

27 stycznia 2019

dr hab. Jolanta Sroka
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 27 stycznia 2019 r



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI W
KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michaliny Grzesik

ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI POLIFENOLI I ZWIĄZKÓW SYNTETYCZNYCH

wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego
pod kierunkiem dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz, prof. UR

Rozprawa doktorska mgr Michaliny Grzesik dotyczy porównania właściwości antyoksydacyjnych flawanoli oraz innych antyoksydantów naturalnych i syntetycznych, określeniu wpływu wiązania jonów Fe^{2+} na właściwości antyoksydacyjne polifenoli oraz porównania wytwarzania nadtlenu wodoru przez antyoksydanty.

Polifenole to występujące naturalnie związki chemiczne, zdolne do neutralizowania wolnych rodników. Są one wtórnymi metabolitami roślinnymi, chroniącymi rośliny między innymi przed grzybami i bakteriami chorobotwórczymi. Związki te stanowią przedmiot licznych badań biologicznych, biochemicznych i klinicznych w wielu pracowniach na świecie, albowiem wykazano, że dieta bogata w polifenole jest bardzo ważnym elementem zarówno w profilaktyce jak i leczeniu już zaistniałych wielu poważnych chorób cywilizacyjnych takich jak zawał serca, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, miażdżyca, zaćma, cukrzyca, osteoporoza, udar mózgu oraz choroby nowotworowej. W tym aspekcie uważam, że recenzowana przeze mnie praca jest niesłychanie ważna.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa opiera się na 3 pracach doświadczalnych:

1. **Grzesik M.**, Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. 2018. Antioxidant properties of catechins: comparison with other antioxidants. *Food Chemistry* 241: 480-492
2. **Grzesik M.**, Bartosz G., Dziedzic A., Naróg D., Namieśnik J., Sadowska-Bartosz I. 2018. Antioxidant properties of ferrous flavanol mixtures. *Food Chemistry* 268: 567-576
3. **Grzesik M.**, Bartosz G., Stefaniuk I., Pichla M., Namieśnik J., Sadowska-Bartosz I. 2019. Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food Chemistry* 278: 692-699

Prace te stanowią spójną całość, co jest zgodne z art. 13 pkt 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami, to jest z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w*

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i

Biotechnologii

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 60 02

fax +48(12) 664 69 02

email:

sekretariat.wbbib@uj.edu.pl

czasopismach naukowych (...)”. Wszystkie prace zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie Food Chemistry (IF = 4,946, co daje sumaryczny IF = 14,838).

Ponieważ wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie na końcu rozprawy zamieszczono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac. Według oświadczeń współautorów Michalina Grzesik jest głównym autorem, wykonała większą część doświadczeń bbbbbw prezentowanych artykułach, brała czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowywania wyników oraz pisania manuskryptów.

W tym miejscu należy również podkreślić, że całkowity dorobek Doktorantki to 7 prac doświadczalnych opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach, o łącznej wartości IF 31,11 (250 punktów MNiSW).

Ocena merytoryczna

Gdy rozprawę doktorską stanowią opublikowane prace recenzent ma znacznie ułatwione zadanie, albowiem publikacje już zostały poddane wnikliwej ocenie przez wskazanych przez redakcję, w której interesie jest utrzymanie wysokiego rankingu czasopisma niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Przypomnę, że mowa tutaj o czasopiśmie *Food Chemistry* z wynoszącym 4,946 współczynnikiem oddziaływania. Biorąc pod uwagę ocenę publikacji przez niezależnych redaktorów, recenzentów i dołączając do tego własną ocenę nie mam merytorycznych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

Muszę przyznać, że te 3 publikacje zrobiły na mnie duże wrażenie. Doktorantka włożyła ogrom pracy w wykonanie badań posługując się przy tym szeregiem technik poczynając od hodowli komórkowych, testów żywotności komórek, technik mikroskopowych po metody, które wykorzystywała w dominującej części swoich doświadczeń, takich jak szereg testów spektrofotometrycznych, wykorzystywanych do badań kinetyki stechiometrii redukcji rodników ABTS⁺ oraz zdolności redukcji jonów Fe³⁺ przy użyciu metody FRAP, techniki spektroskopii w podczerwieni i transformacją Fouriera do oceny wiązań pomiędzy flawanolami, test ochrony fluorescencji przed utratą fluorescencji i inne.

W tym miejscu chciałabym jedynie zapytać Doktorantkę dlaczego do badań żywotności komórek zastosowano akurat test z wykorzystaniem czerwieni obojętnej mimo istnienia wielu innych równie powszechnych testów do oznaczania przeżywalności komórek. Czerwień obojętna jest barwnikiem rozpuszczalnym w wodzie, który wnika do komórek żywych i akumuluje się we wnętrzu organelli o kwaśnym pH (endosomy, lizosomy), a po śmierci komórki dyfunduje do cytoplazmy. Jednak ten test należy stosować z dużą ostrożnością, gdyż wiele związków może odwracalnie zmieniać aktywność endocytozy fazy płynnej w żywych komórkach, zmieniać pH cytoplazmy, co może fałszować wyniki i mieć wpływ na ich właściwą interpretację.

