

**Dr hab. n. farm. prof. UM. Przemysław Sitarek**

Kierownik Zakładu Biologii Medycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Oleksandry 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*”**

**wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii pod kierunkiem**

**dr hab. Joanny Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ**

Podstawą wykonania recenzji jest powołanie na Recenzenta przez Komisję Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 27 czerwca 2023 r. Postępowanie jest prowadzone na podstawie przepisów ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były finansowane w większości w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), uzyskanego w konkursie OPUS: „Aktywność biologiczna ekstraktów z wybranych gatunków rzewienia (*Rheum L.*) - badania właściwości surowca w aspekcie oceny potencjału kardioprotekcyjnego” (UMO2018/31/B/NZ9/01238), którego kierownikiem projektu była p. dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ, a wykonawcą: mgr Oleksandra Liudvytska. Pani mgr Oleksandra Liudvytska realizowała badania przedstawione w dysertacji również we współpracy z Zakładem Biochemii i Jakości Plonów, Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, Katedrą Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego oraz Zakładem Immunologii Translacyjnej i Eksperymentalnej Intensywnej Terapii, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy wpływu różnych ekstraktów z dwóch gatunków rzewienia na funkcjonowanie wybranych osoczowych i komórkowych składników układu hemostazy, w kontekście aktywności biologicznej, która może być jedną z kluczowych dla kardioprotekcyjnego działania substancji naturalnych, to jest: działanie przeciwzapalne,

antykoagulacyjne/przeciwwzkrzepowe oraz przeciwutleniające. Choroby układu krążenia, są najczęstszą przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Mimo coraz lepszej diagnostyki i bardziej nowoczesnych metod leczenia, w Polsce, co roku z powodu chorób układu krążenia umiera około 200 tysięcy osób. W przeciwdziałaniu rozwojowi chorób układu sercowo-naczyniowego kluczowe znaczenie ma styl życia i dieta, które w odróżnieniu od predyspozycji genetycznych, są czynnikami modyfikowalnymi. Molekularne podłoże tych schorzeń obejmuje nie tylko procesy zapalne i związany z nimi stres oksydacyjny, ale także pobudzenie płytek krwi oraz osłabienie mechanizmów przeciwwzkrzepowych osocza krwi i śródbłonna naczyń krwionośnych (dysfunkcja śródbłonna). Dlatego też nieustannie poszukuje się nowych substancji o wielokierunkowym prozdrowotnym działaniu, mogących modulować funkcjonowanie różnych elementów układu sercowo-naczyniowego - zarówno komponentów ściany naczyniowej, jak i składników krwi. Ważnym źródłem takich składników pozostają niezmiennie rośliny. Interesującą rośliną o szerokim zastosowaniu jest rzewień potocznie zwany rabarbarem należący do rodziny *Polygonaceae* i ceniony jako surowiec jadalny i/lub leczniczy. Rabarbar znany jest przede wszystkim od tysiącleci w tradycyjnej medycynie Azji, ale część gatunków uprawiana jest również w celach spożywczych i jako surowiec zielarski na innych kontynentach. Pomimo powszechnego zastosowania rzewienia do celów kulinarnych i etnomedycznych, biologiczne działanie ekstraktów pozyskiwanych z większości gatunków nadal pozostaje jedynie częściowo poznane. Literatura naukowa przedstawia wiele danych na temat profilu chemicznego i właściwości biologicznych ekstraktów z różnych gatunków rzewienia, jednak brak jest kompleksowego spojrzenia na działanie tych roślin, zwłaszcza pod kątem wpływu na układ sercowo-naczyniowy. Ponadto, mechanizmy większości typów aktywności biologicznej niektórych gatunków, jak na przykład *R. rhaponticum* i *R. rhabarbarum*, są tylko częściowo lub słabo opisane.

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej pani mgr Oleksandra Liudvytska podjęła się zatem istotnego z punktu widzenia medycyny problemu sprawdzenia wpływu ekstraktów z rzewieni na funkcjonowanie wybranych osoczowych i komórkowych składników układu hemostazy. Doktorantka swoje prace badawcze podzieliła w jasny i klarowany sposób na trzy moduły eksperymentalne; (1) moduł przeciwzapalny: badania właściwości przeciwzapalnych ekstraktów z rzewienia i stilbenów, prowadzone w celu oceny zdolności badanych substancji modulowania odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna i leukocytów, w tym regulacji ekspresji genów i hamowania aktywności enzymów prozapalnych - cyklooksygenazy-2 (COX-2) i 5-lipooksygenazy (5- LOX); (2) moduł hemostatyczny: ocena wpływu ekstraktów z rzewienia i stilbenów na aktywność osoczowych elementów układu hemostazy (białek kaskady krzepnięcia krwi i układu fibrynolitycznego) oraz odpowiedź hemostatyczną komórek śródbłonna (3); moduł antyoksydacyjny: ocena działania przeciwutleniającego badanych ekstraktów i stilbenów w aspekcie ich zdolności do ochrony składników osocza krwi przed uszkodzeniami, w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego

nadtlenoazotynem. Takie badania nie zostały do tej pory przeprowadzone, w związku z tym ich podjęcie jest niezwykle istotne i w pełni uzasadnione co stanowi o oryginalności rozwiązania problemu badawczego.

Na recenzowaną rozprawę doktorską składa się cykl czterech powiązanych tematycznie publikacji naukowych- jedna praca przeglądowa oraz trzy oryginalne.

Praca przeglądowa

- (I) Kołodziejczyk-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 MEiN2021: 100; Impact Factor2021 7,741

Prace oryginalne

- (II) **Liudvytska O.\***, Ponczek M.B., Ciesielski O., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Balcerczyk A., Kołodziejczyk-Czepas J. *Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum* extracts as modulators of endothelial cell inflammatory response. *Nutrients* (MDPI), 2023; DOI: 10.3390/nu15040949. Punkty MEiN2021: 140, Impact Factor 2021 6,706
- (III) **Liudvytska O.\***, Ponczek M.B., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Balcerczyk A., Kołodziejczyk-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 MEiN2021: 140, Impact Factor 2021 5,195
- (IV) **Liudvytska O.\***, Bandyszewska M., Skirecki T., Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Kołodziejczyk-Czepas J. Anti-inflammatory and antioxidant actions of extracts from *Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum* in human blood plasma and cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 165, September 2023, 11511; Punkty MEiN2021: 140, Impact Factor 2021 7,5

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 27,142 oraz 520 punktów MEiN. Z załączonych do dokumentacji oświadczeń wszystkich autorów wynika, że Doktorantka prawie we wszystkich publikacjach miała wiodący wkład w ich powstawanie **oraz we wszystkich pracach jest pierwszym lub ostatnim autorem korespondencyjnym, co niewątpliwie świadczy o dużej samodzielności naukowej.** W pierwszej pracy opublikowanej w *Phytochemistry Review* (2021) mgr Aleksandra Liudvytska deklaruje znaczący udział w napisaniu i zredagowaniu pracy przeglądowej (wkład 74%) oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

W kolejnej pracy opublikowanej w 2023 r czasopiśmie *Nutrients* doktorantka deklaruje, że jej wkład (42%) polegał na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, uczestniczeniu w izolowaniu komórek

