



prof. dr hab. inż. Alicja Kucharska

Wrocław, 23.09.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chojnackiej pt. „Ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego” wykonanej w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Urszuli Lewandowskiej

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Chojnackiej ma formę spójnego tematycznie cyklu sześciu publikacji w tym trzech prac oryginalnych i trzech przeglądowych. Teksty publikacji uzupełnione są opracowaniem uwzględniającym następujące punkty: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp teoretyczny, cele prowadzonych badań i główne założenia pracy doktorskiej, wyniki, wnioski, literatura, lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, lista publikacji naukowych nieuwzględnionych w pracy doktorskiej oraz komunikaty zjazdowe. Część zasadnicza opracowania zawiera opis przeprowadzonych badań (skrót publikacji) przedstawiony w układzie pracy naukowej, jednak brakuje tu wydzielonej (osobnej) części metodycznej oraz dyskusji wyników. Z zakresu „Materiały i metody” Autorka zamieściła tylko opis otrzymania i charakterystykę ekstraktów z liści pigwowca we wstępie opracowania. Do rozprawy dołączono także oświadczenia wszystkich współautorów publikacji stanowiących cykl oryginalnych prac naukowych, na podstawie których Doktorantka przygotowała rozprawę doktorską.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2018-2022 w recenzowanych czasopismach (Journal of Physiology and Pharmacology (3 publikacje oryginalne i 1 publikacja przeglądowa), Food Reviews International (1 publikacja przeglądowa), Journal of Functional Foods (1 publikacja przeglądowa)) o łącznej liczbie punktów MEN 600 i sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym 22,973. Oznacza to, że praca naukowa Doktorantki została już oceniona przez niezależnych specjalistów recenzujących artykuły naukowe w czasopismach z listy JCR. Stanowi to gwarancję merytorycznej poprawności przyjętego modelu badawczego i sformułowanych wniosków. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, jednak nie jest autorem korespondencyjnym. Zgodnie z deklaracją Doktorantki i oświadczeniami współautorów, udział pani mgr Katarzyny Chojnackiej w publikacjach był wiodący i dominujący.

Reasumując uważam, że przedstawiona rozprawa od strony formalnej spełnia wymogi pracy doktorskiej.

Liście drzew i krzewów owocowych zawierają znaczącą ilość związków cennych z punktu widzenia właściwości biologicznych, dlatego mogą stanowić doskonały surowiec farmaceutyczny do otrzymania suplementów z ukierunkowanym działaniem. Przedstawiona do recenzji praca badawcza dotyczy określenia właściwości przeciwwzapalnych i antynowotworowych ekstraktów z liści pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.) w modelach *in vitro*. Jest ona kontynuacją badań prowadzonych w Katedrze



Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nad właściwościami biologicznymi ekstraktów z owoców wspomnianej rośliny. Skład i właściwości fitozwiązków ekstraktów z liści w ostatnich latach wzbudzają coraz większe zainteresowanie wśród naukowców wielu różnych dziedzin nauki. Niewiele jest jednak prac dotyczących określenia właściwości biologicznych takich ekstraktów w modelach komórkowych *in vitro*, dlatego podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę uważam za celowe, ważne z punktu widzenia nauki i praktyki. Wysoka ocena podjęcia tematu wynika także z wyboru jednostki chorobowej, tj. nowotworu jelita grubego, który jest jednym z najczęściej występującym nowotworem i niestety, jedną z najczęstszych przyczyn zgonów.

Przeprowadzony przez Doktorantkę przegląd literatury, zawarty we wstępie opracowania oraz w publikacjach, w szczególności przeglądowych, potwierdza jej szeroką wiedzę teoretyczną w zakresie stanu zapalnego i jego wpływu na patogenezę raka jelita grubego, jak i w zakresie związków z grupy polifenoli.

