



Łódź 19.01.2020 r.

**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Maksim Ionov, Prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Napařo
pt. „Ochrona modelowych komórek przed stresem oksydacyjnym przez
polifenole oraz związki syntetyczne”**

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Napařo została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego pod promotorską opieką Prof. dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz. Badania były finansowane z dwóch źródeł, tj. 1) dotacji celowej dla młodych naukowców i uczestników studiów doktorskich przyznanej przez Wydział Biologiczno-Rolniczy UR, 2017-2018 oraz środków Zakładu Biochemii Analitycznej UR; 2) grantu przyznanego przez NCN, nr. UMO-2014/14/A/ST4/00640, kierowanego przez pana prof. dr hab. Inż. Jacka Namieřnika.

Według powszechnie dostępnej wiedzy polifenole i ich pochodne są szczególnie interesującymi związkami uznawanymi za uniwersalne przeciwutleniacze, które mogą być skutecznie wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu wielu chorób związanych ze stresem oksydacyjnym.

W związku z tym badania właściwości przeciwutleniających polifenoli wciąż wnoszą waźny wkład w rozszerzenie ich zastosowań, jako naturalnych związków chroniących komórki przed niepořadnym stresem oksydacyjnym.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej, mgr Katarzyna Napařo scharakteryzowała szereg związków polifenolowych analizując ich potencjał przeciwutleniający. Celem badań była ocena skuteczności katechin w hamowaniu procesów peroksydacji lipidów i utleniania białek oraz ocena właściwości ochronnych tych związków przed stresem oksydacyjnym względem żywych komórek. Z uwagi na możliwość potencjalnych zastosowań medycznych analizowanych związków, przeprowadzone zostały również badania ich cytotoksyczności i hemotoksyczności.

Założenia i cele pracy zostały precyzyjnie sformułowane, i uzasadnione w oparciu o ogólnie-dostępną wiedzę w tym temacie, jak również o wcześniejsze osiągnięcia zespołu oraz

wyniki badań innych ośrodków naukowych. Tematyka opracowania naukowego jest, moim zdaniem interesująca i ważna, z uwagi na fakt, że jest bezpośrednio związana z poszukiwaniem czynników chroniących komórki przed utlenieniem.

W swoich badaniach mgr K. Napařo skupiła się na przedstawieniu szeroko pojętej charakterystyki biofizycznej określającej profil antyoksydacyjny wybranych katechin, występujących m.in. w warzywach, owocach i herbacie. W szeregu badanych związków znalazły się: katehina (C), epikatehina (EC), epigallokatehina (EGC), galusan epikatechiny (ECG) oraz galusan epigallokatechiny (EGCG). W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano szereg nowoczesnych metod badawczych do analizy układów biologicznych na poziomie molekularnym i komórkowym. W szczególności zostały wykorzystane techniki spektroskopowe, w tym spektrofotometria, fluorescencja, elektronowy rezonans paramagnetyczny, zastosowano również technikę mikroskopową.

Praktyczna wartość pracy polega na tym, że przedstawione wyniki poszerzają wiedzę o mechanizmie działania katechin i mogą być wykorzystywane do oceny przydatności tych związków w budowaniu systemów przeciwutleniających, jak również do tworzenia skutecznych i niskotoksycznych leków na bazie polifenoli.

Rozprawę doktorską stanowi zestawienie 3 oryginalnych prac badawczych z całkowitym współczynnikiem IF-9,217 i liczbą punktów MNiSW wynoszącą 270. We wszystkich wieloautorskich publikacjach pierwszym autorem jest mgr Katarzyna Napařo, co świadczy o jej znacznym wkładzie w powstanie tych prac, co zostało dodatkowo potwierdzone w oświadczeniach współautorów. W skład materiałów rozprawy wchodzi także 3 prace niestanowiące jej podstawy, oraz 5 komunikatów zjazdowych, w tym jedna prezentacja ustna. Sumaryczna wartość współczynnika IF dorobku publikacyjnego doktorantki wynosi 24,278 i 370 punktów MNiSW. Prace te były cytowane według bazy Web of Knowledge 137 razy. Należy podkreślić, że niektóre z nich w momencie pisania obecnej recenzji uzyskały dodatkowe, dalsze cytowania. Wydaje się, że jedna z prac ze spisu nieobjętego doktoratem, ale zgodna tematycznie i ze znaczącym wkładem doktorantki (jest drugim autorem) mogłaby z powodzeniem uzupełnić zaproponowany przez nią zestaw publikacji. Liczba cytowań tej pracy na moment przygotowania recenzji wynosi 110 i stale rośnie. Indeks Hirsha mgr Napařo według bazy Web of Science wynosi 3. Jak wynika z powyższego zestawienia wskaźniki naukometryczne dorobku publikacyjnego doktorantki można ocenić, jako dobre.