śródbłonka, przeprowadzeniu wszystkich oznaczeń dotyczących wpływu badanych ekstraktów i związków na żywotność i odpowiedź zapalną komórek śródbłonka, wykonaniu analiz statystycznych i uczestniczeniu w interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu ze wszystkimi jego elementami. W trzeciej pracy cyklu, a zarazem drugiej oryginalnej opublikowanej w 2023 r w czasopiśmie *Journal of Ethnopharmacology*, Doktorantka deklaruje swój wkład (55%), polegający na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, uczestniczeniu w izolowaniu komórek śródbłonka i oznaczaniu aktywności badanych białek, przeprowadzeniu wszystkich oznaczeń dotyczących wpływu badanych ekstraktów i związków na żywotność i odpowiedź zapalną komórek śródbłonka, wykonaniu analiz statystycznych i uczestniczeniu w interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu ze wszystkimi jego elementami. Ostatnią oryginalną pracą w cyklu która na etapie otrzymania niniejszej pracy do recenzji była na etapie złożenia do redakcji czasopisma jest opublikowana w 2023 r. w czasopiśmie *Biomedicine and Pharmacotherapy* w której, Doktorantka deklaruje swój wkład znaczący bo aż 74% na przeprowadzeniu w zawartych w pracy oznaczeń dotyczących wpływu badanych ekstraktów i związków na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, osocze i fibrynogen oraz współwykonaniu oznaczeń odpowiedzi komórek THP1-ACS-GFP. Dodatkowo Doktorantka wykonała analizy statystyczne i uczestniczyła w interpretacji wyników, a także przygotowała pierwotną wersję manuskryptu obejmującą wstęp, metodykę, opis wyników oraz ich dyskusję. Zadeklarowany przez Doktorantkę wkład w powstanie cyklu potwierdzają również załączone do dysertacji oświadczenia Współautorów (deklarowany udział Współautorów był na poziomie od 3% do 25%) .

Poza recenzowanym cyklem publikacji wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej, Doktorantka jest współautorem pięciu artykułów naukowych z czego dwa opublikowane są w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Sumaryczna liczba punktów dla całkowitego dorobku naukowego mgr Oleksandry Liudvytskiej według listy czasopism punktowanych MEIN wynosi 800, sumaryczny IF w roku opublikowania wynosi 38,275. Ponadto mgr Oleksandra Liudvytska jest współautorką 7 prezentacji ustnych zaprezentowanych na konferencjach naukowych, w których we wszystkich przypadkach była osobą prezentującą; jest również współautorem 4 posterów. Jak przedstawiono wcześniej Doktorantka jest wykonawcą w projekcie badawczym, finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki „Aktywność biologiczna ekstraktów z wybranych gatunków rzewienia (*Rheum L.*) - badania właściwości surowca w aspekcie oceny potencjału kardioprotekcyjnego”, ale także uczestnikiem międzynarodowego konsorcyjnego projektu RiEcoLab Responsible Innovation Led Entrepreneurial University Transformation Centres (Ecosystem Integration Labs) (Konsorcjum Innowacyjnych Uczelni Wyższych - Centra Transformacji Przedsiębiorczych Uniwersytetów na Rzecz Odpowiedzialnych Innowacji (Laboratoria Transformacji Ekosystemu). Dodatkowo ukończyła liczne kursy praktyczne, szkolenia zawodowe oraz intensywnie

udzielała się na rzecz Uczelni w ramach działalności organizacyjnej i promocyjnej. Przytoczony powyżej dorobek Doktorantki świadczy o dużej aktywności zarówno pod kątem badawczym jak i organizacyjnym, a wykonana w bazie Scopus analiza bibliometryczna 6 prac opublikowanych w latach 2021-2023, w których Doktorantka jest współautorem było cytowane 41 razy co daje Autorce indeks Hirscha= 3 . Jest to bardzo dobry rezultat biorąc pod uwagę dość krótki staż pracy naukowej mgr Oleksandry Liudvytskiej.