W opracowaniu poprzedzającym publikację, w części pt. „Cele prowadzonych badań i główne założenia pracy doktorskiej” Doktorantka przedstawiła główny cel naukowy prowadzonych badań, tj. „określenie właściwości przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego w modelach *in vitro*” oraz 9 celów szczegółowych. Cele pracy zostały przedstawione w sposób jasny i logiczny stanowiąc uzasadnienie podjętych badań, jednak brakuje w tym miejscu poprawnie sformułowanych założeń pracy i postawionej hipotezy. Są one zawarte w celach i można się ich tylko domyślać. Mam także drobną uwagę co do dwóch pierwszych celów szczegółowych, gdyż nie jestem przekonana, czy Doktorantka samodzielnie je zrealizowała, gdyż w opisie swoich udziałów (str. 46) nie wymieniła otrzymania ekstraktów i analizy jakościowej i ilościowej związków. Wczytując się natomiast w oświadczenia współautorów można dowiedzieć się, że np. otrzymanie preparatów z liści pigwowca było udziałem innej osoby. Reasumując, można przyjąć, że były to cele zespołu badawczego a nie samej Doktorantki.

Poszczególne badania zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane. Mam jednak wątpliwość co do czasu jaki upłynął między wykonaniem ekstraktów i analizą ich składu a przeprowadzonymi badaniami opisanymi w oryginalnych publikacjach. Z publikacji wynika, że Doktorantka wykorzystywała do badań *in vitro* ekstrakty raz przygotowane w październiku 2017 roku. Potwierdziła to w opracowaniu na stronie 28: „Do badań wykorzystano ekstrakty pochodzące z tej samej ekstrakcji, które przechowywano w formie liofilizatu w temperaturze -20°C.”. Wiadomo jednak, że związki polifenolowe są mało stabilne i że skład ilościowy a czasami także jakościowy może się zmieniać podczas długotrwałego przechowywania ekstraktów, nawet po zastosowaniu najlepszych warunków przechowalniczych. Dlatego przy wydłużającym się okresie od analizy składu ekstraktów do przeprowadzanych badań z ich wykorzystaniem powinno się kontrolować i ewentualnie aktualizować ich skład. Zastanawiam się więc czy była przeprowadzana analiza składu ekstraktu przed każdym badaniem modelu *in vitro*? Brakuje także informacji dotyczącej rodzaju rozpuszczalnika w jakim był rozpuszczany liofilizat ekstraktu z liści pigwowca przed analizą jego składu i przed zastosowaniem go do badań na liniach komórkowych. Główny ciężar gatunkowy pracy doktorskiej postawiony jest jednak na badania linii komórkowych i odnosząc się do tego zakresu analiz mogę stwierdzić, że techniki badawcze opisane szczegółowo w części metodycznej oryginalnych publikacji nie budzą moich zastrzeżeń. Wydaje się, że Doktorantka dobrze opanowała



warsztat badawczy i nabyła dobre doświadczenie w prowadzeniu badań na liniach komórkowych w warunkach *in vitro*.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w trzech oryginalnych publikacjach i zaprezentowane w opracowaniu poprzedzającym wspomniane prace. Doktorantka poddała wyniki analizie statystycznej co umożliwiło przeprowadzenie właściwej ich interpretacji. W opracowaniu i w publikacjach zawarła bardzo dobrej jakości ryciny, które ułatwiają lekturę tekstu stanowiąc dobre tło do omawianych zagadnień teoretycznych i prowadzonych badań, co w konsekwencji podnosi jakość całości.

W pierwszej fazie badań został określony skład dwóch ekstraktów z liści pigwowca, różniących się sposobem ekstrakcji. Dodatkowo Doktorantka zbadała ich zdolności antyoksydacyjne i właściwości cytotoksyczne na ludzkich komórkach raka jelita grubego (SW-480 i HT-29) oraz ludzkich prawidłowych komórkach jelita (CCD 841 CoN i CCD-18Co). Na podstawie analizy tych wyników Doktorantka wybrała do dalszych badań jeden ekstrakt o wyższej zawartości związków polifenolowych, wyższej aktywności antyoksydacyjnej i silniejszym działaniu cytotoksycznym na komórki nowotworowe. W kolejnych badaniach dotyczących aktywności przeciwzapalnej Autorka wykazała, że wybrany ekstrakt z liści pigwowca posiada zdolność do hamowania ekspresji prozapalnych cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) i enzymów (COX-2 i iNOS) oraz wykazuje zdolność do hamowania produkcji NO. Po analizie ekspresji białek związanych ze szlakiem NF- κ B, Doktorantka wywnioskowała, że aktywność przeciwzapalna badanego ekstraktu wynika ze zdolności związków ekstraktu do hamowania ekspresji mediatorów stanu zapalnego poprzez właśnie szlak NF- κ B. W badaniach aktywności antynowotworowej Autorka wykazała działanie hamujące migrację i inwazję komórek raka jelita grubego SW-480 i HT-29 w wyniku działania związków ekstraktu z liści pigwowca. Analiza otrzymanych wyników z testów *in vitro* została przeanalizowana i zinterpretowana prawidłowo. Podsumowując dokonania Doktorantki, można stwierdzić, że dużym jej osiągnięciem jest wykazanie po raz pierwszy przeciwzapalnej i antynowotworowej aktywności związków wchodzących w skład ekstraktu z liści pigwowca japońskiego.

