



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii



dr hab. Anna Szakiel, prof. ucz.
Zakład Biochemii Roślin

Warszawa, 2023-01-05

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Rolnik pt. „Analiza składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływ na wybrane elementy hemostazy”

wykonanej pod opieką promotorską dr hab. Beaty Olas, prof. UŁ (Katedra Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego) i prof. dr hab. Anny Stochmal (Zakład Biochemii i Jakości Plonów, IUNG-PIB, Puławy) w ramach Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich InterDOC-START

Podstawą wykonania recenzji jest powołanie na Recenzenta przez Komisję Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 18 października 2022 r.

Ocena formalna. Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana jako cykl publikacji (4 prac oryginalnych i dwóch przeglądowych) opublikowanych w latach 2020-2022. Wszystkie prace ukazały się w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MEiN. Prace oryginalne zostały opublikowane w *Molecules* (IF=4,412; MEiN=140 pkt), *Biomedicine & Pharmacotherapy* (IF=6,529; MEiN=100 pkt) oraz *Scientific Reports* (IF=4,996; MEiN=140 pkt), a prace przeglądowe w *Nutrition* (IF=4,893; MEiN=140 pkt) i *International Journal of Molecular Sciences* (IF=6,208; MEiN=140 pkt). Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, a jej udział w tworzeniu tych prac – zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami – był znaczący (w pracach oryginalnych od 40% do 50%), w pracach przeglądowych 60%. We wszystkich publikacjach mgr Agata Rolnik zarówno projektowała jak i wykonywała doświadczenia, analizowała i opracowywała wyniki, przygotowywała manuskrypt i odpowiadała na uwagi recenzentów, co świadczy o dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Publikacje składające się na cykl są starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną dokumentację

graficzną, w tym chromatogramy, fotografie oraz liczne wykresy obrazujące uzyskane wyniki.

Autoreferat, stanowiący wprowadzenie do rozprawy, został w sposób typowy podzielony na rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski, streszczenie (także w języku angielskim) i spis literatury. Rozprawa zawiera także informacje o źródłach finansowania badań, spis artykułów wchodzących w skład recenzowanego cyklu oraz stanowiących pozostały dorobek naukowy, a także oświadczenia o udziale w publikacjach doktorantki, promoterek i pozostałych współautorów. Z formalnego punktu widzenia rozprawa jest kompletna, jej treść jest poprawnie opracowana redakcyjnie. Autoreferat jest napisany zrozumiałym i klarownym językiem naukowym (literówki i niedociągnięcia redakcyjne są nieliczne, nie obniżają wartości pracy).

Ocena merytoryczna. Podjęty w rozprawie temat prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego za pomocą diety zawierającej warzywa z rodzin dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) jest istotny zarówno z punktu widzenia medycznego, jak i społecznego czy ekonomicznego. Jak słusznie zauważyła Autorka rozprawy, choroby układu sercowo-naczyniowego są poważnym zagrożeniem dla życia i zdrowia człowieka, gdyż od lat znajdują się w czołówce przyczyn zgonów na całym świecie (w Europie są powiązane prawie z połową zgonów), a skutki zawałów i udarów są odczuwane przez pacjentów przez długie lata. Choroby układu sercowo-naczyniowego są zaliczane do tzw. chorób cywilizacyjnych, których eskalacja jest związana z niekorzystnymi zmianami w trybie życia i odżywiania, dlatego wzrost świadomości społecznej dotyczącej roli zdrowej diety może sprzyjać zarówno profilaktyce, jak i bardziej efektywnym terapiom. Uważam temat rozprawy za interesujący, a główny cel pracy, którym była analiza składu chemicznego preparatów z wybranych warzyw oraz ocena ich wpływu na wybrane parametry hemostazy w układzie *in vitro* (właściwości antypłytkowe, w tym antyadhezyjne; antykoagulacyjne i antyoksydacyjne) za wartościowy i godny podjęcia badań.

