Prof. dr hab. inż. Wiesław Skrzypczak
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

OCENA
pracy doktorskiej mgr inż. Klary Zglińskiej

wykonanej w Samodzielnej Pracowni Żywienia Zwierząt
Instytutu Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
pod kierunkiem dr hab. Tomasza Niemca, prof. SGGW

nt.

Wpływ ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raka pręgowatego na zmiany wywołane stresem oksydacyjnym w fibroblastach HFFF-2

Recenzja została przygotowana na wniosek Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie
(pismo INZ-64/2023 z dnia 17.10.2023 roku)

1. Naruszenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem wolnych rodników, a zdolnością organizmu do ich „utylizacji" stanowi przyczynę wielu zaburzeń metabolicznych manifestujących się przede wszystkim na poziomie komórkowym i subkomórkowym, a obniżających sprawność funkcjonowania całego organizmu. W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania nad stresem oksydacyjnym oraz możliwościami wspomagania mechanizmów antyoksydacyjnych ustroju. Badania prowadzone od wielu lat w Pracowni Żywienia Zwierząt Instytutu Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie mieszczą się właśnie w tym nurcie dociekań naukowych. Wyniki tych badań, a także wyniki badań innych autorów, pozwoliły Doktorantce na założenie, że dieta bogata w efektywne formy antyoksydantów może zapobiec lub złagodzić następstwa niekorzystnych zmian wywołanych deficytem antyutleniaczy i/lub nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu w organizmie, zwłaszcza w warunkach obciążenia metabolicznego czy środowiskowego.

2. Pani mgr inż. Klara Zglińska, jako oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, w rozumieniu art. 13 ust. 1 i 2 ustawy, z dnia 14 marca 2003 roku „*O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), przedłożyła rozprawę doktorską pod tytułem *Wpływ ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raka pręgowatego na zmiany wywołane stresem oksydacyjnym*

w fibroblastach HFFF-2. Praca ta stanowi spójny tematycznie zbiór trzech oryginalnych prac naukowych:

Zglińska, K., Rygało-Galewska, A., Bryś J., Koczoń, P., Borek, K., Roguski M., Niemiec, T. 2021. *Elaeagnus umbellata* fruit - chemical composition, bioactive compounds, and kinetic of DPPH inhibition compared to standard antioxidants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(8), 2021, s. 639-646, doi: https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i8.2738 **[**$IF_{(2021)}$ **1,04; 40 pkt.]**,

Zglińska, K., Niemiec, T., Łozicki, A., Matusiewicz, M., Szczepaniak, J., Puppel, K., Kutwin, M., Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Koczoń, P. 2021. Effect of *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) fruit extract on H_2O_2-induced oxidative and inflammatory responses in normal fibroblast cells. *PeerJ* 9:e10760, doi: doi.org/10.7717/peerj.10760 **[**$IF_{(2021)}$ **3,03; 100 pkt.]**,

Zglińska, K., Jaworski, S., Rygało-Galewska, A., Łozicki, A., Roguski, M., Matusiewicz,. M, Niemiec, T. 2022. Effect of Spiny-Cheek Crayfish (*Faxonius limosus*) on H_2O_2-Induced Oxidative Stress in Normal Fibroblast Cells. *Applied Sciences*, 12(17):8546. doi: doi.org/10.3390/app12178546 **[**$IF_{(2022)}$ **2,70; 100 pkt.]**.

Łączny IF ww. prac wynosi **6,77**, a suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MEN wynosi **240** (według punktacji obowiązującej w roku publikacji).

Publikacje są współautorskie, należy jednak podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Wkład mgr inż. Klary Zglińskiej w ich powstanie został uznany przez współautorów za wiodący i został oszacowany na 70%. Udział Doktorantki polegał na opracowaniu koncepcji, hipotezy i metodologii badań; wykonywaniu doświadczeń i analiz laboratoryjnych; opracowywaniu i interpretacji wyników; sformułowaniu wniosków; przygotowaniu manuskryptów publikacji.

3. Integralną częścią rozprawy doktorskiej, poza kopiami ww. prac, jest autorskie ich opracowanie obejmujące: wstęp, hipotezę badawczą, cel i zakres pracy, metodykę badań, omówienie głównych wyników badań, podsumowanie wyników, a także wykaz piśmiennictwa (52 pozycji) oraz streszczenie (w języku polskim i angielskim). Ponadto Autorka zamieściła oświadczenia wszystkich współautorów cytowanych prac, o ich udziale w badaniach i publikacjach.

