



Zakład Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok, Polska
tel.: 85-748-56-94; fax: 85-748-54-16
e-mail: michal.tomczyk@umb.edu.pl

Białystok, 1 maja 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Mainki (z domu Rogowskiej) zatytułowanej:

„Wybrane substancje roślinne stosowane w schorzeniach skóry - ocena składu oraz potencjalnej aktywności przeciwzapalnej na modelach bezkomórkowych i komórkowych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Agnieszki Bazylko
w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Promotor pomocniczy: dr hab. Monika Czerwińska

Obserwowany rozwój badań analitycznych nad roślinnymi surowcami leczniczymi staje się obecnie bardzo istotnym etapem w poszukiwaniu nowych, wydajnych źródeł związków pochodzenia naturalnego, a ostatecznie stanowi podstawę do kompozycji nowych potencjalnych leków roślinnych. Elementem niekiedy pomijanym, a niezmiernie istotnym z punktu widzenia właściwej fitoterapii, jest również szczegółowa ocena zarówno skuteczności leczniczej jak i bezpieczeństwa stosowania leku roślinnego. Dodatkowym utrudnieniem w badaniach roślinnych surowców leczniczych w kontekście zarówno badań fitochemicznych jak i niekiedy wielokierunkowego działania leczniczego jest złożoność matrycy roślinnej w tym składników czynnych odpowiedzialnych za efekty terapeutyczne.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr farm. Marty Mainki wpisuje się w bardzo aktualny nurt prowadzonych obecnie na świecie badań obejmujących ocenę aktywności biologicznej wybranych trzynastu gatunków roślin uznanych za lecznicze oraz ocenę ich charakterystyki fitochemicznej w oparciu o techniki wielkoskalowe w tym techniki chromatograficzne LC-MS. Doktorantka postawione hipotezy badawcze podparła właściwie postawionymi celami badawczymi. Przyjęła bowiem za zadanie ocenę na modelach bezkomórkowych (*in vitro*) aktywności przeciwzapalnej i przeciwutleniającej wyciągów wodnych i wodno-etanolowych z wybranych substancji roślinnych tradycyjnie stosowanych w schorzeniach skóry, a następnie wyselekcjonowanie tych najbardziej aktywnych. W tym

miejscu wyjaśnienia wymaga kwestia, czy analiza literaturowa tradycyjności zastosowania wybranych do badań surowców została wykonana jedynie w oparciu o pozycje polskojęzyczne (Tabela 1. Str. 53)? W celu zbadania ich potencjalnego wpływu na proces gojenia rany zaplanowała przeanalizowanie odpowiedzi zapalnej komórek układu odpornościowego, neutrofilów ludzkich, jak również komórek zaangażowanych w odbudowę naskórka, ludzkich keratynocytów. Niemniej istotne było określenie również składu chemicznego wyciągów o znaczącej aktywności przeciwzapalnej. Jednocześnie podjęła się odpowiedź która z substancji roślinnych może mieć potencjalne zastosowanie w chorobach skóry poprzez ocenę aktywności antyoksydacyjnej oraz aktywności inhibicyjnej enzymów związanych ze stanem zapalnym, ocenę inhibicji uwalniania mediatorów stanu zapalnego z ludzkich neutrofilów i keratynocytów czy wpływie na proliferację keratynocytów i proces gojenia naskórka/rany.

Doktorantka podjęła się ambitnego zadania badawczego uwzględniającego szereg złożonych etapów badawczych. Przyjęte tezy badawcze pracy doktorskiej zasługują na wyraźne podkreślenie, oraz co istotne, zostały skonstruowane bardzo czytelnie i poprawnie. Następstwem tego są uzyskane wyniki nie budzące moich jakichkolwiek zastrzeżeń. Jako przedmiotowy cel badań Pani mgr farm. Marta Mainka wybrała niebadane to tej pory surowce roślinne ze znanych już tradycyjnie stosowanych gatunków roślin z kilku rodzajów botanicznych i wykonane z nich dwa rodzaje preparatów galenowych. Przedmiotem były wyciągi wodne, a także 70% etanolowe kolejno z liści *Sambucus nigra* L., kwiatów *Centaurea cyanus* L., ziela *Viola tricolor* L., ziela *Achillea millefolium* L., liści *Arctium minus* (Hill) Bernh., korzenia *A. minus* (Hill) Bernh., liści *A. lappa* L., korzenia *A. lappa* L., ziela *Thymus serpyllum* L., liści *Taraxacum officinale* F.H. Wiggers., kwiatów *Calendula officinalis* L., ziela *Urtica dioica* L. oraz ziela *Galium aparine* L. To bardzo okazała kolekcja surowców roślinnych. Nasuwa się tutaj pytanie o właściwą identyfikację oraz nazewnictwo gatunkowe materiału do badań. Czy korzystano z tematycznych baz danych jak Kew Plant Database potwierdzając ich obowiązujące nazewnictwo taksonomiczne? W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na użyte potoczne określenie „wzorniki” zamiast „okazy zielnikowe”.

