



dr hab. Agata Wawrzyniak prof. UR
Katedra Nauk Morfologicznych
Kolegium Nauk Medycznych UR

Rzeszów, 30.10.2020.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej pt.:
„Interakcje pochodnej kwercetyny – lenzozydu A β z błonami i ich korelacje z
biologicznymi efektami na komórki. (Interactions of quercetin derivative – lensoside A β
with membranes and their correlations with biological effects on the cells).

Pani mgr Justyna, Helena Kapral-Piotrowska wykonała pracę w Instytucie Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem Pani dr hab. Bożeny Pawlikowskiej-Pawłęgi, prof. UMCS.

Przedstawiona do recenzji praca ma na celu określenie interakcji pochodnej kwercetyny – lenzozydu A β należącej do flawonoidów, z błonami komórkowymi oraz ich korelacje z biologicznymi efektami na komórki. Tematyka pracy jest interesująca i ważna, ponieważ Doktorantka podjęła się badań, których celem było wyjaśnienie sposobu interakcji flawonoidu z błonami oraz potwierdzenie wpływu tych oddziaływań na zdrowe oraz zmienione nowotworowo komórki. W ostatnim czasie flawonoidy stały się przedmiotem licznych badań, ze względu na ich właściwości antyoksydacyjne, antyalergiczne oraz aktywność przeciwnowotworową, a jednym z miejsc ich oddziaływania są błony komórkowe. Wyjaśnienie interakcji pomiędzy flawonoidami, a błoną komórkową może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów ich oddziaływania na komórki na poziomie molekularnym, a w przyszłości może okazać się istotne dla terapii wielu chorób, w tym chorób nowotworowych.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję i wnioski. Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny, Heleny Kapral-Piotrowskiej liczy 219 stron, układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Rozpoczyna ją obszerny wstęp literaturowy, w którym Autorka przedstawiła

bardzo dokładną i czytelną charakterystykę flawonoidów z uwzględnieniem ich budowy, aktywności biologicznej, zastosowaniem w profilaktyce i terapii chorób oraz ich oddziaływanie na błony komórkowe. Następnie zaprezentowała dokładną charakterystykę błon biologicznych z uwzględnieniem różnic pomiędzy komórkami o prawidłowej budowie, a komórkami nowotworowymi. Rozdziały te stanowią idealne wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktorantki. W prezentowanym rozdziale Doktorantka ujawniła doskonałą znajomość aktualnej wiedzy dotyczącej tematu pracy, a analiza bieżącego piśmiennictwa stanowi solidne i przejrzyste przedstawienie zagadnień związanych z tematem rozprawy.

W kolejnym rozdziale Autorka wyjaśnia cel naukowy pracy i osiągnięte wyniki. Przedmiotem badań było określenie zdolności lenzozydu A β do wchodzenia w interakcje z błonami komórkowymi, określenie sposobu oddziaływania tego związku na membrany, poznanie lokalizacji i orientacji flawonoidu w błonach komórkowych oraz ocenę skutków jego działania na komórki. Należy podkreślić, że przedstawione wyniki badań wymagały bardzo dużego nakładu pracy. W kolejnym rozdziale rozprawy Doktorantka w sposób jasny, szczegółowy i nie budzący żadnych zastrzeżeń przedstawiła metodykę oraz materiał, który posłużył do badań. Aby wyjaśnić sposób interakcji flawonoidu z błonami komórkowymi oraz potwierdzić wpływ tych oddziaływań na zdrowe i nowotworowo zmienione komórki, Doktorantka posłużyła się różnorodnymi metodami badawczymi z których należy wymienić: absorpcyjną spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), za pomocą której badano w jaki sposób na poziomie molekularnym flawonoid oddziałuje z białkami oraz lipidami. Technika jądrowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR) oraz różnicową kalorymetrią skaningową (DSC), badano działanie flawonoidu na modelowe błony sporządzone z DPPC oraz jego wpływ na ich właściwości fizyczne. Zastosowana mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), pozwoliła określić planarną orientację lenzozydu A β w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy lipidowej. Dzięki technice patch-clamp udało się stwierdzić modulujące działanie flawonoidu w stosunku do białek transportowych. Analizy komórek z użyciem techniki mikroskopii elektronowej: transmisyjnej i skaningowej (TEM, SEM) oraz mikroskopii fluorescencyjnej ujawniły skutki działania lenzozydu A β na komórki nowotworowe. Ponadto w doświadczeniach zastosowane zostały różne modele badawcze takie jak liposomy wielowarstwowe (MLV), wielkie jednowarstwowe liposomy (GUV) oraz hodowle komórek *in vitro*: linie nowotworowe raka szyjki macicy (HeLa) i raka krtani (Hep-2) oraz linia prawidłowa fibroblastów skóry człowieka (HSF).

