



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

dr hab. Paweł Nowak, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii UŁ
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 9 sierpnia 2017 r.

**Ocena pracy doktorskiej
Mgr Dominiki Dudzińskiej
pt. „Przeciwplytkowe właściwości preparatów polifenolowych uzyskanych z
liści jeżyny i maliny”
Promotor pracy – prof. dr hab. Cezary Watała**

Badania epidemiologiczne wskazują, że wysoka konsumpcja owoców i warzyw jest ważnym czynnikiem redukującym wystąpienie chorób sercowo-naczyniowych. Sądzi się, że korzyści płynące ze spożywania pokarmów pochodzenia roślinnego wynikają głównie z obecności w owocach i warzywach związków polifenolowych. Polifenole są bardzo zróżnicowaną pod względem właściwości i struktury grupą naturalnych antyoksydantów. Nie są syntetyzowane w organizmach zwierzęcych, są wtórnymi metabolitami roślinnymi, które odgrywają ważną rolę m.in. w pigmentacji owoców, w reprodukcji, wzroście czy ochronie roślin przed szkodliwym działaniem promieniowania UV i czynnikami chorobotwórczymi.

Związki polifenolowe są obecnie najbardziej badanymi cząsteczkami pochodzenia naturalnego, których potencjalne, prozdrowotne właściwości mogą zostać wykorzystane w profilaktyce i wspomaganiu leczenia wielu chorób. Na rynku farmaceutycznym pojawia się coraz więcej suplementów diety (nutraceutyków) opartych na ekstraktach roślinnych, zawierających związki polifenolowe o potwierdzonym naukowo działaniu. Związki polifenolowe można znaleźć w preparatach wspomagających leczenie schorzeń wątroby, wzmacniających odporność, znoszących objawy związane z niewydolnością krążenia w obrębie żył kończyn dolnych czy w nutraceutykach sojowych będących alternatywą dla terapii hormonalnej w profilaktyce objawów menopauzalnych.

Bogatym źródłem związków polifenolowych o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych są ekstrakty uzyskane z liści roślin rodzaju *Rubus*. Wykazanie, w przedłożonej mi do recenzji pracy, ich przeciwpłytkowego działania czyni je obiecującym źródłem do pozyskiwania nutracetyków o działaniu kardioprotekcyjnym.

Recenzowana praca doktorska jest liczącym łącznie 100 strony opracowaniem, zawierającym 9 rycin, 8 tabel i 172 pozycji literaturowych, których dobór nie budzi zastrzeżeń. Cytowane prace w zdecydowanej większości zostały opublikowane w ostatnich 8 latach.

Rozprawa ma układ typowy dla tego rodzaju dysertacji. Zawiera następujące rozdziały: *Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie wyników i Wnioski, Streszczenie* w języku polskim i angielskim oraz *Bibliografię*. Autorka zamieściła także na początku pracy alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów oraz listę publikacji zawierających uzyskane wyniki, a na końcu spis rycin i tabel. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z dużą starannością i co należy podkreślić napisana jest poprawną polszczyzną.

Liczące 18 stron *Wprowadzenie* stanowi znakomite zapoznanie się czytelnika z tematyką badawczą rozprawy. Autorka w sposób przejrzysty i rzeczowy opisuje rolę płytek krwi, oddziaływania płytkowo-leukocytarne oraz udział śródbłonka naczyniowego w hemostazie. Następnie przedstawia najnowsze informacje na temat prozdrowotnych właściwości polifenoli obecnych w ekstraktach roślinnych. Doktorantka precyzyjnie uzasadnia podjęcie tematu badań oraz formułuje siedem szczegółowych celów pracy związanych z weryfikacją następujących hipotez badawczych, mówiących, że ekstrakty z liści jeżyny lub liści maliny:

1. są źródłem polifenoli o istotnych właściwościach przeciwutleniających
2. nie wpływają na żywotność i proliferację komórek śródbłonka;
3. zwiększają ekspresję antygenu CD39 na powierzchni komórek śródbłonka
4. zwiększają aktywność enzymatyczną śródbłonkowego antygenu CD39
5. nie wpływają na żywotność płytek krwi poprzez zaburzenie integralności błony płytkowej
6. zmniejszają ekspresję markerów aktywacji (selektyny P i aktywnej formy receptora fibrynogenu) w płytkach krwi stymulowanych ADP
7. zmniejszają agregację płytek we krwi pełnej oraz w osoczu bogatopłytkowym po stymulacji ADP

