

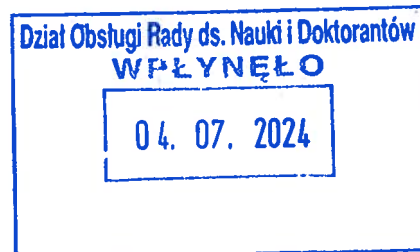


UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław 4.07.2024

Dr hab. nauk farm. Sylwester Ślusarczyk prof. uczelni
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław



Recenzja

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, Pani mgr farm. Weroniki Skowrońskiej pt. Charakterystyka fitochemiczna i aktywność biologiczna wyciągu z liści dzikiego czarnego bzu – wskazanie składników o potencjale przeciwwzapalnym” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem promotora Pani dr. Hab. Agnieszki Bazylko

Ocena merytoryczna

Podstawa dysertacji Pani mgr farm. Weroniki Skowrońskiej jest cykl 3 oryginalnych, spójnych artykułów naukowych (dwóch eksperymentalnych i jednej przeglądowej) opublikowanych w latach 2022-2024 w czasopismach naukowych o łącznym wskaźniku cytowań (Impact Factor) = 16,2 i punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki = 420, **co jest zgodne z aktualnymi wymaganiami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn. zm.), artykuł 187, pkt. 3 i 4.**

Powyższe publikacje zostały opatrzone streszczeniem, przedstawionym w języku angielskim z wprowadzeniem, celem pracy, rozdziałami poświęconymi materiałom i metodom badawczym, wynikami przeprowadzonych eksperymentów, a także dyskusji nad nimi, podsumowaniem, wnioskami i bibliografią. Ogółem rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Skowrońskiej liczy 65 stron, podzielona na 10 rozdziałów z zamieszczonymi 6 rycinami . Stwierdzam brak

rozdziału 8, ale biorąc pod uwagę prawidłową numerację stron całej pracy domyślam się, że jest to jedynie przeoczenie i błąd edytorski, nie wpływający na całościową merytoryczną zawartość pracy. Szkoda również, że w tym miejscu nie mogę napisać o ilości przeglądu literaturowego ponieważ bibliografia nie jest numerowana. Doktorantka umieszcza osobno załączone oryginalne publikacje wchodzące w cykl wraz z oświadczeniami współautorów publikacji odnośnie ich udziału w poszczególnych manuskryptach. W pierwszej publikacji Doktorantka określa własny udział na 60 %, w drugiej 70 % i w trzeciej 90%. O ile wiodąca rola Pani mgr Weroniki Skowrońskiej w przeprowadzeniu badań nie budzi wątpliwości, fakt, iż według wspomnianych oświadczeń, nie deklaruje choćby współudziału w tworzeniu koncepcji i założeń prac eksperymentalnych, jest nieco zaskakujący, taka deklaracja jest tylko w publikacji trzeciej przeglądowej. Jeśli chodzi o sam układ pracy to moim zdaniem logicznym byłoby kontynuowanie rozdziału 6 czyli wprowadzenie z uzasadnieniem tematyki badań oraz rozdziału 7 i 9 zaraz po rozdziale 4 czyli streszczeniu, a dopiero na końcu umieściłbym rozdział 5 dotyczący prezentacji sylwetki doktorantki z jej całą aktywnością naukową. Jest to jedynie uwaga nie wpływająca na zawartość merytoryczną całej pracy.

Na podstawie zamieszczonych publikacji mogę stwierdzić, że problem naukowy który doktorantka podjęła się rozwiązać było ustalenie składu liści bzu czarnego *Sambucus nigra* L. poprzez analizę fitochemiczną z wykorzystaniem technik UHPLC-DAD-MSⁿ i HPLC-DAD oraz zbadanie aktywności biologicznej w warunkach *in vitro* wyciągów z tego materiału w kontekście ich tradycyjnego zastosowania w schorzeniach skóry o podłożu zapalnym.

Bez czarny od lat znany jest i stosowany w medycynie ze względu na posiadane właściwości lecznicze jego kwiatów i owoców. Surowiec ten działa napotnie i przeciwgorączkowo, dlatego też głównie łagodzi objawy przeziębienia. Współczesne badania biologiczne potwierdziły wspomniane powyżej zastosowanie za które w głównej mierze odpowiada bogata frakcja polifenolowa, triterpenowa oraz garbnikowa. Z kolei w medycynie ludowej wykorzystywane były również liście czarnego bzu, głównie zewnątrznie, w leczeniu ran, oparzeń i schorzeń skóry o podłożu zapalnym. Jednakże dotychczas ich działanie, jak i skład chemiczny nie były dokładnie przebadane. W związku z powyższym oraz biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonej szczegółowo kwerendy literaturowej, a także wstępne badania fitochemiczne, Pani mgr Weronika Skowrońska sformułowała podstawowy cel projektu doktoranckiego, (publikacja 1 i 2), którym było scharakteryzowanie jakościowego oraz ilościowego składu chemicznego liści *Sambucus nigra* w zakresie profilu polifenolowego, ze szczególnym uwzględnieniem połączeń izomerów kwasu kawoilo-treoninowego. Doktorantka zaplanowała również dla wyciągów wodnych oraz wodno-etanolowych (70 % v/v) z liści bzu czarnego,

dwa kierunki aktywności biologicznej. Pierwszy przeciwutleniający, badając wpływ na wymiatanie rodników w układach *in vitro* (DPPH, H₂O₂, NO, O₂⁻), i drugi przeciwzapalny, badając hamowanie aktywności lipooksygenazy, obniżanie wydzielania reaktywnych form tlenu (ROS) i mediatorów stanu zapalnego (tj. TNF- α , IL-1 β i IL-8) przez ludzkie neutrofile *ex vivo*. Oba te kierunki są jakże istotne dla potencjalnego efektu przeciwzapalnego przetworów z niniejszego surowca. Cykl zamyka szeroki przegląd literatury (publikacja 3) dotyczącej stosowania produktów pochodzenia naturalnego w leczeniu oparzeń w tym oparzeń słonecznych, w której przygotowano zestawienie i ocenę opublikowanych w latach 2010-2022 wyników badań klinicznych i badań na zwierzętach, w których analizowano wpływ na gojenie zarówno pojedynczych substancji roślinnych, jak i ich mieszanin.

Cel badań został określony w sposób jasny, a przedstawiony dodatkowo szczegółowy plan dotyczący poszczególnych zadań eksperymentalnych, realizowanych w obrębie szeroko rozumianego profilowania metabolicznego oraz bioaktywności przeciwzapalnej *Sambucus nigra* pozwala zorientować się w zakresie podjętych wyzwań naukowych.

W tym miejscu chciałbym również podkreślić, że przeprowadzone przez Panią mgr Weronikę Skowrońską poszczególne prace eksperymentalne, w tym ich poziom, aktualność, trafność, podjętej tematyki badawczej, sposób wykonania doświadczeń oraz poprawność i znaczenie uzyskanych wyników z uwagi na ich walory poznawcze, a także aplikacyjne zostały pozytywnie zweryfikowane w toku procedur związanych z innymi licznymi publikacjami autorki. Z tego względu moja recenzja ma charakter bardziej ogólny i poza potwierdzeniem wymienionych powyżej aspektów dotyczących wysokiej jakości prowadzonych badań ma na celu również ocenę poziomu naukowego samej Doktorantki.

Ocena szczegółowa

Przechodząc do recenzji szczegółowej dysertacji należy zaznaczyć, że cykl prac eksperymentalnych, w których opisano realizację poszczególnych zadań projektowych został uzupełniony o publikację przeglądową.

W pierwszej części pracy szczegółowo opisanej w 1 z cyklu publikacji *Sambucus nigra* L. leaves inhibit TNF- α secretion by LPS-stimulated human neutrophils and strongly scavenge reactive oxygen species; opublikowanej w *Journal of Ethnopharmacology* z 2022 roku wykonano cztery ekstrakty z liści *S. nigra* – wodne i 70% (v/v) etanolowe w temperaturze pokojowej i w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Poddano je jakościowej i ilościowej analizie fitochemicznej, wykorzystując odpowiednio metody kolorymetryczne oznaczenia

całkowitej zawartości polifenoli z użyciem odczynnika Folina-Cicalteu, metod UHPLC-DAD-MSn i HPLC-DAD. Następnie oceniono ich właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne, badając wpływ na wymiatanie rodników w układach *in vitro* (DPPH, H₂O₂, NO, O₂^{-·}), hamowanie aktywności lipooksygenazy, a także obniżanie wydzielania reaktywnych form tlenu (ROS) i mediatorów stanu zapalnego (tj. TNF- α , IL-1 β i IL-8) przez ludzkie neutrofile *ex vivo*. W tym miejscu chciałbym zauważyć brak porównania poszczególnych aktywności z odpowiednimi związkami kontrolnymi. Ułatwiłoby to interpretacje wyników i określenie faktycznej aktywności opisanych frakcji. Takie informacje odszukałem dopiero czytając uważnie każdą z zamieszczonych publikacji w oryginale. Zaskakujące dla mnie było również podanie w tym miejscu jedynie aktywności hamowania 5-lipooksygenazy na poziomie IC₅₀ 376-433 μ g/ml, z pominięciem aktywności z innych testów. Z kolei analiza fitochemiczna wykazała, że w wyciągach dominowały związki z grup kwasów fenolowych i flawonoidów. Zawartość głównych substancji chemicznych – izomerów kwasu kawoilo-treoninowego, których obecność została po raz pierwszy stwierdzona w liściach, kwasu chlorogenowego, pochodnych kwercetyny i kemferolu była najwyższa w 70% (v/v) etanolowym wyciągu sporządzonym w temperaturze pokojowej. Wyniki badań *in vitro* wskazywały na silne działanie przeciwutleniające badanych ekstraktów, przede wszystkim wobec tlenu azotu. W badaniach *ex vivo* doktorantka wykazała, że wyciągi silnie i zależnie od stężenia hamują uwalnianie ROS i TNF- α przez izolowane z krwi neutrofile stymulowane odpowiednio f-MLP i LPS. Na podstawie wyników uzyskanych w pierwszym etapie do dalszych badań wybrano wyciąg etanolowy 70% (v/v) sporządzony w temperaturze pokojowej. Charakteryzował się on najwyższą zawartością głównych składników, działał silnie przeciwutleniająco w układach *in vitro*, a także wykazywał istotną aktywność przeciwzapalną *ex vivo* przy najniższym negatywnym wpływie na żywotność komórek.

W kolejnej publikacji 2 z cyklu zatytułowanej Wound healing potential of extract from *Sambucus nigra* L. leaves and its fractions umieszczonej w *Journal of Ethnopharmacology*, z 2024 roku, doktorantka analizowała wpływ wytypowanego poprzednio ekstraktu (70% (v/v) etanolowego wyciągu sporządzonego w temperaturze pokojowej) z liści czarnego bzu na procesy biorące udział w gojeniu ran. W tym celu sporządzono wyciąg w większej skali, a następnie poddano go frakcjonowaniu za pomocą rozpuszczalników o wzrastającej polarności. Następnie zbadano wpływ otrzymanych frakcji na odpowiedź zapalną komórek bezpośrednio zaangażowanych w gojenie ran (neutrofili, keratynocytów i fibroblastów), migrację keratynocytów do miejsca zranienia, a także na aktywność enzymów biorących udział w procesach naprawczych i stanie zapalnym skóry. Należy wspomnieć, że badania te doktorantka

