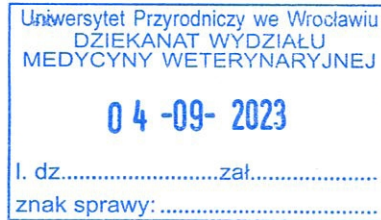


dr hab. Monika Sujka, prof. UP  
Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie



## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Joanny Niewiadomskiej

pt. „Analiza potencjału biologicznego ekstraktu polifenolowego ze skórek *Punica granatum* L. na szczurzym modelu zespołu metabolicznego”

wykonanej w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów (Zakład Medycyny Translacyjnej) na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Noszczyk-Nowak

oraz w Zakładzie Ratownictwa Medycznego na Wydziale Nauk o Zdrowiu

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Gajka

### **Podstawa prawna:**

- Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm),

**Podstawa formalna:** pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego, z dnia 27.06.2023 w sprawie powołania recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Joanny Niewiadomskiej oraz wydruk pracy doktorskiej.



## Ocena formalna pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Analiza potencjału biologicznego ekstraktu polifenolowego ze skórek *Punica granatum* L. na szczurzym modelu zespołu metabolicznego” liczy 90 ponumerowanych stron i składa się z 10 rozdziałów zatytułowanych następująco: *Streszczenie i wykaz skrótów*, *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*, *Wstęp*, *Bibliografia*, *Cele badania*, *Manuskrypt I*, *Manuskrypt II*, *Manuskrypt III*, *Wnioski i Podsumowanie*. W treści rozprawy ujęte są pełne teksty trzech spójnych tematycznie, oryginalnych prac twórczych opublikowanych w latach 2022-2023 w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się w wykazie czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN).

1. **Niewiadomska J.**, Gajek-Marecka A., Gajek J., Noszczyk-Nowak A.: Biological Potential of Polyphenols in the Context of Metabolic Syndrome: An Analysis of Studies on Animal Models. *Biology*, 2022, 11(4), 559. <https://doi.org/10.3390/biology11040559>
2. **Niewiadomska J.**, Kumiega E., Płóciennik M., Gajek J., Noszczyk-Nowak A.: Effects of *Punica granatum* L. peel extract supplementation on body weight, cardiac function, and haematological and biochemical parameters in an animal model of metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Research*, 2023, 67. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0031>
3. **Niewiadomska J.**, Kasztura M., Janus I., Chełmecka E., Stygar D.M., Frydrychowski P., Wojdyło A., Noszczyk-Nowak A.: *Punica granatum* L. extract show cardioprotective effects measured by oxidative stress markers and biomarkers of heart failure in an animal model of metabolic syndrome. *Antioxidants*, 2023, 12, 1152. <https://doi.org/10.3390/antiox12061152>

Sumaryczna liczba punktów dla cyklu publikacji wg wykazu MEiN wynosi 340, a sumaryczny współczynnik wpływu *Impact Factor* wg bazy JCR – 14,901. Wszystkie publikacje są wieloautorskie (4-8 autorów), a Doktorantka w każdej z nich jest pierwszym autorem. Z deklaracji umieszczonej w Rozdziale 2 pracy oraz oświadczenia dołączonego w oddzielnym dokumencie (potwierdzonego przez Promotor rozprawy prof. dr hab. Agnieszkę Noszczyk-Nowak) wynika, że udział Doktorantki w powstaniu publikacji polegał



na przygotowaniu przeglądu piśmiennictwa (Manuskrypt 1), opracowaniu koncepcji i metodologii (Manuskrypty 1, 2 i 3), przeprowadzeniu eksperymentów (Manuskrypty 2 i 3), analizie statystycznej wyników oraz ich graficznej prezentacji (Manuskrypty 1, 2 i 3), a także przygotowaniu pierwotnej i ostatecznej wersji publikacji (Manuskrypty 1, 2 i 3). Nie ulega więc wątpliwości, że Jej rola była wiodąca. Świadczy to zatem o opanowaniu przez Doktorantkę umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym planowania eksperymentu i wykonania analiz oraz prezentowania i interpretacji wyników badań. Doktorantka nie wymieniła w oświadczeniu faktu, że w każdej publikacji pełniła również rolę autora korespondencyjnego (w Manuskrypcie 3 wspólnie z prof. dr hab. Agnieszką Noszczyk-Nowak). Powierzenie Pani lek. wet. Joannie Niewiadomskiej tak odpowiedzialnej funkcji jest wyrazem uznania pozostałych współautorów dla Jej profesjonalizmu.

Podsumowując, stwierdzam, że pod względem formalnym praca spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Zespół metaboliczny (ang. *metabolic syndrome*, MetS) stanowi niezwykle istotny, globalny problem zdrowotny, ekonomiczny oraz społeczny. Szacuje się, że tylko w Polsce dotyczy on ok. 1/3 populacji osób dorosłych i niestety dane te wykazują tendencję wzrostową. W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszy się zastosowanie substancji biologicznie czynnych pochodzenia roślinnego w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych. Związki takie, o sprawdzonym i udowodnionym w badaniach klinicznych działaniu, uważane są za tańszą i bezpieczniejszą dla zdrowia alternatywę dla tradycyjnie stosowanych syntetycznych farmaceutyków. W licznych badaniach klinicznych i epidemiologicznych dowiedziono, że dieta będąca źródłem związków polifenolowych przyczynia się do zmniejszenia ryzyka występowania między innymi otyłości, cukrzycy typu 2, nowotworów oraz chorób układu sercowo-naczyniowego. Naturalne związki polifenolowe wykazują zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne. Najwięcej badań dotyczy takich źródeł tych substancji jak zielona herbata, kakao, kawa, jagody, owoce cytrusowe i imbir. Stosowanie związków pochodzenia naturalnego w profilaktyce czy leczeniu chorób jest jednak problematyczne. Przede wszystkim pozyskiwanie takich związków może być kosztowne i czasochłonne m.in. ze względu na ich zróżnicowaną zawartość w surowcu roślinnym, a ponadto ich biodostępność,



a tym samym efekt farmaceutyczny, zależy od szeregu czynników. W przypadku badań nad zespołem metabolicznym dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że jest to schorzenie wieloukładowe i wymaga kompleksowego podejścia. Aby scharakteryzować farmakokinetykę i farmakodynamikę związków polifenolowych *in vivo* niezbędne są więc rozszerzone badania na modelach zwierzęcych, zanim zostaną one wykonane na ludziach. Dlatego bez wątpienia tematyka badawcza podjęta przez lek. wet. Joannę Niewiadomską jest bardzo aktualna, a uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale również aplikacyjną.

Tytuł rozprawy jest zgodny z jej treścią. Rozdział pierwszy stanowi wykaz skrótów stosowanych w dysertacji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Do tej części mam drobną uwagę dotyczącą Ryc. 1. Znajduje się ona w nieodpowiednim miejscu (pod wnioskami, zamiast w części metodycznej) i brakuje odniesienia do niej w tekście. Dodatkowo, w streszczeniu w j. polskim (str. 6) w ostatnim zdaniu *Wstępu* użyto dwukrotnie w jednym zdaniu sformułowania „na modelu zwierzęcym”. W rozdziale drugim znajduje się wykaz publikacji chodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z deklarowanym wkładem Doktorantki w ich powstanie oraz wskaźnik *Impact Factor* czasopism i liczba punktów wg wykazu MEiN (w tekście zastosowano błędny skrót MNiSW). Kolejnym rozdziałem jest 11-stronnicowy „*Wstęp*”, w którym Doktorantka dokonuje syntetycznego omówienia zespołu metabolicznego, skupiając się głównie na patofizjologii, a także omawia związki polifenolowe i ich rolę w terapii tej choroby. Ta część pracy napisana jest zwięźle i rzeczowo, i w moim odczuciu wyczerpująco przedstawia zagadnienia, które interesują Autorkę. Jedynie pewne zastrzeżenia mogą mieć do użytego słownictwa i stylu niektórych zdań, który sugeruje dosłowne tłumaczenie tekstu anglojęzycznego na język polski. Moim zdaniem Autorka nadużywa słowa „komponenta”, które w niektórych zdaniach mogłoby być zastąpione słowem „czynnik” lub „składowa” (zależnie od kontekstu). Na str. 12 zamiast słowa „definicja” pojawiło się słowo „delicja”. Znalazłam też w tekście nieliczne błędy interpunkcyjne. Piśmiennictwo zebrane w rozdziale 4 pt. „*Bibliografia*” liczy 77 pozycji, w ogromnej większości anglojęzycznych, z których ponad 75% to publikacje z ostatnich 10 lat. Dobór źródeł jest bardzo staranny, co świadczy o dobrym zorientowaniu Doktorantki w literaturze przedmiotu. Cytowane prace pochodzą z prestiżowych czasopism z obszaru medycyny, dietetyki, technologii żywności, czy botaniki.

W rozdziale pt. „*Cele badania*” (tytuł powinien brzmieć raczej „Cel badań” lub „Cel pracy”) Autorka wymieniła 3 główne cele, z których pierwszy moim zdaniem powinien być



znacznie skrócony i brzmieć następująco: „Analiza jakościowa i ilościowa związków polifenolowych wchodzących w skład ekstraktu ze skórek *Punica granatum* L”. W celu drugim i trzecim powinna się znaleźć informacja, że pomiary będą dotyczyły modelu zwierzęcego. Rozdział ten nie zawiera jasno sformułowanej hipotezy (lub hipotez) badawczej. Jest wprawdzie krótka wzmianka w pierwszym zdaniu tego rozdziału, że, parafrazując, „wysunięto hipotezę o efektywności ekstraktu ze skórek granatowca również w przypadku współwystępowania komponent zespołu metabolicznego”, ale to sformułowanie jest moim zdaniem zbyt ogólne.

Kolejne trzy rozdziały zawierają pełne teksty publikacji wraz z jednostronicowymi ich streszczeniami w języku polskim. Brakuje, obszerniejszego niż w streszczeniu w Rozdziale 1, omówienia części eksperymentalnej oraz uzyskanych wyników w języku polskim. Stanowi to pewne wyzwanie dla czytelnika, ponieważ traci się płynność w analizowaniu treści dysertacji, przechodząc z części polskojęzycznej do części w języku angielskim. Każda z prezentowanych publikacji została pozytywnie oceniona przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów międzynarodowych, co potwierdza zasadność podjęcia badań oraz właściwą ich realizację.

Pierwsza publikacja (*Manuskrypt I*) wchodząca w skład cyklu jest pracą przeglądową dotyczącą badań skuteczności związków polifenolowych w terapii zespołu metabolicznego na modelu zwierzęcym. Praca ta powstała w oparciu o 110 starannie wyselekcjonowanych pozycji literaturowych z ostatniego dwudziestolecia. Doktorantka przedstawiła główne czynniki patofizjologiczne leżące u podstaw zespołu metabolicznego, a następnie skupiła się na omówieniu badań nad wpływem wybranych naturalnych związków polifenolowych na poszczególne komponenty MetS z wykorzystaniem modeli zwierzęcych: genetycznie modyfikowanych - Zucker Fatty Rats, Zucker Diabetic Fatty Rats, Spontaneously Hypertensive Rats oraz indukowanych dietą lub lekami modelach cukrzycy/otyłości/nadciśnienia. Sposób prezentacji omawianych zagadnień wskazuje na bardzo dobrą orientację Doktorantki w tematyce i umiejętność właściwego doboru źródeł oraz ich analizy. Warto podkreślić fakt, że publikacja została już kilkakrotnie zacytowana przez innych badaczy.

Dwie kolejne publikacje (*Manuskrypt II* i *Manuskrypt III*) są pracami eksperymentalnymi. W obydwu materiałem badawczym był samodzielnie otrzymany etanolowy ekstrakt ze skórek granatowca, a model zwierzęcy stanowiły szczury Zucker



Diabetic Fatty (ZDF-Leprfa/Crl, fa/fa). Ekstrakt podawano szczurom w dawkach 100 i 200 mg/kg mc. przez 8 tygodni. Doktorantka zastosowała do oceny potencjału biologicznego ekstraktu ze skórek granatowca szerokie spektrum metod badawczych: biochemicznych, chromatograficznych, mikroskopowych, diagnostycznych. W tym miejscu pragnę podkreślić, że to co wyróżnia prace Doktorantki na tle innych prac naukowych dotyczących efektu terapeutycznego suplementacji diety szczurów z MetS ekstraktem ze skórek granatowca jest kompleksowe podejście do problemu badawczego. Pani lek. wet. Joanna Niewiadomska oceniła oddziaływanie badanego ekstraktu na dynamikę przyrostu masy ciała szczurów, morfologię krwi i obraz wymazu krwi obwodowej, profil glikemiczny i lipidowy, parametry echokardiograficzne, stężenie wybranych markerów stresu oksydacyjnego w mięśniu sercowym oraz markerów niewydolności serca, a także obraz histologiczny lewej komory mięśnia sercowego i aorty wstępującej. Niewątpliwie wymagało to dużego nakładu pracy i doskonałej jej organizacji. Najważniejszym osiągnięciem badań zaprezentowanych w *Manuskrypcie II* było udowodnienie kardioprotekcyjnego działania ekstraktu w dawce 200 mg/kg mc. objawiającego się zmniejszeniem częstotliwości rytmu serca, zwiększeniem objętości końcoworozkurczowej lewej komory serca oraz poprawę frakcji skracania włókien środkowych u szczurów ZDF. Doktorantka zidentyfikowała również związki fenolowe występujące w ekstrakcie ze skórek granatowca oraz dokonała ich analizy ilościowej. W przypadku badań opisanych w *Manuskrypcie III*, Doktorantka dowiodła w oparciu o ocenę histologiczną mięśnia sercowego oraz aorty, że ekstrakt zastosowany w w/w dawkach nie ma właściwości toksycznych. Ponadto, analiza markerów stresu oksydacyjnego wykazała, że u szczurów ZDF otrzymujących ekstrakt polifenolowy w dawce 100 mg/kg mc. obniżeniu uległ poziom całkowitego statusu oksydacyjnego, a aktywność katalazy oraz transferazy s-glutationowej była wyższa w porównaniu do analogicznych wyników uzyskanych dla szczurów kontrolnych. Sposób w jaki Autorka omówiła wyniki i przeprowadziła ich dyskusję w obu publikacjach świadczy o dobrym przygotowaniu do pracy naukowej i umiejętności krytycznej analizy oraz oceny własnych dokonań, a także ich konfrontacji z osiągnięciami innych badaczy. W trakcie czytania prac nasunęły mi się pytania i proszę o odpowiedź na nie w trakcie publicznej dyskusji nad rozprawą:

1. Czym był uzasadniony wybór dawki ekstraktu 100 i 200 mg/kg m.c.?
2. Dlaczego w Manuskrypcie III nie zastosowano kontroli w postaci zdrowych zwierząt, tak jak w Manuskrypcie II?



3. Jak wyjaśnić fakt, że zwiększenie dawki ekstraktu ze 100 mg/kg m.c. do 200 mg/kg m.c. nie wpłynęło korzystnie na większość oznaczonych markerów stresu oksydacyjnego?

W rozdziale 9 pt. „Wnioski” Doktorantka umieściła 6 wniosków wynikających z rezultatów prac badawczych. Wnioskowanie jest prawidłowe, ale mam zastrzeżenia do sposobu formułowania zdań i ich stylu. Dlatego proponuję następującą korektę:

1. Głównymi związkami polifenolowymi w ekstrakcie ze skórek *Punica granatum* L. są kwas elagowy i jego pochodne. Do pozostałych najliczniej reprezentowanych związków należą: HHDP-galoilo-heksozyd, heksozyd kwasu elagowego, elagitanina i izomer punikaliny.
2. Ekstrakt ze skórek granatowca stosowany w dawce 200 mg/kg mc. nie wykazuje działania toksycznego.
3. Badany ekstrakt wykazuje zależne od dawki działanie kardioprotekcyjne, objawiające się poprawą statusu oksydacyjnego w homogenatach z mięśnia sercowego oraz korzystnymi zmianami w wynikach pomiarów echokardiograficznych u szczurów predysponowanych do MetS.
4. Suplementacja diety szczurów z MetS ekstraktem ze skórek granatowca nie powoduje istotnej statystycznie redukcji masy ciała, ale ogranicza dynamikę jej przyrostu.
5. Podaż ekstraktu zawierającego polifenole ze skórek granatowca nie powoduje poprawy profilu glikemicznego i lipidowego szczurów z MetS oraz nie ma wpływu na przebudowę miocardium i stopień uszkodzenia kardiomiocytów.

Ostatni z rozdziałów stanowi „Podsumowanie”, w którym Doktorantka krótko przedstawia najważniejsze rezultaty swoich badań oraz wskazuje na ich potencjał aplikacyjny w kontekście produkcji żywności funkcjonalnej oraz odzysku cennych substancji z bioodpadów.

W tym miejscu pragnę podkreślić, że zawarte w recenzji uwagi mają przede wszystkim charakter redakcyjny i w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej pracy, która w mojej ocenie jest wysoka.



## Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że moja ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Joanny Niewiadomskiej pt. „Analiza potencjału biologicznego ekstraktu polifenolowego ze skórek *Punica granatum* L. na szczurzym modelu zespołu metabolicznego” jest pozytywna w zakresie wymaganych kryteriów oceny i w pełni odpowiada ustawowym wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim (ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami (tekst jednolity Dz.U. 2022, poz. 574)). W związku z tym stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu **o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lek. wet. Joanny Niewiadomskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

Ze względu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy oraz opublikowanie otrzymanych wyników w czasopiśmie o wysokiej punktacji i posiadających wysoki współczynnik wpływu IF, proponuję **wyróżnienie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej** stanowiącej podstawę postępowania doktorskiego Pani lek. wet. Joanny Niewiadomskiej.

Monika Szyko

