



Łódź 2021-06-21

dr. hab. n. med. Beata Smolarz, prof. Instytutu  
Zakład Patomorfologii Klinicznej  
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki  
Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pana magistra Bartosza Skalskiego**

**pod tytułem:**

**Standaryzowane preparaty z różnych organów rokitnika zwyczajnego  
(*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) jako modulatory stresu  
oksydacyjnego i hemostazy.**

**Standardized preparations from various organs of the sea buckthorn (*Elaeagnus  
rhamnoides* (L.) A. Nelson) as modulators of oxidative stress and hemostasis.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza Skalskiego została wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii pod kierunkiem Pani dr hab. Beaty Olas, prof. UŁ.

Temat rozprawy obejmuje ocenę wpływu preparatów (ekstraktów, frakcji fenolowych oraz bogatych w związki niepolarne) z rokitnika zwyczajnego na stres oksydacyjny oraz hemostazę w układzie *in vitro*.

Rokitnik zwyczajny to gatunek krzewu liściastego, którego owoce oraz liście mają znaczenie użytkowe. Wytwarzane są z nich soki, oleje, ekstrakty i wyciągi. Owoce rokitnika zawierają różne rodzaje składników odżywczych i substancji biologicznie aktywnych jak witaminy, karotenoidy, flawonoidy, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, wolne aminokwasy i składniki mineralne. Badania potwierdzają wartość odżywczą i właściwości lecznicze rokitnika zwyczajnego, a w tym – działanie przeciwnowotworowe, przeciwrzodowe oraz

hepatoprotective. Nie ma natomiast dokładnych danych na temat roli preparatów na bazie rokitnika w profilaktyce czy leczeniu chorób układu krążenia, które mogą wynikać z zaburzeń hemostazy czy stresu oksydacyjnego.

Poznanie znaczenia związków biologicznie czynnych pochodzących z różnych organów rokitnika może być szczególnie istotne dla rozwoju terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.

### ***Ocena formalna***

Przedstawiona do recenzji praca stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji dotyczących wpływu preparatów (ekstraktów oraz frakcji) wyizolowanych z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) na wybrane parametry oceny stresu oksydacyjnego oraz hemostazy w modelu *in vitro*.

Tytuł pracy jest dobrze i jasno sformułowany, właściwie odzwierciedla jej treści i odpowiada tematyce analizowanych publikacji.

24 strony rozprawy doktorskiej obejmują: streszczenie w języku polskim i angielskim, listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (6 pozycji), listę pozostałych publikacji wchodzących w skład dorobku naukowego (8 pozycji), listę udziału doktoranta w konferencjach międzynarodowych (6 pozycji) i krajowych (9 pozycji), wstęp, omówienie publikacji oryginalnych składających się na rozprawę doktorską, wnioski, informacje o finansowaniu i współpracy i spis piśmiennictwa. Następnie w rozprawie umieszczone są pełne wersje publikacji, które stanowią trzon rozprawy doktorskiej oraz informacje o charakterze udziału i procentowym wkładzie współautorów w publikacje.

Na początku rozprawy doktorskiej zostały umieszczone dwa streszczenia; odpowiednio w języku polskim i angielskim. Napisane są one w sposób zwięzły, komunikatywny i umożliwiają szybkie zapoznanie się czytającego z tematem już na samym wstępie pracy. W streszczeniach doktorant zawarł podsumowanie zagadnień omawianych w rozprawie oraz wnioski z przeprowadzonych badań, poprawnie sformułowane i w pełni uzasadnione.

W moim mniemaniu jako recenzenta lepszym sposobem byłoby umieszczenie streszczeń na końcu pracy, co byłoby zwieńczeniem i krótkim podsumowaniem uzyskanych rezultatów, natomiast na ich miejscu umiejscowienie spisu treści i wykazu najczęściej stosowanych w pracy skrótów. Tych dwóch elementów nie znalazłam w przedstawionej mi do oceny rozprawie. Praca od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń i jest właściwie przygotowana.

