipidowych. Badania hemolityczne i mikroskopowe przeprowadzono na erytrocytach. Badania fluorymetryczne, spektrofotometryczne metodą FTIR, kalorymetryczne i elektryczne (BLM), przeprowadzono na różnych modelach błon biologicznych: na błonach erytrocytów oraz liposomach i płaskich błonach lipidowych uformowanych z lipidów syntetycznych lub naturalnych. Skutki oddziaływania związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z błonami określano na podstawie indukowanej hemolizy oraz zmian kształtu i oporności osmotycznej erytrocytów, płynności błony w obszarze hydrofobowym, stopnia uporządkowania główek polarnych lipidów błonowych, stopnia hydratacji błony, a także zmian temperatury przejścia fazowego oraz rezystancji i pojemności elektrycznej lipidowych modeli błon. W dalszej części autoreferatu zostaną omówione wyniki opublikowanych badań, stanowiących osiągnięcie naukowe, według metod badawczych służących do wyznaczenia poszczególnych parametrów fizycznych błon.

III.1. Indukowanie hemolizy oraz badania oporności osmotycznej erytrocytów poddanych działaniu ekstraktów roślinnych

Badania aktywności hemolitycznej związków polifenolowych zawartych w ekstraktach względem krwinek czerwonych przeprowadzono w szerokim zakresie stężeń przekraczających stężenie fizjologiczne, co pozwoliło stwierdzić, czy związki zawarte w ekstraktach indukują hemolizę erytrocytów. Proces hemolizy jest, bowiem związany z destrukcją błony prowadzącą do zniszczenia komórki i wypływu hemoglobiny. Procent hemolizy krwinek zmodyfikowanych badanymi substancjami określano metodą spektrofotometryczną, na podstawie stężenia uwolnionej z komórek hemoglobiny. Aktywność hemolityczną ekstraktów określono na podstawie wartości absorbancji zmierzonej przy długości fali $\lambda = 540$ nm dla erytrocytów zmodyfikowanych i niemodyfikowanych, względem krwinek całkowicie zhemolizowanych. Wyższy procent hemolizy krwinek w obecności użytych substancji świadczy o wyższej aktywności hemolitycznej związków.

Wyniki badań hemolitycznych wykazały, że użyte ekstrakty i związki polifenolowe nie działają destrukcyjnie na błonę erytrocytów, ponieważ nie indukują hemolizy w szerokim zakresie badanych stężeń. Oznacza to, że mogą być one bezpiecznie stosowane bez ryzyka wystąpienia niepożądanych skutków ich działania w odniesieniu do struktur błonowych. Poziom hemolizy dla wszystkich ekstraktów, przy najwyższych użytych stężeniach substancji pozostawał na poziomie krwinek kontrolnych. Badania hemolityczne wykazały, zatem brak toksyczności hemolitycznej badanych ekstraktów i związków polifenolowych [Bonarska-Kujawa i in., 2014 a, b].

Przy użyciu metody spektrofotometrycznej określono również wpływ ekstraktów na oporność osmotyczną erytrocytów. Na podstawie zmierzonej absorbancji przy długości fali $\lambda=540$ nm określano procent hemolizy krwinek, które wcześniej zmodyfikowano badanymi substancjami o wybranym stężeniu, w roztworach chlorku sodu o różnym stężeniu (od 0,9 % do 0,5 % zawartości NaCl). Przesunięcie krzywej hemolitycznej w kierunku niższych stężeń chlorku sodu dla krwinek w obecności badanych substancji w stosunku do krwinek niemodyfikowanych, świadczy o wzroście wytrzymałości błony erytrocytów na zmiany toniczności otaczającego je środowiska, czyli o wzroście oporności osmotycznej erytrocytów. Wpływ ekstraktów na oporność osmotyczną erytrocytów wyrażano ilościowo w postaci współczynnika C_{50} tj. stężenia chlorku sodu, przy którym 50 % erytrocytów ulega hemolizie.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że ekstrakty nie zmieniały oporności osmotycznej, a niektóre z nich (z liści i owoców czarnej porzeczki i jagody kamiczackiej oraz kwas chlorogenowy) nieznacznie zwiększały oporność osmotyczną krwinek, a więc ich wytrzymałość na zmiany ciśnienia osmotycznego w ich otoczeniu [Bonarska-Kujawa i in., 2014 a i b, 2015].

Badania indukowanej hemolizy i oporności osmotycznej wykazały, zatem, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach roślinnych nie tylko nie są toksyczne w odniesieniu do błony erytrocytów tj., nie działają na nią destrukcyjnie, ale powodują wzrost jej oporności osmotycznej. Można, zatem sądzić, że nie wnikają one głęboko w obszar hydrofobowy błony komórkowej, a jedynie wiążą się z jej powierzchnią, powodując jej uszczelnienie i wzmocnienie oraz ograniczają wnikanie wody do erytrocytów. Staje się ona przez to mniej wrażliwa na zmiany ciśnienia osmotycznego występującego w środowisku.

III.2. Określenie amfifilowości ekstraktów

W celu zbadania właściwości związków polifenolowych zawartych w wybranych ekstraktach określono ich powinowactwo do fazy wodnej i lipidowej. Spektrofotometrycznie wyznaczono współczynnik podziału pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy dla ekstraktów z owoców i liści czarnej porzeczki i jagody kamiczackiej oraz kwasu chlorogenowego. Badania te pozwoliły na wstępne oszacowanie czy badane substancje wykazują charakter hydrofobowy czy hydrofilowy, w związku z tym czy będą wbudowywać się w obszar hydrofobowy czy pozostawać na powierzchni w obszarze hydrofilowym błony. Ekstrakty dodawano do oktanolu i po ustalonym czasie inkubacji spektrofotometrycznie rejestrowano widma tych roztworów. Absorbancję, odpowiadającą maksymalnemu stężeniu badanych związków w fazie organicznej, reprezentowanej przez oktanol, odczytywano przy długościach fali, przy których występowały maksima pochłaniania. Następnie do oktanolu dodawano bufor fosforanowy. Po inkubacji usuwano bufor fosforanowy i ponownie rejestrowano widma roztworów, dla których odczytano absorbancję, opowiadającą stężeniu badanych substancji, jakie pozostały w fazie organicznej. Na podstawie maksimów absorbancji wyznaczano współczynniki podziału (P) ekstraktów pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy, i obliczano jego logarytm. Dodatnie wartości $\log P$, świadczą o hydrofobowym charakterze związków, a więc ich większym powinowactwie do fazy organicznej, reprezentowanej przez oktanol. Ze wzrostem ujemnych wartości $\log P$, rośnie hydrofilowy charakter związków, a więc ich powinowactwo do fazy wodnej. Uzyskane w badaniach ujemne wartości współczynnika amfifilowości dla badanych substancji wskazują na hydrofilowy charakter polifenolowych składników ekstraktów z owoców i liści jagody kamiczackiej i czarnej porzeczki. Ekstrakty z liści jagody kamiczackiej i czarnej porzeczki wykazały bardziej hydrofilowy charakter, niż ekstrakty z owoców tych roślin. Najbardziej hydrofilowy charakter wykazał jednak kwas chlorogenowy i Trolox, z którym porównywano wyniki uzyskane dla substancji polifenolowych.

III.3 Kształty erytrocytów indukowane polifenolami obserwowane w mikroskopach optycznym i elektronowym

Znając powinowactwo badanych substancji do fazy wodnej i organicznej podjęłam próbę określenia lokalizacji związków polifenolowych w błonie komórkowej na podstawie kształtów erytrocytów. Erytrocyty modyfikowane badanymi ekstraktami obserwowano pod mikroskopem świetlnym i skaningowym mikroskopem elektronowym. Kształty tych komórek wskazywały na lokalizację związków polifenolowych zawartych w tych ekstraktach w błonie, oraz na rodzaj ich oddziaływania z błoną. Na podstawie zarejestrowanych zdjęć krwinek modyfikowanych substancjami polifenolowymi i krwinek kontrolnych przeprowadzono klasyfikację kształtów erytrocytów wg skali Bessis'a i Brecher'a, w której określonym kształtom są przypisane odpowiednie wartości indeksów morfologicznych; zerowy dla dyskocytów, ujemne dla stomatocytów oraz dodatnie dla echinocytów. Określono procentowy udział poszczególnych kształtów erytrocytów w ich populacji wynoszący ok. 800 komórek dla każdej próby. Powstawanie echinocytów w obecności badanych substancji, zgodnie z teorią Sheetz'a i Singer'a, świadczy o ich lokalizacji głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony erytrocytów, natomiast powstanie stomatocytów świadczy o inkorporacji związków głównie do monowarstwy wewnętrznej. Badania mikroskopowe wykazały, że substancje zawarte w ekstraktach zmieniają dyskoidalny kształt krwinki czerwonej. Indukują one różne formy echinocytów, w zależności od użytego stężenia. Przy wyższych stężeniach ekstraktów (0,1 mg/ml) obserwowano zwiększony udział procentowy echinocytów w populacji krwinek, którym odpowiadają wyższe indeksy morfologiczne tj. echinocyty (+2) i sferoechinocyty (+3), a nawet sferocyty (+4) [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2012 b, 2014 a i b, 2015]. Ilościowe badania mikroskopowe wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego, jak również obrazy zarejestrowane mikroskopem elektronowym wykazały, że w obecności ekstraktów oraz wybranych związków polifenolowych erytrocyty przyjmują głównie różne formy echinocytów, co wskazuje na ich obecność w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony biologicznej, a ich oddziaływania z błoną erytrocytów mają charakter elektrostatyczny.

III.4. Badania płynności i parametru uporządkowania błon modelowych i biologicznych metodą fluorymetryczną

Wyniki badań indukowanej hemolizy, kształtów erytrocytów oraz właściwości amfifilowych ekstraktów wskazały na możliwość wiązania się ich z powierzchnią błony. Kolejne badania wykonane metodą spektroskopii fluorymetrycznej „steady – state” w stałej temperaturze 37°C miały na celu wyznaczenie i zlokalizowanie w błonie zmian, które wywołują badane substancje polifenolowe. Badania zostały wykonane dla różnych modeli błon, od prostych błon modelowych utworzonych z jednego rodzaju lipidów liposomów, poprzez liposomy utworzone z mieszaniny różnych lipidów, aż do białkowo-lipidowej błony erytrocytów. Użycie wielu modeli błon pozwoliło ocenić wpływ, jaki mają polifenole na zmiany właściwości fizycznych części hydrofilowej i hydrofobowej błony erytrocytów i lipidowej. Błony erytrocytów i liposomów, różnią się między sobą uporządkowaniem oraz upakowaniem i dynamiką lipidów. Błona erytrocytów w stosunku do błony lipidowej jest bardziej uporządkowana i wykazuje większe upakowanie cząsteczek lipidowych, które w związku z tym mają mniejszą ruchliwość, co wynika niewątpliwie z obecności białek. Należy także podkreślić, że tylko w błonie erytrocytów lipidy są asymetrycznie rozłożone w dwuwarstwie i odpowiednie mechanizmy aktywne i bierne ten rozkład utrzymują, natomiast taki rozkład nie występuje w liposomach.