### **Celowość podjęcia tematu oraz ocena formalna pracy**

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu ekstraktów z dwóch gatunków rzewienia - *Rheum rhaponticum* L. oraz *Rheum rhabarbarum* L. oraz typowych dla tych surowców stilbenów (rapontygeniny i rapontycyny) na funkcjonowanie wybranych osoczowych i komórkowych składników układu hemostazy. Przedmiotem prac badawczych były aktywności biologiczne wskazywane jako jedne z kluczowych dla kardioprotekcyjnego działania substancji naturalnych, to jest: działanie przeciwzapalne, antykoagulacyjne/przeciwzakrzepowe oraz przeciwutleniające. Przedłożona do recenzji książkowa wersja rozprawy ma typowy układ dla opracowań tzw. „zszywki”, a mianowicie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Praca składa się z typowo sformatowanej strony tytułowej i spisu treści. Następnie Doktorantka zamieściła informację o źródle finansowania swoich badań (Narodowe Centrum Nauki (NCN), uzyskanego w konkursie OPUS: „Aktywność biologiczna ekstraktów z wybranych gatunków rzewienia (*Rheum* L.) - badania właściwości surowca w aspekcie oceny potencjału kardioprotekcyjnego” (UMO2018/31/B/NZ9/01238), informację o współpracach z ośrodkami naukowymi w ramach których powstała niniejsza dysertacja, oraz prezentację dorobku naukowego z wyszczególnieniem publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej, a także spis pozostałych osiągnięć i aktywności Doktorantki. W dalszej części jest syntetyczny opis badań, które zostały przedstawione w formie czterech artykułów. Opis został poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim, choć brak jest skrótów stosowanych w pracy. Opis badań ma typowy układ dla opracowań naukowych. Zawiera krótki wstęp, który stanowi ciekawe i bardzo klarowne wprowadzenie dotyczące chorób układu krążenia i mechanizmów wpływających na ich rozwój, a także prezentacje i praktyczne zastosowanie analizowanych w pracy roślin zarówno pod kątem etnomedycznym jak i fitochemicznym, co jednocześnie uzasadnia celowość prowadzonych przez Doktorantkę badań. W tej części pracy można zauważyć jedną rycinę, która w jasny sposób przedstawia główne elementy układy hemostazy, modelu na którym opierała się część badawcza.

Cel pracy (hipoteza badawcza) i cele szczegółowe zostały sformułowane w sposób zrozumiały i logiczny i na kolejnych etapach badań były konsekwentnie realizowane i opublikowane w czterech recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Sekcja „Materiały i Metody” przedstawiona przez Doktorantkę jako „Modele doświadczalne i główne metody badawcze” stanowi raptem krótki syntetyczny opis szczegółowo opisany w załączonych artykułach.

Z kolei „Literatura” w liczbie 45 przedstawiona przez Doktorantkę w pracy jest zasadna i w pełni prawidłowo dobrana do analizowanych tematów, a co warto podkreślić w większości anglojęzyczna i pochodząca z renomowanych czasopism.

Opis badań kończy się zwięzłym i treściwym podsumowaniem wyników, które zawarte są w pracach oryginalnych oraz czterema wnioskami końcowymi adekwatnymi do uzyskanych wyników, choć trochę brakuje w nich bardziej konkretnego przedstawienia i wyselekcjonowania, który ekstrakt czy związek miał najlepsze działanie w każdym z analizowanych bloków badawczych.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić pewne uwagi które nasunęły się po przeczytaniu niniejszej rozprawy. Wnioski końcowe przedstawione przez Doktorantkę są trochę zbyt ogólne i w porównaniu do zaprezentowanych prac opisanych w dysertacji przy sekcji wyniki powinny być bardziej wyeksponowane, aby czytelnik mógł w przejrzystszy sposób wywnioskować, który ekstrakt czy też związek badany w pracy ma najlepsze działanie. Poza tym w streszczeniu Doktorantka pisze, że „przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji na temat właściwości biologicznych metabolitów rzewienia w kontekście.....”, tak właściwie były to ekstrakty i pewne czyste związki, które nie były izolowane z badanego przez Doktorantkę materiału. Przedstawione przez mnie drobne uwagi nie umniejszają oczywiście wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam wysoko.

#### **Ocena merytoryczna przedstawionego do recenzji cyklu publikacji**

Pierwsza praca która, wchodzi skład cyklu pt.: „*Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum*: a review of phytochemistry, biological activities and therapeutic potential”) opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Phytochemistry Reviews*, którego Impact Factor za rok 2021 jest równy 7,741 stanowi przegląd dostępnych danych na temat profilu fitochemicznego, zastosowań etnomedycznych oraz aktywności biologicznej (a także właściwości leczniczych) badanych gatunków rzewienia. W artykule skrupulatnie przedstawiono dostępne w tym czasie (rok 2019 i 2020) informacje na temat substancji biologicznie czynnych obecnych w *R. rhaponticum* i *R. rhabarbarum* (m.in. przedstawicieli hydroksystilbenów, antrachinononów i flawonoidów), a także omówiono aktualny stan wiedzy na temat właściwości rzewieni i krytycznie przeanalizowano stan zaawansowania badań różnych typów aktywności wyżej wspomnianych roślin, w oparciu o informacje pochodzące głównie z czasopism indeksowanych w międzynarodowych bazach danych (Medline/Pubmed, Scopus, Science Direct/Elsevier, Springer Link/ICM). Szczególną uwagę zwrócono na nieliczne badania dotyczące działania przeciwtłeniającego i przeciwzapalnego, a także przesłanki