### ***Ocena merytoryczna***

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi monotematyczny cykl sześciu prac opublikowanych w latach 2018 – 2021, dotyczący badań wpływu preparatów z rokitnika zwyczajnego na wybrane parametry stresu oksydacyjnego i hemostazy *in vitro*.

W skład rozprawy przedstawionej do recenzji wchodzi sześć prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania IF (ang. Impact Factor): IF=2,833; MNiSW=100pkt; IF=3,617, MNiSW=40 pkt; IF=3,977; MNiSW=100 pkt, IF=3,060; MNiSW=100 pkt; IF=3,743, MNiSW=100 pkt i IF=4,556; MNiSW=140 pkt.

Łączny współczynnik oddziaływania IF cyklu publikacji wynosi 17,23. Całkowita liczba punktów za publikacje stanowiące rozprawę doktorską według listy czasopism punktowanych MNiSW (w latach 2018-2020) wynosi 440.

Wysoki sumaryczny IF wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone przez doktoranta oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, co zostało pozytywnie ocenione przez recenzentów tych czasopism. Wszystkie te prace stanowią opracowania zbiorowe, w których doktorant jest pierwszym autorem. W poszczególnych pracach udział doktoranta wynosił (jak wynika z załączonych oświadczeń) od 35 do 50%. Ponadto, dołączone oświadczenia współautorów ww. publikacji, zaświadczenia o dominującej roli mgr Bartosza Skalskiego w powstawaniu prezentowanej rozprawy doktorskiej. Doktorant odegrał wiodącą rolę w zaplanowaniu i realizacji prac doświadczalnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Jako recenzent, zwróciłam uwagę na fakt, że mgr Bartosz Skalski w żadnej z sześciu wchodzących w skład rozprawy prac nie jest „autorem korespondencyjnym”. Recenzent zdaje sobie sprawę, że określenie tego, kto jest „autorem wiodącym”, nie jest proste. Dla wielu dyscyplin będzie to pierwszy autor, dla innych ostatni lub korespondencyjny. W moim mniemaniu rola autora korespondencyjnego jest niezmiernie istotna, gdyż jest on głosem grupy badaczy. Osoba ta jest odpowiedzialna za wszelką korespondencję lub komunikację między grupą autorów a czasopismem. Korespondent jest jedyną osobą, z którą publikacja ma bezpośredni kontakt. Dlatego też pełnienie takiej roli na pewno wzbogaciłoby doktoranta o nowe doświadczenia w samodzielnej pracy naukowej i zwiększyło jego osobisty udział w powstawaniu publikacji.

Rozdział „Wstęp” napisany jest w sposób zwięzły, uporządkowany i zrozumiały dla czytającego. Mgr Bartosz Skalski przedstawia zwięzłą charakterystykę rokitnika zwyczajnego oraz znaczenie jego ekstraktów dla procesu hemostazy i stresu oksydacyjnego. Omawiany

rozdział rozprawy został potraktowany w sposób wskazujący na dużą wiedzę i rozeznanie doktoranta w tematyce. Zawiera wszystkie najważniejsze informacje z badanej dziedziny.

Cel pracy jest bardzo jasno zdefiniowany. Zadaniem badawczym podjętym przez doktoranta było określenie wpływu preparatów (ekstraktów oraz frakcji) wyizolowanych z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) na wybrane parametry oceny stresu oksydacyjnego oraz hemostazy w modelu *in vitro*.

Koncepcja ta jest słuszna, gdyż badania wskazują, że preparaty powstałe na bazie substancji pozyskiwanych z roślin wpływają istotnie na układ krążenia i stres oksydacyjny.

W przypadku stresu oksydacyjnego w pracy oznaczono stężenia produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym, oznaczenie stężenia grup karbonylowych oraz tiolowych w białkach oraz zastosowano metodę opierającą się na redukcji cytochromu c. W przypadku hemostazy przeprowadzono pomiar czasów krzepnięcia, pomiar adhezji oraz agregacji płytek krwi, pomiar peroksydacji lipidów w płytkach krwi, pomiar ekspresji selektyny p, receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi oraz pomiar fosforylacji VASP.