przeprowadziła podczas zagranicznego stażu naukowego na Uniwersytecie w Zagrzebiu, co świadczy o jej mobilności naukowej i umiejętności współpracy z innymi ośrodkami naukowymi w tym zagranicznymi. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że najsilniej aktywność elastazy hamowała frakcja butanolowa, kolagenazy frakcje dichlorometanu i eteru etylowego, hialuronidazy frakcję dichlorometanu i sam ekstrakt, a lipooksygenazy frakcja eteru dietylowego. Natomiast wyciąg i poszczególne frakcje nie wpływały istotnie na aktywność tyrozynazy. Doktorantka przeprowadziła również badania na dwóch liniach komórkowych; unieśmiertelnionych keratynocytach (HaCaT) i prawidłowych fibroblastach (NHDF) oraz na izolowanych z ludzkiej krwi neutrofilach. Na modelu neutrofilii zbadano, wpływ na produkcję ROS po stymulacji f-MLP, a także uwalnianie TNF- α , IL-1 β i IL-8 po stymulacji LPS. W tych doświadczeniach zarówno wyciąg, jak i frakcje silnie hamowały produkcję ROS. Wydzielanie TNF- α istotnie obniżały niemal wszystkie badane próbki, oprócz FR1. Natomiast uwalnianie IL-1 β było pobudzane, za wyjątkiem FR2, która je hamowała zależnie od stężenia. Ekstrakt i frakcje FR3-5 nie wpływały na sekrecję IL-8, podczas gdy frakcje FR1-2 znacznie ją pobudzały. Na keratynocytach linii HaCaT przeprowadzono badania wpływu ekstraktu i frakcji na migrację komórek do miejsca zadrapania, a także na wydzielanie IL-6 i IL-8 po naświetlaniu promieniowaniem UVB oraz po stymulacji mieszaniną TNF- α i IFN- γ . W toku doświadczeń Doktorantka stwierdza, że ekstrakt i frakcje FR1, FR2 i FR4 istotnie pobudzają migrację komórek, przyspieszając zamknięcie rany. Dodatkowo, modulują odpowiedź zapalną, pobudzając wydzielanie IL-6, a hamując uwalnianie IL-8. Pani mgr Weronika Skowrońska opracowała również nowy model wywoływania odpowiedzi zapalnej w komórkach fibroblastów (NHDF) wykorzystując kwas lipotejchojowy (LTA) obecny w ścianie komórkowej *S. aureus*, dobierając odpowiednie stężenie i sposób rozcieńczania supernatantów w celu wykrycia poszczególnych cytokin w supernatantach z nad hodowli. Zaobserwowano, że po narażeniu na obecność LTA wzrasta ilość IL-6 i IL-8 wydzielanych przez fibroblasty, natomiast zarówno ekstrakt, jak i wszystkie zbadane frakcje istotnie obniżały ich sekrecję zmniejszając odpowiedź zapalną. Szkoda jedynie, że doktorantka nie spróbowała skorelować profilu działania z identyfikacją poszczególnych związków we frakcjach czy samym wyciągu. W kolejnych badaniach Pani mgr Weronika Skowrońska ustaliła skład ekstraktu, poszczególnych frakcji oraz wodnej poekstrakcyjnej pozostałości, które oceniono jakościowo metodą UHPLC-DAD-MSn. W ekstrakcie i frakcjach doktorantka zidentyfikowała 41 związków chemicznych z grupy flawonoidów, kwasów fenolowych, lignanów i glikozydów cyjanogennych, co w porównaniu z publikacją 1 było znacznym osiągnięciem. W tym miejscu proszę o wytłumaczenie dlaczego związek nr 8 z tabeli oryginalnej publikacji o masie 297 przy

jonizacji ujemnej oznaczony jako pochodna kwasu kawowego nie został zinterpretowany jako kwas kawoilo-trenoinowy? Ta sama masa 297 m/z w publikacji 1 jest właśnie tym związkiem tym bardziej że identyfikowany był dużo wcześniej bo w 2022 roku. Doktorantka stwierdza, że obecność części z tych metabolitów wtórnych po raz pierwszy zidentyfikowano w liściach *Sambucus nigra*. W tym miejscu byłoby wskazane umieścić te nowe dla tego surowca metabolity, zważywszy, że jest to pewne odkrycie naukowe. Kolejnym krokiem doktorantki było wykonanie izolacji 11 metabolitów, których strukturę ustalono na podstawie analizy widm ¹H NMR. Sama doktorantka, nie wyjaśnia w tym miejscu na jakiej podstawie wytypowano te metabolity do izolacji, czy chodziło o aktywność poszczególnych frakcji (nie wiem czy frakcji FR3 i FR4) i związków właśnie z tych frakcji czy może zawartość ilościowa miała decydujące znaczenie. Dopiero analizując szczegółowo oryginał tej pracy (publikacja 2) odnajduję informacje o frakcjach FR3 i FR4 użytych w celu wyodrębnienia poszczególnych metabolitów. Nie są to nowe związki tym bardziej dziwię się, że poświęcono na to czas, a z własnego doświadczenia wiem że proces izolacji czy identyfikacji poszczególnych struktur jest bardzo pracochłonny, wymaga czasu i nakładu finansowego. Zrozumiałbym jeszcze motywację do tego kroku, gdyby w opisywanych wynikach podano aktywności poszczególnych wyizolowanych związków w użytych modelach biologicznych. Być może takie badania się odbywają lub są w planach doktorantki, nie mniej jednak należałoby te kwestie w jakiejś formie zinterpretować lub wyjaśnić.

Ostatnia z zaproponowanych przez doktorantkę prac wchodzących w cykl publikacji (publikacja 3) jest publikacją przeglądową pt. The potential of medicinal plants and natural products in the treatment of burns and sunburn – a review; opublikowaną w *Pharmaceutics* z roku 2023. W celu weryfikacji tradycyjnego zastosowania produktów pochodzenia naturalnego w leczeniu oparzeń w tym oparzeń słonecznych doktorantka przeanalizowała ponad 125 prac opublikowanych w okresie 2010-2022, świadczących o takim działaniu zarówno w badaniach z udziałem ludzi i zwierząt. W proponowanej pracy przeglądowej analizę wykonano zarówno dla preparatów zawierających jedną substancję roślinną, jak i dla produktów naturalnych wieloskładnikowych. Doktorantka również dokonała krytycznej oceny przedstawionych badań, co jak najbardziej wpisuje się w prawidłowe postępowanie w tego typu manuskryptach. Doktorantka na podstawie tak licznych źródeł publikacyjnych stwierdza, że niektóre preparaty ziołowe wykazują większą skuteczność w leczeniu ran oparzeniowych, obejmując skrócenie czasu gojenia i zmniejszenie stanu zapalnego, w porównaniu z leczeniem konwencjonalnym. Miedzy innymi przytacza przykłady wymienionych roślin; *Albizia julibrissin*, *Alkanna tinctoria*, *Aloe vera*, *Arnebia euchroma*, *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Centella asiatica*,

Hippophaë rhamnoides, *Juglans regia*, *Lawsonia inermis* oraz mieszanki *Matricaria chamomilla* i *Rosa canina*, o takim profilu działania. Modele zwierzęce pokazują, że wiele ekstraktów z tych roślin może potencjalnie przynieść korzyści w leczeniu ran oparzeniowych w tym oparzeń słonecznych. Ze względu na różnorodny mechanizm działania, działanie przeciwbakteryjne, bezpieczeństwo stosowania i opłacalność, preparaty ziołowe mogą konkurować z leczeniem konwencjonalnym. Nie tylko pojedyncze preparaty ale także preparaty złożone powinny być brane pod uwagę, ponieważ dotychczasowe przeprowadzone badania często sugerują synergistyczne działanie składników.

Przedstawione wyniki badań, uzyskane, w opisanym zakresie (publikacje 1 i 2), po raz pierwszy dla liści bzu czarnego, mają istotne znaczenie z uwagi na potwierdzenie właściwości przeciwzapalnych i uzasadnienie stosowania surowca z tego gatunku w medycynie ludowej w leczeniu ran, oparzeń i schorzeń dermatologicznych o podłożu zapalnym. W ramach pracy Pani mgr Weroniki Skowrońskiej opracowano trzy modele badania odpowiedzi zapalnej na komórkach skóry, które są aktualnie wykorzystywane rutynowo w pracy naukowej Katedry i Zakładu Biologii Farmaceutycznej. Skłaniają one również do kontynuacji projektu, w oparciu o kolejne modele eksperymentalne *in vitro* oraz *in vivo*. Z uwagi na powyższe oceniam je bardzo wysoko. W zakresie badań biologicznych Pani mgr W. Skowrońska ściśle współpracowała z Katedrą farmakognozji Uniwersytetu w Zagrzebiu w Chorwacji, w którym to Pani prof. Marijana Zovko Končić była jej opiekunem naukowym.

Podsumowując

Ogólnie, zaprezentowane w manuskrypcie 1 i 2 badania są przykładem nowoczesnego podejścia farmakognostycznego, łączącego klasyczne eksperymenty fitochemiczne oraz testy biologiczne w obrębie matryc roślinnych. Uzyskane w nich rezultaty są wyjątkowo cenne zarówno pod względem aplikacyjnym jak i poznawczym, co jest szczególnie ważne w naukach farmaceutycznych. Publikacja z cyklu 3 jest swoistym podsumowaniem takiego podejścia w którym bogate źródło roślinne może być wykorzystane w terapiach przeciwzapalnych oraz schorzeniach skóry w tym poparzeniach słonecznych.

Ocena doktorantki

Analizując szereg dokonań naukowych Pani mgr Weroniki Skowrońskiej jestem pod wielkim wrażeniem jej zaangażowania w tak wiele projektów badawczych, odbytych staży krajowych i zagranicznych, liczego udziału w konferencjach, czy sporej jak na ten moment rozwoju naukowego, ilości publikacji w których doktorantka jest współautorem. Cały dorobek naukowy

Pani Weroniki Skowrońskiej jednoznacznie świadczy o jej pracowitości, za pewne sumienności w wykonaniu powierzonych zadań jak i tak zwanemu talentowi naukowemu. Z całą swoją wiedzą mogę stwierdzić że dorobek naukowy mógłby zawstydzić nie jednego badacza z wyższym niż kandydatka stopniem naukowym. W tym miejscu pozwolę sobie przytoczyć te najważniejsze osiągnięcia Pani Weroniki Skowrońskiej;

- była lub jest kierownikiem lub wykonawcą 5 projektów naukowych,
- odbyła 7 różnych starzy lub wyjazdów naukowych,
- jest współtwórcą badań opisanych w 7 publikacjach naukowych z poza cyklu,
- wygłosiła 7 prezentacji ustnych na różnych konferencjach krajowych i międzynarodowych,
- miała swój znaczący udział w licznych prezentacjach plakatowych.

Reasumując końcowy dorobek naukowy Pani Weroniki Skowrońskiej w liczbach to

- Sumaryczny Impact Factor: 57,37.
- Łączna punktacja MEiN: 1350.
- Sumaryczna liczba cytowań (wg bazy Scopus): 65.
- Index Hirscha (wg bazy Scopus, bez autocytowań): 6.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Skowrońskiej zawiera elementy nowości naukowej o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym. Tematyka pracy jest aktualna i istotna w obszarze badań farmakognostycznych. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, a także umiejętnością prowadzenia doświadczeń oraz ich interpretacji.

Tym samym raz jeszcze stwierdzam, że niniejsza rozprawa, zatytułowana: Charakterystyka fitochemiczna i aktywność biologiczna wyciągu z liści dzikiego czarnego bzu – wskazanie składników o potencjale przeciwzapalnym, **w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574).**

Przedstawiam zatem Radzie Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Skowrońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
KATEDRA BIOLOGII
I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
dr hab. Sylwester Ślusarczyk, profesor uczelni