sugerujące, że opisywane gatunki rzewienia mogą wykazywać działanie kardioprotekcyjne, co podkreśla tylko po raz kolejny zasadność wyboru i prowadzenia przez Doktorantkę badań w tym kierunku.

Podsumowując, recenzowana praca pogładowa w sposób przystępny i wyczerpujący przedstawia aktualną wiedzę na temat dwóch badanych przez Doktorantkę gatunków rzewieni pod kątem fitochemicznym i biologicznym, a na podkreślenie zasługuje fakt, że praca ta od momentu opublikowania została zacytowana 20 razy przez innych badaczy, co świadczy tylko o wysokiej wartości poznawczej tego artykułu.

Kolejną pracą w cyklu to oryginalny artykuł pt.: „*Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum* extracts as modulators of endothelial cell inflammatory response” opublikowany w czasopiśmie *Nutrients*, którego Impact Factor za rok 2021 jest równy 6,706 i obejmuje doświadczenia związane z oceną aktywności przeciwzapalnej badanych substancji roślinnych w aspekcie ich zdolności do modulowania odpowiedzi zapalnej śródbłonna. W pierwszym etapie badań wykonano oznaczenia wpływu badanych ekstraktów oraz stilbenów na żywotność komórek HUVECs, w celu wykluczenia ich cytotoksyczności i wyboru optymalnych, bezpiecznych dla komórek stężeń. W przypadku ekstraktów z korzeni *R. rhabarbarum* i jednego ze stilbenów (RHPG), bezpieczny zakres stężeń był niższy od pierwotnie założonego (1-50 µg/ml) i wynosił odpowiednio 1-30 oraz 1-25 µg/ml, natomiast dla pozostałych badanych substancji założony wstępnie zakres stężeniowy został utrzymany. W pracy zastosowano panel doświadczeń umożliwiający ocenę wpływu badanych ekstraktów i stilbenów na różne elementy i etapy odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna. Wykazano, że badane substancje roślinne posiadają właściwości przeciwzapalne i mogą modulować odpowiedź prozapalną komórek śródbłonna na różnych poziomach: ekspresji genów dla enzymów prozapalnych, uwalniania cytokin i interakcji z leukocytami. Ze względu na to, że substancje zawarte w ekstraktach są związkami egzogennymi (ksenobiotykami) i mogą same wpływać na niepobudzone komórki, w prowadzonych badaniach zastosowano dwa układy badawcze: komórki śródbłonna niestymulowane oraz komórki stymulowane LPS. W oparciu o wyniki oznaczeń ekspresji genów dla enzymów prozapalnych (*COX-2* oraz *ALOX5*), stwierdzono różnice w działaniu preparatów z ogonków liściowych i korzeni oraz stilbenów w obu układach doświadczalnych. W przypadku genu *COX-2*, w niestymulowanych komórkach odnotowano częściowe zahamowanie ekspresji przez ekstrakty z ogonków liściowych obu gatunków, z korzeni *R. rhabarbarum* oraz RHPG, natomiast RHPT nie wpływała na poziom ekspresji tego genu. Z kolei ekstrakty z korzeni *R. rhaponticum* częściowo zwiększały ekspresję *COX-2*. Natomiast w komórkach śródbłonna stymulowanych do odpowiedzi zapalnej, ekstrakty z ogonków liściowych oraz oba stilbeny wyraźnie zmniejszały poziom ekspresji genu *COX-2*, podczas gdy ekstrakty z korzeni zwiększały ekspresję genu *COX-2*. Ocena poziomu ekspresji *ALOX5* w komórkach niestymulowanych wykazała efekt hamujący ekstraktów z ogonków