Doktorantka w rozdziale *Materiały* szczegółowo opisuje w jaki sposób uzyskiwano materiał roślinny wykorzystany do otrzymania ekstraktów polifenolowych, a także charakteryzuje dawców krwi pod względem wieku i płci. Na wykonywanie badań z wykorzystaniem krwi ludzkiej Autorka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej.

W rozdziale *Metody* Autorka zapoznaje czytelnika z metodologią badań, dobraną prawidłowo dla realizacji postawionych celów pracy. Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje sposób otrzymywania ekstraktów jak i ich analizę chemiczną. W tym miejscu chciałbym zapytać Autorkę czy wszystkie oznaczenia fitochemiczne wykonała samodzielnie, ponieważ nie znalazłem w pracy informacji o udziale innych osób w tych analizach.

Rezultaty przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w formie prawidłowych pod względem merytorycznym i graficznym rycin i tabel. Poza sposobem prezentacji wyników, uderza duża dojrzałość i dociekliwość w ich interpretacji oraz wyciąganiu wniosków.

Dyskusja licząca 9 stron została podzielona na sześć podrozdziałów. Ułatwiło to zarówno jej prowadzenie, jak i odbiór. Autorka w sposób kompetentny porównała wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. Potwierdziła tym samym dobrą znajomość literatury przedmiotu i właściwy krytycyzm do wyników badań, zarówno własnych, jak i danych literaturowych. *Dyskusję* kończy jedenastopunktowe podsumowanie wyników oraz cztery prawidłowo sformułowane wnioski.

Przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki potwierdzają, że ekstrakty z liści maliny właściwej i jeżyny popielicy są źródłem polifenoli o bardzo dużym potencjale antyoksydacyjnym. Wskazują na ich istotne działanie przeciwplatekcyjne we krwi pełnej, które jest prawdopodobnie modulowane przez inne składniki morfotyczne, np. neutrofile. Badane ekstrakty neutralizują reaktywne formy tlenu powstające podczas wybuchu tlenowego z udziałem neutrofilii. Jednocześnie nie wpływają na przeciwplatekcyjne właściwości komórek śródbłonka. Wszystko razem, jak już wspomniałem wcześniej, czyni je obiecującym źródłem do pozyskiwania nutracetyków o działaniu kardioprotekcyjnym.

W rozprawie doktorskiej znalazłem kilka drobnych błędów (głównie edytorskich) i uchybień. Niektóre z nich z obowiązku recenzenta chciałbym przekazać Autorce:

- W tekstach polskojęzycznych obowiązującym separatorem dziesiętnym jest przecinek, a nie kropka.
- Str. 35 - zawartość proantocyjanidyn wyrażano....., stosując molarny współczynnik ekstynkcji – powinno być molowy współczynnik ekstynkcji
- Na rycinach 2-4, a także pod ich opisem, brak jest informacji o stężeniu stosowanych ekstraktów.

Chciałbym również, aby Autorka wyjaśniła, dlaczego niektóre wyniki badań cytofluorometrycznych przedstawiła tylko opisowo (rozdziały 3.2 i 3.3), a nie w postaci rycin/tabel. Dlaczego stężenia ekstraktów wyrażała w ekwiwalencie kwasu galusowego (GEA)? Jakie było faktyczne stężenie masowo/objętościowe ekstraktów stosowanych w badaniach?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska ma bardzo wysoką wartość poznawczą, a w przyszłości aplikacyjną. Autorka dysertacji zrealizowała obszerny i ambitny program badań. Zastosowanie przez Doktorantkę różnorodnych, nowoczesnych technik świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego. Sposób analizy wyników, wnioskowanie oraz przedstawione hipotezy świadczą o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) Część wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach naukowych. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału

Nauk o Zdrowiu UM w Łodzi o dopuszczenie mgr Dominiki Dudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Paweł Nowak

P. Nowak