We wstępie Doktorantka wprowadziła czytelnika w problematykę rozprawy, przeprowadziła krytyczną analizę piśmiennictwa dotyczącą stresu oksydacyjnego

oraz mechanizmów i czynników antyoksydacyjnych, z uwzględnieniem produktów pochodzenia roślinnego (w tym ekstraktów z owoców oliwnika baldaszkowatego) oraz pochodzenia zwierzęcego (w tym ekstraktów z raka pręgowatego). Następnie sformułowała *hipotezę badawczą i cel badań*. Autorka założyła weryfikację hipotezy, że ekstrakty z owoców oliwnika baldaszkowatego i raków pręgowatych indukują mechanizmy ograniczające skutki stresu oksydacyjnego wywołanego nadtlenkiem wodoru, w komórkach fibroblastów linii HFFF-2 (w warunkach *in vitro*). Tak dość szerokie ujęcie zagadnienia Doktorantka doprecyzowała podając *cele szczegółowe i zakres badań*. W trakcie trzech etapów doświadczalnych: (1) scharakteryzowano owoce oliwnika baldaszkowatego, metanolowo-acetonowy ekstrakt z tych owoców oraz wodny ekstrakt z raków pręgowatych pod kątem zawartości wybranych substancji bioaktywnych i właściwości antyoksydacyjnych (*in vitro*), (2) oceniono zdolności antyoksydacyjne ekstraktów z owoców oliwnika baldaszkowatego i raków pręgowatych w teście redukcji 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). (3) oceniono cytotoksyczność ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raków pręgowatych względem fibroblastów linii HFFF-2, (4) zbadano działanie obu ekstraktów w modelu indukowanego nadtlenkiem wodoru stresu oksydacyjnego w komórkach fibroblastów HFFF-2. W rozdziale *metodyka badań* Autorka przedstawiła szczegółowo układ doświadczeń, metody badań i analiz laboratoryjnych oraz obliczeń statystycznych. Metodyka doświadczeń została przemyślana, dobrze zaplanowana i dokładnie opisana. Główne wyniki badań Doktorantka opisała w kolejnym rozdziale, skomentowała je rzeczowo, w oparciu o wcześniejsze badania prowadzone w macierzystej jednostce i dane z piśmiennictwa. Przedstawiła własne spostrzeżenia i wysunęła uzasadnione supozycje. Zwieńczeniem rozprawy jest *podsumowanie wyników*, które mają uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach i zdaniem recenzenta, powinny stanowić inspirację do dalszych badań.

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje staranna redakcja pracy i dbałość o „szczegóły" edytorskie.

4. Badania będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały wykonane w trzech etapach. W pierwszym scharakteryzowano owoce oliwnika baldaszkowatego, pochodzącego z upraw na terenie Polski, pod względem zawartości substancji bioaktywnych oraz właściwości antyoksydacyjnych, a wyniki zamieszczono w pracy, *Elaeagnus umbellata* fruit - chemical composition, bioactive compounds, and kinetic of DPPH inhibition compared to standard antioxidants. W badaniach określono skład podstawowy owoców tej rośliny (suchą masę, białko ogólne, tłuszcz surowy, popiół) oraz zawartość związków przeciwutleniających: całkowitą zawartość fenoli, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (D, E, K) i karotenoidów

(β-karotenu, likopenu) oraz skład kwasów tłuszczowych. Aktywność przeciwutleniającą oceniano na podstawie hamowania rodnika tlenowego DPPH przez owoce oliwnika (w stosunku do dedykowanych standardów – witaminy C i BHT) oraz kinetyki reakcji ekstraktu z rodnikiem DPPH. W badaniach wykazano m.in., że: (a) owoce oliwnika baldaszkowatego pochodzące z Polski mają podobny profil substancji bioaktywnych jak owoce z innych terenów uprawowych, zawierają liczne składniki bioaktywne i mają właściwości antyoksydacyjne, (b) tłuszcz z owoców oliwnika baldaszkowatego charakteryzuje się bardzo wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych i korzystnym stosunkiem kwasów Ω 3/Ω 6.

W drugim etapie badań podjęto próbę oceny wpływu ekstraktu z oliwnika baldaszkowatego na skutki stresu oksydacyjnego w komórkach fibroblastów linii HFFF-2, a uzyskane wyniki opublikowano w pracy, Effect of *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) fruit extract on H_2O_2-induced oxidative and inflammatory responses in normal fibroblast cells. W badaniu określono skład chemiczny ekstraktu z owoców oliwnika baldaszkowatego (całkowitą zawartość fenoli, witamin D, E i C oraz karotenoidów - β-carotenu, likopenu). Następnie badano jego wpływ na indukowany nadtlenkiem wodoru stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów (linii HFFF-2). Analizowano także wpływ ekstraktu i H_2O_2 na: ekspresję RFT przez fibroblasty; aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD); żywotność i proliferację badanych komórek; typ śmierci fibroblastów – apoptoza/nekroza oraz ekspresję wybranych (dziewięciu) cytokin. Do najistotniejszych wyników tych badań można zaliczyć wykazanie, że ekstrakt metanolowo-acetonowy z owoców oliwnika baldaszkowatego: (a) wykazuje zależną od dawki efektywność antyoksydacyjną, (b) istotnie zmniejsza wydzielanie reaktywnych form tlenu przez fibroblasty narażone na stres oksydacyjny, (c) zwiększa żywotność komórek, chroni fibroblasty HFFF-2 przed szkodliwym działaniem nadtlenku wodoru i zmniejsza ich śmiertelność (zarówno apoptozę jak i nekrozę).

