



WŁOCSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa 28.07.2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Liudvytskiej

pt.: „Aktywność biologiczna metabolitów wtórnych rzewieni (*Rheum L.*) – ocena wpływu ekstraktów z *Rheum rhabarbarum* oraz *Rheum rhaponticum* na wybrane osoczowe oraz komórkowe składniki układu hemostazy *in vitro*”

Omawiana rozprawa na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne została przygotowana w Katedrze Biochemii Ogólnej, Instytutu Biochemii, Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką dr hab. Joanny Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ.

Substancje roślinne stanowią ważne źródło związków o potencjalnie biologicznym. Wiele z obecnych na rynku leków bezpośrednio zawiera substancje roślinne lub otrzymane z nich przetwory, związki chemiczne izolowane z materiału roślinnego bądź ich syntetyczne pochodne. Trend ten jest od lat obserwowany w lecznictwie i badaniach naukowych. Jednak znaczenie roślin jest dużo szersze, nie tylko leczenie czy wspomaganie leczenia, ale ważne są one jako składniki diety w prewencji rozwoju wielu schorzeń.

Jednymi z najczęstszych przyczyn m.in. przedwczesnych zgonów u ludzi są choroby układu krążenia, na które corocznie w Polsce umiera 200 tysięcy osób. W tej grupie schorzeń zarówno działanie antyoksydacyjne jak i wykazują substancje roślinne, jak i ich aktywność przeciwzapalna, przeciwzakrzepowa, przeciwcukrzycowa czy hipolipidemiczna mogą dawać pozytywne efekty.

Rzewień/rabarbar (*Rheum L.*) to rodzaj z rodziny Polygonaceae obejmujący około 60 gatunków roślin. Są one wykorzystywane jako surowce jadalne, ale także jako surowce lecznicze. Jednak działanie biologiczne i fizjologiczne wyciągów

otrzymywanych z substancji roślinnych z tego rodzaju w przypadku większości gatunków nadal pozostaje jedynie częściowo poznane.

Najlepiej opisanymi w literaturze są gatunki *Rheum palmatum* i *Rheum officinale*, z których pozyskane substancje roślinne są stosowane jako środki przeczyszczające. Jednak można znaleźć doniesienia, że w medycynie tradycyjnej w leczeniu schorzeń układu krążenia wykorzystywane są surowce pozyskane z *Rheum rhaponticum* oraz *Rheum rhabarbarum*.

Celem przedstawionej do recenzji pracy była ocena wpływu frakcji butanolowych otrzymanych z zakwaszonych wyciągów metanolowych z ogonków liściowych oraz korzeni pozyskanych z ww. dwóch gatunków rzewieni oraz typowych dla tych gatunków stylbenów (rapontygeniny i rapontycyny) na funkcjonowanie wybranych osoczowych i komórkowych składników układu hemostazy. Doktorantka skupiła się w swoich badaniach na aktywnościach kluczowych dla kardioprotekcyjnego działania substancji naturalnych, czyli działaniu przeciwzapalnym, antykoagulacyjnym/przeciwzakrzepowym oraz przeciwutleniającym. Wybór takiego zakresu badań został przez Doktorantkę wyczerpująco udowodniony w oparciu o dostępną literaturę.

Rozprawa została przygotowana jako cykl powiązanych tematycznie czterech publikacji naukowych (trzech oryginalnych i jednej przeglądowej) opublikowanych w renomowanych czasopismach zagranicznych z listy JCR. W skład pracy wchodzi następujące artykuły:

Praca przeglądowa

(I) Kolodziejczyk-Czepas, J., **Liudvytska, O.*** *Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum: a review of phytochemistry, biological activities and therapeutic potential*. *Phytochemistry Reviews* (SPRINGER), 2021, 20, 589-607. DOI: 10.1007/s11101-020-09715-3. Punkty MEiN₂₀₂₃: **100**; Impact Factor₂₀₂₁ **7,741**

Prace oryginalne

(II) **Liudvytska O.***, Ponczek M.B., Ciesielski O., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Balcerczyk A., Kolodziejczyk-Czepas J. *Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum extracts as modulators of endothelial cell inflammatory response*. *Nutrients* (MDPI), 2023; DOI: 10.3390/nu15040949. Punkty MEiN₂₀₂₃: **140**, Impact Factor₂₀₂₂ **5,9**