liściowych *R. rhaponticum*, a pozostałe badane substancje nie wykazywały istotnego statystycznie wpływu lub był on niewielki. W dalszej części artykułu sprawdzono, czy oprócz modulowania ekspresji genów, badane substancje mogą wpływać na COX-2 i 5-LOX także na poziomie już powstałego białka enzymatycznego, i w celu zastosowano komercyjne testy skринingowe i wykonano oznaczenia zdolności hamowania aktywności tych enzymów. Badane substancje hamowały aktywność COX-2 z różną skutecznością, ale wyraźnie dało się zauważyć silniejszy efekt ekstraktów z korzeni obu gatunków (ok. 80% inhibicji, przy stężeniu 50 µg/ml). Natomiast efektywność inhibicyjnego działania RHPG przy tym samym stężeniu wynosiła ok. 40%. Z kolei zdolność hamowania aktywności 5-LOX przez badane substancje była niższa i w większości nie przekraczała 20% (z wyjątkiem RHPG, której maksymalny efekt wynosił ok. 40% zahamowania aktywności 5-LOX). Obserwacje z przeprowadzonych badań znalazły potwierdzenie w analizach *in silico*, które stanowią mechanistyczne uzupełnienie wykonanych badań choć tylko w przypadku COX-2, ale jak podkreśla Doktorantka nie jest to głównym celem badań i stanowi jedynie dodatek. Z kolei uzyskane wyniki profilowania cytokin uwolnionych z komórek HUVECs do medium hodowlanego wykazały, że większość badanych substancji (m.in. RHPT, ekstrakty z ogonków liściowych *R. rhaponticum* i *R. rhabarbarum* oraz ekstrakt z korzenia *R. rhaponticum*) hamuje uwalnianie kluczowych czynników prozapalnych, takich jak na przykład CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 i IL-18/IL-1F4.

Praca jest bardzo obszerna (36 stron; 61 pozycji literaturowych, plus ogromny suplement), napisana jest w sposób logiczny i zrozumiały a wyniki przedstawione są na zróżnicowanych wykresach, rycinach i zdjęciach. Dyskusja została napisana w sposób dojrzały i merytoryczny, brak jest typowych odniesień do innych badaczy, ale to wynika z faktu, iż tego typu badania przeprowadzone były po raz pierwszy co tylko podkreśla ich ważność dla świata nauki.

W kolejnej pracy oryginalnej pt. „Effects of *Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum* extracts on haemostatic activity of blood plasma components and endothelial cells in vitro” opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie Journal of Ethnopharmacology którego Impact Factor za rok 2021 jest równy 5,195. Doktorantka przedstawia wyniki doświadczeń dotyczących wpływu badanych ekstraktów i stilbenów na odpowiedź hemostatyczną komórek śródbłonna oraz aktywność hemostatyczną wybranych składników osocza krwi. Założeniem pracy było uzyskanie odpowiedzi na 2 główne pytania: (1) czy badane substancje mogą wpływać na hemostatyczne właściwości białek osocza krwi i komórek śródbłonna oraz (2) czy mają właściwości przeciwzakrzepowe, czy raczej prokoagulacyjne? W pierwszej części doświadczeń zbadano proces wykrzepiania osocza, monitorując wpływ ekstraktów z rzewienia i stilbenów na szlak krzepnięcia zależny od czynnika tkankowego (tzw. szlak zewnątrzpochodny), będący głównym fizjologicznym torem aktywacji krzepnięcia krwi. Przeprowadzone testy wykazały, że wszystkie badane ekstrakty z rzewienia wpływały hamująco na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi. Aby wskazać najbardziej prawdopodobne mechanizmy