Wybrane do badań ekstrakty objęła szerokim panelem badań eksperymentalnych - biologicznych w tym ocenę zdolności wymiatania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowego (DPPH•), ocenę zdolności wymiatania anionorodnika

ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oraz zdolność hamowania aktywności oksydazy ksantynowej w układzie ksantyna-oksydaza ksantynowa, zdolność wymiatania nadtlenu wodoru (H_2O_2), zdolność hamowania aktywności lipooksygenazy, zdolność hamowania aktywności hialuronidazy. W ocenie aktywności przeciwwolnorodnikowej oraz enzymatycznej zastosowała odpowiednio kontrole pozytywne, jednak wyjaśnienia wymaga fakt wyboru do kontroli pozytywnej do jedynie jednego stężenia. Dodatkowo dokonała izolacji neutrofilów oraz wpływu wybranych wyciągów na aktywność stymulowanych neutrofilów. Poza tym w panelu badań biologicznych przeprowadziła ocenę aktywności cytotoksycznej w hodowlach komórek skóry ludzkiej – keratynocytów oraz ocenę wpływ wybranych do badań wyciągów na wydzielanie mediatorów stanu zapalnego, oceniając tym samym bezpieczeństwo stosowania wybranych wyciągów.

Badania biologiczne podparła wykonaniem oznaczeniem analizy składu chemicznego zarówno w oparciu o metody spektrofotometryczne (suma zawartości polifenoli – metoda Folin’a-Ciocalteu) oraz wysokospecjalistyczną ocenę składu fitochemicznego metodą UHPLC-DAD-MS/MS, w której prawidłowo opisała główne składniki występujące w badanych ekstraktach, co potwierdza przedstawiona w rozprawie szczegółowa dokumentacja w postaci chromatogramów i tabel z przeprowadzonej dużej liczby analiz LC-MS.

Uzyskane przez mgr Martę Mainkę bardzo cenne wyniki wykazały po raz pierwszy dla badanych ekstraktów szereg właściwości biologicznych w tym działanie przeciwutleniające. Niektóre z badanych ekstraktów w tym uzyskane z ziela macierzanki piaskowej hamują również aktywność lipooksygenazy i hialuronidazy. Otrzymane wyniki potwierdzają, iż wyciągi z liści łopianu większego hamowały wydzielanie mediatorów stanu zapalnego oraz przyspieszały migrację/proliferyzację keratynocytów. Co ciekawe, w modelu badań na ludzkich neutrofilach wyciągi z liści łopianu większego, ziela krwawnika pospolitego oraz ziela macierzanki piaskowej indukowały produkcję cytokin prozapalnych ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-8$). Jak słusznie konkluduje doktorantka, ekstrakty te nasilając produkcję cytokin przez neutrofile mogą wpływać na procesy obronne przed zakażeniami w tym w procesie zranienia powłoki skóry. Z kolei, analizowane wyciągi hamowały wydzielanie cytokin prozapalnych przez ludzkie keratynocyty. Wyciąg wodny z liści łopianu większego najefektywniej hamował wydzielanie $IL-6$ i $IL-8$ przez ludzkie keratynocyty. Wodne wyciągi

z ziela krwawnika pospolitego oraz liści łopianu większego przyspieszały migrację /prolifrację keratynocytów w teście leczenia rany. Wyniki te skłaniają do dalszych badań w modelach *in vivo*, ze względu na potencjalne zastosowanie w terapii powikłanego gojenia ran ze względu na efekt immunomodulujący i potencjalnie zwalczający patogeny. Poza tym doktorantka zaobserwowała, że wyciągi z ziela macierzanki piaskowej wykazywały wysoką aktywność antyoksydacyjną oraz najefektywniej hamowały aktywność enzymów prozapalnych, co może być związane z najwyższą zawartością polifenoli. Z kolei wyciągi z liści łopianu większego hamowały wytwarzanie prozapalnych cytokin, co prawdopodobnie było wynikiem obecności w badanych ekstraktach związków lignanowych w tym diarktigeniny i arktyny. Zastosowane techniki oceny składu chemicznego w znaczącym stopniu pozwoliły na wstępną odpowiedź o związkach odpowiedzialnych za aktywność biologiczną. Podsumowując, testowane wyciągi mogą wspomagać gojenie się ran oraz terapię stanów zapalnych skóry poprzez zwiększanie proliferacji/migracji ludzkich keratynocytów HaCaT, działanie przeciwutleniające oraz modulując odpowiedź zapalną. Moją uwagę w wynikach badań biologicznych skupiło przedstawienie graficzne jedynie jednego stężenia zastosowanych kontroli pozytywnych, czy badano też związki referencyjne w innych stężeniach?

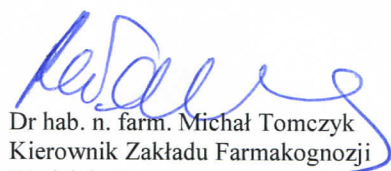
Niewątpliwie na uwagę zasługuje wielokierunkowe podejście do oceny aktywności biologicznej znanych surowców leczniczych pod tym kątem badanych po raz pierwszy. Zadania badawcze Doktorantka zrealizowała w kilku obszarach tematycznych ściśle ze sobą powiązanych, wykorzystując jednocześnie nowoczesne techniki chromatograficzne z uwzględnieniem systemów LC-MS/MS. Większość etapów badawczych zostało przeprowadzonych po raz pierwszy, co stanowi element nowości i oryginalności naukowej recenzowanej dysertacji. W tym miejscu chciałbym jedynie zwrócić uwagę na opisane w literaturze naukowej analiz biologicznych w tych samych schematach dotyczących liści bzu czarnego, co oczywiście otwiera dyskusję i wymaga krótkiego wyjaśnienia. Nie odnalazłem takiego odniesienia w tekście bardzo obszernej dyskusji.

Z uwagi na bardzo rozbudowany metodologicznie i zadaniowo charakter recenzowanej pracy pozwolę sobie na wyrażenie mojej bardzo pozytywnej opinii. Lektura dysertacji uprawnia mnie do stwierdzenia, że Autorka wykazała się zdolnością w opanowaniu szeregu bardzo pracochłonnych technik pracy w laboratorium biologicznym oraz fitochemicznym. Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki badań oraz obszerna

i zrozumiała, ale i krytyczna dyskusja potwierdza dojrzałość badawczą Doktorantki, jak i dociekliwość oraz umiejętność stawiania i rozwiązywania problemów badawczo-naukowych. Strona techniczna rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Mainki w zasadzie nie budzi moich większych zastrzeżeń tym bardziej, iż jest przygotowana z zachowanym klasycznym i bardzo estetycznym układem edytorskim. Moja uwaga dotyczy również zaobserwowanej w trakcie lektury monografii dość dużej ilości błędów literowych, szczególnie w końcowej części rozprawy, które z pewnością wynikają z opracowywania ogromnej ilości danych i wyników co stanowi naturalny element rzetelnej edycji tekstu.

Podsumowując, chciałbym jednoznacznie stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Marty Mainki jest ogromnie wartościowa zarówno z naukowego ale co istotne i aplikacyjnego punktu widzenia. Uzyskane wyniki powinny zostać wykorzystane w kontekście potencjalnych nowych preparatów dermatologicznych zawierających wybrane do analizy przetwory z roślinnych surowców leczniczych.

Wnoszę tym samym do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr farm. Marty Mainki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując tym samym do nadania Pani mgr farm. Marcie Maince stopnia doktora nauk farmaceutycznych w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.



Dr hab. n. farm. Michał Tomczyk
Kierownik Zakładu Farmakognozji
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku