

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bernadetty Lis pt. „Polifenolowe ekstrakty z różnych części mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*) jako modulatory hemostazy”

### **Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w Rozprawie Doktorskiej**

Zdaniem ekspertów Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego niezmiernie istotna jest profilaktyka żywieniowa oparta m.in. na suplementacji preparatami roślinnymi, które bogate są w polifenole wykazujące działanie antymiażdżycowe. W świecie roślin zdarza się, że chwast może okazać się rośliną leczniczą. Mniszek pospolity (*Taraxacum officinale*) wykazuje szerokie spektrum korzystnych działań. Pomimo wielu doniesień i prowadzonych badań nad aktywnością biologiczną mniszka pospolitego, wciąż brakowało danych odnośnie wpływu preparatów (ekstraktów i frakcji) otrzymanych z różnych organów tej rośliny na układ hemostazy. Mgr Bernadetta Lis zdecydowała się pogłębić wiedzę dotyczącą działania różnych pod względem składu chemicznego preparatów mniszka pospolitego wyizolowanych z liści, płatków, korzeni i owoców tej rośliny jako modulatorów homeostazy. Niemniej jednak, hipoteza badawcza dysertacji nie jest jasno sprecyzowana.

Doktorantka podaje w „Celu pracy”, że badała „wpływ preparatów z mniszka pospolitego na wybrane parametry stresu oksydacyjnego w osoczu, jak i płytkach krwi” (str. 13 Autoreferatu) . Nasuwa się pytanie – dlaczego? Wszystkie rośliny wytwarzają metabolity pierwotne i wtórne o właściwościach antyoksydacyjnych, można więc mieć *a priori* pewność, że po dodaniu do osocza czy komórek, poddanych działaniu stresu oksydacyjnego, ekstraktu jakiegokolwiek rośliny [np. ozdabiającej mieszkania i stoły konferencyjne paprotki zwyczajnej (*Polypodium vulgare*)] także można byłoby obserwować efekt ochronny. Co jest więc wyjątkowego w mniszku pospolitym? Uzasadniając podjęcie badań Doktorantka powołuje się na istniejące analizy profilu fitochemicznego poszczególnych organów mniszka pospolitego (jednak bez wskazania, co jest w nich tak ciekawego, by uzasadniało podjęcie badań) i „dane literaturowe wskazujące na potencjał mniszka pospolitego w różnych schorzeniach”, zapewne mając na myśli potencjał leczniczy. Obszerniejsze uzasadnienie podjęcia badań znajduje się we Wstępie i w Publikacji 6. Dobrze byłoby niektóre fragmenty Wstępu uzasadniające celowość podjęcia badań przenieść do rozdziału Cel pracy. Mimo iż większość prac składających się na rozprawę doktorską została opublikowana w czasopiśmie poświęconych żywności, Doktorantka nie podejmuje w Dyskusji tych prac wątku żywieniowego – tego

mianowicie, że liście mniszka pospolitego są używane do sporządzania sałatek, a z płatków mniszka sporządzone jest wino, mimo iż wspomina o tym we Wstępie. Praktyczne znaczenie tej rośliny wykracza więc poza stosowanie wyciągów, a stwierdzenie o najwyższej, w porównaniu z innymi organami, aktywności antyoksydacyjnej, antypłytkowej i przeciwzakrzepowej wyciągów z liści mniszka (Wniosek 2, str. 25 Autoreferatu) mogłoby być cenną wiadomością dla miłośników sałatek z liści mniszka.

Marginalna uwaga: czy „aktywność przeciwplatek” (termin powszechnie zresztą stosowany w polskim piśmiennictwie) jest terminem optymalnym? Dla laika oznaczałby aktywność niszcząca płytki czy hamującą wytwarzanie płytek, a nie o to przecież chodzi.

Nie mam zastrzeżeń do doboru i sposobu cytowania piśmiennictwa. Dobór pozycji piśmiennictwa jest właściwy, a sposób cytowania poprawny.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana z zastosowaniem standardowych metod, umożliwiając uzyskanie wiarygodnych wyników.

Należy zaznaczyć, że rozprawa doktorska Pani mgr Bernadetty Lis była finansowana m.in. przez NCN - projekt PRELUDIUM 14 pt. „Fenolowe frakcje z różnych organów mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*) jako potencjalne modulatory hemostazy” (2017/27/N/NZ9/02009, rozpoczęcie projektu: 2018-08-14, zakończenie projektu: 2020-08-13). Głównym celem tego projektu badawczego była identyfikacja składu chemicznego liści, płatków, korzeni i owoców mniszka pospolitego, przy użyciu technik chromatograficznych.

