



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/14548/2022 P
Data: 2022-09-16

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	16-09-2022
L. dz. RN-BM/	1453

Katowice / 12.09.2022 r.

Ocena

**rozprawy doktorskiej Pana Macieja Danielewskiego z Katedry Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
zatytułowanej: „Wpływ naturalnych irydoidów i antocyjanów na wybrane parametry
funkcji wątroby i układu sercowo-naczyniowego” wykonanej pod kierunkiem doktora
habilitowanego Tomasza Sozańskiego**

Klinika
Chorób Wewnętrznych
i Farmakologii Klinicznej
Katedry Farmakologii

40-752 Katowice,
ul. Medyków 18
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY i KLINIKI
prof. Bogusław Okopień
bokopien@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KATEDRY
tel.: +48 32 252 39 02
fax: +48 32 288 85 32
farmklin@sum.edu.pl

SEKRETARIAT KLINIKI
tel.: +48 32 789 43 40
fax: +48 32 789 43 43
cwfk@uck.katowice.pl

Przedstawiona do oceny dysertacja liczy 75 stron, na które składają się trzy opublikowane prace naukowe o współczynniku oddziaływania IF ponad 18 punktów wraz z komentarzami w języku polskim. We wszystkich publikacjach Kandydat jest pierwszym autorem. Autor zamieścił również streszczenie w języku polskim i angielskim, 38 pozycji piśmiennictwa do komentarzy oraz oświadczenia współautorów publikacji o ich udziale w tworzeniu dzieł w formie załączników.

Głównym zagadnieniem poszukiwań naukowych magistra farmacji Macieja Danielewskiego jest ustalenie czy ekstrakt z owoców derenia jadalnego może być skutecznym środkiem terapeutycznym w chorobach będących konsekwencją diety obfitującej w cholesterol. Kandydat zrealizował ten cel w pracy pogładowej analizując dostępne źródła przedstawiające mechanizmy działania irydoidów i antocyjanów na funkcję wątroby, serca i naczyń. Następnie podsumował aktualny stan wiedzy na temat działania tych związków na metabolizm cholesterolu i lipidów poprzez regulację zaangażowanych w ten proces czynników transkrypcyjnych. Wreszcie Badacz wybrał model badawczy i zaplanował wykonanie procedur pozwalających ocenić efekt ekstraktu z derenia jadalnego na uszkodzenia narządowe powodowane nadmiarem cholesterolu.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Autor na wstępie dokładnie przedstawia dwie grupy badanych przez siebie związków chemicznych. Szczególną uwagę zwraca na wywoływane przez nie zmiany ekspresji czynników transkrypcyjnych, tj. PPAR, czy receptorów wątrobowych X. Kandydat zwraca uwagę na stężenie adipokin regulujących insulinowrażliwość, ważne ogniwo schorzeń metabolicznych. Przedstawia także wpływ wybranych przez siebie do analizy substancji na lipidogram oraz aktywność białkowych rdzeni poszczególnych jego frakcji, apoprotein.

Następnie Doktorant formułuje cele pracy oraz dokonuje wyboru założeń wyjściowych. U ich podstaw legł dokonany wcześniej gruntowny przegląd aktualnego piśmiennictwa.

Pan magister farmacji Maciej Danielewski detalicznie komentuje zastosowany materiał i wykorzystane przez siebie metody badawcze. Ekstrakt z owoców derenia jadalnego sporządzono według opisanej wcześniej procedury (J Food Comp. Anal. 2015, 40, 95). Autor włączył do eksperymentu trwającego miesiąc przygotowania i dwa miesiące badania 50 królików. Podzielił zwierzęta na 5 grup, pierwsza otrzymywała karmę standardową, druga bogatocholesterolową (1% wzbogacenia). Kolejne grupy oprócz diety zawierającej cholesterol otrzymywały ekstrakt z derenia 10 lub 50 mg / kg m.c. oraz simwastatynę 5 mg / kg m.c. Tkanki pobrane do oznaczeń po zakończeniu badania to krew obwodowa, aorta i wątroba.

Irydoidy oznaczono ilościowo jako kwas loganowy, antocyjany jako cyjanidyno-3-O-glukozyd oraz kwasy fenolowe, kwas kawowy i elagowy, a także flawonole przy określonych długościach fali detekcji. Wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową wyposażoną w detektor z matrycą diodową. Podano parametry kolumny.

Glikemie, lipidogram, stężenie apoprotein, insuliny i adipokin oznaczono powszechnie stosowanymi metodami. Histopatologicznie oceniono ściany aorty piersiowej i brzusznej dokonując pomiaru grubości kompleksu intima-media.

Ekspresję mRNA PPAR- α i - γ określono ilościową reakcją PCR w czasie rzeczywistym z klasycznym genem referencyjnym (GAPDH). Podano wykorzystany zestaw primerów. Sprawdzone swoistość reakcji PCR. Metodą $\Delta\Delta C_t$ obliczono względną ekspresję mRNA badanych PPAR- α i - γ .

