



**Samodzielna Pracownia
Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedra i Zakład Farmakognozji
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN
tel./fax +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

Lublin, 05.05.2020

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych mgr farm. Anny Marchelak zatytułowanej „**Charakterystyka fitochemiczna i aktywności biologicznej ekstraktów z kwiatów *Prunus spinosa* L. w kontekście chorób układu krążenia**” wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Moniki A. Olszewskiej, prof. UM (promotor) oraz dr n. farm. Aleksandry Owczarek (promotor pomocniczy) w Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W skład recenzowanej pracy doktorskiej wchodzi cztery publikacje z listy A czasopism punktowanych MNiSW. Sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu, zgodny z rokiem publikacji, jest równy **9.727**, zaś punktacja MNiSW wynosi **270**. Są to następujące pozycje:

1) Owczarek A., Magiera A., Matczak M., Piotrowska D.G., Olszewska M.A., Marchelak A.: Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochemistry Letters*, 2017, 20, 415-424, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.01.010>. (IF₂₀₁₇=1.575, MNiSW₂₀₁₇=20, MNiSW₂₀₁₉=70)

2) Marchelak A., Owczarek A., Matczak M., Pawlak A., Kolodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Olszewska M.A.: Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8, e680, 1-15, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00680>. (IF₂₀₁₇=3.831, MNiSW₂₀₁₇=40, MNiSW₂₀₁₉=100)

3) Marchelak A., Owczarek A., Rutkowska M., Michel P., Kolodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Olszewska M.A.: New insights into antioxidant activity of *Prunus spinosa* flowers: Extracts, model polyphenols and their phenolic metabolites in plasma towards multiple in vivo-relevant oxidants. *Phytochemistry Letters*, 2019, 30, 288-295, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.011>. (IF₂₀₁₈=1.338, MNiSW₂₀₁₈=20, MNiSW₂₀₁₉=70)

4) Marchelak A., Olszewska M.A., Owczarek A.: Simultaneous quantification of thirty polyphenols in blackthorn flowers and dry extracts prepared thereof: HPLC-PDA method development and validation for quality control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 184, 113121, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113121>. (IF₂₀₁₈=2.983, MNiSW₂₀₁₈=35, MNiSW₂₀₁₉=100)

Wraz z:

Marchelak A., Olszewska M.A., Owczarek A.: Data on the optimization and validation of HPLC-PDA method for quantification of thirty polyphenols in blackthorn flowers and dry extracts prepared thereof. *Data in Brief*, 2020, 29, 105319, <http://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105319>. (MNiSW₂₀₁₉=40)

Wyniki badań prezentowane w ramach niniejszej pracy zostały również przedstawione w formie 8 komunikatów zjazdowych. Były to trzy konferencje krajowe oraz cztery sympozja międzynarodowe. Na realizację części badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej Doktorantka pozyskała finansowanie Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Preludium 2017/27/N/NZ7/02074.

Choroby układu krążenia są nadal jednym z największych zagrożeń zdrowia i życia Polaków. Pomimo istotnego postępu poczynionego w dziedzinie przeciwdziałania przedwczesnej umieralności z tej przyczyny, nadal odnotowuje się umieralność na poziomie 46%. Dostrzeganie wagi tego problemu znalazło odbicie w rekomendacjach Rządowej Rady Ludnościowej, w których stwierdzono, że problematyka chorób układu krążenia powinna zajmować priorytetowe miejsce w polityce zdrowotnej państwa i jest niezbędna również z demograficznego punktu widzenia. Od lat duży nacisk postawiony jest na skuteczną profilaktykę, w której ogromne znaczenie przypisuje się prawidłowej diecie. Poszukując skutecznych substancji efektywnych zarówno w profilaktyce jak i terapii, naukowcy od lat prowadzą intensywne badania nad polifenolami - różnorodną grupą związków naturalnych o udokumentowanej aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej. Właśnie zagadnieniu temu Doktorantka poświęca pierwszą część Wstępu, gdzie jasno i precyzyjnie uzasadnia podjętą tematykę badawczą. Na 7 stronach charakteryzuje krótko mechanizm działania polifenoli, zwracając uwagę na fakt, iż substancje roślinne bogate w nie są od wieków wykorzystywane, z dobrymi rezultatami, w medycynie tradycyjnej w schorzeniach sercowo-naczyniowych, a ich działanie udokumentowane jest we współczesnych badaniach.

Doktorantka uwagę swoją kieruje na gatunek od tysięcy lat stosowany w medycynie tradycyjnej, a mianowicie na śliwę tarninę – *Prunus spinosa* L. Poszczególne części rośliny wydają się być dokładnie poznane pod kątem fitochemicznym, niewiele jednak jest danych literaturowych potwierdzających aktywność biologiczną wynikającą z obecnych w nich

metabolitów wtórnych. Punktem wyjścia do sformułowania celu rozprawy doktorskiej były wyniki badań zespołu Zakładu Farmakognozji. Biorąc pod uwagę powyższe, Doktorantka skoncentrowała się na najstabilniej jak dotąd przebadanych organach sliwy tarniny a mianowicie kwiatach. Dwutorowo prowadzone badania obejmowały dokładną analizę fitochemiczną suchych ekstraktów z kwiatów *P. spinosa* wraz z opracowaniem metodyki kontroli jakości, jak również ocenę aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej w modelach *in vitro*. Cel pracy jest jasno sformułowany i uszczegółowiony.

Część doświadczalna krótko przedstawiona jest na 5 kolejnych stronach. Doktorantka charakteryzuje materiał roślinny oraz sposób pozyskania poszczególnych ekstraktów suchych (schemat), a w formie czytelnej tabeli przedstawia koncepcję i plan badań. Autorka przedstawiła także krótko stosowane techniki badawcze. Podkreślić należy, iż Doktorantka wykazać się może znajomością szeregu nowoczesnych technik badawczych. Do analizy profilu jakościowego ekstraktów wykorzystywała nowoczesną technikę UHPLC-PDA-ESI-MS³, analizę jakościową wykonała przy użyciu metody HPLC-PDA-fingerprint. Autorka wykonała cały szereg badań *in vitro* mających na celu określenie potencjału antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego, głównie w oparciu o spektro- i fluorometrię, które to opisane zostały na stronach 23-25 w rozdziale **Metodyka badań**, a dokładniej przedstawione w odpowiednich publikacjach.

Uzyskane **wyniki** opisane są na 6 kolejnych stronach. Autorka dołącza też jednostronicowe **podsumowanie** oraz krótkie **wnioski końcowe**. Doktorantka wykazała, iż zarówno wyjściowy suchy ekstrakt metanolowo-wodny, jak i jego poszczególne frakcje, zwłaszcza eterowa i octanowa, stanowią bogate źródło związków polifenolowych, porównywalne do znanych innych roślin cenionych w prewencji chorób układu krążenia, jak ekstrakt z nasion winorośli czy zielonej herabty. Wykazała tym samym ważność kwiatów traniny, niemalże na równi z dotychczas szeroko stosowanymi gałązkami.

W badanych ekstraktach Doktorantka całkowicie lub częściowo zidentyfikowała ponad 50 związków polifenolowych, z czego 36 było nowymi dla kwiatów. W większości były to flawonoidy, głównie mono- i diglikozydy kemferolu i kwercetyny, pozostałe zaś to pochodne flawan-3-olu (katechiny i procyanidyny typu A), pseudodepsydy kwasu kawowego i proste kwasy fenolowe. Część z nich występuje w naturze rzadko. Podkreślić w tym miejscu należy, iż prawidłowa identyfikacja tego rodzaju związków nie jest zadaniem najłatwiejszym i pokazuje to doświadczenie i wiedzę Doktorantki w tym zakresie. Analizie UHPLC-PDA-ESI-MS³ Autorka poddała także ekstrakty otrzymane z liści *P. spinosa*, gdzie zidentyfikowała znacznie mniej, gdyż 25 związków. Wyniki dotyczące identyfikacji polifenoli opublikowane zostały na łamach *Frontiers in Pharmacology*.

