

Wrocław, 06.12.2022 r.

Prof. dr hab. Jan Oszmiański
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Nutraceutyków Roślinnych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

R E C E N Z J A rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr Agaty Rolnik pt.

” Analiza składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływ na wybrane elementy hemostazy”, wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii UŁ i Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów, IUNG-PIB, Puławy składa się z oceny następujących elementów:

1. Dobór i znaczenie tematu.
2. Bibliografia i znajomość literatury.
3. Układ pracy i wymogi formalne.
4. Zastosowana metodyka badań.
5. Koncepcja rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników.
6. Prawdliwość wnioskowania.
7. Ocena końcowa.

Ad. 1. Ocena doboru i znaczenia tematu

Mgr Agata Rolnik w cyklu sześciu publikacji stanowiących rozprawę doktorską podjęła się badań nad oceną składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływu na hemostazę. Z wykorzystaniem nowoczesnych technik chromatograficznych identyfikowała i oznaczała w nich różne grupy wtórnych metabolitów wybranych roślin w tym: związki polifenolowe, laktony seskwiterpenów, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, lipidy oraz glicerofosfolipidy. Oceniała aktywności antyoksydacyjne badanych preparatów z wykorzystaniem metody TLC-DDPH•. Bardzo ważną część doświadczeń Doktorantki stanowiły pomiary wybranych elementów hemostazy. Oceniała właściwości antyplatekcyjne analizując wpływ preparatów roślinnych na adhezję płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu, ekspozycję selektyny P i zmiany konformacji receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi metodą cytometrii przepływowej oraz przemiany arachidonianu w płytkach krwi. Przeprowadziła ocenę właściwości antykoagulacyjnych preparatów mierząc czasy krzepnięcia w osoczu oraz ocenę tworzenia skrzepliny z wykorzystaniem systemu T-TAS w krwi pełnej.

Zagadnienia, które przedstawiła w rozprawie mgr Agata Rolnik są aktualne, ważne dla nauki i praktyki, prezentują wiedzę z dyscypliny biologii. Dużą wartość poznawczą ma pełna, kompleksowa charakterystyka wtórnych metabolitów warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) dobrze udokumentowana z wykorzystaniem nowoczesnej techniki chromatografii cieczowej HPLC-MS-MS. Aktualne są także zagadnienia dotyczące wpływu związków biologicznie aktywnych na aktywności przeciwutleniające i potencjał prozdrowotny żywności, w tym na choroby układu sercowo-naczyniowego, które są główną przyczyną śmierci na świecie. Podjęcie badań w pracy doktorskiej mgr Agaty Rolnik uważam za trafne, ważne i aktualne, uzasadnione ze względów poznawczych i praktycznych. Wybór do badań warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) uważam za trafny, stanowią one potencjalne dobre źródło związków biologicznie aktywnych o mało poznanym ich wpływie na choroby sercowo-naczyniowe.

Doktorantka podjęła się ważnego dla nauki i praktyki, interesującego tematu badań, który realizowała w ramach projektu współfinansowanego z Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, Oś priorytetowa III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.2 Studia doktoranckie Konkurs nr POWR.03.02.00-IP.08-00-DOK/16. Część badań, sfinansowano w ramach jednorazowego stypendium MINI „InterDOC-START”.

Ad. 2. Ocena bibliografii i znajomości literatury

Bibliografia maszynopisu pracy dotycząca opracowania załączonych sześciu publikacji liczy 32 pozycje przedstawiające zagadnienia ściśle związane z tematem badań. Wszystkie prace, z wyjątkiem cytowanego jednego skryptu, są w języku angielskim. O bardzo dobrej znajomości literatury z zakresu tematu rozprawy świadczą dwie prace przeglądowe zamieszczone w czasopismach z listy JCR (1. “Vegetables from *Cucurbitaceae* family and their products: positive effect on human health” A. Rolnik, B. Olas; Nutrition 2020, 78, 1-6 (IF=4,893 (2021)); 2. “The plants of the *Asteraceae* family as agents in the protection of human health” A. Rolnik, B. Olas; International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 1-10 (IF=4,556 (2021))) w których cytuje łącznie 75 pozycji literaturowych. Autorka wykazała się dużą dociekliwością i pracowitością w gromadzeniu informacji ze światowej literatury również do opracowania pozostałych czterech publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Recenzent nie ma zastrzeżeń odnośnie znajomości tematu, zakresu i sposobu wykorzystania przedstawionej literatury.

