



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, 14 grudnia 2021

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Bernadetty Lis

Rozprawa doktorska mgr Bernadetty Lis p.t. „Polifenolowe ekstrakty z różnych części mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*) jako modulatory hemostazy” wykonana została w Katedrze Biochemii Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Beaty Olas, prof. UŁ, w ramach realizacji projektu NCN Preludium 2017/27/N/NZ9/02009 oraz dotacji celowej dla Młodych Naukowców i uczestników studiów doktoranckich MNiSzW. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF 22,628, liczbie punktów MNiSW 480. Pięć poniżej wymienionych publikacji (1 – 5) wchodzących w skład tego cyklu to prace doświadczalne i w czterech doktorantka jest pierwszym autorem a praca szоста jest artykułem przeglądowym:

1. Lis B., Jędrejek D., Stochmal A., Olas B. 2018. „Assesment of effects of phenolic fractions from leaves and petals of dandelion in selected components of hemostasis” *Food Research International* 107, 605-612 (IF2018= 3,579; MNiSW= 40)
2. Jędrejek D., Lis B., Rolnik A., Stochmal A., Olas B. 2019. „Comparative phytochemical, cytotoxicity, antioxidant and haemostatic studies of *Taraxacum officinale* root preparations” *Food and Chemical Toxicology* 126, 233-247 (IF2019= 4,679; MNiSW= 40)
3. Lis B., Rolnik A., Jędrejek D., Soluch A., Stochmal A., Olas B. 2019. „Dandelion (*Taraxacum officinale* L.) root components exhibit anti-oxidative and antiplatelet action in an in vitro study” *Journal of Functional Foods* 59, 16-24 (IF2019= 3,701; MNiSW= 100)
4. Lis B., Jędrejek D., Móldoch J., Stochmal A., Olas B. 2019. „The anti-oxidative and hemostasis-related multifunctionality of L-chicoric acid, the main component of dandelion: an in vitro study of its cellular safety, antioxidant and anti-platelet properties, and effect on coagulation” *Journal of Functional Foods* 59, 16-24 (IF2019= 3,701; MNiSW= 100)
5. Lis B., Jędrejek D., Rywaniak J., Soluch A., Stochmal A., Olas B. 2020. „Flavonoid preparations from *Taraxacum officinale* L. fruits – a phytochemical, antioxidant and hemostasis studies” *Molecules* 25, 1-33 (IF2019= 3,267; MNiSW= 100).
6. Lis B., Olas B. 2019. „Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products - history and present” *Journal of Functional Foods* 59, 40-48 (IF2019= 3,701; MNiSW= 100).

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 27 stronicowe opracowanie w języku polskim którego celem jest wprowadzenie w tematykę badań i uzasadnienie powodów ich podjęcia (5-cio stronicowy Wstęp, Cel rozprawy, Materiały i metody badawcze, omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo (43 aktualne pozycje, opublikowane, z wyjątkiem czterech w okresie ostatnich 10-ciu lat). Uzupełnione zostało rozdziałami stanowiącymi części składowe klasycznej wersji pracy doktorskiej jak: Spis treści, lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także listą 11 publikacji wchodzących w skład pozostałego dorobku naukowego, listą ustnych (4) i posterowych (12) doniesień zjazdowych, Rozdział „Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” stanowi skondensowaną wersję prezentacji wyników zawartych w opublikowanych pracach. Zgodnie z wymogami dotyczącymi tego typu rozpraw załączone są również Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach. Udział Doktorantki szacowany jest na 32 – 60%.

Opublikowanie wyników badań w czasopismach z wysokim współczynnikiem oddziaływania bardzo dobrze świadczy o ich aktualności i znaczeniu, a fakt, że doktorantka jest w czterech z nich pierwszym autorem wskazuje na Jej zasadniczą rolę w planowaniu i prowadzeniu badań oraz opracowaniu wyników i przygotowaniu ich do druku. Uznać więc należy, że osobiście przeprowadziła zdecydowaną większość omawianych eksperymentów, albo w znaczącym wymiarze uczestniczyła w ich wykonaniu.

Mniszek lekarski (łac. *Taraxacum officinale*) ma wiele właściwości leczniczych, dzięki którym znalazł zastosowanie w medycynie naturalnej. Stanowi źródło związków o właściwościach prozdrowotnych, antyoksydantów (flawonoidy, witaminy A, C, D, E), nienasyconych kwasów tłuszczowych, mikroelementów, prowitamin (tokoferole, karotenoidy). Celem przedstawianej do oceny rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu ekstraktów i frakcji z mniszka na wybrane parametry stresu oksydacyjnego (poziom anionorodnika ponadtlenkowego, peroksydacji lipidów, grup tiolowych i karbonylowych w białkach) indukowanego mieszaniną nadtlenu wodoru i siarczanu żelaza w osoczu i płytkach krwi. Celem podjętych badań była również ocena skuteczności preparatów z mniszka pospolitego względem parametrów hemostazy (pomiar agregacji i adhezji płytek krwi, czasów krzepnięcia, ekspresji selektyny P i receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi), co uzasadniałoby ich stosowanie w celach profilaktycznych czy

też wspomagających leczenie chorób układu krążenia. Dodatkowo celem pracy było sprawdzenia cytotoksyczności badanych preparatów względem płytek krwi i badanie właściwości biologicznych kwasu cykoriowego wyizolowanego z 50% frakcji liści mniszka pospolitego.

Doświadczenie zespołu, w którym praca była wykonywana oraz wcześniejsze zainteresowania Doktorantki właściwościami leczniczymi mniszka pospolitego, co znajdowało wyraz w publikowanych pracach, uzasadniają podjęcie tematu pracy doktorskiej. Stres oksydacyjny leży u podstaw wielu chorób, w tym chorób cywilizacyjnych. Zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej może wpływać na hemostazę i zmiany w procesie krzepnięcia czy aktywacji płytek krwi. Pogłębienie wiedzy dotyczącej działania różnych pod względem składu chemicznego preparatów z mniszka pospolitego wyizolowanych z liści, płatków, korzeni i owoców na wybrane parametry stresu oksydacyjnego oraz hemostazy wydaje się więc uzasadnione. Rośliny lecznicze, w tym mniszek pospolity są źródłem naturalnych przeciwutleniaczy i związków o aktywności antypłytkowej, takich jak polifenole, uznane nutraceutyki o silnej zdolności zmiatania wolnych rodników.

Charakterystyka formalna rozprawy:

W pracy przeglądowej (**Praca numer 6**) wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej przedstawiona została aktualna wiedza na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej związków obecnych w preparatach otrzymanych z różnych organów mniszka lekarskiego. Związki między budową chemiczną i właściwościami biologicznymi tych preparatów nie zawsze są jasne. Dalsze badania powinny zmierzać do określenia mechanizmu ich działania i/lub określenia profilaktycznych i ewentualnie terapeutycznych dawek związków o udokumentowanej aktywności biologicznej.

Analizę składu chemicznego frakcji z korzeni mniszka pospolitego opublikowano w **Pracy numer 2**). W **Pracy numer 4** przedstawiono izolowanie kwasu cykoriowego z 50% frakcji z liści mniszka i jego aktywność biologiczną. Analizę składu metanolowego ekstraktu z owoców mniszka, bogatego w związki polifenolowe przedstawiono w **Pracy numer 5**.

Cennym aspektem badań przedstawianych w pracach składających na rozprawę doktorską była ocena zależnej od stężenia cytotoksyczności badanych preparatów z mniszka pospolitego poprzez oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) - żaden

z testowanych preparatów mniszka pospolitego, w tym kwas cykoriowy w badanym zakresie stężeń nie powodowały lizy płytek krwi (**Praca numer 1, 2, 4 i 5**).

