



Zakład Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego  
Katedra i Zakład Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej  
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE  
ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN  
tel. +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

---

Lublin, 30.01.2023

### RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych mgr farm. Anny Magiery zatytułowanej „**Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza**” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, we współpracy z Katedrą Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii (obecnie Zakład Biologii i Farmakognozji) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorami pracy są dr hab. n. farm. Monika A. Olszewska, prof. UM (promotor) oraz dr hab. n. farm. Monika E. Czerwińska (promotor pomocniczy).

Postęp cywilizacyjny i, co za tym idzie, rozwój nauki, technologii i przemysłu sprawił, że styl naszego życia zmienia się. Brak aktywności fizycznej, zła dieta, stres, zanieczyszczenie środowiska i palenie tytoniu to główne przyczyny chorób cywilizacyjnych, będących epidemią XXI wieku i istotnym problemem państw wysoko rozwiniętych. Jest to duża grupa schorzeń, do których zaliczana jest m.in. otyłość, cukrzyca oraz miażdżyca, ale także nowotwory złośliwe czy alergie. W krajach wysoko rozwiniętych stanowią jedną z głównych przyczyn absencji w pracy, licznych wizyt lekarskich oraz przedwczesnej śmierci. Jak nadmienia w swojej pracy Pani mgr Anna Magiera „*W badaniach prowadzonych w ostatnich dekadach dowiedziono, iż patomechanizm większości chorób cywilizacyjnych i ich powikłań jest bardzo złożony, jednak w istotnym stopniu powiązany z chronicznym stresem oksydacyjnym*”. W tym kontekście uwaga Doktorantki zwrócona została w kierunku możliwego zastosowania w profilaktyce pierwotnej i wtórnej chorób cywilizacyjnych produktów bogatych w polifenole, a w szczególności kontynuując bogatą historię i doświadczenie macierzystego zakładu, w stronę polifenoli zawartych w owocach śliwy tarniny (*Prunus spinosa* L.). Polifenole roślinne, ze względu na swoje działanie normalizująco-regulujące procesy oksydacyjne i zapalne oraz zaburzenia metaboliczne, mogą wykazać wysoką skuteczność zarówno w profilaktyce, jak i terapii chorób cywilizacyjnych.

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej jest więc charakterystyka świeżych i suszonych owoców *P. spinosa*, a także frakcji polifenolowych, wraz z określeniem potencjalnej aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnej i przeciwcukrzycowej

w kontekście profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby zapalne jelit oraz cukrzyca i jej powikłania naczyniowe.

W skład recenzowanej rozprawy doktorskiej wchodzi cztery publikacje z listy A czasopism punktowanych MNiSW. Sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu, zgodny z rokiem publikacji, jest równy **15.069**, zaś punktacja MNiSW wynosi **380**. Są to następujące pozycje:

1) **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenol-enriched extracts of *Prunus spinosa* fruits: Anti-inflammatory and antioxidant effects in human immune cells ex vivo in relation to phytochemical profile. *Molecules*, 27(5), 1691 (IF<sub>2021</sub> = 4.927)

2) **Magiera A.**, Czerwińska M.E., Owczarek A., Marchelak A., Granica S., Olszewska M.A. (2022). Polyphenols and Maillard reaction products in dried *Prunus spinosa* fruits: Quality aspects and contribution to anti-inflammatory and antioxidant activity in human immune cells ex vivo. *Molecules*, 27(10), 3302 (IF<sub>2021</sub> = 4.927)

3) **Magiera A.**, Kołodziejczyk-Czepas J., Skrobacz K., Czerwińska M.E., Rutkowska M., Prokop A., Michel P., Olszewska M.A. (2022). Valorisation of the inhibitory potential of fresh and dried fruit extracts of *Prunus spinosa* L. towards carbohydrate hydrolysing enzymes, protein glycation, multiple oxidants and oxidative stress-induced changes in human plasma constituents. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1300 (IF<sub>2021</sub> = 5.215)

Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy zostały przedstawione w formie 4 komunikatów zjazdowych (3 posterów i 1 referatu ustnego) na krajowych i międzynarodowych sympozjach naukowych. Za wygłoszenie referatu Doktorantka nagrodzona została nagrodą dla autora najlepszej prezentacji.