Prace stanowiące niniejszą rozprawę są tematycznie spójne i szczegółowo opracowane. Metodyka i wyniki zawarte w tych publikacjach zostały już ocenione przez recenzentów czasopism, w których ukazały się i merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. Autor rozprawy obszernie opisał tematykę, cel pracy, materiały i metody, wyniki i wnioski wynikające z przedłożonych prac oryginalnych zawartych w cyklu publikacji.

W skład cyklu, stanowiącego osiągnięcie naukowe mgr Bartosza Skalskiego, wchodzi następujące prace:

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 Alternartive 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. B. Olas, J. Żuchowski Ł, A. Stochmal. Future Medicinal Chemistry. 2018, 10(20), 2381-2394.
3. Isorhamnetin and its new derivatives isolated from sea buckthorn berries prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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.

W pierwszej pracy mgr Bartosz Skalski i współautorzy przebadali ekstrakty z liści oraz gałązek rokitnika zwyczajnego w pięciu stężeniach od 0,5-50 µg/ml. W celu porównania działania preparatów z rokitnika zwyczajnego badacze zastosowali analizę porównawczą wpływu komercyjnego ekstraktu z owoców aronii – Aronox<sup>R</sup> oraz ekstraktu z pestek winogron na poziom stresu oksydacyjnego w osoczu. W celu oceny wpływu preparatów z badanej rośliny na hemostazę osoczną dokonano pomiaru czasów krzepnięcia krwi: trombinowego, protrombinowego i kaolinowo-kefalinowego. Badane preparaty nie zmieniały istotnie tych dwóch pierwszych. W swojej pierwszej pracy z cyklu doktorant wykazał, że ekstrakty z różnych części rokitnika, zwłaszcza z jagód i gałązek, w porównaniu ze znanymi jagodami roślin jak aronia i winogrono, mogą być również postrzegane jako dobre źródło substancji aktywnych - przeciwutleniaczy do zastosowań w farmakologii lub kosmetyce. Ponadto z ekonomicznego punktu widzenia bardzo ważna jest wiedza, że istnieje możliwość pozyskiwania związków fenolowych nie tylko z jagód czy liści, ale także z gałązek, które stanowią odpad produkcyjny.

W pracy nr 2 doktorant i współautorzy poddali analizie frakcję fenolową oraz zawierającą związki niepolarne z liści oraz gałązek rokitnika zwyczajnego. W badaniach frakcja fenolowa wyizolowana z gałązek rokitnika istotnie zmniejszała peroksydację lipidów w osoczu stymulowaną H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe. Niepolarna frakcja z gałązek w najwyższym stężeniu 50 µg/ml hamowała peroksydację lipidów osocza. Frakcja bogata w związki niepolarne wyizolowana z liści hamowała proces peroksydacji lipidów dla wszystkich badanych stężeń.

W trzeciej pracy mgr Bartosz Skalski i współautorzy wykazali, że flawonoidy jak izoramnetyna oraz jej dwie pochodne mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników.

Zastosowane pochodne izoramnetyny mają różne właściwości biologiczne (m.in. przeciwutleniające, przeciwplatekcyjne i przeciwzakrzepowe). Testowane substancje można postrzegać jako nowe naturalne korzystne związki do stosowania w profilaktyce i leczeniu chorób układu krążenia.

Następstwem badań nad aktywnością antyoksydacyjną badanych preparatów w osoczu były analizy ich działania przeciwutleniającego w płytkach krwi. Wyniki tych analiz mgr Bartosz Skalski zawarł odpowiednio w pracach nr 4 i nr 5. Badania wykazały, że badany ekstrakt z gałązek rokitnika oraz frakcja fenolowa i frakcja bogata w związki niepolarne z liści i gałązek rokitnika są źródłem związków, które mogą modulować aktywność płytek krwi poprzez zakłócenie metabolizmu kwasu arachidonowego. Żaden z badanych preparatów z rokitnika zwyczajnego nie był toksyczny w stosunku do płytek krwi.

W szóstej pracy doktorant i współautorzy określili wpływ sześciu różnych frakcji z rokitnika zwyczajnego na pomiar aktywacji płytek krwi i ich reaktywności. Badacze stwierdzili, że frakcja fenolowa z owoców, liści i gałązek rokitnika zwyczajnego istotnie spowalnia proces powstawania skrzepliny. Aktywność przeciwplatekcyjną wykazała frakcja bogata w glikozydy flawonolowe. Zahamowanie agregacji płytek krwi może być skorelowane z niską ekspresją receptora GPIIb/IIIa. Ponadto żadna z badanych frakcji nie powodowała żadnych zmian w proteomie płytkowym, a ich potencjał przeciwplatekcyjny nie był zależny od receptora P2Y<sub>12</sub>.

W przedłożonych do oceny pracach mgr Bartosz Skalski prezentuje swoje wyniki w sposób konsekwentny i zrozumiały. Zaprezentowane są wszystkie najważniejsze zagadnienia związane z przedstawionymi badaniami poparte odpowiednimi odniesieniami do aktualnego piśmiennictwa.

Zarówno wykorzystany materiał (osocze ubogo- oraz bogato płytkowe, płytki krwi, oraz krew pełna ludzka), a także użyte do przeprowadzenia eksperymentów metody badawcze (metody kolorymetryczne, metoda turbidymetryczna, koagulometryczna oraz cytometrii przepływowej), świadczą o dużym doświadczeniu mgr Bartosza Skalskiego w planowaniu i realizowaniu takich prac naukowych. Niewątpliwie poparciem tej opinii jest fakt realizowania przez mgr Bartosza Skalskiego grantów naukowych, właśnie w tej tematyce:

1. Grant NCN pt: „Metabolity wtórne owoców, liści oraz gałązek rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) jako naturalne substancje bioaktywne” (OPUS 2015/19/B/NZ9/03164)

2. Dotacja celowa dla Młodych Naukowców pt: „Wpływ ekstraktów oraz frakcji z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson na aktywację płytek krwi” (B 1911000002111.02).

Na podstawie wyników uzyskanych w cyklu sześciu przedłożonych do oceny prac doktorant sformułował siedem głównych konkluzji, będących bezpośrednim odzwierciedleniem uzyskanych rezultatów.

1. Preparaty wyizolowane z różnych organów rokitnika zwyczajnego wykazują hamujący wpływ na proces aktywacji płytek krwi.
2. Izoramnetyna zakupiona komercyjnie oraz jej dwie pochodne wyizolowane z frakcji fenolowej z jagód rokitnika zwyczajnego charakteryzują się aktywnością antypłytkową.
3. Zahamowanie aktywacji płytek krwi przez testowane preparaty wiąże się z zaburzeniami przemian biochemicznych zachodzących w płytkach krwi.
4. Badane preparaty z rokitnika zwyczajnego nie są toksyczne w stosunku do płytek krwi
5. Rokitnik zwyczajny jest źródłem związków o aktywności antyoksydacyjnej w osoczu oraz płytkach krwi.
6. Właściwości antypłytkowe i antyoksydacyjne preparatów wyizolowanych z różnych organów rokitnika zwyczajnego są skorelowane z ich składem chemicznym.
7. Największe działanie antypłytkowe i antyoksydacyjne wykazuje frakcja fenolowa wyizolowana z gałązek rokitnika zwyczajnego. Frakcja ta jest bogatym źródłem proantocyjanidyn i katechin.

Zdaniem recenzenta powyższe punkty stanowią podsumowanie wyników uzyskanych w opublikowanych pracach. Wnioski z rozprawy doktorskiej powinny być bardziej syntetycznie ujęte (w trzech do czterech punktach).