Badano właściwości antyoksydacyjne preparatów z mniszka pospolitego w osoczu i płytkach krwi. Stres oksydacyjny generowano mieszaniną H_2O_2/Fe^{2+} . Dla frakcji C preparatów z korzeni mniszka pospolitego oraz dla frakcji A i E poziom peroksydacji lipidów zredukowany był o ponad 30% w porównaniu z kontrolą pozytywną, którą stanowiło osocze traktowane w taki sam sposób. Wszystkie badane frakcje z korzeni mniszka miały ochronny wpływ na grupy tiolowe i wzrost karbonylacji białek osocza w warunkach stresu oksydacyjnego (**Praca numer 2**). Preparaty z korzeni mniszka istotnie hamowały peroksydację lipidów płytek krwi w warunkach stresu oksydacyjnego, a niektóre z nich miały ochronny wpływ na grupy tiolowe białek (frakcje A i E) i hamowanie karbonylacji (**Praca numer 3**). Oznaczano poziom $O_2^{\cdot-}$ w spoczynkowych płytkach krwi oraz aktywowanych trombiną w obecności badanych frakcji z korzeni mniszka - tylko frakcja A miała istotny wpływ na zmniejszenie poziomu $O_2^{\cdot-}$ w spoczynkowych płytkach krwi. W podsumowaniu doktorantka wymieniła frakcje wykazujące najlepsze działanie antyoksydacyjne w osoczu i płytkach krwi a różnice w aktywności biologicznej badanych frakcji tłumaczy różnicami w ich składzie chemicznym. Najsilniejszy efekt hamujący peroksydację lipidów w płytkach krwi wykazały frakcje z liści i płatków mniszka bogate w pochodne kwasów hydroksycynamonowych. Ze względu na największą zawartość kwasu cykoriowego w 50% frakcji z liści i płatków zasugerowano, że może on odgrywać główną rolę w ochronie antyoksydacyjnej (**Praca numer 1**). Właściwości antyoksydacyjne tego związku potwierdzono w **Pracy numer 4** oraz **Pracy numer 5**. W **Pracy numer 5** przedstawiono badania dotyczące właściwości antyoksydacyjnych najmniej poznanych preparatów pozyskanych z owoców mniszka - najlepsze właściwości antyoksydacyjne wykazywał ekstrakt zawierający kwas cykoriowy oraz frakcja bogata w luteolinę.

Inny aspekt badań dotyczył wpływu preparatów z mniszka pospolitego na hemostatyczną aktywność płytek krwi (**Praca numer 3**). Adhezja spoczynkowych płytek krwi do kolagenu w obecności wszystkich preparatów z korzeni mniszka była istotnie hamowana. Niektóre z frakcji z korzeni mniszka hamują agregację płytek krwi stymulowanych, natomiast żaden z badanych preparatów nie wpływał istotnie na agregację płytek krwi stymulowaną kolagenem (**Praca numer 3**) czy trombiną (**Praca numer 2**). W **Pracy numer 3** zasugerowano możliwy mechanizm działania antyagregacyjnego testowanych

preparatów poprzez interakcję związków wchodzących w skład preparatów z receptorami ADP na błonie płytek krwi. Testowane frakcje z liści i płatków mniszka wykazywały aktywność przeciw płytkową. Kwas cykoriowy w wyższych stężeniach hamował adhezję płytek krwi do kolagenu indukowaną trombiną a w najwyższym stężeniu aktywowanych trombiną czy ADP do fibrynogenu (**Praca numer 4**). Flawonoidy obecne w owocach mniszka mają wpływ na aktywację płytek krwi poprzez modulowanie metabolizmu kwasu arachidonowego (**Praca numer 5**). W pracy tej przedstawiono również badania z użyciem cytometrii przepływowej wpływu wybranych preparatów z owoców mniszka na płytki krwi poprzez analizę aktywacji kompleksu GPIIb/IIIa i ekspresję selektyny P.

Badano wpływ preparatów z mniszka w warunkach *in vitro* na wybrane parametry hemostatyczne - czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, czas protrombinowy i czasu trombinowy. W podsumowaniu doktorantka wymienia frakcja z liści, płatków oraz korzeni mniszka, które istotnie wydłużały czas trombinowy osocza w badanych zakresach stężeń. Sugeruje też, że właściwości antykoagulacyjne badanych preparatów są związane z hamowaniem aktywności trombiny (**Praca numer 1 i 2**). Badane ekstrakty i frakcje owoców ani kwas cykoriowy nie wykazywały działania antykoagulacyjnego (**Praca numer 4 i 5**).

W pracy numer 5 przedstawiono nowatorską metodę badania potencjału przeciwwzrzepowego preparatów z owoców mniszka pospolitego, z użyciem microchipu pokrytego kolagenem, w trakcie przepływu krwi przez sztuczne naczynia krwionośne. W posumowaniu doktorantka sugeruje, że aktywność ta, w przypadku preparatów, które ją wykazują, może być uwarunkowana obecnością pochodnych kwasu kawowego (głównie kwasu cykoriowego), pochodnych flawonowych i luteoliny.

Wnikliwe zapoznanie się z rozprawą doktorską mgr Bernadetty Lis zmusza mnie jednak jako recenzenta, do sformułowania kilku uwag oraz zadania pytań, celem wyjaśnienia pewnych wątpliwości czy niejasności:

1/ po przeczytaniu części poprzedzającej załączone publikacje, będącej wprowadzeniem do prezentowanych w nich zagadnień, odczułam pewien niedosyt z powodu braku choćby krótkiej dyskusji. Myślę, że pomimo szczegółowych dyskusji w każdej z publikacji, a także komentarzy do wyników zawartych w rozdziale „Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej”, spójne, spajające klamrą przeprowadzone badania, zaprezentowane wyniki i sugerowane wnioski choćby krótkie ich przedyskutowanie

byłoby bardzo zasadne w ocenie osiągnięcia jakim jest bez wątpienia na starcie kariery akademickiej zestaw prezentowanych prac,

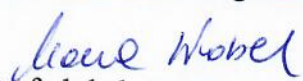
2/ myślę, że jeśli doktorantka pokusiła się o napisanie takiego wprowadzenia, to również istotne dla dokonania właściwej oceny zastosowanego do badań warsztatu laboratoryjnego byłoby zamieszczenie listy technik/metod badawczych wykorzystanych przez nią w ramach realizacji pracy doktorskiej.

W mojej opinii, zamieszczenie dyskusji na końcu części rozprawy doktorskiej, poprzedzającej kopie opublikowanych prac, pomogłaby zebrać, wyjaśnić lub zasugerować przynajmniej w przypadku niektórych składników (związków chemicznych o znanej budowie) podstawy molekularne wykazanych aktywności badanych preparatów – odpowiedzieć na pytania dotyczące mechanizmu(ów) ich działania, jak również dać pewne sugestie dotyczące odrębnego stosowania wyizolowanych składników czy raczej mieszania tych składników.

Wniosek końcowy:

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że – pomimo wysuniętych w recenzji uwag krytycznych i komentarzy – dysertacja doktorska mgr Bernadetty Lis p.t „Polifenolowe ekstrakty z różnych części mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*) jako modulatory hemostazy” prezentuje wyniki oryginalnych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych i powszechnie akceptowanych metod badawczych. Przedstawione wyniki stanowią oryginalny wkład do nauki i otwierają dalsze interesujące obszary badawcze, co stanowi o ich niezaprzeczalnej wartości. Praca doktorska mgr Bernadetty Lis stanowi spójne, dojrzałe opracowane dzieło, które wykazuje, że Doktorantka posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jej 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 doktorantkę 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.


Prof. dr hab. Maria Wróbel