Przy użyciu różnych sond fluorescencyjnych: DPH, TMA-DPH i Laurdanu zbadano wpływ ekstraktów i związków polifenolowych na właściwości hydrofobowego i

hydrofilowego obszaru błony. Modyfikacja zarówno części hydrofilowej, jak i hydrofobowej błon, spowodowana obecnością związków polifenolowych, wpływała na intensywność fluorescencji emitowanej przez sondy zlokalizowane odpowiednio w wymienionych obszarach błony, a w konsekwencji na obliczone wartości odpowiednio anizotropii fluorescencji (A) lub uogólnionej polaryzacji (GP).

Płynność błon w obszarze hydrofobowym, czyli na poziomie łańcuchów alkilowych określano na podstawie anizotropii wartości fluorescencji (A) sond DPH i TMA-DPH. Znaczniki te lokują się w hydrofobowym obszarze błon na różnych głębokościach, a zmiany anizotropii fluorescencji tych sond odzwierciedlają ruchliwość znacznika w błonie, która zależy od ruchliwości i uporządkowania cząsteczek lipidów. Fluoryzująca część sondy DPH, emituje fluorescencję z hydrofobowego wnętrza błony, gdzie zlokalizowane są łańcuchy alkilowe lipidów błonowych. Sonda TMA-DPH natomiast wysyła fluorescencję z poziomu czwartego atomu węgla łańcucha alkilowego lipidów [Lakowicz, 2006].

Badania płynności błon wykazały, że ekstrakty polifenolowe z owoców truskawki, jabłka, aronii, liści i owoców czarnej porzeczki, jagody kamczackiej, a także kwas chlorogenowy, pelargonidyno-3-O-glukozyd oraz cyjanidyno-3-O-galaktozyd, nie powodują znaczącej statystycznie zmiany wartości anizotropii fluorescencji sondy DPH, a więc nie zmieniają płynności wszystkich użytych modeli błon w obszarze łańcuchów węglowodorowych, w którym znajduje się sonda [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2012 b, 2014 a i b, 2015]. Brak istotnych zmian lub bardzo niewielkie zmiany anizotropii fluorescencji wykazano także dla sondy TMA-DPH, której chromofor lokuje się w pobliżu szkieletu glicerolowego dwuwarstwy lipidowej zmodyfikowanej związkami polifenolowymi. Otrzymane wyniki badań wskazują, że badane ekstrakty praktycznie nie zmieniają płynności błon.

Badania wykonane z zastosowaniem hydrofobowych sond fluorescencyjnych dla różnych błon zmodyfikowanych związkami polifenolowymi wykazały, że nie modyfikują one hydrofobowego obszaru błony, zarówno na poziomie czwartego węgla łańcuchów alkilowych, jak i w obszarze zakończeń łańcuchów. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że substancje polifenolowe wiążą się z powierzchnią błon, oddziałując z nimi elektrostatycznie. Można, zatem sądzić, że albo nie wnikają do obszaru hydrofobowego błony, albo znajdują się tam w małych ilościach.

Zmiany zachodzące w części hydrofilowej błon pod wpływem działania badanych substancji, określone zostały na podstawie wartości uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, której chromofor lokuje się na poziomie glicerolu. Parametr uporządkowania części hydrofilowej – uogólniona polaryzacja (GP) zależy od polarności otoczenia chromoforu sondy. Zmiany GP świadczą o zmianach w uporządkowaniu główek polarnych lipidów w błonie biologicznej i lipidowej. Spadek wartości GP w obecności substancji modyfikujących świadczy o wzroście nieuporządkowania główek polarnych lipidów i ich większej dynamice, natomiast wzrost GP związany jest ze wzrostem uporządkowania i mniejszą dynamiką główek polarnych lipidów [Lakowicz, 2006]. Badania z użyciem tej sondy wykazały znaczne zmiany uporządkowania części hydrofilowej w badanych modelach błon w obecności substancji polifenolowych. Spadek wartości GP oznacza, że substancje zawarte w ekstraktach w wyniku oddziaływania z hydrofilowym obszarem dwuwarstwy lipidowej, powodują wzrost nieuporządkowania tego obszaru. Ponadto, wartość GP zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów, czyli wraz z ilością związków polifenolowych przyłączonych do obszaru hydrofilowego błony [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2012 b, 2014 a i b, 2015].

Największe zmiany w hydrofilowym obszarze błony erytrocytów obserwowano w obecności ekstraktów z jabłka, liści jagody kamczackiej oraz kwasu chlorogenowego. Substancje te wykazały także porównywalną lub wyższą od Troloxu aktywność przeciwutleniającą. Można przypuszczać, więc że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów i

związków polifenolowych jest tym wyższa im więcej cząsteczek i silniej wiąże się z częścią hydrofilową dwuwarstwy lipidowej. Ponadto ważną rolę odgrywa rodzaj substancji polifenolowych zawartych w ekstraktach. Ekstrakty z liści jagody kameczackiej i jabłka zawierają w swoim składzie procentowo dużą zawartość kwasu chlorogenowego, który również powodował największe zmiany w obszarze hydrofilowym badanych błon.

III. 5. Badania temperatury przejścia fazowego liposomów fluorymetrycznie i kalorymetrycznie

Badania temperatury przejścia fazowego przeprowadzono dla błon utworzonych z jednego rodzaju lipidów w różnych temperaturach przy użyciu spektroskopii fluorymetrycznej „steady – state” oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Określono wpływ związków polifenolowych na parametry termodynamiczne liposomów jedno- i wielowarstwowych.

W badaniach fluorymetrycznych określono termotropowe parametry anizotropii fluorescencji i uogólnionej polaryzacji. Dla błon utworzonych z jednego rodzaju cząsteczek lipidowych możliwe jest wyznaczenie temperatury przejścia błony z fazy żelu, gdzie cząsteczki lipidów są ciasniej upakowane i wykazują mniejszą ruchliwość łańcuchów węglowodorowych, do fazy ciekłokrystalicznej charakteryzującej się dużo większą ruchliwością i luźniejszym upakowaniem cząsteczek. Zmiany temperatur przejścia fazowego w lipidowych modelach błon utworzonych z DPPC i DMPC, które występują również w błonie erytrocytów są dobrze znane i opisane w literaturze [Blume, 1991, Taylor i in., 1995]. Badania fluorymetryczne przeprowadzono wykorzystując hydrofobowy znacznik fluorescencyjny DPH i hydrofilowe sondy Laurdan i Prodan. Badania wykonano w różnych temperaturach dla liposomów jednowarstwowych (SUV) utworzonych z DPPC potraktowanych wybranym stężeniem ekstraktów z owoców jabłka, truskawki i aronii oraz z liści i owoców czarnej porzeczki i jagody kameczackiej [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2014b, Cyboran i in., 2014]. Dla związków polifenolowych: kwasu chlorogenowego, pelargonidyno-3-O-glukozydu oraz cyjanidyno-3-O-galaktozydu, wykonano badania dla liposomów utworzonych z DPPC oraz z DPPC z dodatkiem cholesterolu, a także dla liposomów uformowanych z DMPC, poddanych działaniu wyżej wymienionych związków o określonym stężeniu [Bonarska-Kujawa i in., 2012 b, Pruchnik i in., 2014]. Badania z użyciem hydrofobowego znacznika DPH przeprowadzone dla ekstraktów z liści i owoców czarnej porzeczki oraz dla kwasu chlorogenowego wykazały, że badane substancje polifenolowe nie zmieniają temperatury głównego przejścia fazowego oraz anizotropii fluorescencji, a tym samym płynności błony w fazie ciekłokrystalicznej, a także w fazie żelu w odniesieniu do liposomów niemodyfikowanych [Cyboran i in., 2014, Pruchnik i in., 2014].

Otrzymane tą techniką wyniki uzyskane dla sond hydrofilowych Laurdan i Prodan wykazują termotropowe zmiany wartości uogólnionej polaryzacji błon zmodyfikowanych substancjami polifenolowymi. Chromofor sondy Laurdan zlokalizowany na poziomie glicerolu rejestruje zmiany polarności i właściwości dynamicznych błony, w regionie główek polarnych lipidów i na granicy lipid/środowisko wodne. Chromofor sondy Prodan jest ulokowany powyżej glicerolu, na granicy części hydrofilowej, a środowiskiem wodnym i jest wrażliwy na zmiany upakowania i uwodnienia cząsteczek lipidowych, a także na temperaturę przedprzejścia, charakteryzującą fazę przejściową między fazą ciekłokrystaliczną, a fazą żelu [Parasassi i in., 1998]. Użyte ekstrakty i związki polifenolowe zmniejszyły wartość uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan w fazie żelu oraz zwiększyły ją w fazie ciekłokrystalicznej, ale nie zmieniały temperatury głównego przejścia fazowego. Wyniki uzyskane dla sondy Prodan wykazały podobnie zmiany wywołane badanymi substancjami zarówno w fazie żelu, jak i w fazie ciekłokrystalicznej, bez zmiany temperatury głównego

przejścia fazowego, ale jednak ze zmianami w fazie przejściowej. Takie wyniki wskazują, że substancje polifenolowe obecne w ekstraktach oraz pojedyncze związki polifenolowe nie zmieniają struktury błony i nie wnikają do hydrofobowego wnętrza błony. Wiążą się natomiast z jej powierzchnią, zmieniając upakowanie główek polarnych cząsteczek lipidów i ich dynamikę, czyli zmieniają uporządkowanie błony w tym regionie zarówno w fazie żelu, jak i w fazie ciekłokrystalicznej.

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w badaniach fluorymetrycznych przeprowadzono eksperymenty przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), która jest precyzyjną, nieinwazyjną techniką termodynamiczną, pozwalającą na bardzo dokładną analizę przejść fazowych. Wyznaczone tą techniką parametry termotropowe błon lipidowych, to temperatury, przy których zachodzą przejścia fazowe tj.: temperatura głównego przejścia fazowego (T_m) i temperatura przedprzejścia (T_p), a także kooperatywność ($\Delta T_{1/2}$) i zmiany entalpii (ΔH) tych przejść. Błony liposomów utworzonych z jednego rodzaju cząsteczek lipidowych poniżej temperatury przedprzejścia znajdują się w fazie żelu, a łańcuchy węglowodorowe lipidów znajdują się w konformacji „all trans”. Natomiast powyżej głównego przejścia fazowego błona lipidowa znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej. W zakresie temperatur: od temperatury przedprzejścia do temperatury głównego przejścia fazowego obserwowana jest faza pośrednia, gdzie dwuwarstwa lipidowa charakteryzuje się współistnieniem fazy żelu i fazy ciekłokrystalicznej, zwana w literaturze „ripple phase”. Wprowadzenie dodatkowego składnika, w postaci związków polifenolowych czy cholesterolu do modelowej błony lipidowej wpływa na zmianę powyższych parametrów, a w szczególności temperatury przejścia fazowego lipidów, z których uformowana jest błona. Obecność cholesterolu w błonach lipidowych powoduje upłynnienie fazy żelu, natomiast usztywnienie fazy ciekłokrystalicznej, czego dowodem jest zmiana lub brak temperatury przedprzejścia i przejścia pomiędzy fazą żelu i ciekłokrystaliczną (przy stężeniu cholesterolu powyżej 50 mol%). Zmiany temperatury głównego przejścia fazowego wywołane obecnością w błonie dodatkowych związków są związane ze zmianami płynności dwuwarstwy lipidowej i struktury błony. Zmiany temperatury przedprzejścia świadczą raczej o zmianach zachodzących w polarnej części błony, skutkującymi rozluźnieniem jej struktury [McMullen i in., 1993, 1995; Blume, 1991].

