

Wrocław, 15 grudnia 2017 r.

Prof. zw. dr hab. inż. Stanisław J. Pietr
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny
Katedra Ochrony Roślin
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
ul. Grunwaldzka 53, 50-375 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej
przedstawionej przez Panią mgr Adriannę Piwoni
„Wpływ lipidów rezorcynolowych na stan fizjologiczny i morfologiczny komórek linii
HepG2 traktowanych alkoholem etylowym”

Przesłana do recenzji przez Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego rozprawa doktorska pt „Wpływ lipidów rezorcynolowych na stan fizjologiczny i morfologiczny komórek linii HepG2 traktowanych alkoholem etylowym” napisana przez Panią mgr Adranę Piwoni pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Jerzego Gubernatora oraz promotora pomocniczego Pani dr Marii Stasiuk jest próbą odpowiedzi na jedno z często zadawanych pytań dotyczących prozdrowotnego oddziaływania naturalnych składników biologicznie czynnych jakimi są lipidy rezorcynolowe szczególnie w przypadku jednoczesnego działania alkoholu etylowego. Badania nad prozdrowotnym oddziaływaniem lipidów rezorcynolowymi doczekały się wprawdzie wielu opracowania jednakże nadal nie mamy pełnej jasności, co do ich interakcji z procesami metabolicznymi etanolu zachodzącymi w komórkach wątroby. Problematyka podjęta w przedłożonej pracy doktorskiej ma istotne znaczenie z poznawczego jak również z medycznego punktu widzenia. Dlatego też warto było podjąć trud przeprowadzenia takich badań, aby uzyskać odpowiedzi na postawione w celu badań pytania o ochronnej roli lipidów rezorcynolowych przed hepatoksycznym działaniem etanolu. Doktoranta podjęła próby określenia stanu fizjologicznego oraz zmian morfologicznych komórek linii HepG2 wątroby poddanych działaniu etanolu oraz lipidów rezorcynolowych.

Przedstawiona do recenzji praca pod względem formalnym jest opracowana bez zarzutów Jest napisana dobrym językiem polskimi zawiera wszystkie elementy rozprawy doktorskiej. Praca obejmuje 173 numerowanych stron. W pracy znajdujemy wykaz stosowanych skrótów wraz z ich angielskojęzycznymi tłumaczeniami. Bardzo czytelne i w pełni odzwierciedlające istotę przeprowadzonych badań streszczenie w języku polskim oraz

angielskim. Wstęp do prac zawarty na stronach od 10 do 56 jest bardzo obszerny i merytorycznie adekwatny do problematyki pracy doktorskiej. We wstępie znajdujemy omówienie aktualnego stanu wiedzy, w oparciu o 220 publikacji spośród 291 cytowanych w rozprawie. Autorka podzieliła omówienie aktualnego stanu wiedzy na siedem podrozdziałów. W poszczególnych rozdziałach uwzględniła praktycznie wszystkie najważniejsze publikacje dotyczące zagadnień występowania i roli lipidów rezorcynolowych, ich biologicznej aktywności, szlaków metabolizmu, chorobom związanym z używaniem etanolu oraz metabolizmem i jego toksycznym oddziaływaniem. W podrozdziałach 3.5 i 3.6 znajdujemy bardzo obszerny opis funkcjonowania wątroby oraz opis modeli wątrobowych stosowanych w badaniach hepatoksyczości. Na podkreślenie zasługuje fakt, że autorka dokonując przeglądu stosowanych modeli wątrobowych dokonała ich krytycznej analizy wskazując na ich ograniczenia. Kolejny podrozdział 3.7. pt. „*Charakterystyka wybranych linii komórkowych*” poświęcony hepatocytom pierwotnym, linii komórkowej HepaRG oraz linii komórkowej HepG2. Doktorantka przeprowadziła wnikliwą analizę wad i zalet wykorzystania omawianych linii komórkowych w badaniach hepatoksyczości.

Wstęp do rozprawy pozwolił autorce na analizę aktualnego stanu wiedzy, zdefiniowanie problemu naukowego dotychczas nie rozstrzygniętego w literaturze przedmiotu jak również stanowi uzasadnienie przyjętego modelu badawczego. W oparciu o dokonana analizę literatury przedmiotu we wstępie w rozdziale „Cel pracy” na stronie 57 kandydatka dokładnie i jasno zdefiniowała cele swojej rozprawy.

