

Prof. dr hab. Mirosław Soszyński
Katedra Biofizyki Molekularnej UŁ
Uniwersytet Łódźki
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 28 stycznia 2019 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Grzesik

pt.: „Antyoksydacyjne właściwości polifenoli i związków syntetycznych”

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

Antyoksydanty pochodzenia roślinnego zdominowały o ostatnich dwóch dekadach badania nad żywnością, problemem zdrowego żywienia i profilaktyką chorób cywilizacyjnych. Szczególnie często badanymi związkami są tu polifenole, których liczbę określa się obecnie na ok. 8 000. Prowadzone prace koncentrują się szczególnie na ich właściwościach przeciwutleniających, co doskonale wpasowuje się w tematykę badań nad udziałem stresu oksydacyjnego w powstawaniu wielu chorób. Wyniki licznych badań biochemicznych, klinicznych i epidemiologicznych dobrze dokumentują korzystny wpływ roślinnych polifenoli dietarnych na profilaktykę i przebieg takich chorób jak miażdżyca, choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne (Parkinson, Alzheimer, demencja starcza), cukrzyca, schorzenia układu krążenia, schorzenia narządu wzroku i wiele innych.

Większość prowadzonych badań jest wykonywana w warunkach *in vitro* na modelach komórkowych. Zjawiska i procesy biochemiczne zachodzące w trakcie prowadzenia hodowli komórkowej są powszechnie znane, choć nie zawsze uwzględniane i brane pod uwagę w opracowywaniu wyników i formułowaniu wniosków z doświadczeń.

Koncepcja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Grzesik jest godna uznania. Badania podjęte przez Doktorantkę i Panią Promotor doskonale wpisują się w tematykę badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Analitycznej pod kierunkiem Pani dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz, prof. nadzw. UR.

Praca Pani mgr inż. Michaliny Grzesik dotyczy oceny właściwości antyoksydacyjnych grupy wybranych polifenoli i związków syntetycznych. Wykonana została analiza procesu wiązania jonów żelazawych do badanych polifenoli oraz ocena wpływu tego zjawiska na właściwości antyoksydacyjne. Zaproponowano mechanizm procesu wytwarzania nadtlenku wodoru przez stosowane antyoksydanty.

Ocena strony formalnej i poprawności struktury pracy

Przedstawiona do oceny dokumentacja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Grzesik liczy 79 stron, na które składa się *Wykaz stosowanych skrótów, Informacje wprowadzające* zawierające wykaz

źródeł finansowania doktoratu, dorobek publikacyjny Autorki oraz Jej udział w projektach badawczych (3 strony), nienazwana część, którą można potraktować jako *Omówienie wyników* (21 stron), *Oświadczenia współautorów* (6 stron) oraz kopie trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (45 stron).

Z lektury o źródłach finansowania dowiadujemy się, że praca była finansowana z jednej celowej dotacji wydziałowej dla uczestników studiów doktoranckich oraz z jednego projektu Narodowego Centrum Nauki MAESTRO.

Na całkowity dorobek publikacyjny Doktorantki składa się siedem prac eksperymentalnych, wszystkie wieloautorskie, z których trzy stanowią podstawę rozprawy doktorskiej. Wszystkie publikacje są pracami z listy JCR i zostały opublikowane w okresie 3 lat (2017-2019), a ich łączny *Impact factor* wynosi 31,11; 250 punktów MNiSW. W trzech pracach stanowiących podstawę rozprawy pani mgr inż. M. Grzesik jest pierwszym autorem. Zostały one opublikowane w ciągu 2 lat (2018-2019) a ich łączny *Impact factor* ma wartość 14,838; 120 punktów MNiSW. Doktorantka jest ponadto współautorką 5 doniesień zjazdowych, we wszystkich jako pierwszy autor. Brała udział jako wykonawca/asystent naukowy w 4 projektach badawczych.

Z przedstawionych oświadczeń współautorów wynika, że wkład Doktorantki we wszystkich trzech pracach eksperymentalnych wyniósł 50%.