Widząc jak duży potencjał terapeutyczny posiadają kwiaty sliwy traniny Doktorantka zajęła się niezwykle ważnym zagadnieniem jakim jest opracowanie uniwersalnej i prostej metody do celów kontroli jakości surowca, co ze względu na wysoką złożoność badanej matrycy polifenolowej oraz podobieństwo strukturalne związków, nie było zadaniem łatwym. Bazując

na wzorcach 30 związków polifenolowych charakterystycznych dla surowca, Autorka zaproponowała 35-minutową zwalidowaną metodę zapewniającą rozdzielanie analitów z tak złożonej matrycy z satysfakcjonującą rozdzielczością. Metoda ta z powodzeniem zastosowana została do oceny jakości materiału roślinnego zakupionego od trzech producentów europejskich, co wskazuje na jej uniwersalność. W pełni opracowaną, uniwersalną metodę Doktorantka opublikowała na łamach prestiżowego *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Celem izolacji 4 diglikozydów kemferolu, o podobnych właściwościach chromatograficznych, Doktorantka opracowała optymalną metodę chromatografii preparatywnej HPLC, rozwiązując tym samym kolejny istotny problem analityczny. Otrzymane czyste związki z powodzeniem wykorzystywała jako substancje wzorcowe do analiz fitochemicznych i badań aktywności biologicznej.

W dalszej części badań Doktorantka dokonała wstępnej analizy aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, wykazując ich wysoki potencjał przeciwutleniający, korelujący oczywiście z zawartością polifenoli. Starając się dogłębniej wyjaśnić mechanizm działania kontynuowała badania wykorzystując model ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego ONOO⁻, który odzwierciedla warunki panujące *in vivo* w układzie krążenia w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych oraz w przypadkach niedokrwienia i reperfuzji. Autorka wykazała działanie ochronne już niskich dawek badanych ekstraktów w stosunku do białkowych i lipidowych składników ludzkiego osocza, potwierdzając tym samym, iż aktywność przeciwutleniająca może częściowo warunkować korzystne działanie kwiatów śliwy tarniny w obrębie układu krążenia, sugerowane dotychczas przez medycynę tradycyjną. Poszukując dalej, Doktorantka w dalszej części oceniła aktywność ekstraktów i frakcji kwiatów tarniny wobec szeregu rodnikowych i nierodnikowych oksydantów generowanych *in vivo*. Istotne jest to, iż do badań wytypowała także izolowane związki pojedyncze, jak i ich metabolity *in vivo*. Tak dokładne, dobrze zaplanowane działania pozwoliły zaugerować prawdopodobny mechanizm działania. Wyniki własne Doktorantka opublikowała na łamach *Phytochemistry Letters*.

Aby w pełni scharakteryzować ekstrakty śliwy tarniny oceniony został także potencjał przeciwzapalny w testach hamowania enzymów prozapalnych: hialuronidazy i lipooksygenazy, ale także, co ważne a często pomijane w badaniach tego rodzaju, Doktorantka oceniła bezpieczeństwo stosowanych ekstraktów wykorzystując test cytotoksyczności z użyciem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej PBMCs.

Jak widać na tym mgr. Marchelak nie zamierza poprzestać. W krótkim rozdziale **Perspektywy i plany na przyszłość** wyjaśnia, iż dzięki pozyskanemu projektowi Preludium NCN, nadal kontunuuje badania w kierunku oceny ekstraktów i substancji pojedynczych na układ homeostazy. Zaplanowane są już badania oceniające aktywność hipotensyjną w teście *in vitro* inhibicji konwertazy angiotensynowej, badania bezpośredniego hamowania innych enzymów prozapalnych (cyklooksygenazy-2, fosfolipazy A2), testy uwalniania mediatorów

stanu zapalnego (cytokin i enzymów) przez komórki układu odpornościowego (neutrofile, monocyty i limfocyty) czy ocena wpływu na wybrane markery dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. Wszystko to świadczy o dogłębnym zrozumieniu tematu, konsekwencji w realizacji zmierzonego celu, umiejętności zadawania kolejnych pytań oraz poszukiwania odpowiedzi na nie. W moim odczuciu Doktorankę cechuje właściwa prawdziwemu naukowcowi ciekawość i systematyczność.

Badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i konsekwentnie zrealizowała, a uzyskane wyniki omówione są w sposób prawidłowy. Piśmiennictwo jest dobrane odpowiednio i liczy 74 pozycje, w przeważającej części pochodzące z ostatnich lat. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Dobór literatury uważam za niezwykle trafny a jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w omówieniu wyników, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Do pracy dołączone są oświadczenia współautorów, z których jednoznacznie wynika, iż udział Doktorantki w powstawaniu prac jest wiodący. Każdorazowo brała udział we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, zaangażowana była w każdy z etapów eksperymentów, samodzielnie wykonała większość z analiz fitochemicznych, jak i biologicznych.

Wszystkie rozdziały dysertacji stanowią spójną całość, do pracy dołączony jest wykaz skrótów oraz trzystronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa przygotowana jest z niezwykłą starannością, napisana jest precyzyjnym, przystępnym językiem i trudno dopatrzeć się jakichkolwiek błędów – nawet edytorskich. Jedyne co mogłabym zasugerować, to unikanie stwierdzeń „proces optymalizacji rozdziału”, gdzie „rozdział” zastąpiłabym wyrazem „rozdzielenie”.

Poszczególne publikacje przeszły już proces recenzji przed ich przyjęciem do druku. Po lekturze rozprawy, jak i analizie wspomnianych prac nasuwa się komentarz dotyczący całego, spójnego poniekąd cyklu. Doktorantka podjęła się izolacji 4 wymienionych wcześniej związków wykorzystując liście badanego surowca jako znacznie bogatsze źródło. W tym miejscu pojawia się pewne niedomówienie. Autorka na stronie 29 nadmienia, iż „Wstępne analizy LC-MS wykonane w ramach niniejszej pracy wykazały, że dwa diglikozydy kemferolu pozostają nieznanne”, dlatego też podjęła się ich izolacji. Jednakże związki te, jak również dwa kolejne zostały zidentyfikowane właśnie w ramach niniejszej dysertacji, co opublikowano w publikacji III.

Związki te, wraz z kilkoma innymi substancjami wzorcowymi, wykorzystane były do badań biologicznych. Celowym w moim odczuciu byłoby podjęcie próby izolacji innych metabolitów głównych jak np. związki 17, 46, 49, 57, 58 czy 59 (wg identyfikacji zamieszczonych w publikacji II – Figura 1, Tabela 1). Uzyskane wyniki aktywności mogłyby poszerzyć wiedzę dotyczącą także zależności struktura-aktywność oraz izolacja ich pozwoliłaby na ustalenie dokładnej struktury.

Biorąc pod uwagę ogromny potencjał terapeutyczny badanych ekstraktów, jak i potencjał twórczy Doktorantki, może też warto byłoby pokusić się w przyszłości o ocenę możliwości zastosowania ekstraktów w chorobach metabolicznych.

Komentarze te w żaden sposób nie umniejszają mojej niezwykle pozytywnej opinii. Recenzowana rozprawa doktorska zasługuje na szczególne uznanie, świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym, jak i ogromnej biegłości warsztatowej Doktorantki. Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Pani mgr farm. Anna Marchelak skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazała dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego.

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. O dużej wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie wyników w postaci dobrej jakości artykułów w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, o czym wspomniałam na wstępie recenzji.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie **wniosuję do Rady Naukowej ds. Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr farm. Anny Marchelak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

*Krzyszyna Skalicka-
-Woźniak*

Prof. dr hab. Krzyszyna Skalicka-Woźniak