Rozdział 5 rozprawy „Materiały i Metody” zawarty na stronach 58 – 77 został przygotowany bardzo starannie i dokładnie. Doktorantka rozdział ten podzieliła na 3 główne podrozdziały, w których wyodrębniła dodatkowo szereg podrozdziałów niższego rzędu opisujących szczegółowo materiały, stosowane sekwencje czasowe oraz poszczególne metody analityczne. Rozdział ten w pełni spełnia kryterium weryfikowalności naukowej. Pewne zastrzeżenia budzi brak pełniejszych informacji w podrozdziale 5.1.1. pt. „*Lipidy rezorcynolowe*” na temat odmiany żyta ponieważ udział homologów od C17 do C21 może być zróżnicowany pomiędzy odmianami i jednocześnie autorka nie przeprowadziła analizy jakościowej badanej mieszaniny. Ponadto autorka przedstawiła wyniki w postaci zależności procentowych co pozwala na łatwiejszą ich graficzną prezentację jednakże nie píše czy analiz statystycznych dokonano w oparciu o wyniki rzeczywiste czy przekształcone do wartości procentowych.

Wyniki badań autorka zamieściła na stronach od 78 do 120 w rozdziale 6 w 15 podrozdziałach poświęconych poszczególnym zagadnieniom będących przedmiotem badań. Przyjęty układ wraz dokumentacją wyników badań zamieszczona bezpośrednio w tekście w postaci tabel, wykresów i dokumentacji fotograficznej w znacznym stopniu ułatwia bezpośrednie śledzenie toku myślowego autorki. Dokumentacja wyników badań jest czytelna i nie wzbudza zastrzeżeń. Wyniki badań prezentowane w podrozdziałach 6.1 i 6.2 stanowią uzasadnienie wyboru dawek etanolu oraz alkilorezorcynoli w surowym ekstrakcie jak uwodrowianych do dalszych badań. Pozostałe podrozdziały zawierają analizy ochronnego działania lipidów rezorcynolowych na komórki linii HepG2 poddanych następnie inkubacji z etanolem. Przeprowadzono analizy przeżywalności z wykorzystaniem testu MTT, poziomu ATP, uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, poziomu reaktywnych form tlenu, aldehydu malonowego oraz glutationu. Badania stanu fizjologicznego są uzupełnione badaniami cyklu komórkowego wraz z ilości komórek apoptotycznych i nekrotycznych co zilustrowano dokumentacją fotograficzną preparatów w mikroskopii fluorescencyjnej. Opis badań jest szczegółowy i każdy z podrozdziałów kończy się uogólnieniem.

Pewien niedosyt w analizie tak bogatych i cennych wyników wzbudza brak próby określenia wzajemnych relacji pomiędzy poszczególnymi parametrami fizjologicznymi i morfologicznymi poprzez dokonanie analizy wieloczynnikowych korelacji lub poprzez dokonanie analizy skupień. Taka analiza niezależnie od oceny wpływu badanych czynników na poszczególne parametry pozwoliłoby na dokonanie całościowego podsumowania wzajemnych zależności badanych cech fizjologicznych i ich rolę w obserwowanych procesach hepatotoksycznych.

W przedstawionej do oceny rozprawie zakres badań obejmował wiele różnorodnych, ale ściśle powiązanych, żmudnych i wymagających dużej wiedzy i umiejętności prac eksperymentalnych jak również weryfikacji zastosowanych metod analitycznych. Tak wszechstronnie zrealizowane badania, pomimo powyższych zastrzeżeń, pozwalają na stwierdzenie że mają one dużą wartość poznawczą jak i praktyczną, Autorka udokumentowała w sposób nie wzbudzający zastrzeżeń prozdrowotną rolę lipidów rezorcynolowych oraz potencjalne możliwości wykorzystania ich uwodrowianych form w leczeniu i zapobieganiu wpływu hepatotoksycznemu oddziaływaniu alkoholu etylowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka opracowała bardzo starannie rozdział Dyskusja na stronach od 121 do 143. W rozdziale tym w sposób rzeczowy, ale i krytyczny kandydatka przedstawiła własne wyniki badań na tle doniesień innych autorów. Według mojego rozeznania autorka uwzględniła wszystkie ważniejsze opublikowane do