### ***Merytoryczna i edytorska ocena Rozprawy Doktorskiej***

Przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych (dyscyplina nauki biologiczne) Pani mgr Bernadetty Lis pt. „Polifenolowe ekstrakty z różnych części mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*) jako modulatory hemostazy” wykonana pod kierunkiem promotora - dr hab. Beaty Olas, prof. UŁ jest cyklem sześciu powiązanych tematycznie prac (pięciu prac doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej), opatrzonych omówieniem. Tytuł rozprawy precyzyjnie określa zakres pracy. Wstęp Autoreferatu po części dostarcza przesłanek do zdefiniowanego celu badawczego (patrz uwagi powyżej) oraz metod, po których następują omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wnioski oraz streszczenie.

Artykuły składające się na rozprawę doktorską zostały opublikowane w czasopiśmie *Food Research International* ( $IF_{2018} = 3,579$ ), *Food and Chemical Toxicology* ( $IF_{2019} = 4,679$ ), *Journal of Functional Foods* ( $IF_{2019} = 3,701$ /trzy artykuły) oraz *Molecules* ( $IF_{2019} = 3,267$ ). Poza dwoma z tych artykułów, wszystkie prace zostały opublikowane w 2019 roku. Za wyjątkiem jednego z wymienionych czasopism (*Molecules*) pozostałe czasopisma nie są przypisane do dyscypliny nauki biologiczne.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania, Impact Factor publikacji (w roku opublikowania), wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 22,628 (480 punktów MNiSW).

W pięciu publikacjach Pani mgr Bernadetta Lis jest pierwszą autorką. Należy zaznaczyć, że Doktorantka jest korespondującym autorem jednej z prac doświadczalnych składających się na rozprawę doktorską oraz pracy poglądowej, co jest przeze mnie przyjęte pozytywnie. Praca poglądowa jest świetnym przeglądem prozdrowotnych właściwości mniszka pospolitego, wystawiającym znakomite świadectwo skrupulatności Autorki. Można jednak polemizować z cytowanym zdaniem: „*These components possess the ability to scavenge harmful free radicals that are capable of attacking the healthy cells of the body, causing them to lose their structure and function. As cell damage caused by free radicals appears to be a major contributor to degenerative diseases such as cancer, cardiovascular disease or osteoporosis*” (patrz str. 40, publikacja 6).

Udział Doktorantki w powstaniu prac składających się na rozprawę doktorską wyceniany jest w jednym przypadku na 32%, w pozostałych na 50-60%. Ciekawość moją budzi metodyka oceniania wkładu procentowego z dokładnością do 1%. Treść oświadczeń wszystkich współautorów nie pozostawia także wątpliwości, że Doktorantka odegrała kluczową rolę w ich powstaniu, zarówno na etapie planowania badań, wykonania doświadczeń, interpretacji wyników, a wreszcie przygotowania manuskryptów. W znakomitej większości prac udział Pani mgr Bernadetty Lis polegał na: realizacji części doświadczalnej (oznaczenie parametrów stresu oksydacyjnego tj. peroksydacji lipidów w płytkach krwi metodą z kwasem tiobarbiturowym, poziomu grup tiolowych i grup karbonylowych w białkach płytek krwi metodą kolorymetryczną, generacji anionorodnika ponadtlenkowego w płytkach krwi metodą redukcji cytochromu c; oznaczenie parametrów hemostazy tj. czasów krzepnięcia metodą koagulometryczną; oznaczenie parametrów cytotoksyczności metodą Wróblewskiego i La Due), opracowaniu wyników, analizie statystycznej, wykonaniu rycin i przygotowaniu części manuskryptu.

Materiał roślinny tj. korzenie, liście, płatki i owoce mniszka pospolitego został zebrany w okolicach Rzeszowa. Chciałabym zapytać Doktorantkę dlaczego zdecydowała się zebrać rośliny z terenu podkarpacia? Czy w województwie łódzkim chwasty te nie występują?

Analiza składu chemicznego poszczególnych organów mniszka pospolitego została przeprowadzona w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów, w Instytucie Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Autorzy otrzymali preparaty z ww. organów mniszka pospolitego różne pod względem składu chemicznego. Z frakcji 50% liści mniszka pospolitego wyizolowano kwas cykoriowy (2,3-O-dikawoilo-L-winowy). Recenzenta dziwi fakt, że żaden spośród autorów przedłożonych do oceny manuskryptów nie przypisuje sobie wykonania analiz fitochemicznych badanych ekstraktów z mniszka pospolitego przy użyciu m.in. takich technik jak ultrasprawa chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas (ang. *ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; UHPLC-MS/MS)

(Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Autoreferat). Skąd więc wzięły się te dane w publikacjach?