i/lub cele molekularne dla badanych substancji, kolejne etapy badania obejmowały analizy ich wpływu na dwie kluczowe proteazy serynowe krzepnięcia: czynnik krzepnięcia Xa i trombinę (czynnik krzepnięcia IIa). Wykazano, że badane substancje roślinne hamowały aktywność obu badanych enzymów kaskady krzepnięcia. W badaniach zdolności hamowania aktywności czynnika Xa, zaobserwowano ok. 40-50% inhibicji w przypadku stilbenów oraz ekstraktu z ogonków liściowych *R. rhaponticum* w stężeniu 50 µg/ml, natomiast w tym samym stężeniu, ekstrakty z korzeni *R. rhaponticum* i *R. rhabarbarum* oraz ekstrakt z ogonków liściowych *R. rhabarbarum* wykazywały efektywność na poziomie >70% inhibicji. Badane ekstrakty roślinne hamowały również aktywność amidolityczną i proteolityczną trombiny (zwłaszcza frakcje uzyskane z korzeni), natomiast stilbeny wykazywały niewielką zdolność hamowania hydrolitycznej aktywności trombiny. Kolejną ważną obserwacją wynikającą z badań jest znikomy wpływ badanych ekstraktów na aktywność generowanej plazminy, centralnej proteazy serynowej układu fibrynolitycznego, co jest szczególnie ważne w kontekście poszukiwania selektywnych, naturalnych inhibitorów kaskady krzepnięcia, niezaburzających aktywności białek fibrynolitycznych. Badane ekstrakty i związki pochodzące z rzewienia zmniejszały reaktywność stymulowanych trombiną komórek śródbłonna. Spadek sekrecji czynnika von Willebranda wskazało, że część z nich (tj. RHPG, RPT, ekstrakt z ogonków liściowych *R. rhaponticum* i ekstrakt z korzeni *R. rhabarbarum*) zmniejszają aktywność prokoagulacyjną komórek śródbłonna. Odnotowano także nieznaczny spadek poziomu kompleksów PAI-1+t-PA w przypadku HUVECs traktowanych ekstraktem z ogonków liściowych i korzeni *R. rhaponticum*, korzeni *R. rhabarbarum* (w stężeniu 1 µg/ml) oraz stilbenami. Natomiast, ekstrakt z korzeni *R. rhabarbarum* w stężeniu 30 µg/ml wyraźnie zwiększał poziom kompleksów PAI-1+t-PA. Zaobserwowano również spadek uwalniania t-PA. Uzyskane wyniki sugerują, że badane substancje modulują aktywność profibrynolityczną i ograniczają procesy sekrecyjne komórek śródbłonna.

Praca jest bardzo starannie napisana z niezwykłą dbałością o szczegóły i detale pod kątem prezentacji wyników (zawiera różnego typu schematy, wykresy, zdjęcia, tabele), co ze względu na zastosowanie metod było dużym wyzwaniem. Podobnie jak w pracy poprzedniej dyskusja również opiera się raczej na własnych wynikach autorów, choć w pracy tej można dostrzec już pewną polemikę z wcześniejszymi badaniami uzyskanymi przez Doktorantkę, choć raz jeszcze chcę podkreślić, że wynika to z faktu pierwszych tego typu badań na tym polu.

Ostatnia praca oryginalna w cyklu nosi tytuł „Anti-inflammatory and antioxidant actions of extracts from *Rheum rhaponticum* and *Rheum rhabarbarum* in human blood plasma and cells in vitro” i na etapie otrzymania niniejszej rozprawy doktorskiej do recenzji była w fazie wysłania do redakcji czasopisma, ale jej aktualny status to praca zaakceptowana i co warto podkreślić w czasopiśmie niezwykle istotnym w dziedzinie tj. Biomedicine and Pharmacotherapy z wysokim