czasu przygotowania rozprawy prace. Jednakże, doktorantka nie uniknęła drobnych potknięć w trakcie dyskusji. Między innymi pisze na stronie 141, że „... *obserwujemy tu wyraźną w oznaczanym poziomie GSH po inkubacji komórek z ARs ...*” a w kolejnym zdaniu stwierdza „*Różnica ta nie została jednak wykazana statystycznie.*” Jeżeli nie potwierdzono wyników w oparciu o analizę statystyczną nie możemy mówić o jakichkolwiek różnicach. Ponadto autorka kilkakrotnie stwierdza, że wykazano korelacje pomiędzy analizowanymi parametrami (m.in. na str. 141, 142). Takie stwierdzenie nie znajduje uzasadnienia w przedstawionych wynikach badań ponieważ nie przeprowadzono żadnych analiz statystycznych potwierdzających fakt takich korelacji.

Niezależnie od powyższych uwag, dyskusja wyników prezentuje jasny ciąg myślowy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w oparciu o własne wyniki badań dokonała uzupełniającej interpretacji wyników wcześniejszych badań opublikowanych przez innych autorów. Cenna jest również dyskusja własnych wyników badań przeprowadzonych w bardzo szerokim zakresie badania nad ochronnym działaniem lipidów rezorcynolowych oraz ich uwodorowanych form na tle innych stosownych leków oraz nad ich właściwościami antyoksydacyjnymi i prooksydacyjnymi w zależności o stężeń oddziaływających na komórki wątroby. Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie doktorantki, że wbrew dotychczasowym poglądom alkilorezorcynole nie można zaliczyć do silnych antyoksydantów i ich aktywność ochronna wynika z faktu ich inkorporacji do warstwy fosfolipidów dzięki czemu następuje stabilizacji błon komórkowych. Autorka w tej części rozprawy dokonuje oceny potencjalnych możliwości wykorzystania uwodorowanych alkilorezorcynoli oraz identyfikuje również potencjalne kierunki badań nad nimi.

Podsumowaniem rozprawy jest ostatni rozdział zawierający wnioski. Autorka na podstawie przedstawionej rozprawy sformułowała 13 wniosków, które w pełni odzwierciedlają wyniki badań własnych doktorantki.

Rozprawa doktorska Pani mgr A. Piwoni **jest ważnym ogniwem w badaniach nad oceną prozdrowotnej roli lipidów rezorcynolowych, a w szczególności jest cennym wskazaniem możliwości wykorzystania ich uwodorowanych form w medycynie.** Wykorzystanie dodatkowych narzędzi analitycznych może pozwoliłyby na pełniejsze wykorzystanie wyników, jednakże w żadnej mierze nie mają wpływu na jakość ocenianej rozprawy.

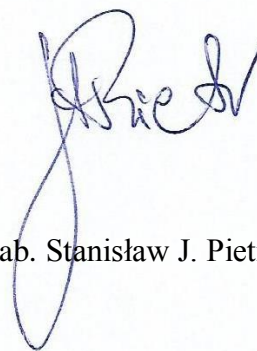
Na dorobek naukowy Pani mgr Adriany Piwoni składają się 2 opublikowane prace w renomowanych czasopismach naukowych oraz jedna praca złożona do druku.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Piwoni w świetle artykułu 13, pkt. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (Tekst jednolity Dz.U. z dnia 15 września 2017, poz. 1789) stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wymogi ustawowe i w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego zgodnie z artykułem 14 pkt. 2, ppkt. 3 w/wym ustawy o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Uzasadnienie

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Piwoni stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje wysoki poziom wiedzy teoretycznej kandydatki w zakresie biochemii jak również umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Jednocześnie biorąc pod uwagę zakres pracy, jej opracowanie, duże znaczenie badanych zagadnień jak wskazanie na możliwość wykorzystania uwodorowanych lipidów rezorcynolowych w leczeniu i zapobieganiu hepatotoksycznemu oddziaływaniu alkoholu etylowego, które to ma duże znaczenie poznawcze jak również duże znaczenie dla rozwoju tej dziedziny nauki oraz ogólnospołeczne stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy nagrodą.



Prof. zw. dr hab. Stanisław J. Pietr