Omówienie wyników liczące 21 stron zawiera: *Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Metody, Wyniki, Dyskusję i Wnioski*. Napisane jest w oparciu o 33 odnośniki literaturowe, z których 16 pochodzi z ostatnich 10 lat.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Michaliny Grzesik obejmuje cykl 3 powiązanych tematycznie publikacji. Taka forma rozprawy doktorskiej jest zgodna z wymogami art. 13 p. 2 znowelizowanej *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*, który mówi, że „Rozprawa doktorska może mieć formę [...] spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki”. Są to następujące prace:

1. **Grzesik M.**, Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Copmarison with other antioxidants. *Food Chemistry* 241: 480-492 (**IF₂₀₁₈ = 4,946; Punkty MNiSW = 40**),
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 (**IF₂₀₁₈ = 4,946; Punkty MNiSW = 40**),
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 (**IF₂₀₁₈ = 4,946; Punkty MNiSW = 40**).

Wszystkie trzy prace zostały opublikowane w *Food Chemistry*, dobrze impaktowanym czasopiśmie z listy JCR w krótkim, dwuletnim okresie czasu i stanowią zwartą, konsekwentnie rozwijaną tematykę. Taka forma przedstawienia doktoratu znacznie ułatwia pracę recenzentowi i stawia go w dość komfortowej sytuacji, bowiem zbytnia polemika z przedstawianymi w pracy wynikami, ich formą prezentacji czy dyskusją mogłaby być poczytana w kategoriach pewnej nieskromności.

Główny cel rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. M. Grzesik, jakim była ocena antyoksydacyjnych właściwości wybranych polifenoli i związków syntetycznych został rozbity na 4 cele cząstkowe:

1. Porównanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych związków obecnych w żywności i antyoksydantów syntetycznych z wzorcowymi, endogennymi antyoksydantami,
2. Ustalenie, czy wyselekcjonowane związki o właściwościach antyoksydacyjnych wykazują działanie prooksydacyjne,
3. Ocena właściwości antyoksydacyjnych mieszanin flawanoli z żelazem,
4. Porównanie generacji nadtlenu wodoru przez ponad 50 naturalnych i syntetycznych antyoksydantów oraz dokonanie wglądu w mechanizm tego zjawiska.

Pierwszy cel badawczy został zrealizowany i przedstawiony w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy. Do badań Doktorantka użyła szerokiej gamy 30 związków; 10 flawonoidów oraz 20 innych powszechnie używanych do tego typu badań związków organicznych, w tym również endogennie występujący glutation, kwas askorbinowy i kwas moczowy. Większość badań została przeprowadzona w układzie bezkomórkowym, do badań w modelowym układzie komórkowym Doktorantka wybrała erytrocyt. Wybór erytrocytu do tych badań wydaje się słuszny, choć ostatnio coraz częściej badacze sięgają do odpowiedniej, dedykowanej dla określonych doświadczeń sprawdzonej linii komórkowej. Chciałbym poznać opinię Doktorantki w kwestii, co przemawiało za wyborem erytrocytu do układu komórkowego stosowanego w doświadczeniach opisanych w dwóch pierwszych publikacjach. Planowane badania nie wymagały stosowania zaawansowanych technik analizy fizykochemicznej. Doktorantka użyła dobrze dobranych, nieskomplikowanych testów spektrofotometrycznych mierząc proces redukcji rodników ABTS⁺, zdolność redukcji jonów żelazowych metodą FRAP, test hamowania utleniania dihydrorodaminy 123 oraz test ochrony fluoresceiny przed utratą fluorescencji. Jako bardzo trafny w opinii recenzenta jest wybór czynników utleniających stosowanych w tych badaniach. Autorzy wybrali SIN-1, który uwalnia nadtlenoazotyn oraz podchloryn sodu; obydwa te związki powstają w organizmie w warunkach fizjologicznych. Podchloryn posiada dobrze udokumentowane właściwości hemolityczne, nadtlenoazotyn z kolei jest uznanym silnym utleniaczem a jego udział w wielu procesach fizjologicznych oraz w patogenezie wielu schorzeń jest w dalszym ciągu nie do końca wyjaśniony.

Dwa kolejne cele badawcze jakie postawiła sobie Doktorantka były realizowane w trakcie wykonywania drugiej publikacji. Dotyczy ona wciąż bardzo aktualnego problemu, czy uznane, sprawdzone i często stosowane (np. jako suplementy diety, kosmetyki) przeciwutleniacze nie mogą w pewnych warunkach wykazywać właściwości prooksydacyjnych. Wydaje się również, że zdolność do wiązania i tworzenia kompleksów z jonami metali ziem przejściowych, głównie jonami żelaza, może mieć znaczący wpływ na właściwości przeciwutleniające flawanoli, może zmieniać ich strukturę, a co za tym idzie aktywność biologiczną tak powstałych kompleksów. Jako materiał do tych badań Doktorantka wybrała pięć flawanoli. Podobnie jak w pierwszej publikacji badania prowadzone były w układzie bezkomórkowym oraz w modelu komórkowym z użyciem erytrocytu. W pracy tej, obok powszechnie

stosowanych testów spektrofotometrycznych zostały zastosowane trzy, wysoce zaawansowane techniki analizy fizykochemicznej. Stechiometria tworzenia kompleksów flawanoli z jonami żelaza była badana przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR. Topografia badanego materiału była z kolei analizowana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego, a średnica hydrodynamiczna powstających cząsteczek polifenoli z przyłączonymi jonami żelaza była wyznaczana techniką spektroskopii korelacji fotonów. Użycie tych zaawansowanych technik, w opinii recenzenta, było wyjątkowo uzasadnione a pozyskane wyniki wydają się doskonale uzupełniać i nie budzą zastrzeżeń.

Autorzy w tej pracy zwrócili uwagę na często podnoszony problem nabywania przez kompleksy z jonami żelaza pseudoenzymatycznej aktywności dysmutazy nadtlenkowej i katalazowej, mogącej w znacznym stopniu wpływać na jakość wyników, które niedostatecznie interpretowane mogą prowadzić do mylnych wniosków.

Czwarty cel badawczy, jaki postawiła sobie Doktorantka był realizowany w trzeciej, zdaniem recenzenta najciekawszej publikacji. Praca dotyczyła procesu generacji nadtlenu wodoru w procesie samoutleniania flawonoidów i innych organicznych związków uznanych jako antyoksydanty. Zjawisko to, podobnie jak w przypadku nabywania pseudodysmutazowych i pseudokatalazowych właściwości jest dobrze udokumentowane, nie zawsze jednak poświęca mu się dostateczną uwagę planując badania. Do realizacji przedstawionego celu Doktorantka użyła 54 różnych, powszechnie stosowanych przeciwutleniaczy. Po przeprowadzeniu prostego testu z użyciem oranżu ksylenowego do dalszych badań wybranych zostało 27 spośród nich. Generowanie nadtlenu wodoru było określane w kilku, standardowych mediach hodowlanych używanych do hodowli komórek zwierzęcych oraz drożdży. Autorzy zaproponowali mechanizm wytwarzania nadtlenu wodoru jako dwuetapowy proces (i) reakcji jednoelektronowego utleniania polifenolu do rodnika semichinonowego a następnie (ii) reakcji jednoelektronowego utleniania tego rodnika. Zastosowanie w tym badaniu czulej i dającej jednoznaczne wyniki techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR budzi zaufanie i skłania do uznania tej tezy. Uzupełnieniem badań prowadzonych w tej pracy było zastosowanie modelu komórkowego, gdzie wybór padł na komórki linii raka prostaty DU-154. W tym miejscu proszę Doktorantkę o informacje, czy jakieś szczególne względy miały wpływ na wybór akurat tej linii komórkowej.

Dwukrotnie w omówieniu wyników i jeden raz w publikacji pojawia się stwierdzenie, że dodatek cytryny do herbaty jest wskazany zarówno jeśli chodzi o zminimalizowanie produkcji nadtlenu wodoru jak i dodatkowo dostarcza cennego askorbinianu. Nie zapominajmy jednak, co nie zostało moim zdaniem dostatecznie wyartykułowane, aby cytryna nie była obecna w trakcie naparzania herbaty, kiedy obecne są jeszcze liście, co może prowadzić do zwiększonej ekstrakcji związków glinu niekoniecznie wskazanych dla organizmu człowieka.

Na zakończenie Doktorantka formułuje 6 wniosków końcowych, których liczba, zgodnie z dobrą praktyką pisanie rozpraw doktorskich, w przybliżeniu odpowiada liczbie postawionych celów badawczych. Są one trafnym podsumowaniem uzyskanych wyników i trudno się z nimi nie zgodzić.

W opinii recenzenta najcenniejszymi wynikami prezentowanej pracy, oprócz dokonania rzetelnej analizy szerokiej gamy związków pod kątem ich właściwości antyoksydacyjnych jest wykazanie, że:

1. Wiązanie stechiometrycznych ilości Fe^{2+} przez flawanole nie obniża w istotnym stopniu ich właściwości antyoksydacyjnych,
2. Kompleksy flawanoli z jonami Fe^{2+} nie wykazują pseudoenzymatycznych aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy,
3. Wytwarzanie nadtlenu wodoru ma wkład w cytotoksyczność niektórych flawonoidów wobec komórek w hodowli *in vitro*.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

W opinii recenzenta strona edytorska rozprawy zasługuje na wyróżnienie. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wyjątkowej staranności językowej, jaką wykazała się Doktorantka podczas pisania pracy. Staranność ta dotyczy zarówno strony gramatycznej, składniowej i stylistycznej oraz formatowania tekstu, który jest konsystentny i cechuje się bardzo dobrą spójnością. Rozprawa została napisana bardzo dobrą polszczyzną, co daje duży komfort w trakcie czytania. Pomimo, że bardzo się starałem udało mi się wychwycić tylko 2 literówki oraz kilka nieścisłości i uchybień edytorskich. Uwagi te nie wpływają na ogólną ocenę pracy, a pełną ich listę przekazałem Doktorantce w oddzielnym zestawieniu.

Publiczna obrona rozprawy doktorskiej i przedstawienie niezależnych recenzji jest doskonałą okazją do oceny życiorysu naukowego Doktorantki oraz Jej dorobku naukowego i publikacyjnego. Pani mgr inż. Michalina Grzesik jest autorem 7 publikacji, wszystkie z listy JCR. W trzech jest pierwszym autorem a ich łączny współczynnik oddziaływania wynosi 31,11 (250 punktów MNiSW). Tak punktowany dorobek naukowy jest często wystarczający w osiągnięciach naukowych zgłaszanych na stopień doktora habilitowanego.

Z życiorysu naukowego, o który poprosiłem Doktorantkę wynika, że od października 2016 roku jest Ona uczestnikiem Stacjonarnych Studiów Doktoranckich. W myśl obowiązującego Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 2013 r., doktorant jest zobowiązany zamknąć przewód doktorski obroną w czasie nie krótszym niż 2 lata i nie dłuższym niż 4 lata. W tym kontekście wynik, jaki osiągnęła Pani mgr inż. Michalina Grzesik wydaje się być rekordowy. Z całą pewnością, jestem o tym przekonany, mogła Ona liczyć na dużą pomoc merytoryczną, organizacyjną i wsparcie ze strony Pani Promotor. Jednak bez ogromnego zaangażowania własnego, pracowitości, determinacji i sumienności, zrealizowanie całego programu studiów doktoranckich w tak krótkim czasie byłoby trudne do wykonania.

Podsumowanie recenzji i wnioski końcowe

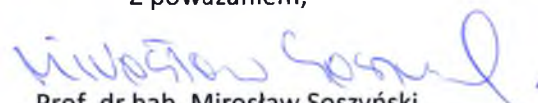
Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Michaliny Grzesik pt. „*Antyoksydacyjne właściwości polifenoli i związków syntetycznych*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych. Praca dotyczy ważnego tematu i może mieć implikacje zarówno w projektowaniu modelu zdrowego żywienia, zapobieganiu chorobom cywilizacyjnych jak również ma aspekt metodyczny mogący być pomocny w pracach laboratoryjnych. Jest poprawna metodologicznie, doświadczenia zostały prawidłowo zaprojektowane

i przeprowadzone zgodnie ze standardami rzemiosła naukowego. Analiza otrzymanych wyników jest przeprowadzona prawidłowo, a wnioski zostały właściwie sformułowane. Dyskusja wyników przeprowadzona przez Doktorantkę świadczy o dużym odczytaniu w aktualnej literaturze fachowej, jest przeprowadzona krytycznie i szczegółowo. Uzyskane wyniki mogą stanowić doskonałą inspirację do kontynuowania dalszych badań w tej tematyce.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Michaliny Grzesik spełnia wszystkie ustawowe wymagania do uzyskania stopnia doktora, zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego, Uniwersytetu Rzeszowskiego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Michaliny Grzesik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną ocenę pracy, znaczny dorobek publikacyjny i bogaty życiorys naukowy Doktorantki zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,



Prof. dr hab. Mirosław Soszyński