Ad. 3. Ocena układu pracy i wymogów formalnych

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Rolnik została przygotowana na podstawie sześciu jednotematycznych publikacji dotyczących składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływu na wybrane elementy hemostazy. W pełni spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim. We wstępie Doktorantka zamieściła wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, następnie pozostały dorobek naukowy. W opracowaniu publikacji stanowiących rozprawę w pierwszej części maszynopisu na 25 stronach Autorka przedstawiła informacje ściśle związane z tematem pracy zawierające krótki wstęp dotyczący przeglądu piśmiennictwa, hipotezę badawczą, cel, założenia podstawowe, opis materiału i metod badawczych, omówienie wyników i dyskusję, cztery wnioski, streszczenie i spis piśmiennictwa. W dalszej części zamieszczone są kopie prac stanowiące rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami współautorów o udziale w publikacjach. We wszystkich sześciu publikacjach Doktorantka jest na pierwszym miejscu z udziałem w dwóch pracach przeglądowych w 60%, w pozostałych badawczych w dwóch w 50%, jednej 45% i jednej w 40%. Według załączonych oświadczeń uczestniczyła Ona w opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu doświadczeń, analizie i opracowywaniu wyników oraz przygotowaniu części manuskryptu i odpowiedzi na komentarze recenzentów, co świadczy o Jej wiodącej roli w opublikowanych pracach.

We wstępnej części pracy, zamieszczone są informacje w pełni uzasadniające celowość podjęcia badań nad profilaktyką chorób układu sercowo-naczyniowego. Doktorantka, mimo że nie ma wykształcenia z zakresu medycyny, wykorzystując dostępne publikacje, przedstawiła zagadnienia dotyczące chorób układu sercowo-naczyniowego wynikające z zaburzenia hemostazy, czyli procesu odpowiadającego za utrzymanie płynności krwi w organizmie i tamowanie krwawienia w przypadku przerwania ściany naczyń. Moim zdaniem informacje o przyczynach homeostazy i działaniu leków w jej leczeniu są zbyt szczegółowo przedstawione w rozprawie doktorskiej z dysypliny nauki biologiczne.

W dalszej części wstępu maszynopisu rozprawy mgr Agata Rolnik przedstawiła zagadnienia ściśle związane z tematem rozprawy dotyczące warzyw dyniowatych i astrowatych. Autorka opisała poszczególne gatunki warzyw, ich skład chemiczny i zastosowanie w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. W podsumowaniu stwierdziła, że właściwości prozdrowotne owoców i warzyw są w większości dobrze poznane, ale nadal brakuje danych literaturowych dotyczących ich wpływu na choroby układu sercowo-

naczyniowego. Doktorantka informacje te zamieściła w oparciu o dwie prace przeglądowe stanowiące rozprawę o warzywach dyniowatych (Vegetables from *Cucurbitaceae* family and their products: positive effect on human health” A. Rolnik, B. Olas; Nutrition 2020, 78, 1-6) i astrowatych (The plants of the *Asteraceae* family as agents in the protection of human health” A. Rolnik, B. Olas; International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 1-10). O wartości i profesjonalnego przygotowania tych prac świadczy, że zostały one przyjęte do druku po pozytywnych opiniach wymagających zagranicznych recenzentów i opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim IF =4,893 i IF=4,556. Materiał opracowany został z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa (75 pozycji). Autorka wykazała się dobrą znajomością zagadnień dotyczących przedmiotu rozprawy. W pełni uzasadniła celowość swoich badań wskazując na zagadnienia, które nie są w pełni poznane. Wykazała celowość przeprowadzenia kompleksowych badań obejmujących skład chemiczny preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*) i ich wpływu na wybrane elementy hemostazy. Przedstawiła trafnie hipotezę badawczą wskazując, że preparaty z wybranych warzyw z rodziny dyniowatych i rodziny astrowatych wykazują aktywność antyoksydacyjną, antypłytkową i przeciwzakrzepową. Podała szczegółowo cel badań i zakres pracy. Do tej części pracy nie mam uwag.

Kolejna część rozprawy zawiera opis materiału badawczego, wykonywania doświadczeń oraz metod badawczych. Zagadnienia te są bardzo pobieżnie przedstawione w maszynopisie, Autorka podaje tylko odnośniki do publikacji stanowiących rozprawę. Niepoprawnie opis analizy jakościowej i ilościowej preparatów z warzyw dyniowatych i astrowatych zamieszcza w kolejnym rozdziale „Wyniki”.

W części rozdziału „Wyniki” Autorka przedstawia rezultaty badań zamieszczone w publikacjach stanowiących rozprawę z dobrze przeprowadzoną dyskusją na 8 stronach maszynopisu. Są one przedstawione poprawnie w odpowiedniej kolejności. Dalsze rozdziały stanowią wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury.

Kolejna część rozprawy zawiera kopie sześciu publikacji i oświadczenia współautorów. We wszystkich przypadkach są podpisy współautorów i dokładna informacja o roli poszczególnych autorów w przygotowaniu publikacji. Pod tym względem nie mam żadnych zastrzeżeń odnośnie prawidłowości przygotowania dokumentacji.

Ad.4. Ocena zastosowanej metodyki badań

Doktorantka podczas stażu w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach miała możliwość korzystania z bardzo nowoczesnych technik chromatograficznych tj. ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas – (HR/Q-TOF/MS), z detektorem CAD i PDA w badaniach nad identyfikacją i oznaczaniem ilościowym wtórych metabolitów z astrowatych i dyniowatych warzyw. Analizę całkowitego potencjału antyoksydacyjnego preparatów z tych warzyw wykonywała z użyciem techniki cienkowarstwowej chromatografii z 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylem DPPH (TLC-DPPH•). Ponadto stosowała nowoczesne metody przygotowania ekstraktów korzystając wysokociśnieniowego ekstraktora Dionex ASE 200, a do oczyszczania związków systemu SPE z Oasis Extraction Cartridges (Waters, MA, USA).

Natomiast dalsze badania preparatów z wybranych warzyw przeprowadziła w Katedrze Biochemii Ogólnej, Wydział BIOŚ UŁ wykonując bardzo dużą ilość dobrze dobranych metod badawczych. Oceniała wpływ preparatów na biomarkery stresu oksydacyjnego w osoczu określając metodami kolorymetrycznymi peroksydację lipidów, grupy karbonylowe i tiolowe w białkach, zdolność absorpcji rodników tlenowych ORAC “OxiSelect™ ORAC Activity Assay Kit”, całkowity potencjał antyoksydacyjny TAC “Antioxidant Assay Kit”. Dużą część badań stanowiły analizy wpływu preparatów na hemostazę. Doktorantka oceniała czasy krzepnięcia tj. trombinowy, protrombinowy, częściowej tromboplastyny po aktywacji metodą koagulometryczną w osoczu. Ponadto oznaczała tworzenie skrzeplin w warunkach przepływu krwi z wykorzystaniem techniki microchipów we krwi pełnej, adhezję płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu w przemitych płytkach krwi, ekspozycję selektyny P i zmiany konformacji receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi, przemianę arachidonianu w płytkach krwi oraz analizę toksyczności preparatów z wybranych warzyw na płytki krwi oznaczając aktywność zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej.

Zastosowane metody analityczne były bardzo złożone i czasochłonne, wymagały dużych umiejętności i nakładu pracy, w pełni pozwoliły zrealizować założony ambitny cel badań.

Część analityczna, która obejmowała dużą ilość bardzo trudnych, czasochłonnych i pracochłonnych badań zasługuje na szczególne podkreślenie, a uzyskanie wielu nowych informacji pozwoliło na opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach o wysokiej

randze międzynarodowej. Istotną rolę w realizacji badań była możliwość korzystania przez Doktorantkę z unikalnej aparatury analitycznej w bardzo dobrze wyposażonym Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach.

Ad.5. Ocena koncepcji rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników

Badania mgr Agaty Rolnik w pierwszym etapie dotyczyły analizy jakościowej wtórnych metabolitów preparatów z warzyw dyniowatych (praca 3) oraz warzyw astrowatych (praca 4). W preparatach z warzyw z rodziny dyniowatych zidentyfikowała 36 metabolitów wtórnych należących do: glikozydów fenyloetanoidowych, flawonoidów, kwasów tłuszczowych, lipidów oraz glicerofosfolipidów. Natomiast w preparatach z warzyw astrowatych scharakteryzowała 44 metabolity wtórne, wśród których są: kwasy fenolowe, flawonoidy, laktony seskwiterpenów, aminokwasy, kwasy tłuszczowe i lipidy. Autorka w maszynopisie rozprawy podaje że związki zostały zidentyfikowane na podstawie spektrometrii mas, techniką jonizacji ESI (elektrorozpylanie), natomiast w publikacjach są dodatkowe informacje o uwzględnieniu także czasów retencji i danych literaturowych. W pracy numer 3, w tabeli 1 brak jest danych literaturowych dla poszczególnych zidentyfikowanych związków potwierdzonych przez innych autorów, jest tylko odnośnik do literatury [10–15]. Takie informacje są w pracy 4 w tabeli 1 dla warzyw z rodziny astrowatych są one pomocne w ocenie prawidłowości identyfikacji związków oraz stwierdzeniu oznaczenia ich po raz pierwszy w danym surowcu. Autorka stwierdziła duże zróżnicowanie pomiędzy zawartością zidentyfikowanych związków w składzie poszczególnych preparatów z warzyw dyniowatych i astrowatych. Dodatkowo oznaczyła ilościowo 6 kwasów fenolowych w preparatach z czterech warzyw z rodziny astrowatych (tabela 2, praca 4).

Generalnie tę część badań w rozprawie mgr Agaty Rolnik oceniam bardzo wysoko. Autorka dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod analitycznych uzyskała wartościowe wyniki w pełni charakteryzując wtórne metabolity preparatów z wybranych warzyw użytych do dalszych badań.

Ważną częścią badań Doktorantki była ocena właściwości antyoksydacyjnych preparatów z wybranych warzyw poprzez pomiar potencjału wychwytywania wolnych rodników z wykorzystaniem chromatografii cienkowsarstwowej z 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazolem (TLC-DPPH•). Autorka trafnie wybrała tę prostą i szybką metodę, która pozwoliła określić istotną cechę dla poszczególnych preparatów z warzyw dyniowatych i

astrowatych w ocenie aktywności zmiatania wolnych rodników. Wyniki tych badań potwierdziły dużą zależność pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a zawartością związków fenolowych. Ponadto Doktorantka przeprowadziła oznaczenie potencjału antyoksydacyjnego w osoczu z wykorzystaniem powszechnie stosowanych analiz metodami ORAC (OxiSelect™ ORAC Activity Assay) i TAC (Total Antioxidant Assay KIT), które jednak nie wykazały istotnych statystycznie zmian w stosunku do kontroli.