Zrealizowanie, a następnie opracowanie tak dużej ilości analiz należało do przedsięwzięć pracochłonnych, wymagających ogromniej cierpliwości, wytrwałości, a

przede wszystkim bardzo dobrego przygotowania i znajomości badanej problematyki.

Doktorantka niezwykle umiejętnie przeprowadziła dyskusję otrzymanych wyników z wynikami podobnych w założeniu doświadczeń, gdzie analizie poddano wybrane flawonoidy, analizowano zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne komórek, określano zmiany organizacji błon komórkowych oraz wpływu modyfikacji na parametry morfometryczne. Doktorantka potwierdza tym bardzo dobrą znajomość problematyki oraz wykazała się świetną orientacją w temacie.

Doktorantka w bardzo logiczny sposób dowodzi, a następnie tłumaczy badania interakcji lenzozydu A β z modelowymi błonami lipidowymi, podkreślając jego istotny wpływ na błony komórkowe. Dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych technik badawczych, Doktorantka wykazała, że lenzozyd A β wchodząc w interakcje z białkami i lipidami, zmienia ich dynamiczne i strukturalne właściwości, a skutkiem jego oddziaływania jest zmieniona morfologia oraz ultrastruktura w porównaniu do kontrolnych komórek nowotworowych, Badany flawonoid nie indukuje apoptozy w komórkach prawidłowych, nie wykazuje wobec nich działania cytotoksycznego, natomiast wzmaga w nich syntezę białek.

Dyskusja jest dobrze napisana, potwierdzając godną podziwu znajomość problematyki. Doktorantka przedstawia wnioski końcowe wynikające z pracy, a uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie 9 wniosków, które dają podstawę do stwierdzenia, że właściwości lenzozydu A β czynią go potencjalnym środkiem terapeutycznym, samodzielnym lub stosowanym w terapii skojarzonej.

Pragnę podkreślić świetną szatę graficzną wyników, które zostały opracowane z dużą starannością oraz dokładnością. Bardzo dobrej jakości fotografie (18), tabele (2), schematy (16) oraz wykresy (37) ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Wyniki są zaprezentowane w sposób przejrzysty, przez co bardzo usprawnia to ich analizę. Opisy wyników są jasne i przystępne, a całość napisana jest poprawnym językiem, bez nadużywania zwrotów anglojęzycznych..

Piśmiennictwo zawiera 330 pozycji literatury, w języku angielskim (274 artykuły) i polskim (56 pozycji), w tym co należy podkreślić 109 pozycji obejmuje okres ostatnich 10 lat. Bardzo obszerna literatura jest prawidłowo przypisana do cytowanych treści.

Doktorantka jednak nie ustrzegła się drobnych błędów głównie natury interpunkcyjnej oraz stylistycznej. Czasami w tekście pojawiają się powtórzenia, które można zastąpić w języku polskim innymi wyrazami np.

Na str. 21 wyraz **najczęściej** można zastąpić przez:.. zwłaszcza, z reguły, zazwyczaj lub przede wszystkim

Na str. 170 wyraz **obserwowano** można zastąpić przez analizowano,
Zgodnie z pisownią języka polskiego, zdania nie należałyby zaczynać od: I tak-(str 21, 28); A więc (Str 134); Tak więc (Str 166, 168, 171); Bowiem (Str 170, 171); Dlatego (Str 165, 172, 173,177)

Na str. 42 zamiast: wyłącznie po zewnątrzkomórkowej stronie błony komórkowej, lepiej brzmiałoby: wyłącznie po zewnętrznej stronie błony komórkowej