Poziom merytoryczny artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Bernadetty Lis jest akceptowalny. Niemniej jednak decydująca różnica pomiędzy pracami doświadczalnymi dotyczy materiału użytego do badań tj. organu mniszka pospolitego (liście, płatki, korzeń, owoce), z którego zostały wykonane preparaty (praca wymieniona jako 1, 2 oraz 5). Nie widzę potrzeby rozparcelowywania wyników na kilka artykułów skoro dotyczą tej samej rośliny. Zdaniem recenzentki co najmniej trzy prace doświadczalne wymienione jako pierwsze mogłyby być przedstawione w jednym, zbiorczym artykule, o większej wartości naukowej i prawdopodobnie bardziej cytowanym. Można więc byłoby zarzucić Autorom niepotrzebne mnożenie liczby publikacji, jednak ten zarzut byłby niestuszny w świetle specyfiki polityki naukowej obowiązującej w naszym kraju. Suma punktów, jakie uzyskałyby te trzy publikacje (przy obecnej punktacji czasopism) wyniosłaby  $140 + 100 + 100 = 340$  punktów, natomiast spłaszczona klasyfikacja czasopism na liście Ministerstwa Edukacji i Nauki kończy się na wartości 200 punktów. Zatem, nawet gdyby udało się Autorom stworzyć na podstawie uzyskanych wyników tak świetną publikację, że mogłaby być opublikowana w Nature czy Science, uzyskaliby za nią jedynie 200 punktów. Ten aspekt wymownie wskazuje na umiejętność Doktorantki i współautorów Jej publikacji dostosowania się do warunków „hiperpunktozy” i podejmowania optymalnych w tych warunkach decyzji publikacyjnych.

Dziwi mnie, że Doktorantka rozpoczyna omawianie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej („Ocena właściwości antypłytkowych badanych preparatów z mniszka pospolitego w osoczu i płytkach krwi”) od pracy 2, choć praca wymieniona jako pierwsza powstała przecież wcześniej. Prosiłabym Doktorantkę o wytłumaczenie dlaczego frakcje bogate w pochodne kwasów hydroksycynamonowych (tj. 50% frakcja z liści i 50% frakcja z płatków) okazały się być bardziej efektywne pod względem aktywności przeciwutleniającej, niż frakcje bogate we flawonoidy. Czy można postulować, że kwas cykoriowy (naturalny kwas fenolowy, stosowany jako nutraaceutyczny składnik żywności w związku z wykazywanym działaniem prozdrowotnym) odgrywa decydującą rolę jako substancja działająca przeciwmiążdżycowo? Czy kwas cykoriowy jest zdaniem Doktorantki lepszym przeciwutleniaczem niż np. kurkumina? Czy flawonoidy i ich pochodne mogą wykazywać działanie prooksydacyjne?

Jako czynnik indukujący stres oksydacyjny w osoczu i w odniesieniu do płytek krwi Doktorantka stosowała układ generujący rodniki hydroksylowe: 4.7 mM nadtlenuk wodoru, 3.8 mM  $\text{FeSO}_4$ /2.5 mM EDTA. Trudno nie zwrócić uwagi na błąd na poziomie nieznamomości podstaw chemii. Doktorantka konsekwentnie pisze „ $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ” zamiast  $\text{FeSO}_4$  i na ten błąd nie zwrócili również uwagi redaktorzy i recenzenci kilku renomowanych międzynarodowych czasopism naukowych pozwalając na publikację formuły nieistniejącego związku. Należy nadmienić, że w innych pracach, w których współautorem jest Pani Promotor (np. Ewelina Piątczak, Łukasz Kuźma, Weronika Porada, Beata Olas, Halina Wysokińska. *Evaluation of antioxidant properties of methanolic extracts from leaves and roots of *Rehmannia Glutinosa* Libosch. In human blood.*

Acta Pol Pharm. 2015;72(4):777-83) wzory związków składających się na tą samą mieszaninę reakcyjną napisane są prawidłowo.