(III) **Liudvytska O.***, Ponczek M.B., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Balcerczyk A., Kolodziejczyk-Czepas J. *Effects of Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum extracts on haemostatic activity of blood plasma components and endothelial cells in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* (ELSEVIER), 2023, DOI: 10.1016/j.jep.2023.116562; Punkty MEiN₂₀₂₃: **140**, Impact Factor₂₀₂₂ **5,4**

(IV) **Liudvytska O.***, Bandyszewska M., Skirecki T., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Kołodziejczyk-Czepas J. *Anti-inflammatory and antioxidant actions of extracts from Rheum raphaniticum and Rheum rhabarbarum in human blood plasma and cells in vitro*. Biomedicine and Pharmacotherapy (ELSEVIER), 2023, DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115111; Punkty MEiN₂₀₂₃: **140**, Impact Factor₂₀₂₂ **7,5**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania przedłożonych prac to 26,541 co odpowiada 520 pkt MEiN. Każda z prac została opatrzona stosownym opisem wkładu Doktorantki oraz oświadczeniami współautorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w załączonych publikacjach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, a we wszystkich pracach autorem korespondencyjnym oraz jej wkład w powstanie każdej z nich był wiodący. Pod tym względem przedłożona rozprawa spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. W mojej ocenie osiągnięcia publikacyjne Pani mgr Aleksandry Liudvytskiej są wyróżniające.

Pierwsza praca włączona do cyklu doktorskiego to artykuł przeglądowy opublikowany w renomowanym czasopiśmie zagranicznym *Phytochemistry Reviews*. Doktorantka dokonała dogłębnego przeglądu literatury dotyczącej składu chemicznego, aktywności biologicznych oraz zastosowań w medycynie ludowej gatunków *Rheum raphaniticum* i *Rheum rhabarbarum* opublikowanej do marca 2020 roku. Praca jest przygotowana w sposób bardzo staranny i w mojej ocenie wyczerpujący. Potwierdza ona zarówno znajomość jak i dobre rozumienie tematyki badawczej podjętej przez Kandydatkę do stopnia. Artykuł jest doskonałym źródłem wiedzy dla wszystkich badaczy zajmujących się składem chemicznym i aktywnością biologiczną wyciągów z opisanych gatunków *Rheum*.

W **publikacji drugiej**, pt. „*Rheum raphaniticum and Rheum rhabarbarum extracts as modulators of endothelial cell inflammatory response*” przedstawiono doświadczenia związane z oceną aktywności przeciwzapalnej badanych frakcji i związków pod kątem ich zdolności do modulowania odpowiedzi zapalnej śródbłonna. W pracy zastosowano panel doświadczeń umożliwiający ocenę wpływu badanych frakcji i stylbenów na różne elementy i etapy odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna. Dowiedziono, że wykazują one działanie przeciwzapalne i mogą modulować odpowiedź prozapalną komórek śródbłonna na różnych poziomach: ekspresji genów dla enzymów prozapalnych, uwalniania cytokin i interakcji z leukocytami.

W publikacji tej znalazły się również wyniki analiz *in silico* potwierdzające obserwacje z przeprowadzonych badań doświadczalnych oraz szczegółowa charakterystyka fitochemiczna badanych frakcji.

Co prawda Doktorantka zaznacza, że badania składu oraz zawartości związków obecnych w badanych frakcjach nie wchodzi bezpośrednio w zakres badawczy pracy ale godne odnotowania jest zaplanowanie w projekcie badań fitochemicznych, bez których znaczenie otrzymanych wyników byłoby trudne do oszacowania.

Publikacja trzecia, pt. „Effects of Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum extracts on haemostatic activity of blood plasma components and endothelial cells in vitro” przedstawia wyniki doświadczeń dotyczących wpływu frakcji i stylbenów na odpowiedź hemostatyczną komórek śródbłonka oraz aktywność hemostatyczną wybranych składników osocza krwi. Aby uzyskać jak najszerszy obraz działania badanych frakcji i związków doświadczenia zostały podzielone na trzy bloki eksperymentalne, obejmujące aktywność osoczowych białek krzepnięcia krwi, działanie układu fibrynolitycznego oraz odpowiedź hemostatyczną komórek śródbłonka.

Przeprowadzone testy wykazały, że jedynie badane frakcje butanolowe wpływały hamująco na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi (szlak krzepnięcia zależny od czynnika tkankowego).

W celu wskazania najbardziej prawdopodobnych mechanizmów i/lub celów molekularnych, kolejne etapy badania obejmowały analizy ich wpływu na dwie kluczowe proteazy serynowe krzepnięcia: czynnik krzepnięcia Xa i trombinę (czynnik krzepnięcia IIa). Wykazano, że badane frakcje hamowały aktywność obu badanych enzymów kaskady krzepnięcia.

Badane frakcje hamowały również aktywność amidolityczną i proteolityczną trombiny (zwłaszcza frakcje uzyskane z korzeni), natomiast stylbeny wykazywały niewielką zdolność hamowania hydrolitycznej aktywności trombiny.

Istotną obserwacją wynikającą z badań jest nieznaczny wpływ badanych frakcji na aktywność generowanej plazminy, centralnej proteazy serynowej układu fibrynolitycznego. Daje to podstawy do twierdzenia, że badane frakcje mogą być rozpatrywane i badane dalej pod kątem działania przeciwzakrzepowego, jako

potencjalne selektywne inhibitory białek kaskady krzepnięcia.

W badaniu odpowiedzi hemostatycznej komórek śródbłonka zaobserwowano, że badane frakcje i stylbeny modulują aktywność profibrynolityczną i ograniczają procesy sekrecyjne komórek śródbłonka.

Prace druga i trzecia powstały we współpracy z Katedrą Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego.

Natomiast **praca czwarta** pt. "*Anti-inflammatory and antioxidant actions of extracts from Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum in human blood plasma and cells in vitro*" powstała częściowo we współpracy z Zakładem Immunologii Translacyjnej i Eksperymentalnej Intensywnej Terapii, CMKP. Zawiera ona wyniki badań właściwości przeciwutleniających i przeciwzapalnych badanych frakcji oraz związków. Doświadczenia dotyczyły oceny zdolności badanych frakcji i stylbenów do ochrony składników osocza krwi przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, a także hamowania odpowiedzi zapalnej leukocytów.

Ocenę potencjalnego działania przeciwzapalnego w stosunku do leukocytów prowadzono stosując 2 modele badawcze - ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs) oraz inflammasomalne komórki reporterowe THP1-ASC-GFP.

Otrzymane wyniki wskazują, że badane frakcje i związki wykazują właściwości przeciwzapalne, bezpośrednio hamując metabolizm kwasu arachidonowego, a także zmniejszając uwalnianie substancji o działaniu prozapalnym z leukocytów.

Przeprowadzone doświadczenia wpływu ochronnego na składniki osocza przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym wykazały, że badane frakcje i stylbeny zmniejszały zakres oksydacyjnych i nitracyjnych modyfikacji białek oraz peroksydacji lipidów osocza krwi, wywołanych działaniem ONOO⁻. Ponadto, normalizowały, a nawet wzmacniały pojemność antyoksydacyjną osocza krwi. A także ograniczały oksydacyjne uszkodzenia fibrynogenu.

Doktorantka w trakcie realizacji pracy wykorzystywała dużą liczbę różnorodnych metod badawczych takich jak: test redukcji resazury, qPCR, mikropłytkowy spektrofotometryczny test skriningowy, profilowanie metodą blottingu, mikroskopię fluorescencyjną, test z zastosowaniem błękitu trypanu,

mikropłytkowe enzymatyczne testy immunosorpcyjne ELISA, kinetyczne pomiary aktywności enzymatycznej trombiny, kinetyczne monitorowanie procesu wykrzepiania osocza, oznaczenia fluorymetryczne, amidolityczne oznaczenia aktywności plazminy, pomiary spektrofotometryczne oraz elektroforezę w połączeniu z analizami densytometrycznymi. Zastosowanie tak wielu metod pozwoliło Doktorantce na zbadanie szeregu aktywności badanej frakcji oraz stylbenów w kontekście potencjalnego działania kardioprotekcyjnego oraz analizę ich mechanizmów /poszukiwanie celów molekularnych. Wybór metod pozwolił Doktorantce w pełni zrealizować wyznaczony cel badań.

