



dr hab. n. farm. Katarzyna Dos Santos Szewczyk

UNIWERSYTET MEDYCZNY w LUBLINIE

ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ

ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, tel. (81) 81448 7060, fax (81) 81448 7060

Lublin, 25.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. inż. Karoliny Pawłowskiej pt. „Badania fitochemiczne oraz badania aktywności przeciwzapalnej wybranych gatunków roślin z rodzaju *Polygonum sensu lato*”.

Uwagi ogólne

Na przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr farm. inż. Karoliny Pawłowskiej składa się liczący 89 stron tekst, stanowiący przedstawienie sylwetki Doktorantki, opracowanie teoretyczne podjętego tematu (w tym wprowadzenie z uzasadnieniem tematyki badań, przegląd aktualnego stanu wiedzy dla kluczowych zagadnień projektu, komentarze do publikacji wraz z wnioskami, streszczenie i obszerne piśmiennictwo), a także kopie trzech spójnych z nim publikacji, które ukazały się w latach 2020-2023. Prace te są wieloautorskie, czego wymagały szeroko zakrojone badania podjęte przez Doktorantkę, jednak we wszystkich Pani mgr farm. inż. jest pierwszym autorem. Ponadto, dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów potwierdzają Jej wiodącą (70%) rolę w koncepcji i przeprowadzeniu badań ujętych w przedłożonym cyklu prac. Czasopisma, w których Doktorantka opublikowała wyniki wchodzące w skład dysertacji, tj. *Phytochemistry* (1 publikacja), *Journal of Ethnopharmacology* (1 publikacja) i *Journal of Food Composition and Analysis* (1 publikacja), znajdują się w wykazie *Journal Citation Reports (JCR)*, a ich łączny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* to 12,920.

Badania stanowiące podstawę publikacji wchodzących w cykl dysertacji zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem naukowym Promotora, Pana prof. dr. hab. Sebastiana Granicy. Prowadzone przez Doktorantkę badania były finansowane ze środków uzyskanych ze środków statutowych Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także były wykonane we współpracy z Centrum Badań Przedklinicznych CBP (w ramach Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT)) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Głównymi kierunkami zawartych w pracy doktorskiej zainteresowań badawczych Pani mgr farm. inż. Karoliny Pawłowskiej była analiza fitochemiczna wybranych gatunków roślin z rodziny Polygonaceae, zidentyfikowanie i oznaczenie zawartych w nich składników fitochemicznych z wykorzystaniem technik chromatograficznych i spektroskopowych, ocena aktywności przeciwzapalnej ekstraktów roślinnych *ex vivo* i określenie mechanizmu działania badanych związków na procesy zapalne, a także ocena ich aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro*.

W części teoretycznej, Doktorantka przytacza główne powody, dla których podjęła się badania wybranych gatunków roślin i precyzuje hipotezy badawcze. Ponadto zapoznaje czytelnika w sposób bardzo rzetelny ze stanem wiedzy dotyczącym kluczowych zagadnień rozprawy doktorskiej, tj. informacjami na temat wybranych gatunków Polygonaceae, ich składu fitochemicznego i zastosowania. Obszerny rozdział poświęcony został ważnemu wątkowi, jakim jest badanie aktywności biologicznej, w którym Doktorantka w sposób bardzo merytoryczny i dojrzały identyfikuje problem badawczy związany z tradycyjnym zastosowaniem *B. officinalis*, przybliża wymagania rejestracyjne dotyczące leku roślinnego w Unii Europejskiej, a także identyfikuje wyzwania związane z badaniami klinicznymi produktów roślinnych. Wybór zacytowanych pozycji literaturowych (158 pozycji z lat 1986-2023), jak również sposób ujęcia omawianych treści, wraz z uwypukleniem niejasności i niespójności wyników literaturowych oraz ich wnikliwa dyskusja, świadczą o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w omawianych zagadnieniach.

Praca jest dobrze napisana i zilustrowana tabelami i rysunkami, co w znaczący sposób ułatwia lekturę dysertacji. Dodatkowym walorem jest umieszczenie zwięzłego streszczenia w języku polskim i angielskim. W mojej opinii, umieszczone przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej opracowanie, w sposób wyczerpujący traktuje założony problem badawczy, uzupełniając i scalając treści ujęte w cyklu trzech zawartych w niej opublikowanych manuskryptów.

Ocena merytoryczna

Rośliny z rodziny Polygonaceae są źródłem leczniczych substancji roślinnych stosowanych tradycyjnie w Europie i innych regionach świata, ze względu na ich działanie przeciwzapalne, moczopędne, przeczyszczające, adaptogenne czy hepatoprotekcyjne. Szerokie zastosowanie tychże roślin uzasadnia potrzebę analizy molekularnych mechanizmów ich działania, zwłaszcza, że dotychczasowe badania nad tymi taksonami wykazały obecność różnych składników fitochemicznych o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym, takich jak flawonoidy, garbniki, fenolokwasy czy stilbenoidy.

Wybór gatunków roślin do badań nie był przypadkowy i miał racjonalne przesłanki, oparte dodatkowo na dogłębnej analizie danych literaturowych.

Pierwszy cel, który założyła sobie Doktorantka, obejmował wykonanie pogłębionych analiz fitochemicznych wybranych gatunków z rodziny Polygonaceae z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych. W ramach tego celu ważnym elementem była również interpretacja uzyskanych wyników metodami analizy głównych składowych (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) i grupowania hierarchicznego (HCA).

Drugim celem była ocena aktywności przeciwzapalnej ekstraktów roślinnych *ex vivo* oraz określenie mechanizmu działania badanych związków na procesy zapalne, w ramach którego Doktorantka dokonała oceny aktywności biologicznej za pomocą aneksyny V i jodku propidyny, oceny wpływu ekstraktów na sekrecję cytokin przez ludzkie neutrofile, a także przebadala substancje wyizolowane z ekstraktu i wyłoniła te najbardziej aktywne.

Wreszcie jako trzeci cel, który Doktorantka wytyczyła w oparciu o dostępną literaturę, postanowiono określić potencjał przeciwbakteryjny wobec bakterii odpowiedzialnych za zakażenia skóry.

Weryfikacja hipotez i wyniki otrzymane przez Doktorantkę to oryginalne i nowatorskie osiągnięcie naukowe. Jako recenzent, chciałabym wyrazić uznanie dla przemyślanego wyboru założonych celów, które doskonale odzwierciedlają oblicze współczesnej farmakognozji, łącząc tradycyjny obszar działań oraz nowoczesne podejście metodologiczne i koncepcyjne. Na wyróżnienie zasługuje również logiczne i przejrzyste uzasadnienie podjętych celów.

Realizację badań rozpoczęła Doktorantka od optymalizacji ekstrakcji i wykonania wstępnych analiz, które następnie poszerzyła o szczegółową analizę składu fitochemicznego (HPLC-DAD-MS). W ramach projektu przeprowadzona została analiza profili fitochemicznych ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych flawonoidowych i kwasów fenolowych, ze względu na ich powszechność i łatwość w analizie. Metodami wykorzystanymi do interpretacji uzyskanych wyników była analiza głównych składowych (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) i grupowanie hierarchiczne (HCA), dzięki którym możliwe było opracowanie kompleksowego obrazu charakterystyki fitochemicznej badanych wyciągów roślinnych.

Określenie mechanizmu działania badanych związków na procesy zapalne jest jednym z kluczowych celów wielu badań naukowych, dlatego zrozumienie mechanizmu działania substancji o działaniu przeciwzapalnym może prowadzić do opracowania skuteczniejszych i bardziej precyzyjnych leków, a także do identyfikacji nowych celów terapeutycznych. Doktorantka, przeprowadziła badania komórkowe na ludzkich neutrofilach izolowanych z kożucha leukocyтарnego pozyskanego od zdrowych ochotników, które umożliwiły identyfikację czynników pochodzenia roślinnego regulujących procesy zapalne poprzez zbadanie czy wybrany ekstrakt z