Opisy metodyki ekspozycji na ten układ są nieprecyzyjne: „*suspensions of blood platelets were [...] treated with*” (publikacja wymieniona jako 1 i inne). Nie jest jasne, czy podane stężenia odpowiadają końcowym stężeniom w zawieszynie, czy też roztwór o takim składzie był dodany do zawiesziny płytek, a jeśli tak, to jakie były proporcje objętości zawiesziny i roztworu? Odtworzenie doświadczenia na podstawie podanych informacji nie byłoby możliwe. Głównym problemem jest jednak skład i charakter zastosowanego czynnika indukującego stres oksydacyjny. Jest on zdecydowanie niefizjologiczny. Tak wysokie stężenia nadtlenu wodoru i  $\text{Fe}^{2+}$  nie występują w osoczu. Dlaczego kwas wersenowy, EDTA, jest stosowany w niedomiarze molowym w stosunku do  $\text{Fe}^{2+}$ ? Początkowo w roztworze znajdują się:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , jony  $\text{Fe}^{2+}$  i kompleks  $\text{EDTA-Fe}^{2+}$ . Od biochemika oczekiwałabym wstępnej charakterystyki takiego układu i jego działania na płytki krwi. Wydaje się, że wytwarzanie rodnika hydroksylowego w tym układzie ma miejsce głównie na zewnątrz płytek krwi. Nadtlenek wodoru może łatwo przenikać do wnętrza płytek krwi, natomiast nie jest jasne, w jakim stopniu przenikają jony  $\text{Fe}^{2+}$  i ich kompleks żelazawy. Zazwyczaj w doświadczeniach dotyczących działania takiego układu bada się wpływ kompletnego układu i poszczególnych składników oddzielnie. Brak mi takich wstępnych doświadczeń w składzie rozprawy doktorskiej.

Jak pisze Doktorantka, właściwości antykoagulacyjne badanych preparatów są spowodowane prawdopodobnie hamowaniem aktywności trombiny (str. 24 Autoreferatu). Czy nie warto było sprawdzić tej hipotezy doświadczalnie?

#### Kilka uwag szczegółowych:

Omówienie Autoreferatu i poszczególnych prac:

str. 15-16 Autoreferatu: Doktorantka pisze o „50%” i „85% frakcjach”, co może być niezrozumiałe bez podania informacji, że chodzi o frakcje ekstrahowane metanolem o stężeniu 50% i 85%.

str. 23 Autoreferatu: Doktorantka pisze (podobnie jak w pracy 5) o „ekspresji” receptorów na powierzchni płytek, oznaczanej techniką cytometrii przepływowej przez wiązanie odpowiednich ligandów. Czy nie należałoby mówić raczej o „ekspozycji” niż o ekspresji, który to termin kojarzony jest raczej z ekspresją genów?

Praca 1)

Ryc. 3 – brak kontroli negatywnej (płytki nie poddane działaniu układu  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ );

Wpływ ekstraktów na generację anionorodnika przez płytki: nie jest jasne, czy ekstrakty nie zmiatają w mierzalnym stopniu anionorodnika ponadtlenu, zatem czy w istocie mierzone jest wytwarzanie anionorodnika przez płytki, czy też wypadkowa ilości anionorodnika wytwarzanego przez płytki i jego reakcji ze związkami obecnymi w ekstraktach.

Ryc. 5 – Niepokojąca jest różnica poziomu grup tiolowych w płytkach kontrolnych nie traktowanych  $H_2O_2/Fe^{2+}/EDTA$  ( $0.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$  białka) i niepobudzonych płytkach (ok.  $0.11 \mu\text{mol}/\text{mg}$  białka), porównywalna z różnicami indukowanymi przez ekstrakty.

Praca 2)

Ryc. 7 – brak kontroli pozytywnej (aktywności LDH uwolnionej przez całkowitą liszę płytek), co pozwoliłoby na ocenę wielkości wpływu ekstraktów; podobnie w Pracy 4 (Ryc. 7) i Pracy 5 (Ryc. 13).

Praca 4)

Niepokojąca jest różnica poziomu produktów peroksydacji lipidów w niepobudzonych płytkach (Ryc. 2A:  $0.04 \text{ nmol}/10^8$  płytek) w porównaniu z Pracą 3, Ryc. 3A ( $0.02 \text{ nmol}/10^8$  płytek), a jeszcze bardziej różnica poziomu grup tiolowych w płytkach kontrolnych (Ryc. 3A – ok.  $23 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka), w porównaniu z Pracą 3 (Ryc. 5A - ponad  $400 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka), Pracą 1 (Ryc. 5A-B: ok.  $200$  i  $120 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka) i Pracą 5 (Ryc. 6: ok.  $12 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka).

Praca 5)

Poziom grup karbonylowych w kontrolnym osoczu wyniósł poniżej  $1 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka (Ryc. 4), podczas gdy w Pracy 2 -  $2 \text{ nmol}/\text{mg}$  białka (Ryc. 4).

#### **Podsumowanie**

W podsumowaniu stwierdzam, iż Doktorantka w przedstawionej do recenzji dysertacji wykazała się poprawną umiejętnością prowadzenia badań naukowych i umiejętnością wyciągania wniosków z uzyskanych wyników. Poczynione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie rzutują na jej pozytywną ocenę.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Wnoszę więc do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Bernadetty Lis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, dnia 28 listopada 2021

Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Uniwersytet Rzeszowski  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej  
*Izabela Sadowska-Bartosz*  
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz