



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; andrzej.gamian@hirszfeld.pl

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 19.09.2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Arlety Dołowackiej-Józwiak pt. „Właściwości antyglikacyjne ekstraktów roślinnych z rodzaju *Reynoutria*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jakuba

Gburka

Praca dotyczy badań nad glikacją w aspekcie możliwości wykorzystania ekstraktów roślinnych do hamowania procesów nieenzymatycznych modyfikacji białek w organizmie. Produkty zaawansowanej glikacji (AGE) tworzą się w warunkach fizjologicznych, a w podwyższonych ilościach w wielu procesach chorobowych są istotnym czynnikiem chorobotwórczości. Zahamowanie tych procesów chorobowych jest poważnym wyzwaniem dla badaczy, dlatego podjęty temat pracy doktorskiej jest istotny, aktualny, wychodzi naprzeciw potrzeb medycyny i jest w pełni uzasadniony. Projekt jest kontynuacją badań prowadzonych już od wielu lat w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Badaniami objęto ekstrakty trzech gatunków rdestu w oczekiwaniu poznania możliwości wykorzystania wyników w terapii lub łagodzeniu objawów chorobowych, schorzeń metabolicznych, poza tym badania mają znaczenie biologiczne. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku jest wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów i metod, wyniki i dyskusja, następnie umieszczono wnioski, spis piśmiennictwa, po czym streszczenie w języku polskim i angielskim, spisy rycin, tabel i wykresów oraz wykaz skrótów. Praca zawiera 225 stron maszynopisu wraz z 36 rycinami, 10 tabelami, 47 wykresami oraz cytowanymi 219 pozycjami piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka wprowadza do tematyki, uzasadnia logicznie cel badań, omawia albuminę surowicy wołowej oraz ludzkiej, porównuje budowę tych cząsteczek, następnie przybliży procesy glikacji białek i produkty AGE, w szczególności modyfikację albumin, z kolei charakteryzuje te procesy w cukrzycy, jej powikłaniach i w innych chorobach. Następnie omawia związki hamujące na różnych etapach glikacji powstawanie produktów AGE, by przedstawić na końcu

badane gatunki rdestowca, skład fitochemiczny, farmakologię i zastosowanie poszczególnych części rośliny i ekstraktów. Cel badań autorka przedstawiła na początku pracy i precyzuje rozpoczynając część doświadczalną. Założyła opracowanie i optymalizację metody glikacji, następnie planuje ocenę potencjału hamującego glikację przez otrzymane ekstrakty, dalej określenie siły oddziaływania antyglykacyjnego wybranych najlepszych ekstraktów, by w końcu przeprowadzić analizę elektroforetyczną produktów AGE dla potwierdzenia poprawności zastosowanych metod tworzenia AGE.

W części metodycznej autorka opisuje surowce roślinne używane w badaniach, mianowicie suszone liście i kłącza trzech gatunków rdestu, następnie metodę glikacji z analizą poszczególnych etapów i parametrów dla ustalenia optymalnych warunków. Pomiaru stężenia AGE dokonywano metodą fluorescencyjną w dwóch odmianach, dla pentozydyny i wesperializyny. Badania właściwości antyglykacyjnych ekstraktów wykonywano metodą hamowania tworzenia produktów AGE. Następnie opisuje metodę oznaczania fruktozaminy, wolnych grup karbonylowych, wolnych grup tiolowych, zawartości struktur β -amyloidowych metodami z czerwienią Kongo i z tioflawiną T, rozdziału nisko- i wysoko-cząsteczkowych AGE oraz elektroforezę SDS-PAGE i na końcu jest przeprowadzona analiza statystyczna. Metody są opisane szczegółowo, czytelnie przedstawiono opisy materiałów, przez co praca jest logicznym, jednolitym wywodem.

Badania prowadzono w pierwszej kolejności optymalizowania warunków glikacji z użyciem dwóch białek, BSA i HSA oraz dwóch cukrów w mieszaninie, glukozy i fruktozy, co przy analizie metodą fluorescencyjną tworzenia produktów glikacji takich jak pentozydyna i wesperializyna okazało się dobrym wyborem. Dobrane wzorce jak resweratrol, aminoguanidyna, witamina C, metformina ułatwiły interpretację wyników. Tutaj pewne zastrzeżenie można mieć odnośnie zebrania do badań kłączy i liści, w miesiącu wrześniu, kiedy wegetacja nie jest tak intensywna jak we wcześniejszych miesiącach i mogła wpłynąć na wyniki większej zawartości korzystnych substancji w kłączach – proszę o odniesienie się do tej kwestii. Przygotowano ekstrakty acetonowe, a z nich kolejno ekstrakty pięcioma rozpuszczalnikami, w sumie 42 ekstrakty. Pytanie nasuwa się odnośnie ekstrakcji etanolowej, dlaczego nie stosowano jej w pracy, mimo cytowanych korzystnych właściwości etanolowych ekstraktów nasion *Cassipourea* zawierających antrachinony? Ważnym osiągnięciem w pracy było opracowanie metody przesiewowej i dobór warunków zapobiegania interferencji fluorescencji samych ekstraktów. Opracowano z sukcesem metodę hamowania glikacji, na jej różnych etapach. Autorka wykazała, że ekstrakty z *Reynoutria sachalinensis* najlepiej

hamowały tworzenie produktów wczesnej i późnej glikacji, natomiast z *R. japonica* najlepiej chroniły przed utlenianiem badanych białek i wykazywały silne właściwości hamowania tworzenia β -amyloidu. Hybrydowa forma *R. x bohemica* wykazywała silne właściwości antyglykacyjne. Spośród ekstraktów najbardziej aktywne w hamowaniu glikacji były ekstrakty octanem etylu, eterem dietylowym i acetonowy. Ważnym wynikiem pracy jest opracowanie i walidacja modelu glikacji i jej inhibicji przez złożone ekstrakty roślinne. Wyniki mają wartość praktyczną dla optymalnego dobierania poszczególnych ekstraktów do hamowania tworzenia produktów glikacji.

W dyskusji autorka odnosi się do danych z piśmiennictwa, właściwie wykorzystanego, podsumowuje uzyskane wyniki, podejmuje wyjaśnienia wyników nieraz trudnych do jednoznacznej oceny. Autorka interpretuje właściwie wyniki optymalizacji warunków glikacji, etapów wczesnej i zaawansowanej glikacji. To pozwoliło na sprawdzenie, który z ekstraktów hamuje tworzenie AGE oraz na którym etapie dany ekstrakt działa. Autorka komentuje ograniczenia opracowanej metody dializy materiału, mającej obniżyć interferencję fluorescencji ekstraktów. Autorka omawia szczegółowo możliwy wpływ składników ekstraktów na poszczególne składowe testów i układu oznaczania glikacji. Zauważone znaczące ograniczenie tworzenia grup karbonylowych i ochrona grup tiolowych przez ekstrakty interpretuje ich działaniem przeciwtleniającym. Największy stopień hamowania ich tworzenia wykazywały ekstrakty z *R. japonica*, zawierające najwyższą zawartość resweratrolu. Niektóre badania cytowane przez autorkę wskazują na korzystne działanie w chorobie Alzheimera, stąd nasuwa się pytanie który z ekstraktów mógłby być skuteczny w leczeniu tej choroby? Ekstrakty badanych gatunków roślin zawierają, poza znanymi, najprawdopodobniej substancje o aktywnościach nie do końca dotąd zbadanych, stąd wyniki uzyskane w pracy są wypadkową aktywności przeciwyglykacyjnej. Wartość i oryginalność przedstawionej pracy polega przede wszystkim na optymalizacji testów do oznaczania aktywności antyglykacyjnej frakcji roślinnych. Autorka wykorzystwała umiejętnie dostępne narzędzia metodologiczne w swoich badaniach, opierając się na wynikach własnych badań proponuje dalsze kierunki poszukiwań.

Odnosnie uwag krytycznych, dotyczą głównie strony redakcyjnej. Nazwa produktów końcowych zaawansowanej glikacji AGE jest dosłownym tłumaczeniem terminu angielskiego, a nie końcowe zaawansowane produkty glikacji, choć dopuszczalna terminologia, jednak istotniejsze jest jednolite nazewnictwo w pracy. Zamiast albumina wołowa (od str. 9) należy ściślej stosować nazwę albumina surowicy wołowej. Wiadomości podręcznikowe na str. 16-17 są zbędne dla czytelnika. Na str. 17, l. 15 powinno być ...Obejmują one procesy np.

przyłączenia..., na str.18. l.1 ...ustrojowych, macierzy..., na str. 30 l. 7 powinno być ...do N-końcowej grupy... Ryciny 4 i 6 są podobne, dlatego można je połączyć. Zamiast ...proces glikacji... lepiej stosować ...glikacji..., gdyż glikacja sama w sobie jest procesem, to samo dotyczy ...PBS... a nie ...bufor PBS o pH 7,4... Ryc. 11 ...choroba Alzheimerera..., str. 53,54 ...galektyna 3..., SDS to siarczan dodecyłu sodu. Sprawdzenia wymagają opisy wykresów 6 i 7, 17, 21 oraz zdanie 3 od dołu na str. 112. Czy ...aktywnością antyoksydacyjną...? na str. 126 l. 16 od dołu, na wykresach 22-25 ...tworzenia... czy ...hamowania tworzenia...?, na str. 161 powinno być ...albuminy ludzkiej (Rycina 34). Niskocząsteczkowe produkty glikacji wędrują w elektroforezie szybko wypływając z żelu, stąd są niewidoczne na rysunkach. Na str. 166 w l. 3 podano ksylitol, czy rzeczywiście jest cukrem redukującym? Podsumowując, należy podkreślić że praca jest wartościowa, dobrze zaplanowana i wykonana. Wyniki przedstawiają dane stanowiące podstawę do dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do poszerzenia wiedzy o glikacji i możliwościach zahamowania tego procesu substancjami roślinnymi.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Arlety Dołowackiej-Józwiak zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w obowiązujących przepisach, w tym w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (na podstawie art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz 1789 ze zm.). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Arlety Dołowackiej-Józwiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych
Andrzej Gamin
Prof. dr hab. Andrzej Gamin