

dr hab. inż. Barbara Tombarkiewicz, prof. URK

Kraków, 07.09. 2022 r.

Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Zwyrzykowskiej – Wodzińskiej  
pt.: „Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych  
gatunkach ostrokrzewów (*Ilex* sp.) – badania *in vitro* i *in vivo*”

wykonanej w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotor: **prof. dr hab. Robert Kupczyński**

Promotor pomocniczy: **dr hab. inż. Sebastian Opaliński, profesor uczelni**

W ostatnich latach obserwuje się duży wzrost zainteresowania substancjami pochodzenia roślinnego, zawierającymi związki biologicznie czynne, które mogą być wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym czy kosmetycznym. W krajach wysoko rozwiniętych coraz powszechniejsza jest świadomość o znaczeniu zdrowej żywności oraz powrót do naturalnych metod leczenia, a także przekonanie, że naturalne substancje występujące w roślinach są bardziej skuteczne w działaniu aniżeli ich syntetyczne odpowiedniki. Zakaz niemedycznego stosowania antybiotyków i hormonów w hodowli zwierząt z pewnością wpłynął na rosnące zapotrzebowanie na fitobiotyki, jako dodatek paszowy, alternatywny dla różnych stymulatorów wzrostu, tradycyjnie stosowanych w żywieniu zwierząt. Badania naukowe prowadzone na różnych gatunkach zwierząt gospodarskich potwierdzają wpływ ziół i preparatów ziołowych, nie tylko na poprawę stanu zdrowia i wyższe przyrosty masy ciała zwierząt, ale również na jakość pozyskiwanego produktu oraz ograniczenie emisji amoniaku i siarkowodoru z produkcji zwierzęcej.

Podjęte przez Doktorantkę nowatorskie badania nad identyfikacją oraz działaniem substancji aktywnych zawartych w rodzimych, ale zapomnianych i dotąd nieprzebadanych gatunkach ostrokrzewów mają duże znaczenie naukowe i użytkowe oraz dobrze wpisują się

w poszukiwaniu nowych surowców roślinnych o właściwościach mogących mieć zastosowanie w profilaktyce ludzi i zwierząt.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 117 strony tekstu, w tym 14 tabel, 33 wykresy i 11 fotografii. Do pracy dołączone jest streszczenie w języku polskim i języku angielskim oraz spis piśmiennictwa obejmujący 182 pozycje. Autorka zastosowała klasyczny układ pracy z podziałem na Wstęp, Przegląd Piśmiennictwa, wyeksponowany Cel badań i hipotezy badawcze, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo, Spis tabel rycin i fotografii oraz Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim. Na początku pracy Doktorantka zamieściła również objaśnienia skrótów przytaczanych w rozprawie.

Poniżej zamieszczam omówienie poszczególnych rozdziałów oraz szczegółowe uwagi

Krótki, dwustronicowy Wstęp jest wprowadzeniem w tematykę będącą przedmiotem badań. Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące zawartości substancji biologicznie aktywnych oraz wykorzystania ochronnych i leczniczych właściwości ekstraktów pozyskanych z jednego z najlepiej poznanych ostrokrzewów - ostrokrzewu paragwajskiego (*Ilex paraguariensis*), który jest jednym z ważnych nutraceutyków. Autorka przybliżyła terapeutyczne właściwości ekstraktów z ostrokrzewów w kontekście coraz powszechniej występujących tzw. chorób cywilizacyjnych, do których zalicza m.in. choroby układu krążenia, nowotwory, otyłość i cukrzycę. Zwraca również uwagę, że w zapobieganiu tym chorobom coraz większe znaczenie przypisuje się propagowaniu i opracowaniu zdrowej żywności, zwłaszcza naturalnie bogatej w bioaktywne związki o działaniu ochronnym.

Stosunkowo obszerny, 21 stronicowy rozdział „Przegląd Piśmiennictwa” dla przejrzystości przekazu Doktorantka podzieliła na 4 podrozdziały, zatytułowane: „Ostrokrzew paragwajski - charakterystyka i zastosowanie”; „Związki biologicznie aktywne zawarte w materiale roślinnym”; „Zastosowanie modeli zwierzęcych” i „Zastosowanie w badaniach biomedycznych związków biologicznie aktywnych”. Faktyczny podział zaprezentowany w tekście pracy nie jest zgodny z numeracją i spisem treści zamieszczonym na początku rozprawy, gdzie wymienione są tylko trzy podrozdziały. W pierwszym z nich Autorka bardzo szczegółowo charakteryzuje ostrokrzew paragwajski, nie tylko jego biologię i wymagania środowiskowe, ale również kulturę, tradycje i sposób przyrządzania naparu z liści tej rośliny

znanego pod nazwą yerba mate. W kontekście tytułu pracy brakuje mi tutaj choćby skrótowego odniesienia się do innych gatunków ostrokrzewów, w tym tych, które są wykorzystywane w doświadczeniu. W drugim podrozdziale (którego brak w spisie treści) Autorka omawia związki biologicznie aktywne zawarte w roślinach, głównie związki fenolowe stanowiące liczną grupę naturalnych antyoksydantów. Przedstawia ich strukturę chemiczną oraz jej wpływ na właściwości biologiczne poszczególnych substancji. Na schemacie zaprezentowanym na str. 14 (ryc. 2) Autorka przedstawia podział związków fenolowych powołując się na pracę Ulewicz - Magulska i wsp., 2014, której jednak brak w spisie literatury, a przywoływana w tekście ryc. 1. nie została w pracy zamieszczona. Szczegółowe omówienie poszczególnych grup związków fenolowych, mechanizmów oddziaływania oraz właściwości farmakologicznych bardzo dobrze koresponduje z tematyką pracy i wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w tym obszarze. Oceniając pozytywnie wartość merytoryczną tego podrozdziału pragnę jednak zwrócić uwagę na niedociągnięcia językowe. Autorka nie ustrzegła się błędów literowych i stylistycznych oraz skrótów myślowych i zwrotów zaczerpniętych raczej z języka potocznego np. „wchłanianie w przewodzie żołądkowo-jelitowym”, „jedna trzecia estrów jest *pochłaniana* w górnym odcinku przewodu pokarmowego”, „działanie przeciwzapalne w modelach eksperymentalnych”, „stłuszczenie tłuszczowe” itp. W następnym podrozdziale Doktorantka omawia znaczenie dla nauk medycznych, zootechnicznych i biologicznych eksperymentów wykonywanych z wykorzystaniem zwierząt oraz zasady prowadzenia takich doświadczeń zgodnie z wymaganiami dobrostanu. Charakteryzuje również jednostki chorobowe, które wcześniej zostały określone jako choroby cywilizacyjne i przedstawia znaczenie badań z wykorzystaniem zwierząt modelowych, w tym szczurów laboratoryjnych, dla postępu w leczeniu tych schorzeń. W ostatnim podrozdziale Autorka omawia znaczenie nutraceutyków jako źródła związków biologicznie aktywnych, ważnych w leczeniu schorzeń metabolicznych.

W osobnym rozdziale zostały wyeksponowane dwa cele badawcze, realizowane oddzielnie w dwóch etapach badań. W etapie I określonym jako *in vitro* (?) celem było oznaczenie składu jakościowego i ilościowego metabolitów wtórnych wybranych gatunków ostrokrzewów oraz ocena właściwości przeciwutleniających polifenoli zawartych w ekstraktach wodnych z ich liści. W etapie II określonym jako etap *in vivo* celem była ocena wpływu ekstraktów wodnych z wybranych ostrokrzewów na organizm szczurów laboratoryjnych, żywionych dietą normalną lub dietą hipercholesterolomiczną. Dla

weryfikacji postawionych celów Doktorantka sformułowała dwie hipotezy badawcze, które moim zdaniem powinny zostać przeredagowane.

Badania będące podstawą dysertacji przeprowadzone zostały w dwóch etapach wg schematów zaprezentowanych na ryc. 8 (etap I) i na ryc. 9 (etap II). Układ doświadczenia oraz zastosowane, nowoczesne metody badawcze nie budzą zastrzeżeń, niemniej w trakcie lektury pracy nasunęło mi się kilka uwag/pytań, które z pewnością zostaną wyjaśnione w trakcie obrony pracy. Odnośnie rozdziału Materiał i metody są one następujące:

- czy przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia w etapie II, szczury przeszły adaptację do warunków eksperymentu, oraz czy zastosowano środki wzbogacające środowisko
- brak, lub bardzo lakonicznie podana informacja, czym kierowano się przy wyborze ekstraktu z *Ilex x meserveae* do badań *in vivo*, jak również jaki to był rodzaj ekstraktu - tę informację podano dopiero w rozdziale Wyniki str. 78, rozdział 5.3
- brak wyrównania w poszczególnych grupach eksperymentalnych po względem początkowej masy ciała szczurów. Co prawda na str. 47 wers 5 jest napisane, że szczury użyte w doświadczeniu miały początkową masę ciała na poziomie około 360 g, ale w rozdziale Wyniki (tab. 11, str. 79) widzimy duże zróżnicowanie wyjściowych, średnich mas ciała szczurów w poszczególnych grupach (różnica sięga aż 90 gramów), jaki był powód takiego doboru zwierząt i jaki potencjalny wpływ mogło to mieć na wyniki doświadczenia?
- dlaczego krew do analiz pobierała Pani z różnych miejsc w poszczególnych pobraniach, tj. z żyły ogonowej w pierwszym, a z serca w drugim pobraniu
- czy krew od szczurów z poszczególnych grup pobierano w tym samym czasie
- czy dwukrotny mechaniczny urazu serca (pobranie krwi z serca i zabieg eutanazji podaniem dosercowo środka usypiającego) mogły mieć wpływ na jego obraz histologiczny
- metodyka dotycząca pobrania materiału do badań histologicznych powinna być bardziej szczegółowa

Szkoda, że dla określenia wpływu badanych substancji na oceniane parametry krwi nie pobrano jej od szczurów również na samym początku doświadczenia etapu II, przed rozpoczęciem podawania ekstraktów, pozwoliłoby to na prześledzenie zmian w obrazie krwi u tych samych zwierząt, w obrębie grup badawczych.

Zastosowane metody obliczeń statystycznych wydają się adekwatne do przeprowadzenia analizy wyników z przeprowadzonego eksperymentu, niemniej jednak opis użytego modelu jest mało precyzyjny. Wymaga on jasnego zdefiniowania zarówno zmiennych niezależnych jak i zmiennych zależnych, które należałoby szczegółowo wymienić zamiast lakonicznego stwierdzenia, że są nimi „parametry fizykalne, biochemiczne oraz morfologiczne”. Niejasnym

jest również zapis ze str. 52 linie 15-16, w których Autorka napisała: „liczba zmiennych niezależnych, 4 dla modelu”, podczas gdy wcześniej wymienia trzy zmienne niezależne. Wskazane byłoby również podanej pełnej nazwy zastosowanego testu statystycznego (SW-W).

Wyniki badań zostały zaprezentowane w logicznym porządku, który odpowiada schematowi przyjętemu w metodyce. Ich opis zaczyna się od analizy profili fitochemicznych taksonów *Ilex sp.*, a kończy na analizach morfometrycznych. Uzyskane wyniki Autorka przedstawiła w tabelach, na rycinach/wykresach i zdjęciach spod mikroskopu oraz omówiła w tekście obszernego rozdziału, zajmującego aż 48 stron maszynopisu. Analiza tego rozdziału wymaga od czytelnika dużego skupienia tym bardziej, że Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości w przekazie. Jedną z niedogodności jest brak ujednolicenia opisu grup doświadczalnych w etapie *in vivo* (II etap badań) z oznaczeniami przyjętymi w I etapie, np. w I etapie badań *Ilex paragoaniensis* oznaczono jako IX1, a w II etapie grupa zwierząt otrzymująca ekstrakt z tej rośliny oznaczona jako YM. Autorka w znacznej części tekstu posługuje się symbolami IX1, IX3, IX5, IX6 dla określenia poszczególnych gatunków ostrokrzewów - czy jest jakiś powód, dla którego nie zachowano tutaj kolejności numeracji 1-4? Przyjęte oznaczenia sprawiają mylne wrażenie, że pewnych danych po prostu brakuje. W rozdziale 5.1.2. Autorka podaje, że badając profil fitochemiczny ekstraktów wodnych zidentyfikowano 46 związków, a parę linijek niżej, że było ich 38. Tabela nr 6 byłaby bardziej czytelna gdyby umieszczono w niej tylko te związki, które zostały zidentyfikowane w trakcie analiz. Następne uwagi w dużej mierze dotyczą opisów tabel i wykresów. Tytuły tabel i podpisy wykresów powinny określać czego one dotyczą, natomiast w ocenianej pracy, w wielu przypadkach są nieprecyzyjne, nazwałabym, że są trochę intuicyjne [tab. 9, tab. 10, tab.11, ryc. 24, 25, 26, 27, 28, 29] np. „Porównanie testu FRAP dla ekstraktu wodnego i metanolowego” (ryc. 26) podczas gdy na wykresie przedstawiona jest aktywność antyoksydacyjna wyciągów z liści ostrokrzewów oznaczona metodą FRAP. Jednak większym uchybieniem są nieprecyzyjne opisy tabel i wykresów. Pod tabelą nr 9 napisano: „A,B,C... w kolumnach oznaczają różnice istotne statystycznie ( $p < 0.05$ )”, nie doprecyzowano jednak czy różnice są statystycznie istotne wtedy, gdy grupy oznaczone są takimi samymi, czy różnymi literami. Podobna sytuacja jest w opisie tabeli nr 10, ale tutaj dodatkowo w opisie istnieją duże litery, natomiast w tabelach wyłącznie małe. Ryciny 20-23 podpisane są jako chromatogramy ekstraktu chloroformowego, podczas gdy zgodnie z tytułem rozdziału i metodyką badań powinny tam zostać zamieszczone chromatogramy ekstraktu dichlorometanowego. W tabeli nr 11 sposób przedstawienia istotności różnic statystycznych

jest dla mnie niezrozumiały i trudny do interpretacji zaprezentowanych wyników. Proszę również o wyjaśnienie znaczenia krzyżyków, które pojawiają się obok niektórych wartości w tabeli. W tabeli tej należy również skorygować nazwę 5 wiersza, w którym wpisane są przyrosty masy ciała szczurów za cały okres doświadczenia, a nie jak błędnie zatytułowano przyrosty dobowe masy ciała. Sugeruję również zmianę podpisu ryciny nr 28, gdyż wykres nie pokazuje dynamiki zmian przyrostów masy ciała a masę ciała szczurów w poszczególnych dniach doświadczenia. Podobnie wykres/rycina nr 29 zatytułowana „Zestawienie wykorzystania wody/ekstraktu w przez poszczególne podgrupy” przedstawia spożycie wody/ekstraktu przez szczury z poszczególnych grup doświadczalnych - w metodyce pracy nie ma wyszczególnionych podgrup. Na wyżej wymienionym wykresie nie zaznaczono również istotności różnic pomiędzy grupami, a Autorka wspomina o nich w tekście pracy. Czy różnice w ilości wypitej wody/ekstraktu mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki? W podrozdziale 5.4.2 Autorka napisała „występuje ogólna tendencja malejąca zarówno w grupie I jak i II” - i znów, w metodyce pracy nie ma wyszczególnionych grup I i II. Podobają mi się zdjęcia preparatów histologicznych, które są bardzo dobrej jakości. Jest to bardzo ważne, gdyż dobra jakość preparatów jest niezbędna do przeprowadzenia prawidłowej analizy histologicznej. Z obowiązku recenzenta w tym miejscu chcę jednak zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania, które pojawiły się w tej części pracy, np. str. 89 „podtytuł” rozdziału 5.4.5 brzmi: „Grupa K – obraz histopatologiczny grupy kontrolnej otrzymującej dietę bez dodatku cholesterolu”, podobnie na str. 91, 92, 93, 95, 95. Podpisy rycin 30-34 również nie są precyzyjne, np. rycina. nr 30 zatytułowana „Analiza morfometryczna długości kosmków jelitowych”, jest wykresem, na którym przedstawiono nie analizę, a długość kosmków jelitowych u szczurów z poszczególnych grup eksperymentalnych. Na wykresie tym i trzech następnych nie zaznaczono również istotności różnic pomiędzy grupami (Autorka powołuje się w tekście na te istotności), oraz nie naniesiono opisu osi Y. Niektóre komentarze do rycin w rozdziale „Analizy morfometryczne” napisane są w dosyć zawiły sposób np. str. 98 linie 6-9 czy str. 100 linie 7-10. Na str. 99 przy omawianiu grubości kardiomiocytów w sercach szczurów z grup żywionych dietą standardową, brakuje uszczegółowienia w stosunku do czego następuje istotny wzrost ich grubości w grupie IM (również brak oznaczeń na wykresie), a w przypadku szczurów otrzymujących dietę bogatą w cholesterol mam wrażenie, że Autorce chodziło o porównanie tego parametru u szczurów z grupy KCH w stosunku do grup YMCH i IMCH, a nie jak napisała w tekście z grupami YM i IM.

Rozdział Dyskusja jest bardzo ważną częścią każdej rozprawy naukowej i powinien zawierać interpretację wyników własnych badań w oparciu o dane naukowe pochodzące z literatury. Doktorantka na 14 stronach maszynopisu, przeprowadziła analizę wyników badań własnych, ukierunkowaną na weryfikację postawionych hipotez i założonych celów badawczych. W pierwszej części dyskusji Autorka charakteryzuje biologiczną aktywność związków zidentyfikowanych w ekstraktach z liści badanych ostrokrzewów oraz konfrontuje wyniki badań własnych z danymi literaturowymi. Wykazuje, że często zapomniane, rodzime gatunki ostrokrzewów są wartościowym źródłem substancji bioaktywnych posiadających właściwości antyoksydacyjne. W dalszej części omawia wyniki II etapu badań własnych, w kontekście badań opisywanych w literaturze, które w większości prowadzone były z wykorzystaniem ekstraktów z ostrokrzewu paragwajskiego na szczurach, bydło i owcach (tutaj drobna uwaga, pewnie przez pomyłkę Autorka pisze o modyfikującym działaniu yerba mate na skład mleka jagniąt). W omawianiu wyników Autorka podkreśla między innymi hepatoprotekcyjne i cholerecyjne działanie ekstraktów z liści badanych ostrokrzewów. W tym miejscu chciałabym prosić o wyjaśnienie poniekąd sprzecznych interpretacji odnośnie wpływu podawanych ekstraktów na wątrobę, mianowicie na str. 112 jest napisane „Do zmian w obrębie badanych histologicznie narządów w pierwszym rzędzie należy zaliczyć zmiany w wątrobie oraz nerkach. W wątrobie należy wyróżnić występowanie kropelek tłuszczowych w hepatocytach w grupie IM oraz nasilenie wydzielania żółci wyrażonych poprzez powiększenie się przestrzeni wrotno żółciowych”, natomiast na str. 113. napisano: „W badaniach własnych również stwierdzono ochronne działanie ekstraktów, co przejawiało się brakiem występowania stłuszczenia, brakiem gwałtownych podziałów komórkowych..... Brak tych zmian wskazuje na działanie ochronne ekstraktów w diecie wysoko tłuszczowej”, a w innym miejscu na str. 113: „W badaniach własnych, zaobserwowano zarówno makroskopowych jak i mikroskopowo wzrost produkcji żółci”. Niejasnym, a nawet trudnym do zrozumienia jest zapis na str. 112, linie 17-18: „Niezależnie od stosowanej diety obserwowano indukcje wzrostu IL10 przez *I. x meserveae* co skutkowało obniżeniem stężenia IL-6 i IL-10 obserwowane przy diecie standardowej. Proszę o wyjaśnienie powyższych zapisów jak również o doprecyzowanie co Autorka ma na myśli pisząc o „nasileniu diurezy obserwowanej nie tylko w badaniu histologicznym, ale i w trakcie całego eksperymentu”.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała osiem wniosków, z których trzy pierwsze korespondują z celem badań określonym dla I etapu doświadczenia. Proponuję przeredagowanie tych wniosków poprzez połączenie wniosku 1 z 2 i podkreślenie wartości biologicznej ekstraktów z *Ilex x meserveae*. Pozostałe wnioski również wymagają

korekty. We wniosku nr 5 należy uszczegółwić, których ostrokrzewów on dotyczy, a część dotycząca wpływu *I. x meservae* na zapobieganie zmianom w obszarze naczyń krwionośnych serca nie koresponduje z opisem preparatów histologicznych na str. 96. Sugeruję również przeredagowanie wniosku 7 oraz wniosku 8, który powinien przybrać formę bardziej ogólną. Rozdział Literatura liczy 182 pozycje, prawie wyłącznie anglojęzyczne. W tekście cytowane jest również kilka prac, których brak jest w spisie piśmiennictwa, a alfabetyczne uszeregowanie skrótów i symboli użytych w pracy. ułatwiłoby czytelnikowi korzystanie z części „Objaśnienia skrótów”.

### **Podsumowanie**

Przedstawiona do oceny praca jest wartościowa pod względem naukowym i użytkowym. Na podkreślenie zasługuje szeroki, wymagający ogromu pracy, zakres badań, oraz konieczność opanowania wielu metod badawczych i dobrego, wielokierunkowego przygotowania merytorycznego. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że nasze rodzime gatunki ostrokrzewów są bogatym źródłem substancji bioaktywnych, które można stosować w profilaktyce chorób metabolicznych oraz w praktyce hodowlanej dla poprawy zdrowia zwierząt i wskaźników produkcyjnych. Uwagi oraz sugestie, które z obowiązku recenzenta zamieściłam w swojej opinii nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy i mam nadzieję, że będą pomocne przy przygotowaniu publikacji do druku. Zauważone przeze mnie błędy literowe, stylistyczne i edytorskie zostały naniesione w przedstawionym do recenzji manuskrypcie.

**Stwierdzam, że praca pt.: „Identyfikacja i działanie substancji biologicznie aktywnych zawartych w różnych gatunkach ostrokrzewów (*Ilex sp.*) – badania *in vitro* i *in vivo*” odpowiada warunkom określonym w ustawie w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Zwyrzykowskiej – Wodzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

  
.....

dr hab. Barbara Tombarkiewicz prof. URK