Rozprawa doktorska zawiera piśmiennictwo obejmujące 28 pozycji literaturowych (zarówno w języku polskim jak i angielskim) wymienione według kolejności alfabetycznej. Literatura naukowa cytowana w niniejszym opracowaniu jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana w tekście rozprawy. Około 40% piśmiennictwa stanowią pozycje z ostatnich pięciu lat. Dodatkowo piśmiennictwo zawarte jest w każdej z opublikowanych prac.

Jako recenzent muszę wspomnieć o drobnych uchybieniach zauważonych podczas lektury rozprawy. Błędy literowe i interpunkcyjne; na stronie 7 rozprawy w tytule pracy nr 5 wkradła się drobna literówka „faction” powinno być „fraction”; strona 7 rozprawy w tytule pracy nr 6

wkradł się błąd - dwukrotnie powtórzone słowo „from”; na stronie 17, wiersz ósmy od góry, jest „pływu” powinno być „wpływu”; na stronie 18 rozprawy, ostatni wers od dołu, niepotrzebnie postawiona kropka po słowie „płytkowych”. Uwagi te oczywiście nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy.

Należy podkreślić, że cykl sześciu prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, dokumentuje oryginalne i nowatorskie podejście do problematyki wpływu preparatów (ekstraktów oraz frakcji) wyizolowanych z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) na wybrane parametry oceny stresu oksydacyjnego oraz hemostazy w modelu *in vitro*.

Wszystkie prace poparte są rzetelnie przeprowadzonymi eksperymentami i świadczą o dużym doświadczeniu mgr Bartosza Skalskiego w poruszonym temacie. Jednocześnie, uzyskane rezultaty mogą w przyszłości przełożyć się na wykorzystanie związków biologicznie czynnych z rokitnika zwyczajnego jako suplementów czy nowych leków w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.

Bardzo istotnym elementem całokształtu działalności naukowej mgr Bartosza Skalskiego, na który zwróciłam uwagę podczas lektury przedłożonej mi do recenzji rozprawy, są starania w pozyskiwaniu zewnętrznych funduszy na prowadzenie badań jak grant NCN pt: „Metabolity wtórne owoców, liści oraz gałązek rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) jako naturalne substancje bioaktywne (OPUS 2015/19/B/NZ9/03164) oraz dotacja celowa dla Młodych Naukowców pt: Wpływ ekstraktów oraz frakcji z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson na aktywację płytek krwi (B 1911000002111.02).

W ramach działalności naukowej mgr Bartosz Skalski wielokrotnie uczestniczył w krajowych oraz międzynarodowych zjazdach i sympozjach, prezentując wyniki swoich badań.

Należy również podkreślić, że Pan mgr Bartosz Skalski w ramach tworzenia pracy doktorskiej współpracował z Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, Państwowym Instytutem Badawczym.

Przedstawiona mi do recenzji praca pt: „Standaryzowane preparaty z różnych organów rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) jako modulatory stresu oksydacyjnego i hemostazy” wymagała dużej pracowitości i została dobrze przygotowana i wykonana co umożliwiło uzyskanie cennych wyników. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i zapytania w żadnym stopniu nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej pracy lecz stanowią element dyskusji z doktorantem.



Lektura rozprawy doktorskiej Pana magistra Bartosza Skalskiego pozwala stwierdzić, że jest on doświadczonym eksperymentatorem zdolnym do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójny tematycznie i przyczynia się do lepszego poznania podjętej tematyki badawczej. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Sylwetka doktoranta rysuje się jako dynamicznie rozwijająca się osoba o dużym potencjale intelektualnym i dużych możliwościach rozwoju w przyszłości.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Bartosza Skalskiego spełnia wszystkie kryteria zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem o jej przyjęcie i o dopuszczenie Pana mgr Bartosza Skalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. n. med. Beata Smolarz, prof. Instytutu