

25.07.2024



Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych

Katedra Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

tel.: +48 81448 7080; e-mail: agnieszka.ludwiczuk@umlub.pl

Lublin, 25.07.2024

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne mgr Weroniki Skowrońskiej zatytułowanej „**Charakterystyka fitochemiczna i aktywność biologiczna wyciągu z liści dzikiego czarnego bzu – wskazanie składników o potencjale przeciwzapalnym**” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Bazyłko w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ocena formalna. Na rozprawę doktorską mgr Weroniki Skowrońskiej składa się spójny tematycznie cykl trzech publikacji o łącznym IF 16.02, które ukazały się w latach 2022-2024 w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu. Są to następujące prace:

1. Skowrońska W., Granica S., Czerwińska M.E., Osińska E., Bazyłko A. *Sambucus nigra* L., leaves inhibit TNF- α secretion by LPS-stimulated human neutrophils and strongly scavenge reactive oxygen species. *Journal of Ethnopharmacology*, **2022**, 290: 115116.
2. Skowrońska W., Granica S., Piwowarski J.P., Jakupovic L., Zovko-Koncic M., Bazyłko A. Wound healing potential of extract from *Sambucus nigra* L. leaves and its fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, **2024**, 320: 117423.
3. Skowrońska W., Bazyłko A. The potential of medicinal plants and natural products in the treatment of burns and sunburn – a review. *Pharmaceutics*, **2023**, 15.2: 633

Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, a z załączonej dokumentacji wynika, że jej wkład w powstanie tych prac był znaczący. Jej zaangażowanie w badania naukowe, jak i powstanie publikacji, odnoszą się zarówno do etapów koncepcyjnych i projektowania badań, ale także do analizy i interpretacji otrzymanych wyników oraz finalnie do pisania publikacji.

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Skowrońskiej ma charakter krótkiego omówienia naukowego artykułów oraz podsumowania wyników. Całość rozpoczyna wstęp teoretyczny, który uzasadnia wybór tematyki podjętych badań. W części tej Doktorantka skupia się nad omówieniem schorzeń skóry, również tych o podłożu zapalnym, opisuje znaczenie produktów pochodzenia naturalnego w dermatologii, a także skupia się na przedmiocie swoich badań, czyli bzie czarnym, *Sambucus nigra* L. Znajdujemy tutaj opis botaniczny rośliny, jej systematykę, ale przede wszystkim zastosowanie w leczeniu ze szczególnym uwzględnieniem liści bzu czarnego. Autorka uzasadnia dlaczego to właśnie liście, a nie kwiaty i owoce, stały się przedmiotem jej zainteresowania naukowego. Następnie przedstawiony jest jasno sformułowany cel pracy oraz opis zrealizowanych zadań jakie doprowadziły do realizacji postawionego sobie celu badań. W dalszej części omówione są wyniki badań z podziałem na prace wchodzące w skład dysertacji. Następny rozdział to podsumowanie otrzymanych wyników oraz wnioski. Integralną częścią pracy są streszczenia i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim oraz publikacje wchodzące w skład dysertacji wraz z oświadczeniami poszczególnych współautorów. Pracę dokorską uzupełnia bibliografia oraz opis dotychczasowej aktywności naukowej Doktorantki.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa jest kompletna, jej treść jest poprawnie opracowana redakcyjnie, a całość spełnia wszystkie wymagania wstępne dla rozpraw kandydatów ubiegających się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Ocena merytoryczna. Substancje pochodzenia naturalnego od lat cieszą się nieustannie zainteresowaniem pacjentów oraz świata nauki i medycyny z uwagi na wielokierunkowe działanie i możliwość zastosowania w profilaktyce i leczeniu wielu chorób. W trend ten wpisują się również naturalne sposoby dbania o skórę, także tą z problemami zdrowotnymi. Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa przeprowadzonego przez Doktorantkę, korzystne działanie substancji roślinnych za skórę potwierdzają też badania kliniczne; m.in. badania dotyczące wykorzystania dziurawca w leczeniu atopowego zapalenia skóry, nagietka w zapobieganiu wystąpienia zapalenia skóry, czy aloesu w leczeniu oparzeń. Pomimo tego, że stosowanie ziół może się wiązać z wystąpieniem pewnych działań niepożądanych jak np. fitodermatozy, to jednak dobroczynne działanie na skórę ekstraktów otrzymanych z roślin leczniczych wykorzystywane jest w niemalże wszystkich dolegliwościach skóry jako środki wspomagające, uzupełniające, osłaniające, a często także zasadnicze, stanowiąc leki pierwszego wyboru. Pośród różnych schorzeń dermatologicznych, to zioła na stan zapalny skóry stanowią najobszerniejszą grupę surowców roślinnych wykorzystywanych w leczeniu. Stąd też zasadnym jest poszukiwanie nowych roślin o właściwościach przeciwzapalnych, bądź też potwierdzenie tego działania wśród roślin, które tradycyjnie stosowane były lub są wykorzystywane w leczeniu schorzeń dermatologicznych, ale to zastosowanie nie było