We wstępie Autoreferatu Doktorantka scharakteryzowała problematykę związaną z chorobami układu sercowo-naczyniowego, zwracając szczególną uwagę na przyczyny ich rozwoju, w tym zaburzenia hemostazy, a także możliwości terapii i stosowane leki. Wstęp nawiązuje do możliwości profilaktyki tych chorób przez zmianę stylu życia i stosowanie diety, w której istotną rolę odgrywałyby odpowiednio dobrane owoce, a zwłaszcza

warzywa, włączając przedstawicieli rodzin dyniowatych i astrowatych. Tę część autoreferatu kończy charakterystyka obu tych rodzin, będąca nawiązaniem do dwóch publikacji przeglądowych, stanowiących wprowadzenie do recenzowanego cyklu prac oryginalnych.

Następnie Doktorantka sformułowała główne i szczegółowe cele pracy oraz hipotezę badawczą. Podstawowymi celami były analiza składu chemicznego preparatów z wybranych warzyw oraz ich wpływu na wybrane elementy hemostazy, cele te zostały wytyczone w oparciu o hipotezę badawczą zakładającą, że analizowane preparaty mogą wykazywać różne aktywności biologiczne, w tym antyoksydacyjną, antypłytkową i przeciwzakrzepową. Do weryfikacji hipotezy posłużyły szczegółowe cele badawcze (określone, moim zdaniem raczej niezręcznie, jako założenia podstawowe) obejmujące analizę składu fitochemicznego preparatów warzywnych oraz oznaczenie wybranych aktywności biologicznych.

Część metodyczna Autoreferatu zawiera wyszczególnienie badanych preparatów warzywnych oraz spis metod badawczych zastosowanych w eksperymentach przeprowadzonych w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB w Puławach oraz w Katedrze Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Doktorantka nie zamieściła szczegółowych opisów procedur badawczych, ale w mojej opinii jest to w pełni usprawiedliwione formą rozprawy – wszystkie opisy są zawarte w częściach metodycznych poszczególnych publikacji. Zastosowane metody (w tym m.in. wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas UPLC-ESI-QTOF-MS, analiza potencjału antyoksydacyjnego z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej TLC-DPPH•, test ORAC, pomiary parametrów koagulacji, cytometria przepływowa, oznaczenie aktywności zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej jako markera uszkodzenia komórek) są nowoczesne, a ich dobór właściwy, w pełni adekwatny do wyznaczonych celów i umożliwiającą ich realizację.

W kolejnym rozdziale Autoreferatu Doktorantka omówiła otrzymane wyniki. Rozdział ten jest syntetycznym podsumowaniem wyników przedstawionych w publikacjach recenzowanego cyklu i uważam go za szczególnie wartościową część Autoreferatu, gdyż zawiera zarówno uzasadnienie wyboru zastosowanych metod, jak i interpretację otrzymanych wyników. Ponadto w opracowaniu tego rozdziału Autorka wykazała się konstruktywnym i całościowym podejściem do podjętej w rozprawie problematyki, przedstawiając kompilację wyników zestawioną w kontekście omawianych zagadnień

(analiza fitochemiczna, poszczególne aktywności biologiczne, ocena cytotoksyczności itp.) unikając częstego błędu polegającego na schematycznym opisie treści kolejnych publikacji. Natomiast pewnym niedociągnięciem tej części Autoreferatu jest brak szerszej dyskusji, w której uzyskane wyniki mogłyby zostać przedstawione na tle danych z literatury naukowej, a także zostałyby przedstawione ich praktyczne znaczenie oraz perspektywy dalszych badań. Oczywiście poszczególne publikacje zawierają adekwatne dyskusje, niemniej brak takiego rozdziału w Autoreferacie pozostawia pewien niedosyt.

Autoreferat kończą zwięźle sformułowane wnioski oraz streszczenie. Streszczenie jest interesujące i poprawnie zredagowane, może trochę zaskakujące jest umieszczenie go na końcu Autoreferatu, gdyż mogłoby raczej tradycyjnie otwierać rozprawę.

Za najważniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy należy uznać:

- przeprowadzenie charakterystyki fitochemicznej wybranych warzyw z rodzin dyniowatych i astrowatych; gdyż uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie istniejących danych o zawartości związków odżywczych i bioaktywnych w tych roślinach;
- ocenę potencjalnych właściwości prozdrowotnych analizowanych preparatów z warzyw, zwłaszcza potencjału antypłytkowego i antyoksydacyjnego, oraz korelację wykazywanej aktywności biologicznej z konkretnymi grupami metabolitów roślinnych, w szczególności różnymi klasami związków fenolowych.

Obowiązkiem Recenzenta jest także zauważenie niedociągnięć rozprawy. Charakterystyczne dla dyniowatych związki chemiczne mają pisownię polską kukurbitacyny (nie cucurbitacyny). Opisując roślinne metabolity wtórne we wstępie, Autorka wymienia m.in. flawonoidy, terpenoidy, seskwiterpeny, saponiny. Takie zestawienie jest formalnie niespójne, gdyż seskwiterpeny należą do terpenoidów, tak więc wymienione grupy nie stanowią równoważnych kategorii chemicznych. Podobna niespójność dotyczy opisu metabolitów zidentyfikowanych w badanych warzywach – kwasów tłuszczowych, lipidów i glicerolofosfolipidów. W tym kontekście trudno zrozumieć, jakie substancje ma na myśli Autorka pisząc „lipidy”?

Przeprowadzona analiza fitochemiczna badanych ekstraktów była jedynie jakościowa, czy nie rozważano możliwości oznaczenia ilościowego przynajmniej niektórych grup istotnych metabolitów, np. flawonoidów czy kwasów fenolowych?

Uzyskane wyniki wskazały m.in. na szczególnie wysoki potencjał antyoksydacyjny i antyplakowy ekstraktu z patisona żółtego (*Cucurbita pepo* var. *patisoniana*). Nie wydaje się, by to warzywo było aktualnie bardzo popularne w sensie kulinarnym. W tym kontekście rodzi się ogólne pytanie dotyczące praktycznego wykorzystania wyników badań przeprowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy. Czy Doktorantka uważa, że wykazane w rozprawie właściwości badanych preparatów z warzyw uprawniają do rekomendowania zwiększenia ich spożycia w celach prozdrowotnych, zwłaszcza w ramach profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych? Niektóre z badanych warzyw można spożywać na surowo, ale wiele (zwłaszcza dyniowatych) wymaga obróbki termicznej. Czy taka forma przygotowania nie zmniejszy wykazywanych właściwości biologicznych? Jakie są dane dotyczące termostabilności szczególnie wartościowych grup metabolitów roślinnych analizowanych w rozprawie? Czy warto byłoby rozważyć opracowanie technologii produkcji jakichś form żywności funkcjonalnej?

Wykazane aktywności biologiczne zostały skorelowane głównie z powszechnie występującymi związkami fenolowymi, a nie z charakterystycznymi dla badanych roślin kukurbitacynami czy laktonami seskwiterpenoidowymi. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych wskazane jest spożywanie jakichkolwiek warzyw bogatych we flawonoidy i inne klasy polifenoli. Czy warzywa dyniowate i astrowate wykazują w tym zakresie jakieś szczególne cechy charakterystyczne? W badanych warzywach dyniowatych w ogóle nie zidentyfikowano kukurbitacyn, czy to wynika faktycznie z ich nieobecności w badanych preparatach, czy raczej z zastosowanych metod ekstrakcji lub identyfikacji związków?

Chciałabym, żeby Doktorantka ustosunkowała się do powyższych zagadnień podczas publicznej obrony swojej rozprawy. Jednocześnie zaznaczam, że przedstawione w recenzji uwagi krytyczne i pytania uzupełniające nie umniejszają ogólnej wysokiej oceny merytorycznej rozprawy.

Podsumowując - uważam, że temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest istotny i wartościowy, cel i hipoteza badawcza zostały wytyczone poprawnie, metody adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące. Doktorantka wykazała się samodzielnością, wiedzą oraz umiejętnością prowadzenia badań naukowych i pisania publikacji.

Uzyskane wyniki wskazały m.in. na szczególnie wysoki potencjał antyoksydacyjny i antypłytkowy ekstraktu z patisona żółtego (*Cucurbita pepo* var. *patisoniana*). Nie wydaje się, by to warzywo było aktualnie bardzo popularne w sensie kulinarnym. W tym kontekście rodzi się ogólne pytanie dotyczące praktycznego wykorzystania wyników badań przeprowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy. Czy Doktorantka uważa, że wykazane w rozprawie właściwości badanych preparatów z warzyw uprawniają do rekomendowania zwiększenia ich spożycia w celach prozdrowotnych, zwłaszcza w ramach profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych? Niektóre z badanych warzyw można spożywać na surowo, ale wiele (zwłaszcza dyniowatych) wymaga obróbki termicznej. Czy taka forma przygotowania nie zmniejszy wykazywanych właściwości biologicznych? Jakie są dane dotyczące termostabilności szczególnie wartościowych grup metabolitów roślinnych analizowanych w rozprawie? Czy warto byłoby rozważyć opracowanie technologii produkcji jakichś form żywności funkcjonalnej?

Wykazane aktywności biologiczne zostały skorelowane głównie z powszechnie występującymi związkami fenolowymi, a nie z charakterystycznymi dla badanych roślin kukurbitacydami czy laktonami seskwiterpenoidowymi. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych wskazane jest spożywanie jakichkolwiek warzyw bogatych we flawonoidy i inne klasy polifenoli. Czy warzywa dyniowate i astrowate wykazują w tym zakresie jakieś szczególne cechy charakterystyczne? W badanych warzywach dyniowatych w ogóle nie zidentyfikowano kukurbitacynu, czy to wynika faktycznie z ich nieobecności w badanych preparatach, czy raczej z zastosowanych metod ekstrakcji lub identyfikacji związków?

Chciałabym, żeby Doktorantka ustosunkowała się do powyższych zagadnień podczas publicznej obrony swojej rozprawy. Jednocześnie zaznaczam, że przedstawione w recenzji uwagi krytyczne i pytania uzupełniające nie umniejszają ogólnej wysokiej oceny merytorycznej rozprawy.

Podsumowując - uważam, że temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest istotny i wartościowy, cel i hipoteza badawcza zostały wytyczone poprawnie, metody adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące. Doktorantka wykazała się samodzielnością, wiedzą oraz umiejętnością prowadzenia badań naukowych i pisanie publikacji.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Agaty Rolnik p.t. „Analiza składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływ na wybrane elementy hemostazy” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

W związku z powyższym, przedstawiam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne **wniosek o dopuszczenie Pani mgr Agaty Rolnik do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy, wartość naukową i oryginalność przeprowadzonych badań oraz pozostały bogaty dorobek naukowy Doktorantki (8 publikacji w renomowanych czasopismach, w tym *Industrial Crops and Products*, MEiN=200 pkt), wnioskuję **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Agaty Rolnik.** Wniosek o wyróżnienie uzasadniam szerokim zakresem przeprowadzonych badań (były to analizy fitochemiczne prowadzące do identyfikacji kilku grup metabolitów, oznaczenia różnych aktywności biologicznych) oraz wyróżniającą się jakością otrzymanych wyników (odzwierciedloną w wysokich parametrach bibliometrycznych czasopism, w których ukazały się publikacje składające się na rozprawę), a także szczególnymi walorami poznawczymi rozprawy, której tematyka jest osadzona w ważnym medycznie i społecznie kontekście profilaktyki chorób cywilizacyjnych i prozdrowotnych właściwości związków pochodzenia roślinnego.