Oprócz wspomnianych publikacji rozprawa zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wstęp wprowadzający w tematykę stresu oksydacyjnego i antyoksydacyjnych właściwości polifenoli. Doktorantka zdecydowaną większość badań prowadziła w układach pozakomórkowych, jednak zbadała również wpływ

wybranych związków na hemolizę erytrocytów izolowanych z ludzkiej krwi oraz na przeżywalność komórek ludzkiego gruczołakoraka prostaty DU-145.

Z racji tej, że jestem biologiem komórki odczuwam pewien niedosyt z powodu braku we wprowadzeniu informacji na temat udziału polifenoli w chemoprewencji nowotworów, a w szczególności właśnie raka gruczołu krokowego. Zatem proszę o krótkie rozwinięcie tego tematu.

Mam jeszcze jedną uwagę odnośnie wstępu. Na stronie 12 umieszczona została rycina (Ryc. 1) opublikowana w pracy Zhanga i wsp. (Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidants and inflammatory effects. Current Opinion in Food Science 8: 33-42; 2016) pokazująca klasyfikację polifenoli. Oczywiście Doktorantka cytuje wyżej wspomnianą pracę, jednak razi mnie, że w rozprawie pisanej w języku polskim pojawia się rycina z opisami w języku angielskim, dlatego wskazane byłoby ją zmodyfikować i opisy przetłumaczyć na nasz język ojczysty.

Dodatkowo, rozprawa zawiera sprecyzowane cele, szczegółową metodykę badań, najważniejsze wyniki doświadczeń, dyskusję oraz listę publikacji liczącą 33 pozycje literaturowe.

Najważniejsze wyniki badań:

1. Flawanole są świetnymi antyoksydantami, wykazującymi w wielu reakcjach aktywność antyoksydacyjną znacznie wyższą niż standardowe antyoksydanty (glutation i askorbinian).
2. Wiązanie substechiometrycznych ilości Fe^{2+} przez flawanole nie obniża w istotnym stopniu ich właściwości antyoksydacyjnych.
3. Kompleksy flawanoli z jonami Fe^{2+} nie wykazują pseudoenzymatycznych aktywności dysmutazy ponadtlenukowej i katalazy.
4. Połowa spośród przebadanych 54 antyoksydantów wytwarza nadtlenek wodoru w pożywkach stosowanych do hodowli komórek i w zbuforowanym roztworze solifizjologicznej.
5. Ilość nadtlenu wodoru wytworzona przez antyoksydant w roztworze zależy od stężenia śladowych ilości jonów metali przejściowych i od pH roztworu.
6. Wytwarzanie nadtlenu wodoru ma wkład w cytotoksyczność galusanu propylo, galusanu epigallokatechiny i kwercetyny wobec komórek w hodowli *in vitro*.
6. Większość badanych antyoksydantów przejawia działanie ochronne wobec erytrocytów eksponowanych na działanie AAPH i podchlorynu sodu.
7. Nadtlenek wodoru wytwarzany w pożywce DMEM wpływał na cytotoksyczne działanie galusanu propylo, galusanu (-)-epigallokatechiny i kwercetyny, gdyż obecność katalazy w pożywce wzrastał procent przeżywalności komórek raka prostaty DU-145.

Na koniec mam jeszcze kilka uwag:

- 1) Jestem zwolenniczką używania wyrazów w języku polskim jeśli oczywiście da się przetłumaczyć wyrazy i zwroty obcojęzyczne. Czemu więc nie używać słowa zahamowanie zamiast inhibicja?
- 2) Transdukcja sygnału to zmiana lub przetwarzanie energii z jednej formy w drugą, a w terminologii biologicznej transdukcja to przeniesienie małych

- (do ok. 50 kb) segmentów DNA z dawcy do biorcy za pośrednictwem bakteriofaga. Właściwe jest użycie sformułowania przekazywanie sygnału.
- 3) Str. 17. Materiały i Metody. Pojawia się opis linii rak prostaty DU-145. Wynika z niego że to Doktorantka wyprowadziła linie tego nowotworu co nie jest prawdą, a ponadto charakterystyka tej linii jest absolutnie niepotrzebna w kontekście prowadzonych badań. Dodatkowo, nie wiem czy przez przeoczenie wyniki dotyczące cytotoksyczności badanych flawonoidów w stosunku do tych komórek zostały pominięte wynikach chociaż znalazły się w streszczeniu i opublikowanej pracy.
- 4) W dyskusji Doktorantka powołuje się na mało wiarygodne informacje pochodzące z Wikipedii. Na usprawiedliwienie przyjmuję fakt, że p. mgr Michalina Grzesik pisze, że są to stwierdzenia nieuprawnione, jeśli nie są odniesione do konkretnego parametru.

Podsumowanie

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Wyniki zaprezentowanych badań przyczyniły się do lepszego zrozumienia właściwości badanych antyoksydantów, ich zdolności do zmiatania wolnych rodników i ich wpływu na przeżywalność komórek. Mam nadzieję, że prace będą kontynuowane i przyczynią się do lepszego poznania ich wpływu na ścieżki przekazywania sygnału w komórkach i w konsekwencji przyczynią się do powstania środka zapobiegającego rozwojowi wielu chorób, szczególnie chorób nowotworowych.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pracy Pani mgr Michaliny Grzesik w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 9o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz o tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr65, poz595, wraz z późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zawarte w recenzji uwagi w niczym nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Zwracam się więc do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego z prośbą o dopuszczenie mgr Michaliny Grzesik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.


Jolanta Sroka