Do cyklu wymienionych publikacji dołączono 27 stron opracowania autorskiego w języku polskim. Opracowanie obejmuje następujące rozdziały: wstęp, cele pracy, zastosowane metody, omówienie otrzymanych wyników i dyskusja z podsumowaniem. W opracowaniu zamieszczone jest również starannie napisane streszczenie w języku polskim i angielskim.

Oceniając wartość naukową rozprawy należy podkreślić imponującą ilość zawartych w publikacjach różnorodnych badań, a także aktywność naukową doktorantki. Analiza

oryginalnych wyników, prezentowanych w załączonych pracach, wskazuje na istotną korelację wynikającą z właściwego dobrania technik badawczych.

Uważam za godne podkreślenia kilka aspektów prowadzonych badań takich, jak ich przejrzystość, jasność, jakość wykonania i szeroka wiedza metodologiczna. Wyniki przeprowadzonych badań wnoszą nowe informacje na temat działania flawonoidów, jako przeciwutleniaczy. Na podstawie badań udało się odpowiedzieć na pytania postawione w pracy i potwierdzić, że katechiny mogą być uznane za przeciwutleniacze chroniące komórki w warunkach stresu oksydacyjnego. Uzyskane dane są wartościowe ze względu na ich aspekt poznawczy, ponadto mogą mieć znaczenie aplikacyjne.

Rozprawę doktorską stanowią doświadczalne prace twórcze zawierające następujące etapy zrealizowanych badań:

1. Naparło K., Zyracka E., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. Flavanols protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against heating and freezing/thawing injury. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*. 126/3 (2018) 872-880. DOI: 10.1111/jam.14170.

Badania zamieszczone w tej pracy dotyczą analizy właściwości ochronnych wybranych katechin względem dwóch szczepów drożdży (BY4741 i BY4741 $\Delta sod1$) w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego wpływem wysokiej lub niskiej temperatury. Uzyskane wyniki wskazują, iż flawonoidy użyte w stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$ chronią komórki obu szczepów drożdży przed utratą żywotności w warunkach stresu oksydacyjnego będącego następstwem stresu termicznego.

2. Naparło K., Bartosz G., Stefaniuk I., Cieniek B., Soszynski M., Sadowska-Bartosz I. Interaction of Catechins with Human Erythrocytes. *MOLECULES*. 25/6 (2020) 1456. DOI: 10.3390/molecules25061456.

W pracy przeanalizowano działanie ochronne katechin na ludzkie erytrocyty. Zbadano ich wpływ na proces hemolizy będącej skutkiem zmieniającego się stężenia NaCl w zawieszynie komórek. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że katechiny, chronią erytrocyty przed hemolizą wywołaną stresem osmotycznym. Analiza interakcji katechin z błonami lipidowymi za pomocą techniki EPR umożliwiła zbadanie ich wpływu na płynność błon erytrocytów. Wykazano ponadto, że zależnie od zastosowanego stężenia katechiny chronią przed utlenieniem białka i lipidy błonowe. Obserwowane procesy miały miejsce przy zastosowaniu katechin w stężeniach wyższych niż fizjologiczne.