IF = 7,5 w którym Doktorantka bada właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne badanych ekstraktów oraz stilbenów. Doświadczenia prowadzono w aspekcie oceny zdolności badanych substancji do ochrony składników osocza krwi przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, a także hamowania odpowiedzi zapalnej leukocytów. Ocenę efektywności działania przeciwzapalnego w stosunku do leukocytów prowadzono stosując 2 modele badawcze - ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs) oraz inflammasomalne komórki reporterowe THP1-ASC-GFP. W PBMCs traktowanych ekstraktami i stilbenami zaobserwowano nie tylko częściowe zahamowanie kaskady przemian kwasu arachidonowego (przejawiające się spadkiem ilości generowanej i uwalnianej do środowiska prostaglandyny E2), ale także poziomu uwalnianych cytokin (IL-2 i TNF- $\alpha$ ) oraz metaloproteinazy-9. Monitorowanie procesu uwalniania inflammasomów, jako mediatorów odpowiedzi immunologicznej i zapalnej komórek THP1-ASC-GFP, również potwierdziło przeciwzapalne właściwości badanych substancji roślinnych. Zaobserwowano wyraźnie zmniejszenie poziomu uwalnianego z nich białka adaptorowego ASC. W prowadzonych doświadczeniach szczególną uwagę zwrócono na ocenę zdolności badanych ekstraktów z rzewienia i stilbenów do ograniczania oksydacyjnych uszkodzeń fibrynogenu. Badania wykazały ochronne działanie badanych ekstraktów i związków, obejmujące częściowe lub większościowe zmniejszenie zakresu uszkodzeń oksydacyjnych cząsteczek fibrynogenu, takich jak modyfikacja reszt tyrozyny i tryptofanu oraz tworzenie agregatów białkowych.

Praca podobnie jak poprzednie w cyklu jest starannie napisana, w klarowny i przejrzysty sposób prezentuje uzyskane wyniki i jest pozytywnym zwieńczeniem i podsumowaniem cyklu badań, które Doktorantka założyła sobie w celach swojej rozprawy doktorskiej.

Uważam, że przedłożone do recenzji osiągnięcie mgr Oleksandry Liudvytskiej składające się z czterech artykułów opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym wymagało dużego nakładu pracy i sumienności, a w toku prowadzonych badań Doktorantka sprawnie posługiwała się terminologią naukową. Jej dobre przygotowanie i opanowanie warsztatu badawczego umożliwiło przeprowadzenie eksperymentów z zastosowaniem różnych technik analitycznych z pogranicza biochemii i biologii molekularnej. Uzyskane wyniki zostały wnikliwie przeanalizowane i logicznie zinterpretowane i finalnie skonfrontowane z piśmiennictwem międzynarodowym, choć zapewne było to możliwe dzięki Pani Promotor dr hab. Joannie Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dowodzi wysokich kompetencji naukowych Doktorantki i ewidentnie znajomości podjętej problematyki.

W oparciu o uzyskane przez Doktorantkę wyniki i po analizie artykułów nasunęły się pewne pytania, które warto przedyskutować. Otóż:

1. Jaki był klucz doboru stilbenów, które zostały użyte razem z ekstraktami z rzewieni do analiz?

2. Czy Doktorantka rozważała analizę wpływu ekstraktów z rzewieni na odpowiedź zapalną komórek na poziomie aktywacji czynnika NF-κB ?
3. Który z badanych ekstraktów czy związków można wskazać konkretnie jako najbardziej efektywny pod względem działania kardioprotekcyjnego?

#### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Konkludując, uważam, że recenzowana dysertacja doktorska składająca się z czterech artykułów powiązanych tematycznie mgr Oleksandry Liudvytskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r - Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. **Na podstawie przywołanego aktu prawnego oceniania dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz prezentuje ogólną wiedzę Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Oleksandry Liudvytskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

#### **Wniosek o wyróżnienie doktoratu**

Dodatkowo, po analizie rozprawy doktorskiej, załączonych kopii publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia oraz ocenie dołączonych do przesłanej dokumentacji dokonań naukowych mgr Oleksandry Liudvytskiej wnoszę do uprawnionych **Członków Komisji ds. Stopni Naukowych o wyróżnienie pracy.**

W uzasadnieniu pragnę nadmienić, iż niniejsza praca charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym, posiada elementy nowości naukowej oraz dalszy potencjał do kontynuowania badań w przyszłości, ponieważ tematyka osadzona jest w istotnym medycznie i społecznie kontekście profilaktyki chorób cywilizacyjnych i prozdrowotnego działania związków i ekstraktów pochodzenia roślinnego. Ponadto, Doktorantka pomimo jej dość krótkiej kariery naukowej posiada pokaźny dorobek publikacyjny z lat 2021-2023 w ilości 6 artykułów, które opublikowane zostały w prestiżowych czasopismach o zasięgu światowym oraz współautorką licznych doniesień zjazdowych.

*Przewidywan  
Sitaruk*