Badania kalorymetryczne przeprowadzono dla modeli lipidowych błon w postaci wielowarstwowych liposomów (MLV), uformowanych z syntetycznych lipidów: DMPC, DPPC, a także DPPC z dodatkiem cholesterolu, które zmodyfikowano ekstraktami i związkami polifenolowymi [Bonarska-Kujawa i in., 2011, 2014b, 2015, Cyboran i in., 2014, Pruchnik i in., 2014]. Wyniki badań kalorymetrycznych wykazały niewielkie zmiany temperatury głównego przejścia fazowego lipidów (T_m) z fazy żelu w fazę ciekłokrystaliczną jedynie dla bardzo dużych stężeń użytych substancji polifenolowych (5 mg/ml), natomiast dla niższych stężeń praktycznie nie stwierdzono zmian. W niewielkim stopniu natomiast związki polifenolowe zmieniały temperaturę przedprzejścia (T_p) w błonach lipidowych, likwidując je przy najwyższych stężeniach i nieznacznie zwiększając szerokość połówkową piku głównego przejścia fazowego ($\Delta T_{1/2}$). Brak wpływu substancji polifenolowych na temperaturę głównego przejścia fazowego dowodzi, że nie zmieniają one struktury i organizacji dwuwarstwy lipidowej, czyli nie wnikają głęboko do obszaru hydrofobowego błon, a zmiany temperatury przedprzejścia i kooperatywności piku T_m świadczą o obecności użytych substancji na powierzchni błon. Dla błon liposomów uformowanych z DPPC z dodatkiem cholesterolu wykazano większe uporządkowanie błon liposomów. Dla tych liposomów potraktowanych pojedynczymi związkami polifenolowymi; pelargonidyno-3-O-glukozydem oraz cyjanidyno-3-O-galaktozydem i kwasem chlorogenowym wykazano, że likwidują przedprzejście już w obecności 10 mol% cholesterolu [Bonarska-Kujawa i in., 2011, Pruchnik i in., 2014]. Stwierdzono również zwiększenie kooperatywności piku oraz zwiększoną

entalpię przejścia fazowego. Taki wynik potwierdza przypuszczenia, że związki te nie zmieniają struktury błony, ale modyfikują jej część hydrofilową, poprzez oddziaływania elektrostatyczne z główkami polarnymi lipidów.

III. 6. Badanie elektryczne płaskich błon lipidowych (BLM)

Badania fluorymetryczne i kalorymetryczne wskazały, że związki polifenolowe w postaci ekstraktów wiążą się z częścią hydrofilową użytych błon. Zostały, więc podjęte badania elektryczne mające na celu określenie wpływu substancji polifenolowych na oporność i pojemność elektryczną płaskich błon lipidowych, zwanych czarnymi (BLM), utworzonych z lipidów wyekstrahowanych z błon erytrocytów (RBCL) oraz fosfatydylocholino jajeckiej (EPC). Badania oporności i pojemności czarnych błon lipidowych wykonano dla ekstraktów z owoców i liści jagody kamczackiej [Bonarska-Kujawa i in., 2014 b] oraz dla kwasu chlorogenowego [Bonarska-Kujawa i in., 2015].

Zmiany pojemności i oporności BLM są związane ze zmianą grubości dwuwarstwy lipidowej, spowodowanej obecnością związków polifenolowych w błonie. Wynikają także ze wzrostu jej hydratacji, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia transportu jonowego przez płaską dwuwarstwę lipidową. Po dodaniu ekstraktów do elektrolitu otaczającego błonę lipidową (BLM) obserwowano zaburzenie równowagi układu elektrolit - dwuwarstwa. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność badanych ekstraktów w otoczeniu dwuwarstwy lipidowej powoduje spadek jej pojemności zależny od stężenia ekstraktu. Spadek ten, świadczy o wpływie substancji zawartych w ekstraktach na obszar hydrofilowy dwuwarstwy lipidowej i może być spowodowany zmianami grubości błony oraz/lub zmianami jej przenikalności elektrycznej.

W obecności kwasu chlorogenowego (CGA) badania wykazały spadek pojemności i rezystancji BLM. Zmiany tych parametrów elektrycznych dowodzą, że związek ten wiąże się z płaską błoną lipidową w obszarze główek polarnych fosfolipidów błonowych. Obecność CGA w obszarze hydrofilowym błony, traktowanym umownie, jako podwójna warstwa elektryczna, powodował zmiany pojemności elektrycznej BLM. Przyczyną spadku pojemności i rezystancji BLM mogły być zarówno zmiany w rozkładzie ładunku elektrycznego w obecności CGA, jak i zmiany przestrzennej orientacji główek polarnych lipidów [Movileann i in., 2000, Everitt i Heydon, 1968]. Kwas chlorogenowy wpływał, zatem prawdopodobnie na rozkład sił w oddziaływaniach elektrostatycznych w warstwie hydrofilowej dwuwarstwy lipidowej, zmieniając tym samym potencjał dipolowy błony. Zmiany te mogły wynikać z obecności polarnych grup OH w cząsteczce CGA. Związki o właściwościach hydrofilowych, do jakich należy kwas CGA, jak się uważa, mogą powodować nawet kilkakrotne zmiany rezystancji płaskich błon lipidowych [Bender i Tien, 1987; Lauger i in., 1967].

Ekstrakty z owoców i liści jagody kamczackiej, również powodowały niewielki spadek pojemności elektrycznej płaskich błon lipidowych. Obserwowane małe zmiany oporności BLM, pod wpływem ekstraktów dowodzą, że lokują się one głównie w powierzchniowej części błony, modyfikując jej właściwości. Ich obecność w części hydrofilowej błony prawdopodobnie wpływała na reorientację główek polarnych lipidów błonowych, a w rezultacie na zmianę potencjału dipolowego błony, spowodowaną zmianą oddziaływań elektrostatycznych w warstwie hydrofilowej. Badania pojemności BLM, utworzonych z lipidów błonowych, wykazały ponadto, że badane ekstrakty nie tylko nie działały destabilizująco na dwuwarstwę lipidową, ale nieznacznie ją stabilizowały [Bonarska-Kujawa i in., 2014b].

III. 7. Badania strukturalne błon z zastosowaniem techniki FTIR

Aby ocenić zmiany w części hydrofilowej błon modyfikowanych ekstraktami i związkami polifenolowymi spektrofotometrycznie wykonano badanie stopnia hydratacji błon lipidowych (DPPC lub EPC) w zakresie podczerwieni, metodą FTIR. W badaniach hydratacji błon metodą FTIR, na podstawie otrzymanych widm, brano pod uwagę cztery widoczne w widmie pasma. Są to następujące przedziały wartości liczb falowych: a) 3000 – 2800 cm^{-1} - dotyczy drgań grup metylenowych i metylowych (CH_2 i CH_3) łańcuchów alkilowych; b) 1780 – 1700 cm^{-1} - odpowiada drganiom grup karbonylowych $\text{C}=\text{O}$; c) 1300 – 1200 cm^{-1} - odpowiada drganiom grup fosforanowych PO_2 ; oraz przedział d) 1000 – 900 cm^{-1} jest związany z drganiami grup cholinowych $\text{N}-\text{CH}_3$.

Częstości drgań grup metylenowych i metylowych łańcuchów alkilowych zależą od ruchliwości (płynności) łańcuchów i rosną np. wraz z temperaturą czy w czasie przejścia ze stanu żelu do ciekłokrystalicznego. Oznacza to, że wzrost liczby falowej tych pasm świadczy o wzroście płynności części hydrofobowej błony. Grupy karbonylowe, a w jeszcze większym stopniu grupy fosforanowe tworzą wiązania wodorowe z wodą. Grupa karbonylowa może wiązać jedną cząsteczkę wody, grupa fosforanowa kilka. Stąd też pasma karbonylowe i fosforanowe fosfolipidów odpowiadają sumie drgań grup $\text{C}=\text{O}$ lub PO_2 będących na różnym stopniu hydratacji. Drganiami grup $\text{C}=\text{O}$ i PO_2 niewiązanych się z wodą odpowiadają liczby falowe odpowiednio ok. 1740 cm^{-1} i ok. 1260 cm^{-1} . Każda związana cząsteczką wody przesuwa te wartości o około 20 cm^{-1} w kierunku mniejszych wartości. Zmiany obserwowane w tych pasmach świadczą, zatem o zmianach stopnia hydratacji błony w rejonie grup karbonylowych i fosforanowych. Częstości drgań grup metylowych części cholinowej (trimetyloamoniowej) zależą od właściwości otaczającego je ośrodka i rosną nieznacznie wraz ze zmniejszaniem się jego lepkości. Liczba falowa drgań całkowicie suchego lipidu jest nieco ponad dwie jednostki mniejsza od całkowicie uwodnionej błony lipidowej (liposomu). Szerokość połówkowa tego pasma zależy od „sztywności” główki polarnej, czyli od możliwości ruchu wzdłuż szkieletu $-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-$ [Lewis i in., 1994, Attar i in., 2000].