Odrębna procedura biologii molekularnej, tj. Western Blot posłużyła Doktorantowi do wykrycia receptora LXR- α w homogenatach wątroby. Autor dokładnie opisuje przebieg rozdzielania elektroforetycznego białek, a później ich półsuchego przeniesienia na odpowiednią membranę i wreszcie inkubację z przeciwciałem anti-LXR- α . Bloty zostały oczywiście zeskanowane i przeprowadzono ocenę gęstości optycznej prążków.

Kandydat podaje zastosowane metody statystyczne, typowe dla badań przedklinicznych na zwierzętach. Do ich wykonania wykorzystał odpowiednie oprogramowanie.

Pierwsza z zaliczonych do osiągnięcia prac ukazała się w *Oxid Med. Cell Longev.* 2020, 2020, ID 2735790 (IF=6,5). Nosi tytuł: „The effects of natural iridoids and anthocyanins on selected parameters of liver and cardiovascular system functions”. Doktorant zarówno co do tej, jak i następnych publikacji dokładnie przedstawia swój przeważający udział w wykonaniu, jest też pierwszym autorem każdej z nich. Praca to wyczerpujące studium dotyczące budowy chemicznej badanych związków, ich mechanizmów działania oraz potencjalnych efektów terapeutycznych. Wśród 92 pozycji cytowanego piśmiennictwa znalazły się cztery prace Pana Profesora Tomasza Sozańskiego, którego dzieło Doktorant twórczo kontynuuje. Rozważania kończą celne stwierdzenia o korzyściach płynących ze spożywania roślin zawierających irydoidy i antocyjany. Autor słusznie zauważa, że dobranie właściwych dawek dla pacjentów, czy to pojedynczych substancji, czy ich kombinacji będzie możliwe po przeprowadzeniu badań klinicznych.

Kandydat dokonał także ważnego podsumowania mechanizmów działania irydoidów i antocyjanów w drugiej publikacji osiągnięcia „The impact of antocyanins and iridoids on transcription factors crucial for lipid and cholesterol homeostasis” (*Int J Mol. Sci.* 2021, 22, 6074; IF=5,9). Do przeprowadzenia analizy Autor wybrał pięć czynników transkrypcyjnych bazalnych dla gospodarki lipidowej. Skomplikowany tekst został bardzo dobrze uzupełniony tabelami i ryciną dla ułatwienia odbioru. W 78 pozycjach cytowanego piśmiennictwa znalazła się autocytacja pierwszej pracy osiągnięcia. Praca znakomicie wiąże stosowanie badanych związków z ekspresją czynników transkrypcyjnych. Stąd logiczna konstatacja, że obniżenie stężenia cholesterolu może być korzystne w rokowaniu wielu chorób metabolicznych i kardiologicznych.

Trzecia praca to dokonanie oryginalne opublikowane w *Nutrients* 2021, 13, 3621. Tytuł: „Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) iridoid and anthocyanin extract enhances PPAR- α , PPAR- γ expression and reduces I/M ratio in aorta, increases LXR- α expression and alters adipokines and triglycerides levels in cholesterol-rich diet rabbit model”. Zgodę na wykonanie badania wydał Lokalny Komitet Etyczny dla Badań ze Zwierzętami w Instytucie Immunologii i Terapii Eksperymentalnej PAN we Wrocławiu (21/2015).

Koncepcja wykonania pracy oryginalnej to wartościowe uzupełnienie wysiłku włożonego w sporządzenie prac poglądowych. Wybrany model i przeprowadzone procedury już przedstawiono w recenzji. Zwraca uwagę przejrzyste i jasne przedstawienie wyników w postaci opisów, tabel, wykresów oraz dokumentacji fotograficznej.

Autor przeprowadził ciekawą i wieloaspektową dyskusję uzyskanych danych opierając się zarówno na piśmiennictwie z własnego ośrodka, jak i na zewnętrznych, aktualnych publikacjach (łącznie 86 pozycji). Z równą uwagą odnosi się do spodziewanych wyników, jak i do takich gdzie nie uzyskano efektów działania ekstraktu z derenia, np. stężenie insuliny i glukozy. Niektóre nie mają odbicia nawet w tak starannie dobranym piśmiennictwie, np. znaczące obniżenie stężeń rezystyny, bardziej zdecydowane po podaniu mniejszej dawki ekstraktu. Pracę kończą precyzyjnie sformułowane wnioski, bez spekulacji, ale z pewnymi odniesieniami do możliwości zastosowania wyciągu z derenia w terapii.

Poziom merytoryczny prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej docenili recenzenci uznanych międzynarodowych periodyków naukowych.

Na zakończenie Doktorant dokonuje liczącego cztery strony podsumowania prac i stawia 10 wniosków. Lektura tego komentarza pozwala dobrze powtórzyć wcześniej bardzo dokładnie przedstawione dane z prac poglądowych i pracy oryginalnej. Pan magister farmacji Maciej Danielewski dostrzegł, że irydoidy i antocyjany działają antyoksydacyjnie eliminując aktywne postaci tlenu, jak i stymulując układy antyoksydacyjne. Hamowanie uwalniania cytokin prozapalnych oraz molekuł adhezyjnych wywiera efekt hepatoprotekcyjny i naczynioochronny. Taka cytoprotekcja może stać się wartościową opcją terapeutyczną w chorobach wątroby, serca i naczyń. Autor podkreślił, że będzie to możliwe po optymalizacji dawek i kompozycji związków w próbach klinicznych. Wreszcie istotnym dla postępu wiedzy ustaleniem Kandydata jest wykazanie wpływu badanych związków na ekspresję czynników transkrypcyjnych. To trudne zagadnienie, bowiem pobudzenie takiego receptora może wywoływać efekt przeciwzapalny, ale i adipogenny.

Bardzo ciekawe jest potwierdzenie, że wyciąg z derenia jadalnego prowadzi do redukcji masy ciała, a więc pojawia się kolejny kierunek terapeutyczny.

Kluczowe dla zastosowań leczniczych jest wykazanie przeciwmiażdżycowego działania ekstraktu z derenia pod postacią zmniejszenia grubości intymy w ścianie aorty.

Ważne, że Doktorant zdaje sobie sprawę z ograniczeń eksperymentu, którymi były krótki czas jego trwania i brak obciążenia węglowodanowego w diecie. Umiejętność krytycznego spojrzenia na własne dokonania to trudny, ale niezbędny dowód dojrzałości naukowej.

Trudno mówić o niedociągnięciach w przypadku opublikowanych już i ocenionych przez recenzentów znakomitych czasopism, manuskryptów. Prace te jasno dowodzą, że Doktorant

posiadł umiejętność trafnego doboru piśmiennictwa oraz projektowania i przeprowadzenia żmudnych i skomplikowanych eksperymentów.

Niemniej jednak z obowiązku recenzenta postaram się przedstawić kilka uwag dotyczących całego opracowania rozprawy doktorskiej.

Znacznym ułatwieniem dla czytającego jest zamieszczenie w rozprawie kompletnego zestawienia używanych skrótów. Należy jednak przyznać, że Autor pamięta przed pierwszorazowym zastosowaniu skrótu o podaniu pełnej nazwy.

Kandydat nie ustrzegł się też przed za daleko idącym używaniem skrótów myślowych, np. „metoda $\Delta\Delta Ct$ ” (str. 19), czy „transfer pólusuchy” (str. 20). Oczywiście dla Piszącego rozprawę, czy dla recenzenta są to jasne sformułowania, ale należy pamiętać, że dysertacja ma być przyczynkiem do postępu wiedzy nawet dla początkujących pracowników nauki.

Zgody Komisji Etyki na prowadzenie eksperymentu doszukał się recenzent w pracy oryginalnej, a powinien to być kolejny załącznik opracowania.

Autor powinien przybliżyć czytelnikowi wybór takich, a nie innych dawek podawanego ekstraktu z derenia i simwastatyny. Rodzi się również pytanie czy wykonano próby pilotowe z innymi dawkami? Czy rozważono zastosowanie większych dawek ekstraktu?

Na stronie 15 Doktorant sprecyzował pięć celów rozprawy. Natomiast na stronie 72 pojawia się 10 wniosków. Recenzent stoi na stanowisku zgodności tych liczb. Poza tym co do ścisłości wnioski to punkty 2-7, ponieważ mają jednoznaczne potwierdzenie w wynikach. Natomiast punkty 1 i 8-10 to zarysowanie interesujących kierunków badawczych. Recenzent widzi szerokie pole do działania na gruncie zaprojektowania modeli insulinooporności z obciążeniem węglowodanowym i zastosowaniu wyciągu z derenia, czy jego składników w nieco dłuższej perspektywie czasowej.

Uwagi recenzenta w niczym nie umniejszają wartości pracy, mają charakter redakcyjny i dydaktyczny. Powinny pozwolić Kandydatowi na nieco inne spojrzenie na możliwość prezentacji niebagatelnych osiągnięć.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska została bardzo dobrze wykonana. Wnosi ona ważne i nowe informacje do naszej wiedzy na temat działania irydoidów i antocyjanów. Praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym dysertacjom doktorskim.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

**Zatem mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
wniosek o dopuszczenie
Pana magistra farmacji Macieja Danielewskiego do dalszych etapów przewodu
doktorskiego.**

**Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie ocenionej pracy po spełnieniu
wymogów formalnych obowiązujących w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.**

KIEROWNIK
Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Bogusław Okopień