potwierdzone badaniami naukowymi. Przykładem takiej substancji roślinnej jest liść bzu czarnego, *Sambuci nigri folium*, który to stał się przedmiotem recenzowanej dysertacji.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie składu chemicznego i aktywności biologicznej liści bzu czarnego w odniesieniu do ich tradycyjnego zastosowania w leczeniu schorzeń skóry. By osiągnąć założony cel Doktorantka rozpoczęła od wykonania czterech ekstraktów (*publikacja 1*). Do tego celu wykorzystwała klasyczną metodę ekstrakcji jaką jest maceracja. Ekstrakty wykonała w temperaturze pokojowej oraz w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Jako ekstahentów użyła wody oraz 70% wodnego roztworu alkoholu etylowego. Wszystkie ekstrakty zostały zbadane pod kątem zawartości sumy polifenoli, a także dokonano ich oceny pod kątem składu chemicznego i zawartości najważniejszych metabolitów. Otrzymane wyniki wskazały, że najbardziej charakterystycznymi związkami obecnymi we wszystkich ekstraktach były kwasy fenolowe i flawonoidy. Wśród flawonoidów zidentyfikowano glikozydy kwercetyny i kemferolu, natomiast wśród związków należących do grupy kwasów fenolowych wskazano na obecność estrów kwasu kawowego z kwasem chinowym i treonowym. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykazała po raz pierwszy obecność w ekstraktach z liści bzu czarnego izomerów kwasu kawoilo-treoninowego, czy raczej kawoilo-treonowego. Z uwagi na to, że w *publikacji 1* czytamy, 'caffeoyl threonic acid' to tłumaczenie na język polski powinno brzmieć 'kwas kawoilo-treonowy'.

Analiza ilościowa sumy związków fenolowych oraz najważniejszych metabolitów wskazała, że zarówno rodzaj rozpuszczalnika jak i temperatura ekstrakcji wpływają na zawartość związków. Najwyższe stężenia zaobserwowano w ekstraktach alkoholowo-wodnych.

Równolegle do badań fitochemicznych przeprowadzono również analizę aktywności przeciwutleniającej w układach bezkomórkowych oraz analizę wpływu otrzymanych ekstraktów na wydzielanie reaktywnych form tlenu (ROS) oraz cytokin (TNF- α , IL-1 β) i chemokin (IL-8), czyli mediatorów stanu zapalnego, przez ludzkie neutrofile *ex vivo*. Zauważono, że wszystkie badane ekstrakty są dobrym źródłem związków o działaniu przeciwutleniającym, dodatkowo istotnie obniżały one wydzielanie TNF- α , który pełni kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej. Silniejszym działaniem odznaczały się ekstrakty wodno-alkoholowe. Aktywność tę Doktorantka przypisuje obecnemu w wyciągach kwasowi chlorogenowemu oraz flawonoidom. Do dalszych badań (*publikacja 2*) wybrano ekstrakt otrzymany przez macerację liści przy użyciu 70% etanolu, który charakteryzował się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą i najsilniejszym hamowaniem wydzielania TNF- α . Ekstrakt ten poddano frakcjonowaniu rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności i badano wpływ samego ekstraktu jak i frakcji na odpowiedź zapalną komórek bezpośrednio zaangażowanych w gojenie ran (neutrofili, ketatynocytów i fibroblastów), migrację keratynocytów do miejsca zranienia, a także na aktywność enzymów biorących udział w procesach naprawczych stanu zapalnego skóry.

Wykazano, że ekstrakt i niektóre frakcje przyspieszały gojenie ran oraz hamowały wydzielanie IL-8 przez keratynocyty, IL-6 i IL-8 przez fibroblasty oraz ROS, TNF- α i IL-8 przez neutrofile. Dodatkowo wpływały one na aktywność enzymów obecnych w skórze. Badania te Doktorantka przeprowadziła podczas stażu naukowego na Uniwersytecie w Zagrzebiu. Aktywność elastazy najsilniej hamowała frakcja butanolowa (F4), kolagenazy – frakcje dichlorometanowa (F1) i eterowa (F2), hialuronidazy – frakcja dichlorometanowa (F1) i sam ekstrakt, a lipooksygenazy – frakcja eterowa (F2). Nie wykazano aktywności wobec tyrozynazy.

Działanie przeciwzapalne na komórkach zaangażowanych w proces gojenia i zdolność regeneracji uszkodzeń *in vitro* Doktorantka badała na opracowanych przez siebie i wdrożonych trzech modelach badań na liniach komórkowych. Dwa pierwsze modele stymulacji komórek HaCaT bądź to promieniowaniem UVB, bądź to mieszaniną TNF- α /IFN- γ opracowano na podstawie doniesień literaturowych dostosowując odpowiednie dawki i stężenia, a także rozcieńczenia supernatantów do oznaczeń ilościowych cytokin. Trzeci model dotyczący wywoływania odpowiedzi zapalnej w komórkach fibroblastów, został opracowany od podstaw przez Doktorantkę. Do wywoływania odpowiedzi immunologicznej wybrano kwas lipotejchowy obecny w ścianie komórkowej *Staphylococcus aureus*. Wykorzystując te modele Doktorantka dowiodła, że zarówno ekstrakt z liści bzu oraz wszystkie frakcje skutecznie zmniejszały odpowiedź zapalną, obniżając sekrecję cytokin. Ponadto ekstrakt i frakcje FR1, Fr2 i FR4 istotnie pobudzały migrację komórek, przyspieszając zamknięcie rany.

Otrzymany ekstrakt i frakcje poddano także analizie składu chemicznego wykorzystując do tego celu metodę UHPLC-DAD-MSⁿ dzięki której zidentyfikowano w sumie 41 związków. Ponadto frakcję octanową i butanolową (F3 i F4) poddano dalszemu frakcjonowaniu przy użyciu chromatografii kolumnowej oraz preparatywnej chromatografii cieczowej, w wyniku czego wyizolowano 11 związków chemicznych, które zidentyfikowano bazując na widmach NMR. Zidentyfikowane związki należały do grupy flawonoidów, kwasów fenolowych, lignanów oraz glikozydów cyjanogennych.

Realizacja pracy wymagała od Doktorantki opanowania/znajomości szeregu nowoczesnych technik badawczych, w tym chromatograficznych (analitycznych i preparatywnych) i spektralnych, jak UHPLC-DAD-MSⁿ, chromatografia typu Flash, prep-HPLC czy NMR, a także testów koniecznych do oceny aktywności biologicznej. Na szczególną uwagę zasługuje fakt opracowania przez Doktorantkę trzech modeli badań na liniach komórkowych, stosowanych z powodzeniem do badań naukowych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

W publikacji 3 wchodzącej w skład ocenianej rozprawy doktorskiej autorka dokonała krytycznej analizy dostępnych danych literaturowych dotyczących substancji roślinnych, które wykazują potencjał w leczeniu oparzeń i oparzeń słonecznych. Autorka zauważa, że zaprezentowane w artykule przeglądowym wyniki badań klinicznych wskazują, że ekstrakty z roślin wpływały korzystnie na gojenie się oparzeń od zastosowanych w grupach kontrolnych

terapii. Pomimo przedstawionych przed Doktorantką niedociągnięć w prezentacji wyników badań i ich analizy, kontynuacja badań nad poszukiwaniem nowych substancji pochodzenia naturalnego, które znajdują zastosowanie w leczeniu oparzeń wydaje się być uzasadniona.

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy należą:

- przeprowadzona po raz pierwszy kompleksowa analiza ekstraktu z liści bzu czarnego oraz frakcji z niego otrzymanych w leczeniu ran i stanów zapalnych skóry,
- wykonana po raz pierwszy kompleksowa analiza składu chemicznego, która doprowadziła do identyfikacji w badanej substancji roślinnej związków dotychczas w niej nieopisanych oraz izolacji jedenastu metabolitów należących do różnych grup chemicznych,
- sposób zaplanowania eksperymentów oraz interpretacja uzyskanych wyników połączona z wnikliwą i rzeczową analizą, co świadczy o wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Doktorantki i są dowodem Jej przygotowania merytorycznego do prowadzenia badań naukowych,
- właściwy dobór metod badawczych, w dużym stopniu zaprojektowanych i opracowanych przez Doktorantkę,
- dużą przejrzystość pracy i uporządkowany wywód naukowy.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, całość przygotowanej rozprawy oceniam bardzo wysoko, zarówno pod względem tematycznym, merytorycznym (poziomu naukowego, planowania i realizacji eksperymentów, elementów nowości naukowej, interpretacji wyników), jak i edytorskim. Nie mniej jednak wypada także zwrócić uwagę na te aspekty rozprawy, które budzą pytania bądź wymagają dodatkowego komentarza:

- W *publikacji 2* badaniami objęto ekstrakt alkoholowo-wodny, który następnie rozfrakcjonowano, a frakcje FR3 oraz FR4 poddano dalszej obróbce w wyniku czego wyizolowano 11 związków chemicznych. Po przeczytaniu publikacji i komentarza do niej nasuwają się dwa pytania:
 - dlaczego wyizolowane związki chemiczne nie stały się przedmiotem badań biologicznych? Może wtedy udało by się wytypować konkretne składniki o potencjale przeciwzapalnym.
 - wyniki dotyczące wpływu otrzymanych frakcji na aktywność enzymów obecnych w skórze wskazały, że frakcje dichlorometanowa i eterowa pojawiają się jako aktywne w stosunku do trzech z pięciu badanych enzymów. Zastanawiam się, dlaczego nie podjęto próby analizy składu chemicznego tych frakcji np. przy użyciu metody GC/MS?

- W *publikacji 1* w tabeli 2 czytamy, że zidentyfikowano kwas 5-kawoilochinowy czyli kwas chlorogenowy, natomiast w tabeli 3 podano zawartość kwasu 3-kawoilochinowego czyli kwasu neochlorogenowego. Moje pytanie brzmi, który z estrów kwasu kawowego z kwasem chinowym występuje w liściach bzu czarnego?
- W swoim komentarzu do *publikacji 1* Doktorantka wskazuje, że na skład chemiczny i zawartość poszczególnych związków wpływa wiele czynników, a jednym z nich jest okres wegetacji. Z publikacji składających się na rozprawę doktorską wynika, że materiał roślinny był zbierany po okresie kwitnienia w lipcu lub sierpniu. Chciałabym zapytać Doktorantkę czy to właśnie ten okres zbioru liści jest najbardziej odpowiedni, czyli charakteryzujący się największą zawartością związków aktywnych? Czy istnieją takie dane literaturowe, bądź też Doktorantka prowadziła takie badania?

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam wysoko. Recenzowana rozprawa doktorska zasługuje na szczególne uznanie, świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym, jak i ogromnej biegłości warsztatowej Doktorantki. Pani mgr Weronika Skowrońska skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy uważam za uzasadniony i niezwykle ważny z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego.

Wnioski końcowe

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Skowrońskiej stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i spełnia warunki określone w 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.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie rozprawy mgr Weroniki Skowrońskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy i jej wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, oryginalność i wartość naukową przeprowadzonych badań, oraz bogaty dorobek naukowy Doktorantki (łącznie liczba publikacji 10, w tym 8 to publikacje oryginalne w renomowanych czasopismach o łącznym współczynniku wpływu IF 57,37 i 1350 punktów MEiN) wnioskuję o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Skowrońskiej**. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam szerokim zakresem i pracowitością przeprowadzonych badań, interdyscyplinarnym podejściem

badawczym, oryginalnością otrzymanych wyników nowatorską metodyką oraz walorami nowości (związki zidentyfikowane po raz pierwszy, opracowane nowe modele badań na liniach komórkowych).

^ ^ ^ ^ ^

Dr hab. n. farm. Agnieszka Ludwiczuk, prof. UM