Przy użyciu techniki FTIR zbadano zmiany poszczególnych elementów strukturalnych błon liposomów uformowanych z DPPC i lecytyny jajecznej (EPC) w obecności ekstraktów z liści i owoców jagody kameczackiej [Bonarska-Kujawa i in., 2014 b] oraz z liści i owoców czarnej porzeczki [Cyboran i in., 2015]. Badania wykazały, że ekstrakty te nie powodowały zmian w części hydrofobowej błon liposomów w zakresie częstości odpowiadającej drganiom wiązań grup CH_2 i CH_3 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidowych. Wykazano natomiast niewielkie przesunięcia w pasmie karbonylowym, cholinowym i fosforanowym absorpcyjnych widm promieniowania podczerwonego (IR). Charakter zmian w części hydrofilowej błony liposomów, odzwierciedlony w zmienionym nieznacznie kształcie widma z dodatkowym maksimum pasma karbonylowego, wskazywał jednak na brak bezpośredniego wiązania między związkami polifenolowymi ekstraktów a grupami karbonyłowymi lipidów. Obserwowane zmiany mogą być wynikiem formowania się wiązania wodorowego pomiędzy grupami OH polifenoli a tlenem w wiązaniu estrowym lipidów, co sugerowali również inni autorzy [Pawlikowska-Pawłęga i in., 2013]. W części widma odpowiadającej drganiom grup fosforanowych zaobserwowano również przesunięcia maksimum w kierunku mniejszych częstości, nieco większe dla ekstraktów z liści, co świadczy o większym uwodnieniu tego pasma w obecności ekstraktów. Ponadto w pasmie cholinowym wykazano redukcję w szerokości połówkowej piku, również nieco większą dla ekstraktów z liści. Kształt widma w pasmie cholinowym świadczy o ograniczeniu ruchliwości grupy cholinowej na skutek oddziaływań z cząsteczkami ekstraktów. Wyniki te wskazują na prawdopodobieństwo wiązania się cząsteczek polifenoli z główkami polarnymi lipidów, ograniczające ich ruchliwość w obszarze grupy cholinowej, a także na wzrost stężenia cząsteczek wody w regionie polarnym błony. Otrzymane wyniki badań FTIR wykazały, więc wzrost hydratacji

blon utworzonych z lipidów DPPC lub EPC modyfikowanych ekstraktami, który jest większy dla ekstraktów z liści czarnej porzeczki i jagody kamczackiej. Prawdopodobnie substancje te wiążąc się z hydrofilową częścią membrany wiązaniami wodorowymi, powodują wzrost stężenia cząsteczek wody w tym rejonie.

Podsumowanie badań

Badania przedstawione w osiągnięciu naukowym miały na celu określenie skutków oddziaływania wybranych ekstraktów i związków polifenolowych na fizyczne właściwości błony biologicznej i lipidowej oraz pozwoliły na zlokalizowanie tych substancji w zmodyfikowanych przez nie obszarach błony. Uzyskane wyniki pozwoliły także zaproponować mechanizm odpowiedzialny za bardzo dobre właściwości antyoksydacyjne ekstraktów polifenolowych w odniesieniu do błon biologicznych. Badania dotyczyły ekstraktów z owoców truskawki, aronii i jabłoni, oraz z owoców i liści czarnej porzeczki i jagody kamczackiej, a także pojedynczych związków polifenolowych. W tym celu zbadano wpływ badanych substancji na właściwości fizyczne błon erytrocytów i modelowych błon lipidowych oraz aktywność przeciwutleniającą tych związków. Badania wykonane w ramach osiągnięcia naukowego pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Użyte ekstrakty są bogatym źródłem związków polifenolowych, a w szczególności ekstrakty z liści różnych roślin, mniej popularne i niespożywane bezpośrednio w codziennej diecie człowieka.
- Ekstrakty polifenolowe posiadają wysoką aktywność antyoksydacyjną w odniesieniu do błon biologicznej i lipidowej. Niektóre z nich są aktywniejsze niż uznane standardowe antyoksydanty, takie jak kwas askorbinowy czy Trolox[®].
- Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów polifenolowych zależy nie tylko od ilości związków polifenolowych w nich zawartych, ale przede wszystkim od ich rodzaju. Rodzaj polifenoli i ich zawartość procentowa w ekstrakcie, zależy z kolei, od gatunku rośliny, a także od tego, z jakiej części rośliny ekstrakt został pozyskany.
- Związki polifenolowe obecne w ekstraktach nie wykazują działań niepożądanych. W zakresie użytych stężeń nie działają destrukcyjnie na błonę erytrocytów, natomiast zwiększają jej wytrzymałość na zmiany ciśnienia osmotycznego otaczającego ją środowiska. Związki polifenolowe praktycznie nie modyfikują części hydrofobowej błon tj. obszaru łańcuchów węglowodorowych. Nie zmieniają płynności części hydrofobowej, ponieważ nie wnikają głęboko do wnętrza błony.
- Ekstrakty i związki polifenolowe modyfikują wyraźnie część hydrofilową błon erytrocytów i lipidowych modeli błon. Zmieniają uporządkowanie i upakowanie części hydrofilowej błon. Nie zmieniają właściwości termotropowych błon lipidowych. Koncentrując się w części hydrofilowej błony erytrocytów powodują zmiany morfologiczne komórek polegające na powstawaniu echinocytów. Poprzez oddziaływania z główkami polarnymi lipidów błonowych związki polifenolowe powodują zmiany w rozkładzie ładunku elektrycznego na powierzchni błon, skutkujące zmianami oporności i pojemności elektrycznej płaskich błon lipidowych. Powodują również zmiany hydratacji obszaru wiązania karbonylowego, cholinowego i fosforanowego główek polarnych lipidów błonowych.

Na podstawie uzyskanych rezultatów można przypuszczać, że ochronne działanie ekstraktów w odniesieniu do błony biologicznej zależy od ilości cząsteczek polifenoli przyłączonych do obszaru główek polarnych lipidów na powierzchni błony, które stanowią specyficzną barierę ochronną. Molekularny mechanizm, odpowiedzialny za ochronę błony biologicznej przed wolnymi rodnikami przez te substancje, można określić w następujący

sposób. Związki polifenolowe wchodzące w skład ekstraktów, obecne w roztworze i przyłączone do części hydrofilowej błony, zmniejszają stężenie wolnych rodników zarówno w otoczeniu błony, jak również stanowią barierę dla tych wolnych rodników, które dotrą do powierzchni błony. Wzmacniając i uszczelniając błonę, poprzez wiązanie się z główkami polarnymi lipidów, zmieniają ich uwodnienie i ograniczają dyfuzję wolnych rodników do jej wnętrza.

Możliwości praktycznego zastosowania uzyskanych wyników:

- Badane ekstrakty, w szczególności mniej popularne wyciągi z liści, mogą być z powodzeniem stosowane, jako naturalne, łatwo dostępne i bezpieczne źródło substancji polifenolowych w zewnętrznej i wewnętrznej ochronie organizmu. W świetle uzyskanych wyników, w celach profilaktycznych, należy zwrócić uwagę przede wszystkim na korzyści wynikające dla organizmu z diety bogatej w warzywa i owoce. Ponadto ekstrakty polifenolowe z owoców i liści mogą zostać użyte w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym lub kosmetycznym, jako naturalne przeciwutleniacze, suplementy diety, składniki leków lub jako dodatki do żywności czy kremów pielęgnacyjnych.
- Rezultaty tych badań mogą posłużyć również do projektowania nowych preparatów lub nanotechnologicznych składników żywności z udziałem polifenoli, wspomagających leczenie i ochronę organizmów przed chorobami, które są wynikiem stresu oksydacyjnego powstającego w organizmie.

* Badania zrealizowane w ramach osiągnięcia naukowego były finansowane z projektów badawczych MNiSW w latach 2008 - 2011, nr N N305 337034 oraz w latach 2011- 2014, nr N N304 173840, kierowanych przez panią prof. dr hab. Halinę Kleszczyńską, w których habilitantka była wykonawcą oraz w latach 2011- 2014, nr N N312 422340, kierowanym przez habilitantkę.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Tematyka badań realizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Studia ukończyłam we wrześniu 2000 roku uzyskując tytuł magistra inżyniera fizyki technicznej o specjalności inżynieria biomedyczna. Pracę magisterską pt.: „Model układu pomiarowego do badania aberracji oka” wykonałam pod kierunkiem dr hab. inż. Marka Zająca.

W kwietniu 2001 roku na drodze konkursu zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu. W pierwszych miesiącach pracy przygotowywałam się do prowadzenia ćwiczeń laboratoryjnych z fizyki, biofizyki i agrofizyki oraz intensywnie zapoznawałam się z tematyką badań realizowanych w Katedrze.

W październiku 2001 roku w ramach wrocławskiego porozumienia o współpracy międzyuczelnianej, podjęłam studia doktoranckie w Instytucie Fizyki na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej, jednocześnie pracując na stanowisku asystenta w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Badania do pracy doktorskiej rozpoczęłam w 2001 i prowadziłam je w ramach realizowanego w latach 2001-2004 projektu badawczego MNiSW pt. „Optymalizacja oddziaływania aminofosfonianów i wybranych herbicydów poprzez ich synergiczne współdziałanie na układy biologiczne naturalne i modelowe. Próba wyjaśnienia mechanizmu synergizmu”, (grant nr 6 P04G 096 21), którego kierownikiem była pani prof. dr hab. Halina

Kleszczyńska. Grant ten realizowany był we współpracy z zespołem kierowanym przez pana prof. dr hab. inż. Romana Gancarza z Instytutu Technologii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej. W instytucie tym przeprowadzono syntezę nowych związków organicznych fosforu (aminofosfonianów). Badania dotyczące aktywności biologicznej tych związków oraz ich mieszanin ze znanymi i stosowanymi powszechnie herbicydami, stanowiły główną treść mojej rozprawy doktorskiej, której przewód został otwarty w październiku 2002 roku w Instytucie Fizyki Politechniki Wrocławskiej, a promotorem pracy została pani prof. dr hab. Halina Kleszczyńska.

Przedstawione w pracy doktorskiej badania miały na celu ocenę aktywności biologicznej nowych związków z grupy aminofosfonianów o potencjalnych właściwościach herbicydowych. Badania miały na celu także znalezienie korelacji między aktywnością biologiczną związku, a jego strukturą chemiczną oraz wyłonienie nowych najaktywniejszych związków. Substancje najaktywniejsze były wstępnie zakwalifikowane, jako potencjalne pestycydy, i poddawane dalszym testom na roślinach - docelowych układach biologicznych. Otrzymane w tej pracy wyniki badań były wykorzystane do projektowania struktur i syntezy nowych związków o optymalnych właściwościach herbicydów.

Badania aktywności biologicznej wykonałam dla kilkunastu nowych aminofosfonianów o różnej strukturze chemicznej (acykliczne, cykliczne i pochodne fluorenu) o charakterze amfifilowym, podobnych strukturalnie do stosowanych w rolnictwie herbicydów. Aktywność biologiczną tych związków określałam na podstawie ich oddziaływania z błoną erytrocytów oraz porównywałam z ich wpływem na inhibicję wzrostu i kiełkowania roślin wyższych. Aktywność użytych w pracy substancji określiłam na podstawie zmian parametrów fizycznych błon erytrocytów takich jak: wytrzymałość mechaniczna, oporność osmotyczna, płynność błony i indeksy kształtów erytrocytów.

