

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
41-200 Sosnowiec, Jagiellońska 4
tel. (32) 364 15 80-82
mmaciazek@sum.edu.pl

Katowice, 19.09.2022

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
pt. „WŁAŚCIWOŚCI ANTYGLIKACYJNE EKSTRAKTÓW ROŚLINNYCH Z RODZINY REYNOUTRIA”

wykonanej przez
mgr Arletę Dołowacką – Józwiak
asystenta Katedry i Zakładu Technologii Postaci Leku
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Praca doktorska realizowana
w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Jakub Gburek
Promotor pomocniczy: dr Krzysztof Gołąb

Ocenę rozprawy doktorskiej przygotowano w związku z pismem z dnia 04.07.2022 Zastępcy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, dr hab. Adama Junki, prof. UMW, zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

1. OCENA OGÓLNA

Podstawą ubiegania się Pani Mgr Arlety Dołowackiej - Józwiak o stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych jest monografia zatytułowana „Właściwości antyglukacyjne ekstraktów roślinnych z rodziny *Reynoutria*”, która powstała pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jakuba Gburka. Promotorem pomocniczym był Pan dr Krzysztof Gołąb. Przedstawiona do oceny praca podejmuje ważne zagadnienie z punktu widzenia farmakoterapeutycznego i poznawczego dotyczące właściwości antyglukacyjnych ekstraktów roślinnych z rodziny *Reynoutria* i ich wpływu na glikację białka transportującego. W mojej opinii przeprowadzone badania mogą stanowić uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat inhibitorów glikacji białek surowicy krwi, co jest wysoce cenione na tym etapie pracy naukowej.

Cukrzyca jest jednym z podstawowych problemów zdrowotnych w skali społecznej. Z powodu wieloletniego przebiegu choroby dochodzi do uszkodzenia i zaburzeń w czynności oraz niewydolności różnych narządów. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za narządowe powikłania cukrzycy jest wzrost

stężenia cukrów redukujących we krwi, której białka, głównie albuminy, w kompleksie z lekami, są odpowiedzialne za ich transport. Zmieniona strukturalnie albumina może tracić właściwości wiążące i doprowadzać do zwiększenia frakcji wolnej, odpowiedzialnej za efekt terapeutyczny leku. W odwrotnej sytuacji, gdy albumina zmieni swoją konformację tak, że miejsca wiązania stosowanego leku będą łatwiej dostępne, lek zwiąże się w większej ilości z makrocząsteczką, a oczekiwane stężenie leku we krwi nigdy nie osiągnie poziomu właściwego dla uzyskania sukcesu terapeutycznego. Istnieje wiele ligandów, które ze względu na swe właściwości mogą hamować zmiany modyfikacyjne albuminy glikowanej, tj. wpływać na powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*ang. Advanced Glycation End products, AGEs*) oraz na strukturę i właściwości wiążące albuminy glikowanej. Poszukiwanie i analiza inhibitorów glikacji może zmniejszyć częstość występowania i nasilenie powikłań narządowych wywołanych cukrzycą oraz wspomóc farmakoterapię.

Rozprawa doktorska Mgr Dołowackiej – Józwiak stanowi kompendium wiedzy dotyczącej naturalnych inhibitorów glikacji. Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, otóż łączy zagadnienia z dyscyplin nauk biologicznych, chemicznych oraz nauk medycznych. Cel doktoratu jest tematyką naukową z jednej strony popularną, lecz biorąc pod uwagę potrzebę stosowania w terapii naturalnych i skutecznych produktów, może stanowić element badań rozwojowych. Z powyższych względów podjęcie przez Panią magister niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione, ważne z punktu widzenia poznawczego, jak i diagnostycznego oraz farmakoterapeutycznego, a dysertację oceniam pozytywnie.

2. OCENA MERYTORYCZNA

2.1 Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Cukry redukujące (m.in. glukoza, fruktoza, galaktoza), w szeregu przemian noszących nazwę *reakcji Maillarda*, reagują z resztami aminokwasów białek powodując ich glikację. Proces glikacji białek przebiega wieloetapowo, a ostatnim etapem jest formowanie się tzw. końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*ang. Advanced Glycation End Products, AGEs*), które nasilają mikro- i makroangiopatię cukrzycową. Ta heterogenna grupa związków o charakterystycznych właściwościach odpowiedzialna jest za zmiany konformacji przestrzennej białek, czego efektem jest utrata ich pierwotnych właściwości oraz zaburzenie pełnionych przez nie funkcji fizjologicznych. Badania *in vivo* oraz *in vitro* procesu glikacji białek pozwalają na zidentyfikowanie markerów biochemicznych, które są stosowane rutynowo w diagnozowaniu czy monitorowaniu chorób. Ponadto AGEs mogą być traktowane jako wskaźniki stopnia nasilenia glikacji.

Istnieje wiele niewyjaśnionych w pełni kwestii naukowych, które spowodowałyby spowolnienie bądź zapobieganie przemianom konformacyjnym białek. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska może stanowić element badań rozwojowych wnoszących wkład w poznanie i zrozumienie zjawisk, które leżą u podłoża procesów wywołujących określone skutki w danych warunkach panujących w organizmie.

2.2 Metodyka badawcza

Ogólny cel pracy i zaprezentowana metodyka dotyczyły oceny właściwości antyglikacyjnych ekstraktów roślin względem albuminy surowicy krwi wołowej (BSA) i ludzkiej (HSA). Pani Doktorantka opracowała i zoptymalizowała model glikacji *in vitro*, oceniła potencjał hamujący badanych ekstraktów na różnych etapach tworzenia AGEs wraz z przeprowadzeniem korelacji między potencjałem antyglikacyjnym ekstraktów roślinnych i zastosowaniem wzorców. By zrealizować zadany cel Pani Magister zastosowała

dializę, technikę spektroskopii fluorescencyjnej oraz elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Biorąc pod uwagę tematykę pracy, która dotyczy jednej z groźniejszych chorób cywilizacyjnych (cukrzyca), popieram zasadność zaplanowanego celu. W mojej ocenie, mimo iż wskazane jest zastosowanie dodatkowych metod badawczych oraz poszerzenie badań o kolejne naturalne inhibitory glikacji, co może zamknąć etap badań *in vitro* i skierować badania do analizy *in vivo*, przeprowadzone badania mogą stanowić jeden z elementów, który znajdzie swoje odzwierciedlenie w profilaktyce lub leczeniu cukrzyca.

2.3 Struktura rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana zgodnie z wymogami ustawowymi. Stanowi formę typowej, spójnej monografii, liczy 225 maszynopisu. Doktorantka w swoim opracowaniu kolejno prezentuje: (i) Wstęp i Cel pracy, (ii) Część teoretyczną, (iii) Część doświadczalną zawierającą oprócz Materiałów i Metod badawczych, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski, (iv) Piśmiennictwo, (v, vi) Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim oraz (vii-x) Spis Rycin, Tabel, Wykresów i Użytych Skrótów. Wydaje się, że praca powinna zawierać dorobek naukowy Doktorantki w postaci wykazu publikacji i doniesień zjazdowych, przygotowany przez Dział Bibliografii i Bibliometrii UM we Wrocławiu oraz inne osiągnięcia, co nie wchodziłoby w skład ocenianego opracowania. Brakuje również informacji o finansowaniu badań.

2.4 Wykorzystana literatura

Lista zacytowanych prac została dobrana przez Autorkę rozprawy poprawnie, co stanowi uzupełnienie prezentowanych zagadnień naukowych. Doktorantka dokonała trafnego przeglądu literatury z zakresu dotychczasowej wiedzy na badany temat. Nieco zaskakującym jest fakt, że Pani Magister nie zacytowała żadnej autorskiej pracy i prac Promotorów, które dotyczą pośrednio bądź bezpośrednio omawianych zagadnień, zwłaszcza, że dane pochodzące z bazy SCOPUS dowodzą o ich istnieniu.

2.5 Szczegółowa ocena merytoryczna

Przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska przygotowana przez Panią Mgr Arletę Dołowacką-Jóźwiak stanowi dowód orientacji Doktorantki w badaniach glikacji białek, co jest nie lada wyzwaniem. Mimo pozytywnej oceny, rolą Recenzenta jest także przedstawienie wszystkich uwag i wątpliwości nie tylko natury redakcyjnej, co zebrano poniżej. Niektóre wymagają odniesienia Doktorantki względem nich.

Tytuł

Praca doktorska została zatytułowana: „Właściwości antyglikacyjne ekstraktów roślinnych z rodzaju *Reynoutria*”. Treść pracy odpowiada tematowi określonymu w tytule.

Wstęp i Cel pracy

Wstęp pracy, czyli odpowiednio uporządkowane wprowadzenie to krótki i zwięzły materiał ogólnie opisujący problem stylu życia współczesnego społeczeństwa prowadzący do schorzeń cywilizacyjnych. Doktorantka w sposób jasny i przejrzysty opisuje cukrzycę, chorobę cywilizacyjną XXI wieku, jej wpływ

na organizm człowieka poprzez gromadzenie się w organizmie zaawansowanych produktów glikacji AGEs i zwiększenie stężenia glikowanych białek, wpływ AGEs na modelowe białko transportujące jakim jest albumina surowicy krwi oraz naturalne inhibitory produktów AGEs, jakimi są rośliny z rodzaju *Reynoutria spp.* Doktorantka postawiła hipotezę, czy stosowanie inhibitorów powstawania AGEs może stanowić obiecujący cel terapeutyczny, dlatego w rozdziale tym sformułowano cztery jasne i spójne zadania badawcze. W mojej ocenie cel pracy z powodzeniem mógłby stanowić odrębny rozdział zamieszczony tuż przed częścią doświadczalną. Główne zadania badawcze Doktorantki były tożsame z kolejnymi etapami pracy. Autorka przyjęła za cel dokonać oceny właściwości antyglykacyjnych ekstraktów roślin z rodzaju *Reynoutria spp.* w stosunku do albuminy wołowej i ludzkiej (o której Pani Doktorantka w tym miejscu nie wspomniała) poprzez opracowanie modelu glikacji, ocenę potencjału hamującego badanych ekstraktów otrzymanych w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (brak informacji o udziale Doktorantki w tej części eksperymentu) oraz zastosowanie elektroforezy do oszacowania poprawności zastosowanej procedury tworzenia AGEs i prawidłowego rozdziału na frakcje wysoko- i niskocząsteczkowe. Tak zaplanowany eksperyment badawczy pozwala odczuć, iż przy prawidłowo wykonanym eksperymencie opracowany model procesu glikacji i inhibicji może mieć szersze zastosowanie w screeningu naturalnych inhibitorów, co daje możliwość przeprowadzenia badań *in vivo*, by w przyszłości stosować wspomniane rośliny w profilaktyce bądź leczeniu cukrzycy. Wracając jednak do Celu pracy, na uwagę zasługuje słuszność prowadzenia badań z użyciem BSA (str. 7) – wiadomo, iż wykazuje w około 76% homologię względem HSA w sekwencji aminokwasów, a koszty jego zakupu są niższe. Czy zatem opracowany model glikacji albuminy wołowej można bezpośrednio stosować do albuminy ludzkiej? Jaki był cel optymalizacji, zwłaszcza pod względem „rodzaju albuminy wołowej”? Czy pierwsze i drugie zadanie badawcze nie należałoby ująć w jedno? Trzecie zadanie badawcze „określające siły działania antyglykacyjnego” wymaga wyjaśnienia, chociażby ze względu na zastosowaną metodę.

Część teoretyczna

Część teoretyczna została przedstawiona na 67. stronach dobrze zredagowanego maszynopisu. Mimo iż zbyt szczegółowo rozbudowana, opracowana na podstawie 7. rozdziałów stanowi o dobrym przygotowaniu merytorycznym z zakresu wiedzy interdyscyplinarnej Doktorantki do tematyki pracy. Dotyczy charakterystyki albuminy jako białka modelowego w procesach glikacji, procesu glikacji i glikooksydacji białek, cukrzycy i jej biologicznych następstw oraz związków hamujących powstawanie produktów glikacji (roślin z rodzaju *Reynoutria*) i ich charakterystyki. Często Autorka pracy nie potrafi wyzbyć się zwrotów będących przykładem żargonu czy języka potocznego, np.: „Wprowadzenie zmian w ich budowie powoduje utratę aktywności biologicznej, co prowadzi do ich deformacji” (str. 16), „Liczna literatura przedmiotu” (str. 21), niemniej jednak ten rozdział pracy świadczy o pracowitości Doktorantki i umiejętności korzystania z literatury naukowej.

Część doświadczalna

107 stron części doświadczalnej Pani Magister podzieliła na główne rozdziały tj. Materiały (1), Metody badawcze (2), Wyniki (3) oraz Dyskusja (4) i Wnioski (5). Biorąc pod uwagę typową strukturę dysertacji doktorskich, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski powinny stanowić odrębne rozdziały. Ponadto uwagę Recenzenta przykuło zdanie cyt. „Związki AGEs można zidentyfikować poprzez zwiększenie intensywności fluorescencji” (str. 76), które jest niefortunnie sformułowane. Otóż wzbudzenie fluorescencji odpowiednią długością fali umożliwia obserwację intensywności fluorescencji w danym zakresie, stąd sugestia by je skorygować.

Materiały

Rozdział Materiały opisuje modelowe *in vitro* badania procesu glikacji albuminy wołowej z zastosowaniem mieszaniny cukrów redukujących. Stworzono agresywne warunki do powstania końcowych produktów zaawansowanej glikacji AGEs, tj. pentozydyny i wesperalizyny. Biorąc pod uwagę dane literaturowe nie znaleziono w nich żadnych informacji nt. istnienia wersperalizyny, dlatego zaleca się Pani Doktorantce wyjaśnienie tego pojęcia (czyżby chodziło o vesperlizynę?). Na uwagę zasługuje fakt, iż w eksperymencie zastosowano odpowiednie wzorce jako wskaźniki hamowania glikacji. Ponieważ głównym celem pracy było zastosowanie ekstraktów i frakcji roślin z rodzaju *Rynoutria*, związków naturalnie hamujących proces glikacji, Doktorantka scharakteryzowała ich pozyskanie, sposób identyfikacji oraz ekstrakcję i sporządzenie roztworów do badań. Wspomnianą pracę wzbogaciła o własne opracowanie graficzne Doktorantki, co świadczy o wysokiej znajomości i zainteresowaniu tematem w/w roślin. Opisała także odczynniki wykorzystane do badań, z podziałem na poszczególne firmy. Dwa spośród trzech stosowanych buforów scharakteryzowała pod względem ich stężenia (str. 79 oraz w wielu miejscach w dalszej części pracy brak informacji nt. stężenia PBS o pH 7.4), wydaje się, iż trzeci bufor (węglanowy) także wymaga charakterystyki. Niestety w wielu miejscach styl wypowiedzi Pani Doktorantki odbiega od stylu, jakiego powinno się używać opracowując prace naukowe. Otóż opisując albuminę Pani Magister użyła żargonu laboratoryjnego, cyt. „...jest bardzo dobrze rozpuszczalna i stabilna w szerokim zakresie w warunkach buforowych oraz solach”, „... przybliżyć warunki fizjologiczne/zbliżone do fizjologicznych” (str. 77, str. 121), dlatego w wielu miejscach dysertacji styl wypowiedzi należy dostosować do stylu pisania doświadczalnych prac naukowych.

Metody badawcze

Rozdział Metody badawcze został podzielony na 13 podrozdziałów, które opisują metodę optymalizacji i badania procesu glikacji *in vitro* (nie należy stosować zwrotu cyt. „w warunkach *in vitro*”, str. 82) wraz z dokładną charakterystyką produktów zaawansowanej glikacji, poziomu glikowanych i uszkodzonych białek, czy badanie właściwości antyglykacyjnych ekstraktów z liści i kłączy z rodzaju *Reynoutria*. Rozdział kończy dobrze opracowana i przeprowadzona elektroforeza w warunkach denaturujących oraz analiza statystyczna. Mimo obszernego opisu, ta część pracy mogłaby być wzbogacona o opis technik badawczych wykorzystywanych podczas eksperymentu. Pani Doktorantka włożyła w opracowanie metodyki i przeprowadzenie eksperymentu dużo pracy, a własne opracowania graficzne w formie 8. Rycin i 2. Tabel tylko potwierdziły Jej znajomość tematu i samodzielność na każdym etapie badań. Stężenie reagentów, czas i temperatura inkubacji to wyzwania, którym Pani Magister sprostała, co więcej, wydaje się iż w/w „zmienne eksperymentalne” nie stanowiły dla Pani Magister większego problemu. Jednak rolą Recenzenta jest wnikliwe opracowanie opinii nie tylko na temat poprawności przeprowadzonego eksperymentu lecz także jego opracowania, dlatego niestety i w tej części pracy Pani Mgr Dołowska – Jóźwiak nie wystrzega się nieściśłości. W pracy znalazło się dużo powtórzonych niefortunnie sformułowanych zwrotów, żargonowych określeń stosowanych roztworów, pomyłek w wartościach liczbowych i wiele innych. Poniżej zawarto część z nich z prośbą o korektę podczas obrony. Na wstępie należałoby ujednotwić stężenia (masowe czy molowe, str. 82), nomenklaturę, gdyż jest napisane cyt. „albumina wołowa” ale już „albumina surowicy krwi ludzkiej” (str. 84), czy też podać stosunek stężeń molowych glukozy i fruktozy w mieszaninie (w niektórych miejscach podano 1:1, czy to oznacza, że zawsze taki stosowano? – str. 82, str. 85 i dalej). Przede wszystkim brakuje wyjaśnienia, czym podyktowany został dobór parametrów (zmiennych) oraz jaki był cel prowadzenia badania glikacji w temperaturze 50°C? Ponadto w treści na str. 92 czy 94 podano stężenie ekstraktu i frakcji z liści kłączy 150 µg/µl a w opracowaniu testu przesiewowego jest stężenie równe 150 µg/ml (powtarzający się problem

dotyczący doprecyzowania wymiaru stężenia – $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ czy $\mu\text{g}/\text{ml}$ na str. 107, $\mu\text{g}/\text{ml}$ czy mg/ml na str. 123, str. 128, str. 132). Sugeruję również przereklamować język pracy z żargonu laboratoryjnego na nieco bardziej formalny, by uniknąć zwrotów typu: „... zawieszono w buforze” (str. 82), „... długościach fali”, „... szerokość szczeliny” (prawidłowy zwrot „... długościach fali wzbudzenia”, „... szerokość szczeliny wzbudzenia i emisji, str. 83 i dalej), „... wybrano doświadczałne stężenie 0.5 M mieszaniny cukrów” (str. 87 i dalej), „współczynnik molowy ε przy $\lambda = 410 \text{ nm} = \dots$ ” (... dla długości fali $\lambda = 412 \text{ nm}$ równy..., str. 103), „... w których/której dodano...” (zawierająca/zawierających to prawidłowe słowo, str. 106). Niestety w wielu miejscach brak szczegółów dotyczących stężeń czy dopełnienia zdań o informacje na temat np. substancji dodanych, co wprawia czytelnika w zakłopotanie (str. 96 i dalej), podobnie jak zdanie na tej samej stronie cyt. „... po wymieszaniu prób inkubowano 15 minut w temperaturze 37°C ”. Wyjaśnienia także wymaga zdanie: „... nie można zatem wykluczyć interferencji” (str. 83), czy „... buforowany/buforowy roztwór soli fizjologicznej PBS...” (str. 85 i dalej), a Rycina 26 prawidłowego podpisu. Wyjaśniając wzór nr 1 podano iż cyt. „... wyniki przedstawiono jako AFU”, tymczasem wyniki przedstawiono jako [%] czyli procent poziomu zaawansowanych produktów glikacji (str. 89). Na str. 93 Pani Doktorantka podała, iż cyt. „dobrano odpowiednie warunki, aby zobrazować wyniki uzyskane w warunkach *in vivo*” – informacja ta wymaga wyjaśnienia, zwłaszcza warunki *in vivo*. Ponadto „... ekstrakty i frakcje ... rozpuszczone w 50% DMSO” – jak wiadomo 50% DMSO denaturuje białko, zatem ta informacja, bądź ta część eksperymentu także wymaga korekty. Podobnie jak wiadomość, iż cyt. „... przeprowadzono dializę ... w celu usunięcia ... nieglikowanej albuminy wobec buforu PBS” (str. 94) – tutaj nasuwa się pytanie, czy taka sytuacja jest możliwa? Czy nieprzeprowadzenie dializy miałoby sens? Pani Doktorantka niezbyt prawidłowo użyła sformułowania dotyczącego krzywej wzorcowej, nazywając współczynniki równania bądź równanie linii prostej „wartościami równania krzywej”, którego pełne równanie postaci $y = ax + b$, winno się podać (str. 98, 102). Podając szczegółowy opis „Oznaczenia stężenia fruktozaminy” (str. 96) dodała, iż odczytano absorbancję BSA i HSA odpowiednio dla $\lambda = 530 \text{ nm}$ oraz 492 nm – zatem dlaczego na osi rzędnych na Wykresie 1 i 2 widnieją inne parametry? Podobne nieścisłości dotyczą pomiaru absorbancji odczynnika Ellmana – podano $\lambda = 410 \text{ nm}$, gdzie prawidłowa długość fali to 412 nm (na co również wskazują opisy osi rzędnych – Wykres 3 i 4). W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę na niezbyt poprawny opis parametrów fluorescencji i brak precyzyjnych określeń, np. na str. 104 długości fali wzbudzenia – $\lambda = 450 \text{ nm}$ czy 440 nm ? W wykazie odczynników na tej samej stronie widnieje chyba omyłkowa informacja nt. roztworu NaOH, w wielu miejscach nazywanego buforem. Ponadto wskazano, iż do buforu PBS (niestety nie wiadomo o jakim stężeniu) dodano 0.1 M NaOH – w tym miejscu Pani Doktorantka powinna wyjaśnić, czy możliwe aby uzyskać pH 10? Podobnie na str. 107 pragnę zwrócić uwagę na fakt, iż wg. Doktorantki użyty do prób 0.125 M bufor Tris-HCl ma pH 6.8 oraz 0.5 M pH 6.6, gdzie przecież w temperaturze 37°C wartość pH mieści się w granicach 7.05-8.95, a w temperaturze 25°C 7.20-9.10? Opis na str. 106 poświęcono ekstraktom z rodzaju *Reynoutria* i stosowanym wzorcom. Fraza cyt. „... wybranych ekstraktów roślinnych: *R. x bohemica*, *R. sachalinesis* i *R. japonica octanu etylu wzorców*” nie jest zrozumiała. Wreszcie podrozdział ten kończy Analiza statystyczna. Biorąc pod uwagę liczne potyczki językowe i brak precyzji w sformułowaniu niektórych zwrotów, wydawać by się mogło, iż opracowując ten podrozdział Pani Doktorantka nie wystrzegnie się błędów. W tym miejscu jednak pokuszę się o pochwałę, gdyż ten fragment pracy jest prawidłowo napisany i świadczy o poprawnym doborze testów, mimo braku danych o liczbie powtórzeń (n) – dla rozkładu innego niż normalny słuszniej jest wykonać 5 powtórzeń. Ponadto na Wykresach brak jest oznaczeń pozwalających na zobrazowanie istnienia istotnych statystycznie różnic między nimi – gwiazdki, litery, symbole, itp. (np. Wykres 7, brak oznaczeń, gdzie są istotnie różnice).

Wyniki

Rozdział Wyniki to 54 poprawnie zredagowane strony, które pokazują zebrane w formie 43. Wykresów, 3. Tabel oraz 5. Rycin efekty pracy Doktorantki przede wszystkim nad oceną wpływu czasu inkubacji,

stężenia czy samych właściwości antyglikacyjnych ekstraktów. Rozwiązując zadany cel Pani Doktorantka uwzględniła kilka zmiennych, co stanowi nie lada wyzwanie, a prawidłowo przeprowadzony eksperyment i jego odpowiednia prezentacja świadczy o Jej dojrzałości naukowej. Wiadomym jest fakt, iż duże opracowanie wyników niesie ze sobą ryzyko potknięć i pomyłek, dlatego nie dziwi fakt, że mierząc się z recenzją tak sporej publikacji wyników, można spotkać się z wieloma niedociągnięciami, czy też elementami żargonu laboratoryjnego (np. „... najwyższy pomiar fluorescencji, powyższe wykresy...” – str. 120, „... przewyższały wartości” czy „... wyższe” – str. 122, str. 124, str. 126, str. 127, str. 131, „... w przypadku wyników...” – str. 123, „... otrzymano w ekstrakcie..” – str. 124, „... pomiar jest wyższy...” – str. 114, „... a wartości ... są podobne dla stężenia...” – str. 118, czy „Użyteczność zastosowania dializy ... zawartych w ekstraktach” oraz „Porównując wartości w przypadku temperatury 37°C – zdania pozbawione sensu, „... trend wzrostu fluorescencji jest mniej wyrazisty” – str. 125, „podobny trend, wartości hamowania niższe niż...” – str. 126, str. 135, str. 136, „hamuje powstawanie (??) glikacji przy 50%.... przy pomiarze produktów dla pentozydyny (??)”, „różnice między wynikami dla pentozydyny i wesperializyny dla niektórych związków”, „lepsze IC₅₀” – str. 155, „W badaniu IC₅₀ hamowania tworzenia pentozydyny i wesperializyny wykazały” – zdanie pozbawione sensu – str. 160 oraz „jednak prątki były w przypadku BSA”, „szerszy zakres cząsteczek”, „... były węższe niż w przypadku od ścieżek” – str. 161, str. 162, „ważne różnice” – str. 160), bądź skrótów myślowych (np. cyt. „... obie wartości fluorescencji dla albumin” – str. 116, bądź cyt. „... dla stężenia ... dla BSA” – str. 117), gdy brakuje już synonimów często powtarzających się określeń. Dużą wartością pracy jest sam fakt, iż problematyka badawcza dotyczy warunków, które odzwierciedlają naturalne środowisko organizmu a badania wpisują się w priorytetowe dla dzisiejszych czasów kierunki badawcze. Podstawowa część eksperymentu została wykonana za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej, niezrozumiałym jest zatem, dlaczego nie zamieszczono nawet w suplemencie żadnego z widm fluorescencyjnych, które mogłyby dodać wartości naukowej tej części dysertacji. W wielu miejscach Pani Magister omyłkowo podpisuje Wykresy (np. Wykresy 6, 7, 17, 21, 44, 47), brakuje jednostki danej zmiennej (np. czas [dni] – Wykresy 5-8), bądź wszystkich parametrów optymalizacji (Wykresy 18-25). Pragnę zwrócić uwagę na prawidłowość sformułowania cyt. „... związku między stężeniem cukrów redukujących” a stężeniem powstających produktów AGEs, a nie cyt. „... powstawaniem produktów AGEs”, jak to opisuje Doktorantka. Podobnie „... wpływa na oznaczanie produktów” – ilościowe czy jakościowe? – str. 114). Zupełnie niepotrzebne są następujące części mowy takie jak: „fluorescencji dla produktów, dla pentozydyny, dla wesperializyny”, „zmian przy wartości średniej” – str. 118). Niestety opis dotyczący Wykresów 14 i 15 jest zupełnie odwrotny, gdyż wraz ze wzrostem stężenia białka zauważalne jest obniżenie, a nie wzrost intensywności fluorescencji produktów AGEs (str. 119). Ponadto Pani Doktorantka tłumaczy to zjawisko złamaniem fluorescencji, co wprowadza w pewien dyskomfort, ponieważ nie jest znane to sformułowanie. A na str. 135 podaje, że cyt. „monitoruje fluorescencje przy maksimach wzbudzenia”, co może nieestety świadczyć o małym doświadczeniu w zakresie znajomości spektroskopii fluorescencyjnej, stąd te nieścisłości. Opisując dalej wyjaśnia iż cyt. „... Najintensywniejszą fluorescencję zaobserwowano dla stężenia 2 mg/ml a najmniejszą dla 40 mg/ml ...”, co daje odpowiednio stężenie 3×10^{-5} M oraz 6×10^{-4} M. Należy spodziewać się różnych powodów tej sytuacji, jeśli stężenie białka wzrosło 20 razy, prawdopodobnie stężenie AGEs także, więc możemy mieć tutaj do czynienia z efektem wewnętrznego filtra (ang. *inner filter effect, IFE*), albo obecnością niewiadomego pochodzenia substancji (być może kontaminacja), albo pomyłką w oznaczaniu próbek (odwrotna kolejność). Autorka pracy wyznaczając *in vitro* stężenie albumin w procesie glikacji podsumowuje, iż cyt. „... wyniki były zadowolające” (str. 121). Niestety Pani Magister użyła zwrotu/sformułowania niezbyt typowego dla opisu badań eksperymental-

nych, dlatego jak już wcześniej wspomniano, należy unikać języka „mówionego”. Nieco dziwi fakt, dlaczego Doktorantka nie podjęła się próby większej współpracy z instrumentem badawczym i jego oprogramowaniem, rozwiązałyby to pewne wątpliwości i być może wpłynęło korzystnie na wyniki. W tym miejscu pragnę przytoczyć fakt, gdzie uzyskano wyższe wartości dla próby badanej względem próby kontrolnej, co cyt. „... nie pozwoliło na określenie aktywności antyglykacyjnej badanych ekstraktów i ... nie udało się wyróżnić najlepszych...” (str. 122). Czy w tej sytuacji nie należałoby zmniejszyć szerokości szczelin, czy wzmocnienia sygnału (tzw. ang. *sensitivity*) by uniknąć wątpliwości, czy ekstrakty z liści i kłączy były inhibitorami glikacji, jak planowano, czy też ją intensyfikowały? A być może jest to jeden z etapów optymalizacji modelu glikacji, dlatego ten fragment należy przereklamować stosując więcej hipotez badawczych w tego typu badaniach. Na str. 123 Pani Magister zmieniając tylko stężenie BSA podczas optymalizacji modelu glikacji twierdzi, iż cyt. „... metoda ta była już bardziej stabilna” – może należałoby również wyzbycić się zbyt ogólnych określeń, zważając w tym momencie na fakt, iż metoda jest wciąż ta sama, a jedynie zmieniają się parametry optymalizacji. Analizując wyniki, które zostały zamieszczone na Wykresach 20 i 21, Pani Magister podsumowuje, iż cyt. „... na ich właściwości antyglykacyjne wpływały następujące parametry: stężenie albuminy wołowej, stężenie cukrów, temperatura oraz czas inkubacji” (str. 126). Należy zaznaczyć, iż oba Wykresy dotyczą wyników uzyskanych dla wybranego stężenia białka, cukru, jednej temperatury i czasu inkubacji – skąd zatem to stwierdzenie, które zaburza większość wyników, podobnie jak przeprowadzona analiza czynnikowa (mało popularne określenie), która pozwoliła na konkluzję, iż „... aktywność antyglykacyjna ekstraktów z kłączy zależna jest od stężenia BSA”, skoro tych oto wyników nie pokazano. W tej części pracy brakuje też wyjaśnienia symbolu „R”, prawdopodobnie taki opis powinien znaleźć się w rozdziale pt. Analiza statystyczna (str. 127). Pani Doktorantka używa często sformułowań zmuszających czytelnika do samodzielnej analizy, otóż cyt. „...wyciągnięcie odpowiednich wniosków”, których nie przedstawiono, a prawdopodobnie są dobrze znane dla samego Autora pracy, wprowadza w pewne zakłopotanie (str. 128). Podobny problem dotyczy informacji zawartych na str. 131 i str. 132. Niestety określenia typu: „odpowiednie, wiele, podobnie”, czy też „... wykluczyć interferencji, oprócz interferencji i załamania” (nieznane sformułowania, które wyjątkowo wymagają objaśnienia, gdyż w tym zakresie tematyki nie są popularne), „wiarygodne wyniki”, „hamowania produktów”, „widmo ... zbliżone do długości fali wzbudzenia”, „zmieniano warunki”, „różnice w wynikach fluorescencji”, „więcej interferencji”, „wymagało dokładnego przygotowania”, „zakłócenia fluorescencji”, „stężenie..., które udowodniło swoją stabilność podczas określenia stężenia doświadczalnego białka”, „wykluczono pomiary fluorescencyjne versperlizyny” (bez podania przyczyny) czy „krzywa hamowania” (nie wiadomo czego) wynikają zapewne z braku doświadczenia w opracowywaniu prac naukowych w języku polskim, co na pewno będzie mniej kontrowersyjne podczas opracowania dysertacji do publikacji w języku angielskim. Na str. 133, Rozdział 3.4 Doktorantka w nawiasie kwadratowym podała wymiary danej wielkości. Być może zapis nie jest błędny, a wynika ze stylu pracy, ale wyjaśnienia wymaga czerwień kongo, która została scharakteryzowana absorbancją o wymiarze „nm”. Ponadto Rozdział 3.4.2 opisujący modyfikacje oksydacyjne białek podczas glikacji w obecności ekstraktów w mojej ocenie powinien mieć nieco zmodyfikowany tytuł: „Wpływ ekstraktów na utlenianie białka (grup karbonylowych i tiolowych) indukowanego procesem glikacji”. Tutaj także należałoby zmodyfikować zwrot dotyczący wg. Pani Doktorantki cyt. „oceny wolnych grup tiolowych” – w tym doświadczeniu raczej prawidłowa forma to: określenie zawartości/zmian zawartości grup tiolowych. Z kolei w Rozdziale 3.4.3 (str. 141) podjęto się próby pomiaru „poziomu struktur β -amyloidowych” – ta forma wymaga wyjaśnienia podobnie jak stężenie produktów β -amyloidu na Wykresach 35-39, czy też cyt. „analiza struktury β -amyloidu za pomocą czerwieni Konga”, która przecież jak wiadomo nie analizuje struktury (str. 142). Dodatkowo budzi wątpliwość w obszarze wiedzy na temat struktury

białek zwrot cyt. „... w zakresie tworzenia β -amyloidu...” (słusznie nie nazwanego jak poniżej produktem). Poddając analizie korelacje między potencjałem antyglikacyjnym ekstraktów roślinnych Autorka w tej części pracy nie wystrzegła się błędów, otóż błędnie opisała zależność, myląc osie „y” z osią „x”, podpisy pod Wykresami 38 i 39 (być może zamieniono Wykresy miejscami, niepoprawnie nazywając też kłacza R. x b w tym miejscu i pod kolejnymi Wykresami, octanem etylu) czy podając w niektórych przypadkach stężenie w jednostkach [AFU] (Wykresy 38, 39, 42) lub [nm] (Wykres 43). Budzą też wątpliwości wartości stężeń pokazane na Wykresach 42 i 43 – z sugestią ponownego przeliczenia. Ponadto podobnie jak wcześniej wspomniano, w pracy Pani Doktorantki na Wykresie 44, w podpisie znajduje się „pentozydyna”, w opisie osi „y” 44a-e, 44g (podwójny wykres) vesperlizyna i odwrotnie na Wykresach 44a-e, 44g (str. 159).

Mimo różnorodności badań, które wymagają bardzo rzetelnych opisów w języku naukowym, Pani mgr Arleta Dołowacka-Jóźwiak wykazała się umiejętnością rozwiązywania problemów badawczych, zrealizowała zadany cel pracy. Przedstawione wyniki badań po uwzględnieniu korekt Recenzenta pod względem językowym i ewentualnych weryfikacji budzących wątpliwości pomiarów, nadają się do komercjalizacji, stanowią bowiem element pracy rozwojowej wykazującej znamiona oryginalności, polegającej na opracowaniu pilotażowych badań celem wdrożenia sposobu/wspomagania leczenia cukrzycy do badań klinicznych.

Dyskusja

Kolejny rozdział części doświadczalnej przygotowany przez Panią Doktorantkę to opracowana na 15. stronach monografii Dyskusja. Wydawać by się mogło, iż po tak obszernym omówieniu wyników pracy, zostaną przygotowane bardzo rozbudowane rozważania nad efektami pracy. Jednakże przedstawienie przez Panią Dołowacką-Jóźwiak dyskusji nad wynikami pozwoliło na kompleksowe spojrzenie na zadany cel pracy, dzieląc dyskusję nad wynikami adekwatnie do przeprowadzonych badań dotyczących optymalizacji modelu glikacji dla badanych ekstraktów z rodzaju *Reynoutria*, przy doborze *in vitro* stężenia reagentów i odpowiednich parametrów oraz przebadania potencjału antyglikacyjnego ekstraktów, używając ostatecznego modelu glikacji, ze zwróceniem uwagi na najbardziej aktywne względem procesu glikacji, co może skutkować w zmniejszaniu ryzyka powikłań cukrzycowych i wspomagać leczenie cukrzycy oraz zmian strukturalnych białek. Zagłębiając się w lekturze tej części dysertacji, jak wiadomo najważniejszej, zabrakło odniesień do konkretnych chociażby rozdziałów, nie wspominając już o Rycinach, co uczyniło dyskusję pogładową i bardzo ogólną. Udowodniono, iż opracowana metoda ma na celu zaprojektowanie skutecznego testu przesiewowego dla inhibitora procesu glikacji z zastosowaniem surowców naturalnych, uwzględniając wszystkie parametry i warunki tego procesu, co może stanowić bazę dydaktyczną z zakresu glikacji czy zmian konformacyjnych białek. Odwołanie się do literatury i skonfrontowanie wyników z innymi Autorami świadczy o znajomości piśmiennictwa zarówno archiwalnego, jak i tego z ostatnich 5. Lat, co podkreśliło zasadność prowadzenia badań, niemniej jednak budzi zdziwienie fakt braku cytacji prac samej Autorki pracy doktorskiej (m. in. *Antiglycoxidative Properties of Extracts and Fractions from Reynoutria Rhizomes*, *Nutrients* 2021, 13(11), 4066) bądź Promotorów pracy.

Pani Doktorantka posłużyła się językiem, którego terminologia czy zwroty nieco odbiegały od naukowych. Czytając tę dyskusję wydaje się jakby Pani Doktorantka nie była pewna swoich wyników, sama stwierdza, iż cyt. „Istotnym ograniczeniem badań stanowi fakt przeprowadzenia ich w warunkach *in vitro*, nie mając przełożenia na warunki *in vivo*, co wymaga dalszych obserwacji i badań w przyszłości” (str. 180). Niemniej jednak biorąc pod uwagę fakt, że większa część badań to poszukiwanie, oszacowanie, analizowanie, niepewność w opracowaniu dyskusji, używanie wielu przypuszczeń i hipotez są

zjawiskami naturalnymi. Pragnę podkreślić krytyczny stosunek Pani Magister do wyników swojej pracy, wierząc, iż przed ich opublikowaniem zostaną dokonane stosowne korekty, czy powtórzenie badań, być może z zastosowaniem innych technik badawczych.

Wnioski

Uwzględniając zadany cel badawczy, rozbudowaną metodykę, wyniki i dyskusję, Pani Doktorantka sformułowała 6 wniosków, które odzwierciedlają najistotniejsze elementy poznawcze pracy i wskazała, które spośród badanych ekstraktów i frakcji przy odpowiednio zoptymalizowanym modelu glikacji wykazują najsilniejsze właściwości antyglykacyjne oraz protekcyjne względem utleniania białek. Sugero- wałabym dodać wniosek świadczący o zmianach konformacyjnych obu albumin i ich wpływ na funkcyj- nowanie organizmu żywego. Ponadto, ponieważ cel pracy zakładał użycie albuminy surowicy wołowej (BSA) jako białka modelowego ze względu na jego wysoką homologię w stosunku do albuminy surowicy ludzkiej (HSA), niski koszt i dostępność, bez szkody dla tej części dysertacji można zrezygnować ze zwró- cenia uwagi na różnice w wynikach badań dla każdego białka z osobna, zwłaszcza, że nie było to prio- rytetowym celem badań. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, iż cel został spełniony, a praca nosi znamiona nowatorstwa ze względu na zastosowanie do badań po raz pierwszy ekstraktów wyizolowa- nych z roślin rodzaju *Reynoutria*. Zalecam dalsze badania, by potwierdzić otrzymane wyniki, wyjaśnić nieznanne mechanizmy hamowania glikacji czy ocenić modyfikacyjne zmiany białek za pomocą stosow- nych technik badawczych.

Piśmiennictwo

Pani Magister wykorzystowała 219 naukowych pozycji bibliograficznych, z czego większość to publikacje międzynarodowe w języku angielskim. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystywania naj- nowszej literatury przedmiotu i liczne odwołania do badań w podjętej tematyce. Publikacje wydane w okresie ostatnich 5. lat stanowią około 47.5% całości literatury, co w obecnie występującej wysokiej dynamice obiegu wiedzy w nauce jest w pełni zadawalającym wskaźnikiem. Pod względem jakości- wym literatura jest dobrana prawidłowo, ponadto jest zróżnicowana i bogata. Niestety sposób jej pre- zentacji cokolwiek odbiega od wymogów redakcyjnych, co przedstawiono poniżej:

- brak akronimów w pozycjach [5, 9, 11, 16, 27, 33, 57, 62, 64, 67, 91, 92, 103, 114, 134, 138, 152, 163-166, 168, 171, 172, 188] – jest pełna nazwa czasopisma
- w pozycji [15] należy pominąć słowo „Journal”, a w pozycji [35] Mol Biomol Spectrosc
- w pozycjach [23, 25] należy numer zeszytu zamieścić w nawiasie (tuż po numerze tomu)
- w pozycji [26] należy usunąć nazwę instytucji
- w pozycjach [46,70] informacje niekompletne (artykuł czy książka)?

Streszczenie&Summary

Treść dysertacji kończy odpowiednio zredagowane, lecz zbyt obszerne (ponad 7 stron), zaprezen- towane w języku polskim i w języku angielskim streszczenie. Zawartość dowodzi o dojrzałości naukowej i stanowi uzupełnienie charakterystyki prezentowanych zagadnień naukowych. W treści streszczenia pojawia się odwołanie do pracy jednego z cytowanych autorów, czego raczej należy się wystrzeżać.

Spis Rycin, Tabel, Wykresów, Użytych Skrótów

Spis Rycin, Tabel i Wykresów przygotowano poprawnie w sposób automatyczny w oparciu o pozycje zamieszczone w pracy. Zgodnie z zasadami redagowania prac naukowych sugeruje się używanie do numeracji Tabel rzymskich liczb. Spis Użytych Skrótów nie wystrzeżę się uchybień natury stylistyczno

– interpretacyjnych (błędna odmiana, brak nawiasu), które nie mają znaczenia w merytorycznej ocenie rozprawy. Spośród wszystkich należy zwrócić uwagę na niezbyt poprawne tłumaczenie AGEs – poprawne to „końcowe produkty zaawansowanej glikacji/lipooksydacji/utleniania białek”, czy też BSA/HSA, których poprawne rozwinięcie to „albumina surowicy wołowej/ludzkiej”.

2.6 Język i formalna strona rozprawy

Umiejętności warsztatowe Doktorantki, zdolność rozwiązywania problemów, innowacyjność badań (użycie po raz pierwszy ekstraktów wyizolowanych z roślin rodzaju *Reynoutria*) i możliwości aplikacyjnego w przyszłości zastosowania w celach terapeutycznych oceniam na prawidłowe. Praca została zredagowana estetycznie, ale z uwagi na jej obszerność nie trudno wystrzec się nieścisłości. Uwagi, sugestie i pytania (nie wątpię w poprawne na nie odpowiedzi), które mogą stanowić element dyskusji, wynikają z mojego obowiązku, ciekawości tematu pracy i wnikliwości w prezentowane zagadnienia. Monoografię powinien zasilić dołączony dorobek naukowy i życiorys. Uczulam także Doktorantkę, aby opracowując rozprawę do publikacji unikać żargonu laboratoryjnego, który niestety w niektórych rozdziałach, od części doświadczalnej począwszy, na stałe zagościł na łamach kart pracy. Kolejnym mankamentem jest prawdopodobnie stosowanie tzw. „kopiuj-wklej”, co powoduje, iż niejednokrotnie nie zgadzają się podpisy pod Rycinami bądź opisy osi na Wykresach (np. str. 120), itp.

Ponadto:

- Często używana fraza „albumina wołowa oraz surowicy krwi ludzkiej” powinna zostać odpowiednio usystematyzowana – albumina wołowa i ludzka bądź albumina surowicy krwi wołowej i ludzkiej – obie bowiem to z ang. *serum albumin human or bovine*.
- „... wymienionych roślin stosunku do albuminy...”, powinno być „... wymienionych roślin w stosunku do albuminy...” (str. 7).
- „... wyznaczono także krzywe hamowania ...”, powinno brzmieć „... wyznaczono także krzywe hamowania procesu glikacji ...” (str. 8).
- Wolna grupa sulfhydrylowa czy wolna grupa tiolowa? – należy ujednoczyć (str. 10).
- „Liczba wiązań dwusiarczkowych”, wcześniej podano „disulfidowych” – należy ujednoczyć (str. 13).
- Rycina 2 – cytując T. Petersa [14], w strukturze albuminy ludzkiej znajduje się jeden Trp w pozycji 214, zaś celem porównania obu albumin i miejsc glikacji należałoby pokazać, iż w strukturze albuminy wołowej znajdują się dwie reszty Trp, w pozycji 214 i 135 (str. 15).
- Wydaje się zrozumiałym, iż w każdym kolejnym rozdziale akronimy pełnych nazw stosuje się wówczas, gdy zostały one objaśnione na początku rozdziału – AGEs (brakuje pełnej nazwy) (str. 17).
- „... w zależności od stężenia...” (str. 25), „... zdolność hamowania...”, „... dobór odpowiednich parametrów...” (str. 76), „... najwyższą fluorescencję” (str. 117), „wartości” (str. 118), „temperatura i czas” (str. 119, str. 133), „... poza zakresem, parametrów, różnic, objęma” (str. 120), „stężenia, czas, obu przypadkach” (str. 121, str. 133), „wartości..., niższe...” (str. 126, str. 127), „... istnieją różnice...”, „... dla długości fal odpowiadających...”, „... to samo dotyczy...”, „istotnie statystycznie związki...”, „najsilniejszy związek...” (str. 127, str. 130), „hamowania”, „zakłócenia” – czego? (str. 155) – nie wiadomo „czego/od czego/jakie/które”?
- Zamiast „reszty cysteinowe” poprawny zwrot brzmi „reszty cysteinyłowe” bądź „reszty cysteiny” (str. 28).

- Wymieniając aminokwasy jako miejsca glikacji należałoby dodać do „Lys-64” itd. słowo „reszt Lys-64 itd.” (dotyczy wszystkich miejsc, w szczególności str. 29).
- Lekki są ligandami egzogennymi, bilirubina, tryptofan, kwasy tłuszczowe – egzogennymi – w tym miejscu należałoby wymienić przykłady ligandów zarówno egzo-, jak i endogennych (str. 29).
- NH₂Cl to „chloramina” (na Rycinie 10 jest „reaktywne chlorany”) (str. 32).
- „... w mitochondriach, dinukleotydnikotyamidoadeninowy (NADH) oraz dinukleotydflawinoadeninowy (FADH₂)” – nieprawidłowa forma (str. 32).
- Brak „[.]” (str. 36), brak numeracji stron od 46 do 54, od 70 do 74, 97, 100, od 149 do 150, od 152 do 153, od 159 do 159, ponadto pozycje [90,91,92] zapisać należy w postaci [90-92] (str. 51), [163, 164, 165, 166, 167] jako [163-167] (str. 165), [169-174] oraz [176-178] (str. 167).
- Jest „pochodnych tiazoliowych” oraz „tiazoliowe”, prawidłowe zwroty to: „pochodnych tiazolowych” oraz „tiazolowe (str. 51).
- Substancja czynna ALT-711 to alagebrium, nie ma potrzeby ponownie w tej samej komórce wymienić „alagebrium” (str. 51).
- „... szkielet opiera się na 1,2-difenyloetylenowym.”, powinno być „... szkielet opiera się na 1,2-difenyloetylenowym szkielecie.” (str. 63).
- Rycina 21 wymaga dostosowania jakości (str. 65).
- Jest „przeprowadzone w warunkach *in vitro*”, „przeprowadzone w warunkach *in vivo*”, prawidłowe zwroty to: „przeprowadzone *in vitro*, ... *in vivo*” (str. 70, str. 73, str. 74, str. 77).
- Po skrócie „mgr” nie można pisać kropki (str. 78).
- Jest „wesperalizyna”, prawidłowa forma to: „vesperlizyna” (str. 83).
- „Spadek” (str. 12, str. 120) – określenie „spadek” wydaje się żargonem laboratoryjnym, powinno być „zmniejszenie, obniżenie”, ponadto „niższą wartość”, „niskiej masie” – prawidłowy zwrot to: „mniejszą wartość”, „małej masie” (str. 160, str. 162, str. 164).
- Jest „roztwór albuminy wołowej”, prawidłowa forma to: „roztwór albuminy ludzkiej” (str. 85 i dalej).
- Zamiast „przy długości fali”, prawidłowa forma to: „dla długości fali” (str. 89 i dalej).
- Jest „... w buforowanym roztworze”, prawidłowa forma to: „w buforowanym roztworze” czego? (str. 91, str. 93).
- Jest „... etanolu: etanol z octanem etylu”, „rozbić”, „zwirować, zwirowaniu” – prawidłowa forma to: „mieszanina etanolu z octanem etylu”, „roztworzyć”, „wirować, wirowaniu” (str. 100).
- Brak pełnej nazwy „TCA” (str. 104).
- Jest „wykonano wykres” – prawidłowa forma to: „sporządzono wykres” (str. 105, str. 155).
- Brakuje informacji nt. dodanej ilości NaN₃ (str. 106).
- W wykazie odczynników pominąć słowo „roztwór” (str. 108).
- Jest „Na Wykresach 8 i 9” – prawidłowo „Na Wykresach 7 i 8” (str. 112).
- Jest „... przed procesem dializy i po” – brakuje „... po dializie” (str. 114).
- Zbędna fraza „w odpowiednich stężeniach” (str. 115).
- Jest „... różne stężenia” – należy wybrać które (str. 120).
- Jest „... 2 mg/ml/10 mg/ml stężenia białka i parametry: temperatura...” – prawidłowe sformułowanie to: „...stężenie białka 2 mg/ml i temperatura...” (str. 122, str. 123, str. 128).
- Tabela 8 – błędny opis – jest „Związek między ... a stężeniem BSA” – niestety stężenie BSA było stałe (str. 127).
- Brakuje skrótu AGEs (str. 130).

- Jest „*acetanowych*” – prawidłowa forma to: „*acetonowych*”, ponadto brakuje przy wartościach (%) informacji, iż to zjawisko dotyczy inhibicji (str. 134, str. 135, str. 138) lub ochrony (str. 140).
- Jest *OH*, *O³*, *O²⁻*, *O³⁻* – powinno być *OH^{*}*, *O₃*, *O^{*}2*, (str. 137).
- Jest „*tworzenie karbonylu*”, powinno być „*tworzenie grup karbonylowych*” (str. 155).
- Jest „*glikacji z HSA, z BSA*” – bez przyimka „*z*” (str. 160).
- Jest „*które przez wiązania*” – prawidłowa forma to: „*poprzez*” (str. 161).
- Jest „*wyraźny spadek ruchliwości elektroforetycznej*” – wyraźnie zmniejszoną ruchliwość elektroforetyczną” (str. 163).

Dodatkowo nieścisłości literowe:

- Jest „*... o bogatym składzie fitochemicznym*”, „*hekspeptydu*”, „*insulina*” prawidłowe zwroty to: „*...o bogatym składzie fitochemicznym*”, „*heksapeptydu*”, „*insulina*” (str. 6, str. 9, str. 17).
- Podpis pod Ryc. 7, jest „*imidazolodilizy*” – powinno być „*imidazolodilizyna*” (ang. *imidazolium dilysine*) (str. 23); na Ryc. 11 – jest „*peoksydacja lipidów*”, prawidłowy zwrot to: „*peroksydacja lipidów*” (str. 35).
- Jest „*neuropatia cukrzycowa*”, „*reaktywnych karobonyli*”, „*produkty Amadori*”, „*gikacji*”, prawidłowe zwroty to: „*neuropatia cukrzycowa*”, *reaktywnych grup karbonylowych*”, „*produkty Amadori*”, „*glikacji*” (str. 39, str. 42, str. 48).
- Jest „*naturalny dipeptyd*”, prawidłowy zwrot to: „*naturalny dipeptyd*” (str. 50)
- Jest „*bromek N-fenacylotiazoliow*” – należy podać poprawną nazwę (str. 51).
- Jest „*reswerarol*”, „*formia*”, „*hipolipidemiczne*”, „*cytoyoksyczność*”, prawidłowe zwroty to: „*resweratrol*”, „*forma*”, „*hipolipidemiczną*”, „*cytotoksyczność*” (str. 68, str. 73).
- Rycina 24 – jest „*ekstarkty*”, prawidłowo powinno być „*ekstrakty*” (str. 79).
- Brak spacji pomiędzy PBS a „*o*”, bufor i PBS, (str. 86).
- Jest „*formazonu*”, „*do wzorowej*” – prawidłowe zwroty to: „*formazanu*” „*do wzorcowej*” (str. 96, str. 97).
- Jest „*poodbne*” – prawidłowa forma to: „*podobne*” (str. 116).
- Jest R.S octan etylu – skrót „*s*” winien być napisany małą literą (str. 129).
- Jest „*antygliakcyjnego*” – prawidłowy zwrot to: „*antyglikacyjnego*” (str. 132)
- Jest „*R. x bocemica*” – prawidłowa nazwa to: „*R x bohemica*” (str. 139).
- Jest „*mL*” – prawidłowa forma to: „*ml*” (str. 160).

oraz błędy gramatyczne:

- Jest „*tłuszczy*”, „*tłumaczq*”, prawidłowe zwroty to: „*tłuszczów*”, „*tłumaczy*” (str. 39, str. 43).
- Jest „*zastosowane krople*”, „*aminogunidyna*”, prawidłowe zwroty to: „*zastosowanie kropli*”, „*aminoguanidyna*” (str. 50, str. 151, str. 155, str. 160).
- Jest „*charakteryzujące się pierścieniem pirydynowych, które wykazały*”, „*rozrywające*”, „*hamujące*”, „*lub ich związania*”, prawidłowe zwroty to: „*charakteryzująca się pierścieniem pirydynowym, która wykazała*”, „*rozrywa*”, „*hamuje*”, „*lub ich wiązania*” (str. 51).
- Jest „*wyizolowany*”, „*optymalizacja*”, prawidłowe zwroty to: „*wyizolowana*”, „*optymalizację*” (str. 74, str. 77).
- Jest „*aminogunidyna*”, „*aminoguniadyna*”, „*aminugunidynę*”, prawidłowe zwroty to: „*aminoguanidyna*” (str. 77, str. 92, str. 48, str. 123, str. 128).
- Jest „*2.4-dinitrofenylohydrazyny*”, prawidłowy zapis to: „*2,4-dinitrofenylohydrazyna*” (str. 80).
- Jest „*wpływa*”, prawidłowa forma to: „*wpływ*” (str. 82).
- Jest „*długosicach*”, prawidłowa forma to: „*długościach*” (str. 84 i dalej).

- Jest „ocenie”, prawidłowa forma to: „oceny” (str. 85).
- „dwukropek” po „... fali wzbudzenia”, a nie przed, jest „zawierające” i „zwierające”, prawidłowy zwrot to: „zawierających” i „zawierające”, wzór nr 1 – należy dodać „w obecności ekstraktu” (str. 89).
- Jest „modyfikacji” – powinno być „modyfikacja” (str. 95).
- Jest „kwasu 5,5'-ditiobis-(kwas 2-nitrobenzoesowy)”, „5-tio-nitrobenzoesowy” – prawidłowa forma to: „kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego)”, „5-tio-2-nitrobenzoesowy” (str. 101).
- Jest „32 μ M roztworu tioflawiny”, prawidłowa forma to: 32 μ M roztwór tioflawiny (str. 104).
- Jest „rozpuszczone, witaminy, metforminę” – prawidłowa odmiana to: „rozpuszczony, witamina, metformina” (str. 105).
- Jest „... octanie etylu”, „mas cząsteczek” – prawidłowa forma to: „... w octanie etylu”, „mas cząsteczkowych” (str. 107).
- Jest „... dodano TEMED”, powinno być „... TEMEDu” (str. 108).
- Jest „przepuszczać, mogło” – powinno być „przypuszczać, mógł” (str. 113).
- Jest „stężeniu”, „zawierające” – prawidłowa forma to: „stężenia”, „zawierających” (str. 119, str. 120).
- Jest „zachodzących” – prawidłowa forma to: „zachodzące” (str. 121).
- Jest „albuminę, mieszaninę” – prawidłowa forma to: „albumina/mieszanina” (str. 123).
- Jest „... powstawania ... produktów pentozydyny”, „obniżyła, wzrosła” – prawidłowy zwrot to: „powstawania pentozydyny”, „obniżył, wzrósł” (str. 124, str. 127, str. 134, str. 139).
- Jest „glikowanych” – prawidłowa forma to: „glikowanej” (str. 137).
- Jest „potencjałem antyglukacyjnym”, „działające ekstrakty” – prawidłowa forma to: „potencjał antyglukacyjny”, „działający ekstrakt” (str. 154, str. 155).
- Jest „chronić”, „roztwory”, „pentozydyny” – prawidłowa forma to: „chronić”, „roztworów”, „pentozydyny” (str. 155, str. 160).
- Jest „rozdziatu elektroforetycznej”, „wskazywały”, „R.J. octanu etylu i metforminy” – prawidłowa forma to: „rozdziatu elektroforetycznego”, „wskazywało”, „R.j. octan etylu i metformina” (str. 162).

2.7 Uwagi i sugestie

Bez wątpienia Pani Doktorantka jest na dobrej drodze, by stać się Specjalistą w dziedzinie glikacji i jej zapobieganiu. Biorąc pod uwagę powyższe, proszę o wyjaśnienie następujących kwestii:

- Skoro glikacja i oksydacja zachodzą równolegle i prowadzą do podobnych skutków ubocznych, czy aby na pewno badania dają podstawy by wnioskować o działaniu hamującym glikację a nie oksydację?
- Wysokie stężenie zaawansowanych produktów glikacji AGEs powoduje destrukcję drugo- i trzeciorzędowej struktury albuminy. Jakie inne znane techniki badawcze można zastosować do oceny stopnia glikacji?
- Lys-137, Lys-414 i inne reszty Lizyny oraz Arg-197 i inne reszty argininy są potencjalnymi miejscami glikacji – jaki to ma wpływ na terapię?
- Czy każdy etap glikacji ma wpływ na powinowactwo względem ligandów?
- Dalsze plany - izolacja albuminy z krwi osób chorych na cukrzycę a może zastosowanie albuminy kontrolnej?

- Jaka jest zasadność stosowania takich rozpuszczalników jak dichlorometan, octan etylu, eter czy butanol, zwłaszcza w kontakcie ekstraktów z albuminą (inaczej, gdyby były stosowane tylko podczas ekstrakcji substancji czynnych). Tutaj nasuwa się pytanie, czy praca pokazuje właściwości ekstraktów względem zastosowania klinicznego?

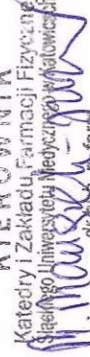
3. WNIOSKI I KONKLUZJA KOŃCOWA

Cukrzyca to przewlekłe schorzenie, którego przyczyną jest zaburzenie wydzielania insuliny. Wiąże się z uszkodzeniem, zaburzeniem czynności, czy niewydolnością różnych narządów. Zasadą terapii cukrzycy jest kontrola gospodarki węglowodanowej i leczenie wszystkich zaburzeń towarzyszących chorobie. Ze względu na jej globalny zasięg i częstość występowania, aby jej zapobiec, opracowuje się nowe preparaty spowalniające procesy cukrzycowe. W związku z powyższym ocena aktywności antyglukacyjnej wybranych produktów, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, jest niezwykle zasadna. Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska spełnia warunek rozwiązania oryginalnego problemu naukowego, stanowi twórczy wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych. Wnosi elementy poznawcze i zachęca do oceny coraz to nowych preparatów, nie tylko naturalnych, lecz także nowosyntetyzowanych. Niestety w rozprawie nie znalazłam żadnych informacji nawet o częściowym opublikowaniu rezultatów, bądź innych formach upowszechniania uzyskanych wyników. Przedstawiony zakres prac badawczych ma charakter badań podstawowych, tym samym nie ma ograniczeń w ich publikowaniu. Nie znalazłam także informacji na temat źródła finansowania badań i ewentualnym udziale Doktoranta w projektach badawczych. Mając na uwadze wartość merytoryczną, postawione hipotezy i odpowiedzi zawarte w nich (włącznie z krytycznym podejściem do otrzymanych wyników) oceniam pozytywnie przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską podkreślając dojrzałość i wnikliwość naukową Doktorantki.

W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dalsze procedowanie niniejszej rozprawy doktorskiej, mając na uwadze, iż bez względu na uwagi, które wynikają z roli Recenzenta, spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązujących przepisach ustawowych – Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.)).

łączę wyrazy szacunku,

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. farm.
Małgorzata Maciążek-Jurczyk prof. SUM