W dyskusji publikacji Autorka często porównywała wyniki ze swoich doświadczeń z wykorzystaniem ekstraktów z liści pigwowca do wyników z doświadczeń z zastosowaniem ekstraktu z owoców pigwowca, dlatego ciekawe byłoby przedstawienie krótkiej charakterystyki porównawczej właściwości obu ekstraktów ze wskazaniem, który ekstrakt mógłby mieć w przyszłości większe szanse, np. na komercjalizację jako suplement diety. W dyskusji wyników Autorka nie zawsze jest konsekwentna, przykładowo w publikacji nr 1 na stronie 8, najpierw przytoczone są dwa artykuły o aktywności przeciwutleniającej i jeden artykuł o aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów z liści pigwowca japońskiego, a następnie w kolejnym akapicie widnieje zdanie, że nie ma doniesień o jakiegokolwiek aktywności biologicznej ekstraktów z liści tej rośliny. Myślę, że wspomniane aktywności można zaliczyć do aktywności biologicznych prowadzonych w warunkach *in vitro*. W kolejnych fragmentach dyskusji wspomnianej publikacji możemy przeczytać, iż aktywność cytotoksyczna ekstraktów z liści pigwowca została zbadana i opisana przez Doktorantkę po raz pierwszy, z czym oczywiście zgadzam się i uważam za niekwestionowane dokonanie Doktorantki.



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYwnoŚCI
KATEDRA TECHNOLOGII OWOCÓW, WARZYW I NUTRACEUTYKÓW ROŚLINNYCH

W końcowej części opracowania Doktorantka przedstawiła podsumowanie związane ze szczegółowymi celami pracy oraz znajdujące uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań opisanych w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Analiza wyników zamieszczonych w niniejszym opracowaniu oraz lektura publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dowodzi, że zamierzony cel recenzowanej pracy został osiągnięty. Doktorantka w badaniach z wykorzystaniem modeli linii komórkowych raka jelita grubego wykazała po raz pierwszy przeciwwzapalny oraz antynowotworowy potencjał ekstraktów z liści pigwowca japońskiego, wskazując na znaczący potencjał chemoprewencyjny związków zawartych w badanym ekstrakcie. Chciałabym także podkreślić znaczną wartość naukową pozostałego dorobku naukowego Doktorantki liczącego 8 publikacji (o sumarycznym IF = 26,342 i 650 pkt MEN) i 7 komunikatów zjazdowych.

Omówienie oraz zamieszczone publikacje dowodzą, że Doktorantka ma szeroką wiedzę z zakresu badań biologicznych i potrafi samodzielnie rozwiązać problem naukowy oraz analizować, interpretować i opracować otrzymane wyniki. Badania Doktorantki mają nie tylko aspekt poznawczy, ale także aplikacyjny. Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają merytorycznej wartości poznawczej oraz znaczenia podjętego problemu badawczego.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Chojnackiej, pt. „Ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów. W związku z tym, wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Katarzyny Chojnackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie doceniając dobrze opanowany warsztat badawczy, uzyskanie wartościowych wyników, właściwą ich interpretację, opublikowanie swoich wyników w punktowanych czasopiśmie, świadczące o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Alicja Kiechaniecka