W celu otrzymania skuteczniejszych środków ochrony roślin i opóźnienia procesu uodparniania się roślin na jeden rodzaj substancji, nowe związki otrzymane na drodze syntezy łączyłam także w mieszaniny ze stosowanymi herbicydami. W badaniach przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej oceniałam również aktywność biologiczną dwuskładnikowych mieszanin, utworzonych z jednego nowego związku z grupy aminofosfonianów oraz dwóch aktywnych i powszechnie stosowanych w uprawach herbicydów: kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), wchodzącego w skład preparatu herbicydowego o nazwie Pielik oraz fosfonometyloglicyny (glifosat, FMG), głównego składnika preparatu Roundup.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że najwyższą aktywność hemolityczną miały związki acykliczne i pochodne fluorenu. Badane związki wbudowywały się zarówno do zewnętrznej, jak i do wewnętrznej monowarstwy błony erytrocytów. Wszystkie związki powodowały zmiany w płynności i stopniu uporządkowania błony, które zależały od struktury związku i jego stężenia. Wykazano, że związki działające destrukcyjnie na błonę erytrocytów, wykazują również większy wpływ na inhibicję wzrostu ogórka i pszenicy oraz na kiełkowanie nasion gorczycy. W odniesieniu do kilku z kilkunastu mieszanin nowych aminofosfonianów ze związkiem 2,4-D lub glifosatem wykazałam działanie synergiczne, co oznaczało, że ich aktywność hemolityczna w odniesieniu do błony erytrocytów była wyższa niż aktywność pojedynczych składników mieszanin.

Badania nad aktywnością pojedynczych aminofosfonianów i ich mieszanin zostały opublikowane w 10 pracach [Kleszczyńska i in., 2001 a, b, 2003; Bonarska i in., 2002, 2003 a i b, Sarapuk i in., 2003, 2005, 2009; Bielecki i in., 2005] i przedstawione w 9 komunikatach konferencyjnych.

Tematyka badań realizowanych po uzyskaniu stopnia doktora

Zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia doktora, realizowałam badania będące częścią kompleksowych badań prowadzonych w Katedrze Fizyki i Biofizyki, które w ogólności dotyczą biofizyki błon biologicznych. Badania te miały na celu poznanie mechanizmów oddziaływania różnych substancji biologicznie aktywnych z błonami biologicznymi i modelowymi na podstawie skutków tego oddziaływania. Badania takie prowadziłam przez cały czas mojej działalności naukowej z różnymi grupami związków w ramach współpracy naukowej z ośrodkami w kraju oraz, w ostatnich latach, z ośrodkiem zagranicznym. Realizowane przeze mnie badania podzieliłam tematycznie, według grup badanych związków, o określonym przeznaczeniu.

1. Czwartorzędowe sole amoniowe

Przed obroną pracy doktorskiej podjęłam badania realizowane w Katedrze Fizyki i Biofizyki nad aktywnością biologiczną nowych związków z grupy czwartorzędowych soli amoniowych, zsyntetyzowanych w ramach współpracy naukowej w latach 2002-2008 z zespołem pana prof. dr hab. inż. Stanisława Witka z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Czwartorzędowe sole amoniowe zostały zaprojektowane, jako potencjalne pestycydy, gdyż w testach biologicznych wykazały dobrą aktywność grzybo-, glono- i bakteriobójczą. Związki te, jako substancje o charakterze amfifilowym, były również aktywne w odniesieniu do błon biologicznych. Ich aktywność była zależna zarówno od długości łańcuchów węglowodorowych, jak i od struktury główki polarnej. We wcześniejszych badaniach wykazano, że substancje o podobnej strukturze indukują hemolizę i modyfikują transport anionów przez błonę. W grupie czwartorzędowych soli amoniowych zsyntetyzowano tzw. związki dwufunkcyjne różniące się długościami łańcuchów alkilowych i strukturami chemicznymi części polarnych, które przy odpowiednich stężeniach mogą być wykorzystywane, jako pestycydy, a dzięki podstawnikowi fenolowemu w stężeniach znacznie niższych mogą pełnić rolę zmiataczy wolnych rodników. Związki te, więc wpisywały się również w nurt badawczy poszukiwania nowych, skutecznych antyoksydantów. Mój udział w badaniach nad aktywnością tych związków polegał na wyznaczeniu ich aktywności hemolitycznej oraz aktywności antyoksydacyjnej w stosunku do lipidów zawartych w błonie erytrocytów utlenianych promieniowaniem UV. Badania były przeprowadzone na cieniach erytrocytów, otrzymanych metodą Dodge'a. Stopień utlenienia lipidów określałam na podstawie stężenia dialdehydu malonowego, będącego produktem utleniania.

W badaniach tych wykazałam, że czwartorzędowe sole amoniowe w stężeniach znacznie niższych od litycznych skutecznie chronią lipidy błonowe przed utlenieniem. Wysoką aktywność antyoksydacyjną wykazały związki o odpowiednio długich łańcuchach alkilowych, które najłatwiej wiązały się z błoną erytrocytów, co uwzględniono w syntezie dalszych związków tego typu. Badania te stanowiły treść 3 prac magisterskich, których byłam opiekunem naukowym oraz zostały zawarte w 5 artykułach: w tym cztery prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora [Kleszczyńska i in., 2002, 2003 a, b, c] i jedna po doktoracie [Kleszczyńska i in., 2008 a] oraz w 4 komunikatach konferencyjnych.

2. Związki lizosomotropowe

Związki lizosomotropowe, które również były przedmiotem moich badań w latach 2002-2005, zostały zsyntetyzowane w postaci szeregów homologicznych trzeciorzędowych amin również w ramach współpracy z zespołem pana prof. dr hab. inż. Stanisława Witka z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Nazwa tych substancji związana jest z faktem, że gromadzą się one szczególnie w lizosomach komórek zwierzęcych lub wakuolach komórek roślinnych, które posiadają najniższe pH spośród wszystkich organelli komórkowych. Związki te zsyntetyzowano, jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Związki lizosomotropowe ze względu na swoje właściwości kumulują się w lizosomach

komórek nowotworowych, w których pH jest niższe niż w komórkach zdrowych. Duże stężenie tych substancji w lizosomach prowadzi do zniszczenia błony i wypływu enzymów niszczących komórkę. Związki lizosomotropowe były również projektowane, jako potencjalne leki przeciwdziałające oporności wielolekowej (MDR). Dla nowych potencjalnych związków lizosomotropowych, o charakterze amfifilowym różniących się strukturą części polarnej cząsteczki i długością jej łańcuchów węglowodorowych, określałam w podstawowych badaniach biofizycznych toksyczność hemolityczną oraz wpływ na zmiany płynności błony erytrocytów i określiłam zależność między ich aktywnością wobec błony erytrocytów, a ich strukturą chemiczną.

Wyniki tych badań zostały zamieszczone w dwóch pracach jednej przed doktoratem [Kleszczyńska i in., 2005a] i jednej po doktoracie [Kleszczyńska i in., 2005a] oraz dwóch komunikatów konferencyjnych.

3. *Koniugaty roślinne polifenolowo-polisacharydowe*

W ramach współpracy z zespołem prof. dr hab. inż. Romana Gancarza z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej w latach 2001-2013 prowadziłam badania nad polifenolowo-polisacharydowymi koniugatami roślinnymi, wyizolowanymi z 10 różnych roślin leczniczych z terenu Polski: krwawnik pospolity, arnika górską, jeżówka purpurowa, przymiotno kanadyjskie, nawłóć pospolita, rumianek pospolity, rzepik pospolity, poziomka pospolita, jeżyna fałdowana oraz krwiściąg lekarski. Rośliny te zostały wybrane do badań ze względu na wykazane wcześniej w testach *in vitro* właściwości antykoagulacyjne (heparynopodobne) w odniesieniu do krwi ludzkiej. Ponieważ choroby układu krążenia są obecnie w krajach rozwiniętych najczęstszą przyczyną śmierci, na całym świecie trwają, więc nieustanne poszukiwania nowych, skutecznych substancji o właściwościach antykoagulacyjnych i przeciwplatekcyjnych, niewykazujących skutków ubocznych. Badania takie coraz częściej skupiają się na substancjach roślinnych.

Z użyciem wyżej wymienionych polifenolowo-polisacharydowych koniugatów roślinnych przeprowadziłam badania hemolityczne i oporności osmotycznej erytrocytów oraz płynności i stopnia utlenienia błon erytrocytów. Preparaty roślinne nie indukowały hemolizy erytrocytów, nie zmieniały również ich oporności osmotycznej, a także nie zmieniały płynności błon erytrocytów. Właściwości przeciwutleniające preparatów roślinnych zbadano w odniesieniu do błon erytrocytów, których utlenianie indukowano promieniowaniem UV. Stopień utlenienia lipidów określano spektrofotometrycznie na podstawie stężenia powstającego w tym procesie dialdehydu malonowego (MDA).

Rezultaty tych badań zamieszczono w 3 pracach magisterskich, których byłam opiekunem naukowym. Ponadto zostały zawarte w 3 artykułach [Pawlaczyk i in., 2003, 2013, Klober i in., 2007] (jedna przed doktoratem i dwie po uzyskaniu stopnia doktora) oraz w jednym komunikacie konferencyjnym. Badania nad tymi substancjami są obecnie kontynuowane *in vivo* w ramach projektu WROVASC – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej i dają nadzieję na zastosowanie w przyszłości nowego, skuteczniejszego wyciągu leczniczego.

4. *Związki organiczne cyny i ołowiu*

Innym tematem badawczym z zakresu toksykologii realizowanym przeze mnie zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia doktora był wpływ związków organicznych cyny i ołowiu na błony erytrocytów. Związki te zanieczyszczają środowisko naturalne, a ich stężenie rośnie ze względu na ich liczne zastosowanie w przemyśle i rolnictwie. Są to substancje toksyczne stanowiące poważne zagrożenie dla człowieka i innych organizmów. Skuteczna ochrona przed związkami organicznymi cyny i ołowiu wymaga wyjaśnienia mechanizmów

ich działania na poziomie molekularnym i komórkowym. Badania nad tymi związkami były przez szereg lat prowadzone w Katedrze Fizyki i Biofizyki przez zespół pana prof. dr hab. Stanisława Przystalskiego. Uczestniczyłam w tych badaniach w ramach czterech grantów, kierowanych przez prof. dr hab. Stanisława Przystalskiego, jako wykonawca. Realizowałam badania w następujących projektach badawczych:

- Antagonizm i synergizm w oddziaływaniach związków organicznych cyny i ołowiu z błonami biologicznymi i modelowymi - zminimalizowanie wpływu toksycznych związków na organizmy, projekt realizowany od 2001 do 2004 (nr 6 P04G 019 21),
- Badanie mechanizmów toksyczności wybranych organicznych związków cyny i ołowiu na błony biologiczne i modelowe oraz ochrony błon przed toksykantami, projekt realizowany od 2004 do 2007 (nr 2 P04G 089 27),
- Mechanizm działania wybranych związków metaloorganicznych na kanały błonowe (jonowe i złącza komórkowych) pewnych komórek i na inne białka i lipidy błonowe oraz ochrona przed działaniem tych związków, projekt realizowany 2008 do 2011 (nr N N305 336434),
- Ochrona środowiska przed toksycznym wpływem związków organicznych ołowiu i cyny metodą elektryczną, projekt realizowany od 2011 do 2014 (nr N N305 133540).

Badania przeze mnie realizowane dotyczyły ochronnego wpływu na błony erytrocytów związków: DTT (ditiotreitoli) i dwusiarczek sodowy (Na_2S) w odniesieniu do tributyl- i trifenylołowiu. Dla związków trifenylo- i tributyl- ołowiu oraz tributyl- i trifenylocyny wykonałam również badania hemolityczne, fluorymetryczne - płynności i uporządkowania błony erytrocytów oraz mikroskopowe badania kształtów erytrocytów. Wyniki badań toksyczności wyżej wymienionych związków w odniesieniu do błony erytrocytów wykazały, że zależy ona od stężenia tych związków i ich lokalizacji w błonie. Najbardziej toksyczny okazał się związek tributyl- ołowiu, który wnikał do wewnętrznej monowarstwy erytrocytów, podczas gdy pozostałe związki kumulowały się w zewnętrznej monowarstwie błony. Wyniki wykonanych przeze mnie badań z użyciem związków organicznych cyny i ołowiu zostały opublikowane w 4 pracach [Kleszczyńska i in., 2004, 2008b, Żyłka i in., 2009, Bonarska-Kujawa i in., 2012c] (1 przed doktoratem i 3 po uzyskaniu stopnia doktora) oraz w 4 komunikatach konferencyjnych.

5. N-tlenki trzeciorzędowych amin

Po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam w badaniach, jako wykonawca grantu MNiSW „Ochrona układów biologicznych przed stresem oksydacyjnym przez nowe substancje z funkcją antyoksydantu”, realizowanym od 2004 do 2007 (nr 2 P04G 088 27) we współpracy z zespołem prof. dr hab. inż. Stanisława Witka z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Celem projektu było wyselekcjonowanie spośród otrzymanych, sześciu szeregów homologicznych N-tlenków trzeciorzędowych amin typu mono- i diamidoamin oraz mono- i diaminoestrów. Zostały one zaprojektowane, jako potencjalnie efektywne antyutleniacze białek i tłuszczów, a więc mogące służyć, jako środki do konserwacji żywności oraz wyrobów przemysłu kosmetycznego i chemii gospodarczej. N-tlenki były związkami o niskiej toksyczności w stosunku do organizmów wyższych, ponieważ ulegały biodegradacji, zatem nie były szkodliwe dla środowiska naturalnego. Badania przeprowadzone na błonach erytrocytów miały na celu określenie aktywności biologicznej, w tym antyoksydacyjnej N-tlenków, w powiązaniu z ich strukturą chemiczną. W szczególności określono wpływ łańcuchów alkilowych, grup amidowych i estrowych na aktywność tych związków. Podjęte badania pozwoliły na wyselekcjonowanie, wśród badanej grupy N-tlenków, tych związków, które wykazywały wysoką aktywność przeciwutleniającą.

W ramach projektu zbadalam toksyczność hemolityczną tych związków oraz ich wpływ na płynność i uporządkowanie błony biologicznej, a także ich aktywność przeciwutleniającą w odniesieniu do błon erytrocytów. Wyniki badań wykazały związek między aktywnością biologiczną tych związków, a określonymi grupami funkcyjnymi zawartymi w ich cząsteczkach, jednak ich właściwości przeciwutleniające nie okazały się wystarczająco dobre. Tylko 3 z ponad 20 przebadanych N-tlenków skutecznie chroniły lipidy przed utlenieniem. Pozostałe związki albo wykazały niewielką aktywność przeciwutleniającą albo działały prooksydacyjne. Badania te zaowocowały 4 publikacjami [Kleszczyńska i in., 2005b, 2006; Bielecki i in., 2007; Bonarska-Kujawa i in., 2007a] i 6 komunikatami konferencyjnymi oraz jedną pracą magisterską, której byłam opiekunem naukowym.

6. Miękkie substancje biologicznie czynne o strukturze gemini

W ramach współpracy z Wydziałem Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w latach 2009-2012 uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w ramach grantu MNiSW „Miękkie substancje biologicznie czynne o strukturze typu gemini” (nr N N209 337737) kierowanego przez zespół dr inż. Jacka Łuczyńskiego. Badania były prowadzone nad nowymi syntetycznymi surfaktantami z grupy czwartorzędowych soli amoniowych o strukturze dimerycznej tzw. „gemini”. Związki te, jako estry glicyny lub alaniny czwartorzędowych soli amoniowych, o zróżnicowanej strukturze chemicznej, zostały zaprojektowane, jako potencjalne inhibitory pomp oporności wielolekowej (MDR). Substancje te charakteryzują się również niską toksycznością i są zdolne do tworzenia kompleksów z DNA, co w perspektywie mogło okazać się użyteczne w terapii genowej. Określenie „miękkie” odnosi się do związków, które po zastosowaniu tracą swoją aktywność i mogą ulegać rozkładowi hydrolitycznemu, zatem są przyjazne dla środowiska naturalnego. Ważnym elementem rzutującym na właściwości związku jest, obok rodzaju ugrupowania hydrofobowego (długość łańcucha węglowodorowego) i rodzaju łącznika między łańcuchami alkilowymi. Substancje te mogą znaleźć zastosowanie, jako biocydy. Mniej aktywne związki mogą być rozważane, jako nośniki leków lub DNA w terapii genowej.

W ramach projektu realizowałam badania toksyczności hemolitycznej tych związków w odniesieniu do erytrocytów oraz badania płynności i uporządkowania błony erytrocytów. Badania te miały na celu określenie aktywności biologicznej tych związków w powiązaniu z ich strukturą chemiczną. W szczególności określono aktywność związków w zależności od długości ich łańcuchów alkilowych i łącznika występującego między tymi łańcuchami. Zbadano ponad 20 związków typu gemini, zsyntetyzowanych w postaci czterech szeregów homologicznych estrów glicyny i alaniny. Wysoką aktywność hemolityczną i zmiany w części hydrofilowej i hydrofobowej błony erytrocytów wykazały związki o odpowiednio długich łańcuchach alkilowych i większym łączniku między łańcuchami, które najłatwiej wiązały się z błoną erytrocytów. W ramach tego projektu byłam opiekunem naukowym 4 prac magisterskich studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz współautorem komunikatu konferencyjnego i pracy wysłanej do czasopisma *Tenside, Surfactants, Detergents*.

7. Substancje polifenolowe: związki i ekstrakty roślinne

Ponieważ poszukiwania nowych i skutecznych antyoksydantów wśród nowych związków syntetycznych nie dały oczekiwanych rezultatów w ramach kolejnego projektu w współpracy z prof. dr hab. Janem Oszmiańskim z Katedry Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu rozpoczęliśmy badania nad związkami i ekstraktami polifenolowymi wyizolowanymi z wielu roślin. Badania te przede wszystkim skupiały się na ochronnym działaniu związków polifenolowych w odniesieniu do błon

erytrocytów i były wykonywane w ramach dwóch grantów. W latach 2008-2011 brałam udział, jako wykonawca w projekcie „Ochrona organizmów żywych przed wolnymi rodnikami przez naturalne substancje polifenolowe” grant MNiSW (nr N N305 337034) oraz w latach 2011-2014, w projekcie: „Ochronny wpływ ekstraktów roślinnych na układy biologiczne narażone na działanie promieniowania UV”, grant MNiSW (nr N N304 173840), kierowanymi przez panią prof. dr hab. Halinę Kleszczyńską. Bardzo dobre właściwości przeciwutleniające tych związków i ekstraktów w odniesieniu do błon erytrocytów i lipidowych zachęciły mnie do podjęcia badań nad wpływem tych substancji na właściwości fizyczne błon erytrocytów i błon modelowych. Powyższe badania prowadziłam w ramach kierowanego przeze mnie projektu MNiSW w latach 2011 do 2014 pt.: „Oddziaływanie polifenoli roślinnych z modelowymi i naturalnymi błonami biologicznymi w aspekcie nanotechnologii” (nr N N312 422340). Badania przedstawione przeze mnie, jako osiągnięcie naukowe były prowadzone w ramach 3 powyższych projektów i dotyczyły wyników uzyskanych dla wybranych ekstraktów z owoców i liści oraz niektórych pojedynczych związków polifenolowych. Badania przeprowadzone w ramach projektów miały na celu określenie właściwości przeciwutleniających i ochronnych polifenolowych ekstraktów roślinnych oraz przybliżenie molekularnego mechanizmu oddziaływania polifenoli z błoną biologiczną na podstawie biofizycznych badań strukturalnych. Zbadano w sumie ponad 20 polifenolowych ekstraktów roślinnych: z owoców i liści czarnej porzeczki, jagody kamczackiej, jagody leśnej, a także z owoców: jabłka, truskawki, aronii, borówki wysokiej i niskiej, czerwonej porzeczki i żurawiny oraz z liści mini kiwi, a także z łąciny i łuski gryki, kocanki, głogu, dziurawca i tarczycy bajkalskiej, a także ekstrakty z owoców wiśni w postaci nanocząstek enkapsulowanych z dodatkiem maltodekstryny lub inuliny. Wyżej wymienione ekstrakty miały oznaczony skład polifenolowy metodami chromatograficznymi HPLC-DAD i UPLC-DAD-MS. Ponadto w badaniach wykorzystano kilkanaście związków polifenolowych w tym: kwas chlorogenowy, glikozydy kwercetyny, epikatechinę, rutynę oraz klika antocyjanów: pelargonidyno-3-O-glukozyd, cyjanidyno-3-O-glukozyd, cyjanidyno-3-O-galaktozyd, malwinidyno-3-O-glukozyd i delfinidyno-3-O-glukozyd, które jak wykazały analizy UPLC, są głównymi składnikami badanych ekstraktów.

W badaniach zastosowano różne modele błon, które posłużyły do określenia charakteru oddziaływań badanych związków i ekstraktów polifenolowych zarówno z błoną biologiczną, jak i z jej fazą lipidową. Dla wyżej wymienionych ekstraktów i związków polifenolowych przeprowadziłam szereg badań różnymi metodami i technikami pomiarowymi, omówionymi również w osiągnięciu naukowym. Fluorymetrycznie i spektrofotometrycznie oznaczano poziom inhibicji utleniania błon biologicznych, które utleniano promieniowaniem UV i związkiem AAPH. Ponadto przeprowadziłam badania hemolityczne, oporności osmotycznej i kształtów erytrocytów poddanych działaniu badanych ekstraktów. Zbadałam także metodą fluorymetryczną uporządkowanie części hydrofilowej błony i płynność hydrofobowego obszaru błon erytrocytów i lipidowej. Ponadto w obecności ekstraktów zostały przeprowadzone badania temperatury przejścia fazowego w liposomach utworzonych z lipidów syntetycznych DPPC i DMPC metodą fluorymetryczną i przy użyciu różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Zbadano stabilność płaskich błon lipidowych (BLM), uformowanych z DPPC, lecytyny jajecznej oraz z lipidów wyekstrahowanych z błony erytrocytów i wyznaczono ich parametry elektryczne: pojemność i oporność. Ponadto metodami FTIR i NMR określono zmiany wywołane w błonach lipidowych przez wybrane substancje i pojedyncze związki polifenolowe. Na podstawie uzyskanych rezultatów badań, omówionych w dużej części, jako osiągnięcie naukowe, można stwierdzić, że związki polifenolowe nie działają destrukcyjnie na błony i praktycznie nie wnikają do ich hydrofobowego wnętrza natomiast łączą się z nią w obszarze hydrofilowym. Można przypuszczać, więc że ochronne działanie ekstraktów wobec błony biologicznej zależy od

ilości cząsteczek polifenoli przyłączonych do powierzchni błony komórkowej, które tworzą specyficzną barierę ochronną, w szczególności dla wolnych rodników. Z jednej strony, jako zmiatacze wolnych rodników substancje polifenolowe redukują ich stężenie w roztworze, z drugiej strony łącząc się z błoną, ograniczają ich dyfuzję do jej wnętrza. Wyniki badań pozwoliły również zwrócić uwagę na fakt, że użyte ekstrakty są bogatym źródłem związków polifenolowych, w szczególności dotyczy to ekstraktów z liści różnych roślin, które są mniej popularne i niestosowane bezpośrednio w codziennej diecie człowieka. Ekstrakty polifenolowe wykazują wysoką aktywność antyoksydacyjną, a niektóre z nich są aktywniejsze niż uznane standardowe antyoksydanty jak kwas askorbinowy czy Trolox[®]. Rezultaty tych badań mogą posłużyć do komponowania składu nowych preparatów lub leków oraz nanotechnologicznych składników żywności wspomagających leczenie niektórych chorób wywołanych stresem oksydacyjnym.

Przeprowadzone w ramach projektów badania, zostały zamieszczone w 16 pracach [Bonarska-Kujawa i in., 2007 a, 2008 a i b, 2011 a i b, 2012 a i b, 2013, 2014 a i b, 2015; Włoch i in., 2008, 2009; Cyboran i in., 2011, 2014; Pruchnik i in., 2014], z czego 8 stanowi osiągnięcie naukowe, a także w 27 komunikatach konferencyjnych. Część wyników badań uzyskanych w ramach projektów została zawarta w pracy doktorskiej pani dr inż. Sylwii Cyboran, której byłam promotorem pomocniczym. Obrona pracy doktorskiej, zrealizowanej na podstawie dorobku naukowego, miała miejsce na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie została zatwierdzona 26 lutego 2014 roku. Część wyników badań uzyskanych w tych projektach została również zawarta w dwóch pracach magisterskich, których byłam promotorem. Pierwsza z nich obroniona w 2009 na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przez panią Karolinę Baczyńską pt.: „Właściwości naturalnych związków polifenolowych w odniesieniu do błon”. Druga obroniona w 2013 na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przez pana Damiana Łyko pt.: „Oddziaływanie ekstraktów roślinnych z błoną biologiczną”.

W badaniach nad związkami pochodzenia roślinnego współpracowałam również z zespołem pani prof. dr hab. Marii Zamaraewej z Katedry Biofizyki Uniwersytetu w Białymstoku. Współpraca dotyczyła badań nad ekstraktem wyizolowanym z liści sumaka, wykazującym właściwości antyhemolityczne i antibakteryjne. W ramach tej współpracy wykonałam mikroskopowe badania kształtu erytrocytów modyfikowanych ekstraktem, a współpraca ta zaowocowała publikacją [Olchowik-Grabarek i in., 2014].

Badania na innych błonach komórkowych

W latach 2011-2012 podjęłam badania w ramach grantu MNiSW, w programie Iuventus Plus, „Modyfikacja zawartości cholesterolu w błonach komórkowych plemników kogutów w celu poprawy żywotności i ruchliwości gamet po kriokonserwacji nasienia” (nr 62 IP2011 040171), kierowanego przez panią dr inż. Agnieszkę Partykę z Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Istotą tego projektu było określenie optymalnego stężenia wybranych substancji cyklodekstryny lub kompleksu cyklodekstryna-cholesterol dodawanego do nasienia koguta przed zamrożeniem, które w znaczny sposób poprawiłoby żywotność i ruchliwość plemników po rozmrożeniu. Ponadto celem naukowym projektu było określenie wpływu zawartości cholesterolu w błonach komórkowych plemników kogutów na: żywotność, ruchliwość i stan akrosomów gamet przed i po kriokonserwacji; zawartość cholesterolu w błonach komórkowych plemników przed i po kriokonserwacji oraz zmiany płynności oraz stopnia uporządkowania lipidów w błonach komórkowych plemników poddanych tej procedurze. Mój wkład w te badania dotyczył określenia płynności i

uporządkowania błony plemników koguta przed i po kriokonserwacji także z dodatkiem cholesterolu i kompleksu cyklodekstryna-cholesterol. Badania te zostały zamieszczone w dwóch komunikatach i pracy wysłanej do czasopisma *Zygote*.

W 2014 roku podjęłam także współpracę naukową z Institute of Microbiology and Immunobiology, Uniwersytetu w Szeged na Węgrzech z zespołem prof. Josepha Molnara, gdzie została określona aktywność antyproliferacyjna i zdolność do odwrócenia oporności wielolekowej (Multi Drug Resistance) komórek nowotworowych chłoniaka myszy (L5178) przez ekstrakty z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny oraz z liści mini kiwi. Ekstrakty te wybrane zostały do badań ze względu na obecność w ich składzie polifenolowym antocyjanów i procyjanidyn, które wykazują również udokumentowane działanie antyproliferacyjne i antymutagenne [Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Faria i in., 2006]. Wybrane ekstrakty wykazały ponadto wysoką aktywność antyoksydacyjną i zdolność do modulacji płynności błon biologicznych i modelowych, przez co mogły być potencjalnie skuteczne w zwalczaniu komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki dla tych ekstraktów nie wykazały jednak ich właściwości antyproliferacyjnych i wpływu na odwrócenie oporności wielolekowej (MDR). Badania te zostały zaprezentowane w jednym komunikacie konferencyjnym.

Warto też zaznaczyć, że w 2009 roku w celu poszerzenia swojej wiedzy i umiejętności w zakresie technik fluorescencyjnych uczestniczyłam w szkoleniu w The Fluorescence Education Center, Instituto Italiano di Tecnologia w Genui we Włoszech. Po ukończeniu kursu pt.: "Principles of Fluorescence Techniques", otrzymałam certyfikat. Przez ostatnie lata pracy naukowej intensywnie starałam się rozszerzać swój warsztat naukowy o nowe techniki i metody badawcze, w szczególności metody spektroskopowe, a także o inne obiekty badawcze tj. komórki plemników czy chłoniaka myszy. Planuję, więc w najbliższym czasie dalsze poszerzanie swojego warsztatu badawczego oraz kontynuację i poszerzanie współpracy naukowej z innymi ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą. W najbliższym czasie, w celu pozyskania środków finansowych, planuję złożyć wniosek o grant do NCN w programie „Sonata Bis” na dalsze badania nad aktywnością i ochronnym działaniem związków polifenolowych w odniesieniu do błon komórkowych.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dotychczasowy dorobek obejmuje łącznie 45 opublikowanych prac doświadczalnych, w tym 8 prac zostało włączonych w osiągnięcie naukowe stanowiące rozprawę habilitacyjną. Wśród opublikowanych artykułów 25 znajduje się w czasopismach z bazy JCR, oraz 20 posiada punktację MNiSW, ponadto dwie nowe prace zostały wysłane do czasopisma, jedna z nich jest po pozytywnej recenzji. Opublikowałam także 62 komunikaty konferencyjne w tym 6 zamieszczonych jest w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Łączna ilość cytowań publikacji na dzień 25.09.2015 według bazy Web of Sciences to 143 (111 bez autocytowań).

Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora	
Artykuły w czasopismach z IF w języku angielskim	10
Artykuły w czasopismach bez IF w języku angielskim z punktacją MNiSW	7
Komunikaty konferencyjne	17 w tym 1 z IF
Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora	
Artykuły w czasopismach z IF w języku angielskim	15
Artykuły w czasopismach bez IF w języku angielskim z punktacją MNiSW	10
Artykuły w czasopismach w języku polskim z punktacją MNiSW	3
Komunikaty konferencyjne:	45 w tym 5 z IF

Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF podany wg. roku publikacji dla artykułów i komunikatów	47,224 artykuły 36,391 komunikaty 10,833
Sumaryczne punkty MNiSW podane wg roku publikacji dla artykułów i komunikatów	684 artykuły 550 komunikaty 134

Literatura

- Attar M., Kates M., Khalil M.B., Carrier D., Wong P.T.T. (2000): A Fourier-transform infrared study of the interaction between germ-cell specific sulfogalactosylglycerolipid and dimyristoylglycerophosphocholine. *Chem. Phys. Lipids* 106,101–114.
- Bender C.I., Tien H.T. (1987): Electrical properties of bilayer lipid membranes containing iodine and iodide, investigated by cyclic voltammetry. *Anal. Chim. Acta* 201,51–58.
- Benzie I. F. F. (2003): Evolution of dietary antioxidants. *Comp. Biochem. Physiol.* 136(1), 113–126.
- Bielecki K., Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H., Sarapuk J. (2005): Biological activity of some aminophosphonates and their binary mixtures with 2,4-D. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 389-392.
- Bielecki K., Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H. Sarapuk J. Łuczyński J., Piasecki A. (2007): Novel N-oxides – antioxidative activities. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 461-464.
- Blume A. (1991): Biological calorimetry: membranes. *Therm. Acta* 193, 299–347.
- Bonarska D., Kleszczyńska H., Sarapuk J. (2002): Antioxidative activity of some phenoxy and organophosphorous compounds. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7, 929-935.
- Bonarska D., Kleszczyńska H., Gancarz R., Sarapuk J. (2003 a): Interaction of some herbicide aminophosphonates with biological membrane. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 337-340.
- Bonarska D., Sarapuk J. and Kleszczyńska H. (2003 b): Biological Activity of new aminophosphonates. *Pol. J. Food Nutr. Sc.* 12/53, SI 2, 17-19.
- Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H., Pruchnik H., Łuczyński J., Sarapuk J. (2007 a): Influence of structural features of some novel N-oxides on their biological activities. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 407-410.
- Bonarska-Kujawa D., Włoch A., Tomicki B., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2007 b): Protection of biological membranes against oxidation by polyphenols. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 415-418.
- Bonarska-Kujawa D., Włoch A., Kleszczyńska H., Oszmiański J. (2008 a): Właściwości przeciwutleniające polifenolowych ekstraktów owocowych. *Błony Biologiczne Monografia pod redakcją J. Gabrielskiej i P. Misiaka. Oficyna wydawnicza PWR*, ISBN 978-83-926758-0-8, 137-142.
- Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Dudra A., Sarapuk S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2008 b): Oddziaływanie polifenolowych ekstraktów owocowych z błonami naturalnymi i lipidowymi. *Błony Biologiczne Monografia pod redakcją J. Gabrielskiej i P. Misiaka, Oficyna wydawnicza PWR*, ISBN 978-83-926758-0-8, 133-136.

- Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Oszmiański J., Sarapuk J., Kleszczyńska H. (2011 a): Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophys.* 6, 58-67.
- Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011 b): Extrats from apple leaves and fruits as effective antioxidants. *J. Med. Plants Res.* 5 (11), 2339-2347.
- Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Bielecki K., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2012 a): Antioxidant Activity of Extracts from Apple, Chokeberry and Strawberry. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 62 (4), 229-234.
- Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Kleszczyńska H. (2012 b): Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 17, 289-308.
- Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H., Przystalski S. (2012 c): The location of organotins within the erythrocyte membrane in relation to their toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 232–238.
- Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Oszmiański J., Bąkowska-Barczak A. (2013): The interaction effects of cherry extracts microencapsulated with maltodextrin or inulin with biological membrane. *Ziółolecznictwo, biokosmetyki i żywność funkcjonalna. Monografia pod redakcją I. Wawer, T. Trziszka, PWSZ im. Stanisława Pigonia w Krośnie, ISBN: 978-83-64457-00-5, 97-114.*
- Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014 a): Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum* L.) in Relation to Erythrocyte Membranes. *Biomed Res. Int.* Article ID 783059, doi:10.1155/2014/783059.
- Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014 b): Biophysical mechanism of the protective effect of the polyphenols extracts from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membranes. *J. Membrane Biol.* 247, 611–625.
- Bonarska-Kujawa D., Cyboran-Mikołajczyk S., Kleszczyńska H. (2015): Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* 32(2), 46-54.
- Bukowska B, Michałowicz J, Krokosz A, Sicińska P. (2007). Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (in vitro). *Blood Cells Mol. Dis.* 39,238–244.
- Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Kapusta I., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2011): Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes. *Curr. Top. Biophys.* 34, 15-21.
- Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014): Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Res. Int.* 65, 47-58
- Daayf F., Lattanzio V. (2008) *Recent Advances in Polyphenol Research, Vol. 1.* Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Everitt C.H., Haydon D.A. (1968): Electrical capacitance of a lipid membrane separating two aqueous phases. *J. Theor. Biol.* 18,371–379.
- Faria A., Calhau C., de Freitas V., Mateus N. (2006): Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2392-2397.

Gonzalez-Vallinas M., Gonzalez-Castejon M., Rodriguez-Casado A., Ramirez de Molina A. (2013): Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: A complementary approach with promising perspectives. *Nutr. Rev.* 71(9), 585–599.

Halliwell B. (2007): Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* 73, 341-347.

Hendrich, A. (2006): Flavonoid–membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol. Sinica* 27, 27–40.

Kleszczyńska H., Sarapuk J., Bonarska D. (2001 a): The hemolytic toxicity of some new aminophosphonates. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6, 271-275.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Sarapuk J., Bielecki K. (2001 b): Physiological Activity of Some Organophosphorus Compounds and Their Influence on Mechanical Properties of erythrocytes. *Z. Naturforsch.* 53c, 999-1002.

Kleszczyńska H., Oświęcimska M., Bonarska D., Sarapuk J. (2002): Antioxidative Properties of Pyrrolidinium and Piperidinium Salts. *Z. Naturforsch.* 53c, 344-347.

Kleszczyńska H., Łuczyński J., Bonarska D., Witek S. (2003 a): Hemolytic activity of quaternary ammonium salts derivatives of N,N-dimethyl tertiary amines. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 367-371.

Kleszczyńska H., Sarapuk J., Bonarska D., Oświęcimska M. (2003 b): Quaternary ammonium salts protect biological membranes against oxidation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12/53, SI 2, 48-50.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Oświęcimska M., Sarapuk J. (2003 c): Hemolysis and Antioxidative Protection of Erythrocytes by Functionalized Quaternary Ammonium Salts. *Pol. J. Environ. Stud.* 12 (1), 63-66.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Bielecki K. and Sarapuk J. (2003 d): The hemolytic and physiological activities of mixtures of some phenoxy and organophosphorous herbicides. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8 (1), 55-61.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Sarapuk J., Przystalski S. (2004): Protection of erythrocyte against organometals-induced hemolysis. *J. Fluorescence* 14 (1), 5-10.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Łuczyński J., Witek S., Sarapuk S. (2005 a): Hemolysis of erythrocytes and erythrocytes membrane fluidity changes by new lysosomotropic compounds. *J. Fluorescence* 15 (2), 137-141.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Pruchnik H., Bielecki K., Łuczyński J., Piasecki A., Sarapuk J. (2005 b): Antioxidative activity of new N-oxides of tertiary amines: membrane model and chromogen studies. *Z. Naturforsch.* 60c, 567-571.

Kleszczyńska H., Bonarska D., Łuczyński J., Witek S., Sarapuk J. (2005 c): Assessment of biological activity of new compounds designated to act as lysosomotropes. *Pol. J. Environ. Stud.* 14 (6), 767-770.

Kleszczyńska H., Bielecki K., Sarapuk J., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Trela Z., Łuczyński J. (2006): Biological activity of new N-oxides of tertiary amines. *Z. Naturforsch.* 60c, 715-720.

Kleszczyńska H., Sarapuk J., Bielecki K., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H. (2008 a): Biological and antioxidative efficiency of some pyrrolidinium salts. *Pol. J. Environ. Stud.* 17 (4), 509-513.

Kleszczyńska H., Bonarska-Kujawa D., Przystalski S. (2008 b): Zmiana kształtu erytrocytów i płynności ich błony indukowane związkami organicznymi cyny. *Błony Biologiczne.*

Monografia pod redakcją J. Gabrielskiej i P. Misiaka. Oficyna wydawnicza PWr, ISBN 978-83-926758-0-8, 75-80.

Kolber M., Bonarska-Kujawa D., Pawlaczyk I. (2007): Oddziaływanie roślinnych polifenoli o właściwościach przeciwutleniających z błonami biologicznymi. *Prace Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Prace badawcze studentów, Zeszyt 5*, 59-62.

Kong J. M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.* 64(5), 923–933.

Lakowicz J.R. (2006): Fluorescence anisotropy. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edn. Springer, New York, 353–382.

Lauger P., Lesslauer W., Marti E., Richter J. (1967): Electrical properties of bimolecular phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 20–32.

Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N., Pohle W., Mantsch H.H. (1994): Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* 67, 2367–2375.

McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (1995): New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 90-98.

McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R. N. (1993): Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behaviour a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochem.* 32, 516-522.

Movileanu L., Neagoe I., Flonta M.L. (2000): Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *Int. J. Pharm.* 205, 135–146.

Myburgh K. (2014): Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sports Med.* 44, S57-S70.

Olchowik-Grabarek E., Święcicka I., Andreeva-Kovaleskaya Z., Solonin A., Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H., Mavlyanov S., Zamaraeva M. (2014): Role of Structural Changes Induced in Biological Membranes by Hydrolysable Tannins from Sumac Leaves (*Rhus typhina* L.) in their Antihemolytic and Antibacterial Effects. *J. Membrane Biol.* 247, 533–540.

Parasassi T., Krasnowska E.K., Bagatolli L., Gratton E. (1998): Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *J. Fluorescence* 8, 365–73.

Patel S.S., Beer S., Kearney D. L., Philips G., Carter B.A. (2013): Green tea extract: a potential cause of acute liver failure. *World J. Gastroenterol.* 19, 5174-5177.

Pawlaczyk I., Kleszczyńska H., Bonarska D., Czerchawski L., Gancarz R. (2003): Natural oligosaccharides with anticoagulant activity and their interactions with model biological membranes. *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Wrocław, 333-336.

Pawlaczyk I., Tsigotis-Maniecka M., Czerchawski L., Pilecki W., Saluk J., Wachowicz B., Bonarska-Kujawa D., Pyrkosz-Biardzka K., Kleszczyńska H., Kuliczkowski W., Witkiewicz W., Gancarz R. (2013): Antykoagulanty pochodzenia roślinnego z perspektywa wykorzystania w leczeniu zakrzepic. *Przegląd lekarski* 70 (3), 157-161.

Pawlikowska-Pawłęga B., Misiak L.E., Zarzycka B., Paduch R., Gawron A., Gruszecki W.I. (2013): FTIR, ¹HNMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 518–527.

- Pruchnik H., Bonarska-Kujawa D., Kleszczyńska H. (2014): Effect of chlorogenic acid on the phase transition in phospholipid and phospholipid/cholesterol membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* 118, 943-950.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4), 152–159.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80 (7),1094–1117.
- Santos-Buelga C., Escribano-Bailon M.T., Lattanzio V. (2010): *Recent Advances in Polyphenol Research*, Vol. 2. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Sarapuk J., Bonarska D., Kleszczyńska H. (2003): Biological activity of binary mixtures of 2,4-D with some aminophosphonates. *J. Appl. Biomed.* 1, 169-173.
- Sarapuk J., Bonarska-Kujawa D., Bielecki K., Dudra A., Grzyś E., Trela Z., Kleszczyńska H., (2009): New aminophosphonates – assessment of biological activity, *Electron. J. Pol. Agricul. Univers. (EJPAU)* 12(4), #30.
- Sarapuk J., Kleszczyńska H., Bonarska D., Bielecki K., Trela Z., Kordas L. (2005): Assessment of potential application of binary mixtures of 2,4-D with novel aminophosphonates. *Z. Naturforsch.* 60c, 421-426.
- Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. (2007): Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 45,130–135.
- Suwalsky M, Vargas P, Avello M, Villena F, Sotomayor C. P. (2008): Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. *Int. J. Pharm.* 363, 85–90.
- Taylor K.M.G., Morris R.M. (1995): Thermal analysis of phase transition behavior in liposomes. *Therm. Acta.* 248, 289–301.
- Włoch A., Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2008): Aktywność przeciwutleniająca polifenoli oraz ich wpływ na właściwości błony erytrocytów. *Błony Biologiczne. Monografia pod redakcją J. Gabrielskiej i P. Misiaka*, Oficyna wydawnicza PWR, ISBN 978-83-926758-0-8, 331-336.
- 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 Biologia i Hodowla Zwierząt LVIII NR 572*, 171-178.
- Żyłka R., Kleszczyńska H., Kupiec J., Bonarska-Kujawa D., Hładyszowski J., Przystalski S. (2009): Modification of erythrocyte membrane hydration induced by organic tin compounds. *Cell Biol. Internat.* 33, 801-806.

Dorota Bonarska-Kujawa

Wrocław 29.09.2015