3. Naparło K., Soszynski M., Sadowska-Bartosz I. Comparison of Antioxidants: The Limited Correlation between Various Assays of Antioxidant Activity. *MOLECULES*. 25/14 (2020) 3244. DOI: 10.3390/molecules25143244

W trzeciej pracy kontynuowano i poszerzono badania dotyczące aktywności antyoksydacyjnej badanych katechin, a dodatkowo porównano ją z aktywnością innych naturalnych i syntetycznych antyoksydantów. Stwierdzono, że katechina i galusan epigallokatechiny wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą. Na podstawie otrzymanych wyników wyciągnięto wniosek, że badane związki mają zróżnicowaną aktywność. Dane wskazują na ograniczoną korelację między zastosowanymi technikami badawczymi. Niektóre z użytych metod wykazały prooksydacyjny efekt wybranych związków, co nie było potwierdzone przy zastosowaniu innych technik. W związku z powyższym przy analizie nowych systemów antyoksydacyjnych sugeruje się wykorzystanie szerokiego spektrum metod badawczych pozwalających na obiektywną i wszechstronną ocenę badanych substancji.

Po przeanalizowaniu publikacji stanowiących rozprawę doktorską pojawiło się jednak kilka wątpliwości i pytań.

- Chciałbym w ramach dyskusji uzyskanych wyników zadać pytanie dotyczące stężeń katechin wywołujących efekty opisane w pracy. Skoro po spożyciu 8 filiżanek czarnej herbaty (Publikacja 2, Str. 2) stężenie katechin we krwi wolontariuszy wzrastało jedynie do 1 $\mu\text{mol/L}$, a uzyskane *in vitro* efekty katechin były najbardziej widoczne przy stężeniu 50 $\mu\text{mol/L}$, czy należy rekomendować badane związki do ich wykorzystywania farmakologicznego, jako antyoksydantów? Czy istnieją dane literaturowe dotyczące zastosowania katechin w produkcji żywności lub medycynie?
- Bardzo interesujące wydają mi się efekty oddziaływania katechin z błonami biologicznymi. Czy w oparciu o otrzymane wyniki można wnioskować, w jakim miejscu w błonie lipidowej lokalizują się badane związki? Ciekaw jestem czy przy oddziaływaniu katechin z błonami biologicznymi związek w całości pozostaje w błonie, czy też częściowo przenika do wnętrza komórki?
- Czy zaobserwowano korelację pomiędzy cytotoksycznością katechin, a ich efektami przeciwutleniającymi? Czy planowane są dalsze badania względem innych komórek niż zastosowano w obecnej pracy?
- Chciałbym zadać pytanie dotyczące różnic biologicznej aktywności badanych związków np. względem ich właściwości przeciwutleniającej, lub różnicy w czasie działania. Czy sprawdzono eksperymentalnie ich zdolność do zmiatania wolnych rodników? Czy jakiś związek z badanej grupy katechin wyróżnia się w tym zakresie?
- W tabeli 7 (Praca 2, str. 7) brakuje jednostek przedstawionych wartości parametru utlenienia lipidów oraz grup tiolowych białek. Zgodnie z informacjami zawartymi w części „Materiały i metody” w tabeli podano wartości procentowe. Uważam jednak, że warto uzupełniać jednostki na każdym etapie opracowywania wyników. To ułatwia śledzenie zmian opisujących analizowane parametry.

- Pomimo, że autorka deklaruje, iż została sprawdzona wrażliwość drożdży na działanie oksydantów (str. 13): metadonu, chlorku sodu, podchlorynu sodu nadtlenku wodoru itp., jak również na wpływ nitroksydów, nigdzie nie znalazłem wyników badań dla takich układów.
- Na koniec chciałbym zapytać, czy planowane są badania *in vivo* analizowanych katechin, np. badania właściwości ochronnych (aktywności przeciwutleniającej), badania farmakokinetyczne itp.

Podsumowując, stwierdzam, że otrzymane przez doktorantkę dane mają wysoką wartość teoretyczną i praktyczną. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w wysoko cytowanych czasopismach naukowych i wnoszą nowe informacje w dziedzinie badań aktywności przeciwutleniającej związków polifenolowych. Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Ochrona modelowych komórek przed stresem oksydacyjnym przez polifenole oraz związki syntetyczne” jest wartościowym opracowaniem spełniającym wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk biologicznych i zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Katarzyny Naparło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