Bistorta officinalis i wyizolowane z niego substancje chemiczne mają wpływ na cykl życiowy tych komórek immunologicznych oraz jak wpływają na sekrecję cytokin zapalnych po stymulacji lipopolisacharydem. Przyjęła model zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi, a eksperymenty dotyczące wpływu na apoptozę pomogły wyciągnąć dodatkowe wnioski na temat potencjalnego wpływu na trudno gojące się rany. Kolejnym etapem badań, była ocena hamowania wzrostu bakterii odpowiedzialnych za zakażenia skóry przez wybrane ekstrakty, a także określenie stężeń hamujących wzrost (MIC) wybranych szczepów bakterii oraz bakteriobójczych (MBC).

W mojej opinii, najważniejszymi i najcenniejszymi efektami przeprowadzonych badań jest możliwość wyłonienia markerów fitochemicznych w roślinach z rodziny Polygonaceae, które mogą ułatwiać identyfikację gatunków; zidentyfikowanie grup związków lub pojedynczych substancji, które można zaproponować jako istotne dla identyfikacji gatunku (na przykład: siarczanowe pochodne flawonoli w *P. mitis* i *P. hydropiper* czy kwas elagowy w *P. lapathifolium*); wyizolowanie i zidentyfikowanie szesnastu związków chemicznych z kłącza wężownika, z których wiele nie było identyfikowanych w dotychczasowych opracowaniach dotyczących tej substancji roślinnej; potwierdzenie negatywnego wpływu wyciągu wodnego z kłącza wężownika na żywotność neutrofilii, a także zidentyfikowanie tego ekstraktu jako potencjalnego inhibitora wzrostu szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*, w tym opornych na antybiotyki.

Całokształt wyników ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji jednoznacznie dowodzi, że przedsięwzięcie badawcze, jakiemu stawiała czoła Doktorantka, zakończyło się dużym sukcesem. Ma to wyraz nie tylko w serii powstałych wartościowych publikacji, ale przede wszystkim we wskazaniu jakie metabolity mogą być przedmiotem dalszych prac izolacyjnych i przedklinicznych. Ponadto, opublikowane przez Doktorantkę wyniki stanowią podstawę pod nowe projekty aplikacyjne, mające na celu upowszechnienie stosowania substancji roślinnych jako środków wspomagających leczenie chorób o podłożu zapalnym.

Reasumując, zarówno pod względem merytorycznym, jak i graficznym praca spełnia wszelkie wymagania stawiane doktoratom z zakresu nauk farmaceutycznych, a zawarta w niej treść świadczy o wysokim poziomie wiedzy i umiejętności Pani mgr n. farm. inż. Karoliny Pawłowskiej, w pełni kwalifikującym ją do ubiegania się o stopień doktora.

Czytając przedłożoną do oceny pracę doktorską, natknęłam się na dość liczne uchybienia redakcyjne, które jednak nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię na temat niniejszej pracy doktorskiej.

Jednocześnie, poniżej zamieszczam listę pytań i komentarzy do niektórych wątków rozprawy, jako zachętę dla Doktorantki do dyskusji:

1. Literatura wskazuje na możliwość występowania w rodzinie Polygonaceae stilbenoidów i antrachinonów – czy Doktorantka weryfikowała ten fakt w badanych gatunkach?

2. Czy Doktorantka wykonała/planuje wykonać badania dotyczące bezpieczeństwa i profilu farmaceutycznego testowanych ekstraktów i związków z nich wyizolowanych?

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. inż. Karoliny Pawłowskiej składa się z trzech prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, a ich sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi 12,920. Osiągnięcie jako całość można określić jako nowatorskie i interdyscyplinarne, a tym samym świadczące o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Wysoko oceniam przedłożoną do oceny rozprawę doktorską i stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymogi zarówno merytoryczne jak i formalne wynikające z ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pani magister inżynier Karoliny Pawłowskiej do dalszych etapów postępowania w ubieganiu się o stopień naukowy doktora, a następnie przyznanie Jej rzezonego stopnia. Równocześnie, ze względu na wysoki poziom rozprawy, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie opiniowanej pracy.