Po lekturze przedłożonej rozprawy doktorskiej nie mam wątpliwości, że spełnia ona formalne i zwyczajowe kryteria stawiane tego typu opracowaniom. Doktorantka przedstawiła w pracy oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i udowodniła swoją ogromną ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie uprawianej dyscypliny naukowej. Tym samym Doktorantka spełnia wymogi formalne i merytoryczne przedstawione w Dziale V, art. 187 pkt 1-4 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r.).

W trakcie przygotowywania niniejszej recenzji nasunęło mi się kilka uwag i pytań. **Prosiłabym, aby Doktorantka odniosła się do poniższych punktów.**

1. Z ciekawości chciałabym zapytać dlaczego wybrano do badań akurat te dwa gatunki z rodzaju *Rheum*. Skąd taka inspiracja?
2. W żadnej z prac nie znalazłam informacji kto przeprowadził botaniczną identyfikację badanych gatunków.
3. Dlaczego stosowano stylbeny otrzymane komercyjnie, a nie izolowane z badanego materiału?
4. Z dostępnej literatury wiadomo, że ksenobiotyki w tym substancje chemiczne zawarte w wyciągach roślinnych podawane doustnie mogą podlegać różnemu metabolizmowi. Proszę o skomentowanie tego problemu w świetle przeprowadzonych badań biologicznych i ustosunkowanie się do kwestii biodostępności związków.
5. Jak Doktorantka widzi przyszłą rolę w profilaktyce i leczeniu badanych frakcji i związków?
6. Jako farmakognosta jestem zobligowana do zwrócenia uwagi na błędy

/nieścisłości w polskiej terminologii. Doktorantka użyła zwrotu „wyzolowaniem badanych ekstraktów”, wyciągi są otrzymywane/przygotowywane, natomiast pojedyncze substancje chemiczne z wyciągów są izolowane. Skrótem myślowym jest natomiast stosowanie zwrotów: „badane substancje roślinne”, „badane gatunki” podczas gdy do badań użyto frakcji butanolowych otrzymanych z zakwaszonych wyciągów metanolowych. Przedstawione w pracy działania zostały wykazane jedynie dla frakcji, a aktywność substancji roślinnej jest wypadkową aktywności wielu związków z różnych grup chemicznych, nie tylko rozpuszczalnych w butanolu.

Powyższe pytania i komentarze nie wpływają w sposób istotny na jakość recenzowanej pracy, a przedłożona przez mgr Oleksandrę Liudvytską rozprawa doktorska pt.: „Aktywność biologiczna metabolitów wtórnych rzewieni (*Rheum L.*) – ocena wpływu ekstraktów z *Rheum rhabarbarum* oraz *Rheum rhaponticum* na wybrane osoczowe oraz komórkowe składniki układu hemostazy *in vitro*” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w związku z czym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Oleksandry Liudvytskiej do dalszych etapów prowadzonego postępowania o nadanie stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionych przez Doktorantkę osiągnięć naukowych zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Przedłożona do recenzji praca ma wysoki poziom merytoryczny o czym mogą świadczyć prace, w których zostały opublikowane wyniki badań Pani mgr Oleksandry Liudvytskiej. Sumaryczny współczynnik oddziaływania prac to 26,541 co odpowiada 520 pkt MEiN. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w załączonych publikacjach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, a we wszystkich pracach autorem korespondencyjnym.

Po raz pierwszy podjęto badania obejmujące aktywność biologiczną frakcji butanolowych otrzymanych z wyciągów z różnych organów dwóch gatunków rzewienia (*R. rhaponticum* i *R. rhabarbarum*) oraz dwóch stylbenów (rapontygeniny i rapontycyny), występujących w tych roślinach, pod kątem ich wielokierunkowego działania ochronnego na składniki układu hemostazy.

Ponadto przeprowadzone doświadczenia stanowią pierwsze badania dotyczące właściwości ochronnych badanych frakcji i stylbenów w stosunku do składników osocza.

A także po raz pierwszy wykazano zdolność badanych frakcji otrzymanych z wyciągu z ogonków liściowych i korzeni dwóch gatunków rzewienia oraz stylbenów do ograniczania uszkodzeń składników osocza, wywołanych stresem oksydacyjnym.

dr hab. n. farm. Agnieszka Bazylko