Autorka w dwu publikacjach (praca 3 i 4) zamieściła wyniki innych metod określenia wpływu preparatów roślinnych na poziom biomarkerów stresu oksydacyjnego w osoczu, w warunkach *in vitro* na podstawie reakcji z kwasem triobarbiturowym. W tych doświadczeniach wykazała większą skuteczność hamowania peroksydacji lipidów osocza przez preparaty z warzyw dyniowatych niż astrowatych. Natomiast w ocenie właściwości protekcyjnych względem grup tiolowych w białkach osocza większą aktywność wykazały preparaty z warzyw astrowatych niż dyniowatych. W kolejnym doświadczeniu oceny zahamowania karbonylacji białek w osoczu w stosunku do próby kontrolnej istotne statystycznie efekty Doktorantka uzyskała dla preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych dyni, ogórka, patisona białego i żółtego oraz dla wszystkich preparatów z warzyw astrowatych. Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki, które uzyskała mgr Agata Rolnik dla preparatu z patisona żółtego, który posiadał najsilniejszą aktywność antyoksydacyjną w badaniach *in vitro* spośród preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych. Godnym podkreślenia jest próba interpretacji tego zjawiska poprzez porównanie zawartości wtórnych metabolitów, które oznaczała w poszczególnych preparatach. Trafnie wyjaśnia tę różnicę zawartością w żółtym patisonie glukozydu fenylopropanoidowego, co potwierdza to zjawisko zdolnością do hamowania peroksydacji lipoprotein o niskiej gęstości i chelatowania jonów metali również wg doniesień literaturowych (López-Munguía i wsp. 2011). Natomiast najlepsze właściwości antyoksydacyjne spośród preparatów z warzyw astrowatych posiadał preparat z cykorii, którego aktywność przypisuje zidentyfikowanym w tym surowcu antocyjanom, potwierdza to danymi literaturowym Mulabagal i wsp. (2009).

Druga część badań mgr Agaty Rolnik dotyczyła wpływu preparatów z wybranych warzyw z rodziny dyniowatych i astrowatych na aktywność antyplatekową, w tym na antyadhezyjną. Oceniała wpływ preparatów roślinnych na adhezję płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu, ekspozycję selektyny P i zmiany konformacji receptora GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi metodą cytometrii przepływowej oraz przemiany arachidonianu w płytkach krwi, blokowania powstawania tromboksanu A₂. Zagadnienia te są mniej poznane i stanowią ważny wkład Doktorantki w ten zakres badań. Wykazała Ona w opublikowanych

dwóch pracach (prace 5 i 6) w badaniach *in vitro* istotny wpływ preparatów z warzyw dyniowatych i astrowatych na wybrane elementy hemostazy. Szczególnie cenne były badania oceny procesu tworzenia skrzepu w pełnej krwi traktowanej preparatami z wybranych warzyw z zastosowaniem systemu T-TAS, który umożliwił analizę przepływu krwi w czasie rzeczywistym w warunkach półfizjologicznych. W badaniu tym zastosowała chipy pokryte kolagenem, które posłużyły do wizualizacji skrzepliny płytek krwi. W przypadku preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych stwierdziła istotne zahamowanie powstawania skrzepu dla preparatów z dyni, ogórka, patisona żółtego i patisona białego, natomiast nie było tego efektu dla preparatów z warzyw astrowatych z wyjątkiem preparatu z korzeni mniszka pospolitego.

W kolejnej serii badań Doktorantka analizowała zdolność płytek krwi do adhezji do białek kolagenu i fibrynogenu, w obecności preparatów z wybranych warzyw różnych układach. Preparaty z warzyw z rodziny dyniowatych i astrowatych oraz z korzeni mniszka pospolitego wykazały zróżnicowane istotne zahamowanie adhezji zależne od rodzaju układu i stężenia preparatów. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian w układzie dla fibrynogenu dla preparatów z warzyw dyniowatych i owoców mniszka pospolitego, gdzie płytki krwi były stymulowane ADP (praca 5 i 6).

Ponadto aktywację płytek w krwi pełnej pod wpływem preparatów z testowanych warzyw oceniała Doktorantka na podstawie pomiarów poziomu ekspozycji P selektyny oraz zmian w konformacji receptora GPIIb/IIIa w 4 układach. W tych doświadczeniach wykazała, że preparaty z ogórka, patisona żółtego i białego oraz z owoców i korzeni mniszka pospolitego powodowały istotne obniżenie zdolności receptora GPIIb/IIIa do wiązania PAC-1 w płytkach krwi aktywowanych 10 μ M ADP. W pozostałych próbach zarówno z warzyw dyniowatych jak i astrowatych nie było żadnych istotnych zmian.

Uzupełnieniem kompleksowych badań Doktorantki nad wpływem preparatów z wybranych warzyw na homostazę była ocena metabolizmu kwasu arachidonowego w płytkach krwi inkubowanych preparatami metodą z kwasem triobarbiturowym w której płytki krwi aktywowała trombiną. Wykazała Ona, że wszystkie preparaty z warzyw z rodziny dyniowatych oraz dwa preparaty z warzyw z rodziny astrowatych z sałaty czerwonej i topinamburu istotnie zahamowały peroksydację kwasu arachidonowego. Autorka właściwie interpretuje te wyniki składem chemicznym preparatów wskazując, które metabolity wtórne prawdopodobnie modulują aktywność płytek krwi poprzez interakcję z metabolizmem kwasu arachidonowego (praca 6).

Doktorantka w ocenie cytotoksyczności preparatów z wybranych warzyw z rodzin dyniowatych i astrowatych wykazała brak toksyczności względem płytek krwi (praca 5 i 6),

nie powodowały one istotnych zmian w poziomie dehydrogenazy mleczanowej, która jest markerem uszkodzenia komórek.

Podsumowując cały zakres badań stwierdzam, że założenia i koncepcja rozwiązania problemu naukowego w pracy doktorskiej mgr Agaty Rolnik były poprawne. Zostały dobrze, profesjonalnie wykonane kompleksowe doświadczenia, które pozwoliły na uzyskanie dużego sukcesu naukowego w zakresie pogłębienia wiedzy na temat składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych i astrowatych oraz ich wpływu na wybrane elementy hemostazy. Autorka w swych badaniach wykazała szerokie pozytywne spektrum działania ekstraktów z warzyw dyniowatych i astrowatych, które mogą stanowić obiecujące źródło składników żywności funkcjonalnej przeznaczonej w profilaktyce chorób układu krążenia związanych z nadmierną aktywacją płytek krwi. Podkreśla, że korzystne efekty badań *in vitro* należy zweryfikować w doświadczeniach *in vivo*. Autorka dysponowała nowoczesną aparaturą naukową, którą w pełni wykorzystwała do przeprowadzenia badań własnych.

O szczególnej wartości wyników badań mgr Agaty Rolnik świadczy opublikowanie ich w renomowanych czasopismach naukowych jak: A. Rolnik, B. Olas: "Vegetables from *Cucurbitaceae* family and their products: positive effect on human health" *Nutrition* 2020, 78, 1-6 (IF=4,893; liczba punktów MEiN=140 ; A. Rolnik, B. Olas: "The plants of the *Asteraceae* family as agents in the protection of human health; *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 1-10 (IF=4,556); liczba punktów MEiN=140; A. Rolnik, I. Kowalska, A. Soluch, A. Stochmal, B. Olas: "Comparative phytochemical, antioxidant and hemostatic studies of preparations from selected vegetables from *Cucurbitaceae* family" *Molecules* 2020, 25, 1-20 (IF= 4,412; liczba punktów MEiN=140 ; A. Rolnik, A. Soluch, I. Kowalska, B. Olas: "Antioxidant and hemostatic properties of preparations from *Asteraceae* family and their chemical composition – Comparative studies" *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021, 142, 1-10 (IF=6,529; liczba punktów MEiN=100 ; A. Rolnik, B. Skalski, A. Stochmal, B. Olas: "Preparations from selected cucurbit vegetables as antiplatelet agents"; *Scientific Reports* 2022, 1, 1-15 (IF=4,996; liczba punktów MEiN=140 ; A. Rolnik, A. Stochmal, B. Olas: "The *in vitro* anti-platelet activities of plant extracts from the *Asteraceae* family"; *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022, 149, 1-8 (IF=6,529; liczba punktów MEiN=100. Łączny IF= 31,915; liczba punktów MEiN=760. Artykuły te były poddane przed publikacją ocenie wielu bardzo wymagających zagranicznych recenzentów, przyjęcie ich do druku świadczy o bardzo wysokiej wartości naukowej. Musiały spełniać wszystkie wymogi dotyczące sposobu przedstawienia wyników, ich interpretacji oraz dyskusji.

Ad.6. Ocena prawidłowości wnioskowania

Doktorantka w publikacjach stanowiących rozprawę poprawnie zamieściła podsumowanie i wnioski z przeprowadzonych badań. Natomiast w przygotowanym maszynopisie najważniejsze wyniki podsumowała w czterech wnioskach. Zawierają one informacje o najważniejszych dobrze udokumentowanych wynikach badań własnych.

Ad. 7. Ocena końcowa

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr Agaty Rolnik stwierdzam, że Autorka wykazała się dobrą znajomością tematyki badań, poprawnie dobrała i wykonała doświadczenia wykazując się umiejętnością posługiwania nowoczesną dostępną aparaturą analityczną uzyskując dużą ilość wartościowych wyników. Szczególnie należy podkreślić duży zakres różnorodnych, czasochłonnych analiz. Na podstawie swych badań Autorka wraz z współautorami opublikowała sześć prac w renomowanych, zagranicznych czasopismach naukowych. We wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem, świadczy to o Jej wiodącej roli w planowaniu i wykonywaniu badań oraz przygotowaniu publikacji do druku. Za te prace o wysokim łącznym **IF= 31,915**; uzyskała **760 punktów MEiN**.

Wyniki prac mgr Agaty Rolnik stanowią ważny wkład w poznanie składu chemicznego preparatów z warzyw z rodziny dyniowatych i astrowatych i ich wpływu na wybrane elementy hemostazy. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską zawierają elementy nowości naukowej, zwłaszcza w zakresie badań nad oceną składu wtórnych metabolitów preparatów z wybranych warzyw oraz ich wpływu na choroby układu krążenia związanych z nadmierną aktywacją płytek krwi. Bardzo duża ilość doświadczeń wniosła wiele nowych informacji z ważnego dla nauki i praktyki zakresu badań. Kandydatka wykazała się dobrą wiedzą teoretyczną w dyscyplinie biologia i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań w pracach naukowych o czym świadczy także Jej pozostały dorobek naukowy obejmujący osiem publikacji z listy JCR o całkowitym IF= 73,262 i liczbie punktów MEiN= 1780.

Uważam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa mgr Agaty Rolnik w pełni odpowiada wymogom art.187. Ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478) stawianym pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Agatę Rolnik do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie proponuję wyróżnić rozprawę doktorską mgr Agaty Rolnik, która jest pierwszym Autorem z dużym procentowym udziałem we wszystkich publikacjach stanowiących rozprawę, świadczy to o Jej wkładzie pracy w wykonywanie doświadczeń i opublikowanie wyników badań w sześciu renomowanych czasopismach naukowych z listy

JCR, których wymiernym wskaźnikiem jest wysoki łączny Impact Factor wynoszący 31,915 i bardzo wysoka punktacja 760 punktów MEiN. Na wyróżnienie zasługuje wykorzystanie nowatorskich metod badawczych jak chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas – (HR/Q-TOF/MS), z detektorem CAD i PDA. Dzięki możliwości spektrometrycznych analiz MS bez fragmentacji i MS-MS z fragmentacją zidentyfikowała w preparatach z warzyw z rodziny dyniowatych 36, a w astrowatych 44 metabolity wtórne. Ponadto rozprawa obejmuje szeroki zakres badawczy w ocenie wpływu preparatów z ośmiu gatunków warzyw oraz z korzeni i owoców mniszka pospolitego na wybrane parametry hemostazy w układzie *in vitro*. Pionierskie, kompleksowe badania obejmowały ocenę wpływu preparatów na poziom pięciu biomarkerów stresu oksydacyjnego w osoczu, czterech metod oceny procesu krzepnięcia w warunkach *in vitro*, na różne etapy aktywacji płytek krwi i przemian biochemicznych zachodzących w tych komórkach w warunkach *in vitro*, ich toksyczności względem płytek krwi. Uzyskane wyniki Jej nowatorskich badań, znacznie przekraczające zakres jednej pracy doktorskiej, znalazły uznanie u redaktorów i recenzentów sześciu czasopism o zasięgu światowym z listy JCR.

