



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, 14 lipca 2021

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Bartosza Skalskiego

Rozprawa doktorska mgr Bartosza Skalskiego p.t. „**Standaryzowane preparaty z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L) A. Nelson) jako modulatory stresu oksydacyjnego i hemostazy**” wykonana została w ramach realizacji grantu NCN OPUS 2015/19/B/NZ9/03164 oraz dotacji celowej dla Młodych Naukowców B1911000002111.02. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF 17,23, liczbie punktów MNiSW 440. Wszystkie poniżej wymienione publikacje wchodzące w skład tego cyklu są pracami oryginalnymi i we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem:

1. „Biological properties of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson twig and leaf extracts” B. **Skalski**, B. Kontek, B. Lis, B. Olas, Ł. Grabarczyk, A. Stochmal, J. Żuchowski. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2019, 19(148), 1-12.
2. „Phenolic fraction and nonpolar fraction from sea buckthorn leaves and twigs: chemical profile and biological activity” B. **Skalski**, B. Kontek, B. Olas, J. Żuchowski, A. Stochmal. Future Medicinal Chemistry. 2018, 10(20), 2381-2394.
3. „Isorhamnetin and its new derivatives isolated from sea buckthorn berries prevent H₂O₂/Fe induced oxidative stress and changes in hemostasis” B. **Skalski**, B. Lis, Ł. Pecio, B. Kontek, B. Olas, J. Żuchowski, A. Stochmal. Food and Chemical Toxicology. 2019, 125, 614-620.
4. „Anti-platelet properties of phenolic extracts from the leaves and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson” B. **Skalski**, B. Kontek, A. Rolnik, B. Olas, A. Stochmal, J. Żuchowski. Molecules. 2019, 24(3620), 1-17.
5. „Response of blood platelets to phenolic fraction and non-polar fraction from the leaves and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson *in vitro*” B. **Skalski**, A. Stochmal, J. Żuchowski, Ł. Grabarczyk, B. Olas. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019, 124(109897), 1-11.
6. „Anti-platelet properties of phenolic and nonpolar fractions isolated from various organs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson in whole blood” B. **Skalski**. J. Rywaniak, A. Szustka, J. Żuchowski, A. Stochmal, B. Olas. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22(3282) 1- 13.

Katedra Biochemii Lekarskiej

31-034 Kraków, ul. Kopernika 7, tel. +48 12 422 74 00, faks +48 12 422 32 72, e-mail: kbl_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

Do zbioru publikacji dołączone zostało 24 stronicowe opracowanie w języku polskim zawierające streszczenie (również w języku angielskim), listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, listę 8 publikacji wchodzących w skład dorobku naukowego, listę konferencji międzynarodowych (6) i krajowych (9), w których Doktorant aktywnie uczestniczył, 10-cio stronicowy Wstęp z uzasadnieniem i celem rozprawy, Wnioski i Piśmiennictwo (28 aktualnych pozycji, opublikowanych, z wyjątkiem jednej, po 2010 roku). Zgodnie z wymogami dotyczącymi tego typu rozpraw załączone są również Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach. Udział Doktoranta szacowany jest na 35 – 50%.

Celem przedstawianej do oceny rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu ekstraktów z owoców, liści i gałązki rokitnika zwyczajnego na wybrane parametry stresu oksydacyjnego (stężenia produktów peroksydacji lipidów, grup karbonylowych oraz tiolowych w białkach, tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego) oraz hemostazę (pomiar czasów krzepnięcia, pomiar adhezji oraz agregacji płytek krwi, pomiar peroksydacji lipidów w płytkach krwi, pomiar ekspresji selektyny P i receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi oraz pomiar fosforylacji VASP) w układzie *in vitro*. Układem biologicznym do badań było osocze ubogo- oraz bogatopłytkowe, płytki krwi oraz krew pełna ludzka. W badaniach korzystano z metod kolorymetrycznych, turbidymetrycznych, koagulometrycznej oraz cytometrii przepływowej.

Znaczenie badanego problemu i jego aktualność z punktu widzenia medycznego, doświadczenie zespołu w którym praca była wykonywana oraz przygotowanie Doktoranta do prowadzenia tego typu badań, co znajdowało wyraz w publikowanych pracach, w pełni uzasadniają podjęcie tematu prezentowanego w pracy doktorskiej. Rokitnik zwyczajny jest bogatym źródłem antyoksydantów (flawonoidy, witaminy A, C, D, E), nienasyconych kwasów tłuszczowych, mikroelementów (m.in. potas, żelazo, fosfor, mangan, wapń), prowitamin (tokoferole, karotenoidy). Preparaty z rokitnika zwyczajnego wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne czy przeciwwirusowe. Wpływają również na hemostazę osoczową, stąd zainteresowanie preparatami tej rośliny, jak również poszczególnymi związkami obecnymi w tych preparatach, w celach profilaktycznych czy też wspomagających leczenie chorób układu krążenia.

Charakterystyka formalna rozprawy:

W *Pracy 1* wykazano, że ekstrakty z organów rokitnika zwyczajnego są bogatym źródłem związków fenolowych, frakcja fenolowa z liści rokitnika zwyczajnego jest bogatym źródłem tanin ulegających hydrolizie (przede wszystkim elagotannin). Ekstrakty z gałązek i liści rokitnika zwyczajnego inkubowane z osoczem ludzkim znacząco wydłużały czas kaolinowo-kefalinowego (APTT), ekstrakt z gałązek ma silniejsze działanie przeciwzakrzepowe niż ekstrakt z liści i z jagód.

W *Pracy 2* wykazano, że frakcja fenolowa z gałązek badanej rośliny jest źródłem proantocyjanidyn (najsilniejszy naturalny przeciwutleniacz) oraz katechin, z kolei frakcja niepolarna jest bogata w triterpeny. Frakcja fenolowa wyizolowana z gałązek istotnie zmniejszała peroksydację lipidów w osoczu stymulowaną H_2O_2/Fe . Również frakcja bogata w związki niepolarne wyizolowana z liści hamowała proces peroksydacji lipidów. Frakcja fenolowa oraz frakcja niepolarna wyizolowana z gałązek rokitnika zwyczajnego chronią przed karbonylacją białek osocza ludzkiego indukowaną przed H_2O_2/Fe . Wykazano również, że frakcja fenolowa z liści znacząco wydłużyła czas protrombinowy a niepolarna frakcja z gałązek istotnie wydłużyła czas kaolinowo-kefalinowy, co prawdopodobnie jest związane z obecnością triterpenów, czy acylowanych triterpenów.

W *Pracy 3* wykazano, że w obecności izoramnetyny zakupionej komercyjnie oraz jej dwóch pochodnych wyizolowanych z jagód rokitnika zwyczajnego (izoramnetyna 3-O-beta-glukozyd-7-O-alfa-ramnozyd oraz izoramnetyna 3-O-beta-glukozyd-7-O-alfa-(3''-izowalerylo)-ramnozyd) peroksydacja lipidów osocza indukowana H_2O_2/Fe była istotnie zmniejszona, podobnie tworzenie grup karbonylowych w osoczu a poziom grup tiolowych w białkach osocza utrzymany, co potwierdza, że flawonoidy (izoramnetyna oraz jej dwie pochodne) wykazują działanie przeciwutleniające w osoczu. Jedna z badanych pochodnych (izoramnetyna 3-O-beta-glukozyd-7-O-alfa-(3''-izowalerylo)-ramnozyd) istotnie wydłużyła czas trombinowy i podobnie jak izoramnetyna hamowała agregację płytek krwi stymulowanych trombiną.

Prace 4 i 5 dotyczą działania przeciwutleniającego badanych preparatów w płytkach krwi. Wykazano, że ekstrakt z gałązek rokitnika zwyczajnego istotnie ogranicza produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w płytkach krwi niestymulowanych oraz stymulowanych trombiną, podobnie frakcja fenolowa i frakcja bogata w związki niepolarne z liści

i gałązek, co jak sugerowano jest związane z wpływem zawartych w nich związków na metabolizm kwasu arachidonowego. W Pracy 4 i 5 oraz w *Pracy 6* badano wpływ ekstraktów oraz frakcji z rokitnika zwyczajnego na wybrane markery aktywacji płytek krwi (stosowano wyizolowane płytki krwi, osocze bogatopłytkowe (PRP) oraz krew pełną). Zahamowanie agregacji płytek krwi, skorelowane jest z niską ekspresją receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi.

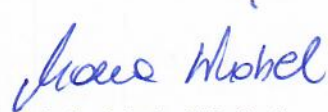
Zapoznanie się z prezentowanymi w poszczególnych publikacjach wynikami pozwala uznać, że przemawiają na rzecz tez stawianych przez Doktoranta odnośnie do właściwości antypłytkowych i antyoksydacyjnych preparatów wyizolowanych z różnych organów rokitnika zwyczajnego a zwłaszcza frakcji fenolowej wyizolowanej z gałązek rokitnika zwyczajnego, zawierającej proantocyjanidyny i katechiny.

Wniosek końcowy:

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że dysertacja doktorska mgr Bartosza Skalskiego p.t. „Standaryzowane preparaty z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L) A. Nelson) jako modulatory stresu oksydacyjnego i hemostazy” prezentuje wyniki oryginalnych, znajdujących się niekiedy – jak w przypadku badań nad mechanizmy przeciwpłytkowego działania triterpenoidów i ich pochodnych – na wstępnym etapie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych i powszechnie akceptowanych metod badawczych. Przedstawione i przedyskutowane wyniki stanowią oryginalny i trwały wkład do nauki i otwierają dalsze interesujące obszary badawcze, co stanowi o ich niezaprzeczalnej wartości. Praca doktorska mgr Bartosza Skalskiego stanowi spójne, dojrzałe opracowane dzieło, które prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje, że Doktorant posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jego zainteresowania, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań oraz interpretowania i komentowania ich wyników w świetle dostępnej aktualnie literatury. Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim, jak również warunki określone w ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r, Dz.U z 2018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

W mojej ocenie przedłożona praca w pełni kwalifikuje Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co niniejszym wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu

Łódzkiego. Mając na uwadze przedstawioną powyżej ocenę, walory merytoryczne dysertacji oraz wynikające z niej wnioski o antypłytkowym i antyoksydacyjnym działaniu frakcji/związków wyizolowanych z rokitnika zwyczajnego wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Skalskiego.



Prof. dr hab. Maria Wróbel