Drobne przejęzyczenie językowe wkradło się również:

str 42- transportować składniki odżywczych oraz produktów przemiany..(transportować składniki odżywcze oraz produkty przemiany)

str 52- charakteryzują się wyższą zawartość - charakteryzują się wyższą zawartością

str 57 - wysoko biokompatybilność- wysoka biokompatybilność

str. 58 – metoda zamrażania- metoda zamrażania

str. 75- każdą analiza – każda analiza

str. 75 - inkubowane z badany związkim- inkubowane z badanym związkiem

str. 77- były odwadniane w szeregu alkoholów i acetonów- były odwadniane w szeregu alkoholi i acetonu

str. 125- obserwowano niewielkim zmniejszenie- obserwowano niewielkie zmniejszenie

Jeżeli w tekście podajemy parametry morfometryczne jakie użyte były do obliczania komórek, w nawiasach należałoby podać symbol jednostki w jakiej były mierzone (str. 77, 122.)

W języku polskim używając rzeczowników policzalnych (komórki) piszemy liczba, a nie ilość (str 76, 109, 113, 117, 118, 122,160, 170, 174, 175)

W niektórych elektronogramch zamieszczono oznaczenia, natomiast w opisie ich brak (str 154: ryc 68 C- na zdjęciu zaznaczono **er**, ryc 68 D- na zdjęciu zaznaczono **m, v**,- ryc 68 E - na zdjęciu zaznaczono **al, au**; str 158 Ryc 70 –A,C, F na zdjęciach zaznaczono **N, m**)

Bibliografia

Cytując bibliografię należałoby ujednolicić i wszędzie pisać [autor i in], zamiast [autor i wsp].

-str 76 Autorka cytuje [Bartnik i in., **2016**]., natomiast w bibliografii jest, **2017**,

-str 27 Autorka cytuje [Beckman i in., 2000]., w bibliografii jest tylko Beckman,

-str 59 Autorka cytuje Cyboran i 2015 natomiast w bibliografii jest Cyboran i współautorzy

-str 172 jest [ElAttar i in., 1999], natomiast w bibliografii jest tylko 2 autorów

W pozycji 65 literatury Autorka podaje **Gasparri F.**, natomiast w cytowaniu na str. 171 jest **Gaspari F.**

-str 22 i 211 Autorka cytuje [Grotewold i in., 2006], natomiast w bibliografii jest tylko. Grotewold

- str 219 Autorka cytuje [Karak, 2009] w bibliografii jest [Karak, 2019]
- str 41, 42, 43, 44, 212 Autorka cytuje [Karp, 2019] natomiast w bibliografii jest Karp G i wsp.
- str 40 Autorka cytuje [Kawiak, 1995]. natomiast w bibliografii jest Kawiak i wsp.
- Na str 24 Autorka cytuje [Kokhar] natomiast w bibliografii jest **Khokhar**
- str 47 Autorka cytuje [Koynova, 1998]. natomiast w bibliografii jest Koynova i współ.
- str 40,42,49,212, Autorka cytuje Monteiro, 2014]. natomiast w bibliografii jest Monteiro i współ.
- str 51 Autorka cytuje Nakazawa i wsp., 1989; natomiast w bibliografii jest Nakazawa i, Iwaizumi
- str 45 Autorka cytuje [Solomon i in., 2008; natomiast w bibliografii jest tylko Solomon
- str 60 Autorka cytuje Tsuchiya i in., 2008, natomiast w bibliografii jest Tsuchiya i Nagayama

Za wyjątkiem nielicznych błędów interpunkcyjnych oraz edytorskich niniejsza dysertacja napisana jest poprawną polszczyzną, a przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości rozprawy.

Reasumując, przedstawiona do oceny dysertacja jest pracą wartościową. Należy podkreślić, że Doktorantka włożyła bardzo wiele wysiłku w jej wykonanie. Opisane w przedstawionej recenzji nieścisłości, czasami uchybienia w niczym nie umniejszają wartości prezentowanej pracy. Staranne omówienie przedstawionych wyników poparte bardzo szeroką bazą piśmiennictwa badań innych autorów, wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki.

Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnej pracy naukowej, przedstawiła w zwięzły sposób wyniki swoich bardzo szeroko zakrojonych badań i wysnuła logiczne wnioski. Pracę oceniam wysoko i **składam wniosek o jej wyróżnienie.**

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Heleny Kapral-Piotrowskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r poz. 1789 oraz z 2016r poz. 1586 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agata Wawrzyniak