W trzecim doświadczeniu scharakteryzowano skład chemiczny ekstraktu z raków pręgowatych oraz określono jego właściwości antyoksydacyjne i wpływ na stres oksydacyjny w komórkach fibroblastów linii HFFF-2. Wyniki tego doświadczenia opisano w pracy Effect of Spiny-Cheek Crayfish (*Faxonius limosus*) on H_2O_2-induced oxidative stress in normal fibroblast cells. Materiał do badań stanowiły raki pręgowate, z których po liofilizacji przygotowywano ekstrakt (patent RP). Dokonano charakterystyki chemicznej ekstraktu. Badano całkowitą zawartość fenoli, witamin: D, E, K oraz β-karotenu, likopenu i glutationu. Oznaczono zawartość białka ogólnego oraz skład aminokwasowy ekstraktu i obliczono wskaźnik jakości białka. Następnie badano zdolność ekstraktu do redukcji wolnych rodników metodą DPPH. Analizowano także wpływ ekstraktu na ekspresję RFT oraz wpływ ekstraktu

i H_2O_2 na morfologię komórek HFFF-2, ich żywotność i proliferację oraz na aktywność kaspazy-3. Do najistotniejszych wyników tych badań można zaliczyć wykazanie, że ekstrakt wodny z raków pręgowatych: (a) zawiera bardzo wysoką zawartość białka o wysokiej wartości biologicznej (wysokiej koncentracji aminokwasów: histydyny, lizyny, treoniny i glutaminy), (b) wykazuje właściwości antyoksydacyjne (jednak potencjał antyoksydacyjny ekstraktu mierzony zdolnością do inhibicji rodnika DPPH był niższy niż ekstraktu z owoców oliwnika), (c) istotne zmniejsza ekspresję reaktywnych form tlenu przez komórki linii HFFF-2 (działanie dawkozależne), jak również narażonych na silny stres oksydacyjny, (d) nie wywiera efektu toksycznego w stosunku do fibroblastów HFFF-2 (niezależnie od stosowanej dawki), jednocześnie wywiera dawkozależne nasilenie proliferacji tych komórek w warunkach stresu oksydacyjnego

W podsumowaniu chciałbym zaznaczyć, że zaplanowane przez Doktorantkę badania miały szeroki zakres, były prowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych i wysokospecjalistycznych technik eksperymentalnych i analitycznych. Z satysfakcją stwierdzam, że z trudnego zadania jakie Autorka zaplanowała do rozwiązania w pracy doktorskiej, wywiązała się w sposób właściwy, co jest potwierdzeniem dużej wiedzy, zaangażowania i umiejętności prowadzenia badań naukowych. Niewątpliwie jednak, zrealizowanie tego przedsięwzięcia naukowego wymagało wsparcia wielu osób, zwłaszcza promotora dr. hab. Tomasza Niemca, prof. SGGW.

5. Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym poprosić Doktorantkę o krótki komentarz do supozycji: (a) że owoce oliwnika baldaszkowatego .... są pożądanym surowcem do produkcji dodatków paszowych dla zwierząt towarzyszących, narażonych na stres oksydacyjny i stan zapalny (s. 30 maszynopisu); (b) że oba ekstrakty .... mogą mieć ... znacznie szersze możliwości aplikacyjne zarówno w kontekście dietetycznym, jak i wsparcia procesów gojenia się ran, nie wyłączając obszarów dermatologii i kosmetologii (s. 44 maszynopisu).

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską pt. *Wpływ ekstraktów z oliwnika baldaszkowatego i raka pręgowatego na zmiany wywołane stresem oksydacyjnym w fibroblastach HFFF-2* oceniam pozytywnie. Podjęty przez Doktorantkę temat jest istotny, zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Stwierdzam, że założenia metodyczne, wykorzystane techniki eksperymentalne, metody analiz laboratoryjnych i obliczeń statystycznych, umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wyników. Wnioski i supozycje przedstawione przez doktorantkę

mają pełne uzasadnienie w przeprowadzonych doświadczeniach i powinny stanowić inspirację do dalszych badań.

Stwierdzam, że praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej, posiadają istotną wartość naukową i stanowią wkład Doktorantki w rozwój dyscypliny naukowej zootechnika i rybactwo. Spełnione są zatem wymagania określone w art. 13 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku *„O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki"* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami).

Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo o przyjęcie rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Klary Zglińskiej i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Szczecin, dnia 3 listopada 2023 roku

Prof. dr hab. inż. Wiesław F. Skrzypczak