We wstępie pracy Doktorantka bardzo dokładnie uzasadnia podjętą tematykę badawczą, skupiając się na aspektach epidemiologicznych jak i ekonomicznych chorób cywilizacyjnych, ale także dyskutuje złożony patomechanizm oraz możliwości terapeutyczne. Szeroko opisana jest aktywność polifenoli roślinnych i prezentowane są najnowsze badania prowadzone na świecie w aspekcie profilaktycznego i terapeutycznego ich wpływu. Bardzo wartościowa jest także charakterystyka rośliny będącej przedmiotem badań. Mgr Magiera charakteryzuje botanicznie śliwę tarninę, jej tradycyjne aplikacje, zestawiając informacje dotyczące udokumentowanego zastosowania z brakami w zakresie analizy fitochemicznej.

W dalszej części Doktorantka przedstawia cel naukowy oraz poszczególne etapy jego realizacji, obrazując wszystko bardzo przejrzystym schematem. Metodyka przedstawiona jest w szczegółowy sposób, co wyraźnie wskazuje na doświadczenie, bogaty warsztat naukowy, rzetelność i skrupulatność Doktorantki, co należy podkreślić.

Na kolejnych 6 stronach mgr Magiera przedstawia uzyskane wyniki opublikowane w trzech pracach składających się na rozprawę doktorską i dyskutuje je wspólnie. Autorka dołącza też dwustronicowe podsumowanie oraz krótkie wnioski końcowe.

Całość pracy jest niezwykle spójna, starannie przygotowana, wyniki dyskutowane są bardzo dojrzałe i w zderzeniu z najnowszą wartościową i dobrze dobraną literaturą (66 pozycje). Do pracy dołączony jest wykaz skrótów oraz trzystronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim.

Do rozprawy dołączone są oświadczenia współautorów, z których wynika, iż udział Doktorantki w powstawaniu prac jest wiodący. Każdorazowo brała udział we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, samodzielnie przeprowadziła większość eksperymentów, wykonywała analizy statystyczne, interpretowała uzyskane wyniki. We wszystkich pracach pełniła funkcję autora korespondencyjnego.

Podsumowując najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy doktorskiej należy zaznaczyć iż:

- Autorka do badań przygotowała ekstrakty metanolowo-wodne (75:25) zarówno z materiału świeżego i suszonego, jak również celem otrzymania frakcji wzbogaconych w poszczególne związki/grupy związków, wykonała frakcjonowaną ekstrakcję rozpuszczalnikami o różnej polarności.
- Analiza LCMS pozwoliła na identyfikację łącznie 57 i 45 składników polifenolowych, odpowiednio w świeżych i suszonych owocach śliwy tarniny. Były to głównie kwasy fenolowe, pochodne kwasów kawoilo- i feruilochinowego, kawoiloszikimowego, benzoosowego i cynamonowego; glikozydy flawonolowe, w tym rzadko występujące w przyrodzie mono- i dipentozylidy kwercetyny i kemferolu; jak również antocyjaniny, glikozydy cyjanidyny i peonidyny. Należy wyraźnie zaznaczyć, iż analiza fitochemiczna owoców suszonych wykonana została po raz pierwszy. Jak podaje Doktorantka *„Sumarycznie udało się wykryć 35 nowych związków polifenolowych dla owoców tarniny, wnosząc tym samym istotną nowość w zakresie fitochemii tego surowca”*.
- Pani mgr Magiera wykazała także, iż suszone owoce charakteryzowały się mniejszą różnorodnością w obrębie składników polifenolowych niż owoce świeże – podczas obróbki termicznej doszło do utraty 19 składników i pojawienia się tylko 7. Ubogość owoców suszonych w zestawieniu ze świeżymi widoczna była także w oznaczeniach ilościowych sumy polifenoli.
- W ekstraktach otrzymanych ze świeżych owoców dominowały garbniki (skondensowane procyjanidyny), a następnie kwasy fenolowe, antocyjany i flawonoidy. Z kolei w ekstrakcie metanolowo-wodnym suszonych owoców głównymi związkami były kwasy fenolowe i garbniki, następnie flawonoidy.
- W suszonych owocach po raz pierwszy wykryto i wyizolowano trzy związki będące wynikiem reakcji Maillarda: 3-hydrokso-2,3-dihydromaltol, 5-hydroksymetylofurfural (HMF) i (5-hydroksymetylofur-2-yl)-metoksymetanol. Ich zawartość, z uwagi na

potencjalne działanie toksyczne, została oznaczona ilościowo. Tym samym zoptymalizowano metodę HPLC-PDA-fingerprint analizy związków polifenolowych i niepolifenolowych, która może znaleźć zastosowanie w kontroli jakości świeżych i suszonych owoców *P. spinosa*.

- Dla badanych ekstraktów i frakcji wykazano wysoki potencjał przeciwzapalny i antyoksydacyjny. Frakcje polifenolowe hamowały sekrecję ROS, prozapalnych ELA-2 i TNF- $\alpha$  oraz nasilały wydzielanie przeciwzapalnej IL-10. Uzyskane dane pozwalają przypuszczać, iż frakcje te mogą łagodzić stan zapalny zarówno ogólnoustrojowo, jak i lokalnie w przewodzie pokarmowym. Po raz pierwszy podobne badania wykonano dla hydroksymetylofurfuralu.
- Wszystkie przebadane ekstrakty i frakcje, zarówno te otrzymane ze świeżego, jak i z suszonego materiału roślinnego, odznaczały się większą zdolnością do inhibicji  $\alpha$ -glukozydazy niż referencyjny lek przeciwcukrzycowy – akarboza.
- Celem uszczegółowienia przeprowadzonych badań aktywności antyoksydacyjnej w modelu ludzkich neutrofilii oceniono aktywność wobec szeregu rodnikowych i nierodnikowych oksydantów generowanych *in vivo*, wykazując wysoki, zależny od dawki i skorelowany z zawartością polifenoli potencjał neutralizacyjny względem wszystkich badanych ROS.
- Wykazano także potencjał do hamowania nieenzymatycznej glikacji białek.
- Dla ekstraktów i frakcji ze świeżych owoców tarniny pozytywnie zweryfikowano hipotezę dotyczącą ochronnego działania przed oksydacyjnym uszkodzeniem biomolekuł ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego ONOO<sup>-</sup>, który jest najbardziej toksyczną formą ROS przyczyniającą się do przewlekłych dysfunkcji sercowo-naczyniowych.

Otrzymane wyniki są bardzo interesujące i wartościowe. Autorka po analizie aktywności ekstraktów i frakcji dokonała korelacji, zestawiając wyniki badań biologicznych z analizami ilościowymi (całkowita zawartość), wykazując wyraźny związek pomiędzy aktywnością a zawartością polifenoli. Badania biologiczne przeprowadzono także na kilku czystych związkach jak np. kwas chlorogenowy, kwercetyna, procyjanidyna B2, glukozyd cyjanidyny czy wspomniany wcześniej 5-hydroxymetylofurfural. Czy Doktorantka podjęła próbę izolacji innych dominujących związków jak np. kwas neochlorogenowy, celem dołączenia ich do panelu badań biologicznych? Czy Doktorantka rozważała przebadanie także tych będących w mniejszych ilościach w ekstraktach. Czy rozważana była analiza korelacyjna pomiędzy aktywnością a składem i zawartością poszczególnych związków?

W ramach realizacji założeń swojej pracy doktorskiej mgr Anna Magiera wykazała się nadzwyczaj dużą pracowitością i skrupulatnością. Wykonała bardzo dużą ilość doświadczeń stosując zróżnicowane techniki i metody badawcze, co sprawia, iż jest młodym naukowcem

o bardzo rozwiniętym i ugruntowanym warsztacie naukowym. Badania zaplanowane i przeprowadzone są bardzo dojrzałe i konsekwentnie. Otrzymane wyniki dyskutowane są w niezwykle dojrzały sposób, a wyciągnięte wnioski są bardzo wartościowe i istotne z punktu widzenia rozwoju nowoczesnego leku roślinnego. O dojrzałości naukowej świadczą też przedstawione plany na przyszłość, gdzie Doktorantka wyraźnie potrafi ocenić potencjał i wartość uzyskanych wyników, przyjrzeć się im krytycznie i świadomie zaplanować kolejne, niezbędne etapy badań. Potwierdzenie tego znajdujemy również studiując dorobek naukowy mgr Magiery, liczne staże naukowe, szereg szkoleń podnoszących kwalifikacje zawodowe, nagrody naukowe oraz współautorstwo 20 (!) artykułów naukowych.

### **Wnioski końcowe**

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. 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 Magiery 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