



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Gdańsk, 15.02.2023 r.

OCENA

pracy doktorskiej mgr Anny Magiery

**pt: „Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych
owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza”**

**przedstawiona Radzie Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Składam podziękowania Wysokiej Radzie Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Anny Magiery zatytułowanej „Profil polifenolowy i aktywność biologiczna ekstraktów ze świeżych i suszonych owoców *Prunus spinosa* L. – analiza porównawcza” przygotowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (UMED) we współpracy z Katedrą Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii (obecnie Zakład Biologii i Farmakognozji) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM), pod kierunkiem promotor dr hab. n. farm. Moniki Olszewskiej, prof. UM (UMED) i dr hab. n. farm. Moniki Czerwińskiej (WUM) jako promotora pomocniczego.

W ostatnich dwóch dekadach obserwuje się ogromny rozwój badań nad owocami, głównie jagodowymi (w szerokim tego słowa znaczeniu), pochodzącymi z różnych gatunków roślin, nie tylko tych leczniczych, mających historię zastosowań w medycynie ludowej (np. owoce maliny czerwonej, owoce żurawiny), ale również tych, które są popularnymi roślinnymi

produktami żywnościowymi (np. inne owoce z rodzaju *Prunus* – wiśnie, czereśnie, z rodzaju *Fragaria* – truskawka, poziomka). Owoce malin, aronii, bzu czarnego, jeżyny i in. w wyniku prowadzonych badań fitochemicznych i badań biologicznych, w różnych modelach *in vitro*, *in vivo* oraz badań klinicznych są obecnie postrzegane nie tylko jako wartościowe składniki codziennej diety, ale również wskazuje się na ich znaczenie zarówno w profilaktyce jak i terapii wspomagającej niektórych schorzeń o charakterze zapalnym np. stanów zapalnych GDO wywołanych infekcją wirusową, chorób reumatycznych oraz chorób cywilizacyjnych - chorób układu krążenia, zespołu metabolicznego, w tym cukrzycy, a także niektórych chorób nowotworowych, np. nowotworów jelita grubego (m.in. owoce maliny czerwonej i czarnej). Udowodniono, w wielu pracach naukowych, że potencjał prozdrowotny owoców jest związany z obecnością szeregu grup związków chemicznych, biosyntezyowanych przez rośliny macierzyste, tworzących zespoły głównie polifenoli (antocyjanów, flawonoidów, proantocyjanidyn) i prostych fenoli (kwasów fenolowych i ich pochodnych), i wielu innych im towarzyszących (lignany, karotenoidy, irydoidy, elagotaniny) w zależności od rodzaju i pochodzenia owocu, a znanych z właściwości antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych. Potencjalne zastosowanie surowca roślinnego jako produktu o znaczeniu terapeutycznym jest związane z rozpoznaniem jego składu chemicznego, zarówno w aspekcie jakościowym jak i ilościowym w powiązaniu z wywieranym powtarzalnym efektem farmakologicznym i klinicznym o znanym mechanizmie, zarówno na poziomie biochemicznym jak i molekularnym.

Na tym tle, podjęte przez Doktorantkę badania fitochemiczne z oceną aktywności biologicznej – przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej, przeciwcukrzycowej owoców śliwy tarniny, zarówno świeżych jak wysuszonych są interesujące o wysokim stopniu nowości naukowej, szczególnie w odniesieniu do faktu, że literatura naukowa dotycząca tego surowca jest fragmentaryczna. Nowoczesny produkt ziołowy, charakteryzuje się powtarzalnym efektem terapeutycznym jako konsekwencją przeprowadzanego procesu standaryzacji surowca czy przetworu a jego skuteczność jest związana ze zjawiskiem synergizmu i poliwalencji. Z tego punktu widzenia mają zasadnicze znaczenie badania szerokiego spektrum związków obecnych w surowcach roślinnych, o często różnych zakresach aktywności biologicznej, poprzez które włączają się one w finalny efekt terapeutyczny surowca/produktu roślinnego. W obszar tych badań włącza się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Magiery.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl 3 prac eksperymentalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach o łącznej wartości współczynnika wpływu IF₂₀₂₁ – 15.069, i punktacji MEiN₂₀₂₁ 380, mianowicie

- **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, doi: 10.3390/molecules27051691. **Publikacja 1, IF = 4.927, MEiN = 140**
- **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, doi: 10.3390/molecules27103302. **Publikacja 2, IF = 4.927, MEiN = 140**
- **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, doi: 10.3390/ph15101300. **Publikacja 3, IF= 5.215, MEiN = 100**

Powyżej wymienione prace zostały opublikowane w czasopismach należących do I kwartyła w dziedzinie nauk farmaceutycznych (publikacje 1,2 -*Molecules* i publikacja 3 -*Pharmaceuticals*). Jest to potwierdzeniem wysokiej wartości naukowej prac objętych cyklem. Wymienione wieloautorskie prace, stanowią tematycznie spójny zbiór artykułów, w których pierwszym autorem jest Doktorantka, a udziały określające indywidualny wkład poszczególnych współautorów w ich powstanie zostały przedstawione w załączonych w rozprawie doktorskiej oświadczeniach. Udział Doktorantki w publikacji 1 jest oceniony na poziomie 50%, w publikacji 2 - 65% oraz publikacji 3 65%. Ważnym podkreślenia jest fakt, że we wszystkich pracach Doktorantka współtworzyła koncepcję i plan pracy. Wyniki badań zawarte w niniejszej dysertacji były również przedstawiane w formie 4 komunikatów

zjazdowych (3 posterów i 1 referatu ustnego) na krajowych i międzynarodowych sympozjach naukowych.

Doktorantka badaniami, objęła zarówno świeże jak i wysuszone owoce śliwy tarniny, wskazując na różnice w profilach metabolicznych oraz sile aktywności biologicznej otrzymanych z nich ekstraktów metanolowo-wodnych oraz frakcji – eteru dietylowego, octanu etylu, n-butanolu, pozostałości wodnej. W sposób jednoznaczny wykazała, że proces suszenia owoców w temp. do 60°C prowadzi do degradacji szeregu związków aktywnych biologicznie. Nasuwa się pytanie, czy owoce poddane liofilizacji zachowałyby w większym stopniu profil owoców świeżych, ponieważ ta metoda suszenia staje się obecnie wiodącą w odniesieniu do owoców, i w przypadku kontynuacji tematu, a tak zapowiada Doktorantka w zakończeniu dysertacji, ten wątek należałoby wziąć pod uwagę.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania fitochemiczne są wstępem do badań aktywności biologicznej w modelach komórkowych i chemicznych *in vitro* – przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej i potencjalnie przeciwcukrzycowej.

Doktorantka do badań fitochemicznych wykorzystwała powszechnie stosowane narzędzia - w badaniach profili metabolicznych w kontekście jakościowym system sprzężenia wysokosprawnej chromatografii ciekowej z selektywnymi detektorami, mianowicie: detektorem stanowiącym matrycę diodową, oraz spektrometr mas z jonizacją ESI typu pułapki jonowej UHPLC-PDA-ESI-MS³ natomiast w analizach ilościowych system HPLC-PDA. Ich użycie umożliwiło rozpoznanie szeregu związków aktywnych biologicznie – 57 i 45 odpowiednio jako składników badanych matryc roślinnych ze świeżego i wysuszonego surowca, w oparciu o porównanie parametrów chromatograficznych takich jak wartość t_R , wartości m/z [M-H]⁻ jonów pseudomolekularnych, jonów fragmentacyjnych, ze związkami wzorcowymi, pochodzącymi ze źródeł komercyjnych (15 z grupy flawonoidów, kwasów fenolowych, antocyjanów lub 16 uwzględniając amygdalinę) jak i wyizolowanych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji UM w Łodzi, z liści i kwiatów *P. spinosa* (5 związków flawonoidowych). Ponadto, poprzez analizę otrzymanych wartości parametrów chromatograficznych, z wykorzystaniem dostępnych danych literaturowych, zidentyfikowała wstępnie podając struktury przypuszczalne, również pozostałe związki chemiczne z wymienionych grup w badanych ekstraktach i frakcjach. 35 składników wykryto po raz pierwszy w badanym materiale roślinnym; Z tego obszaru kieruję pytanie do Doktorantki, czy w oparciu tylko o otrzymane

widma UV związków flawonoidowych w systemach HPLC-UV (DAD) możemy rozróżnić pochodne kwercetyny od kemferolu?. Proszę o odniesienie do konkretnych pozycji literaturowych z tego obszaru wiedzy. Nieczytelny wydaje się opis warunków analizy ilościowej - analiza HPLC-DAD, była przeprowadzona wg procedury opracowanej wcześniej dla kwiatów tarniny (Marchelak i wsp., 2020) i zrewalidowanej w zakresie składników typowych dla owoców, a parametry walidacyjne opisano jedynie dla 7 związków wzorcowych spośród ocenianych 19.

Przeprowadzenie badań chromatograficznych oraz interpretacja otrzymanych danych wymagała od Doktorantki pogłębionej wiedzy z zakresu spektroskopii UV i spektrometrii mas metabolitów wtórnych należących do różnych klas naturalnych związków chemicznych - flawonoidów, kwasów fenolowych pochodnych kwasu kawowego, pochodnych flawan-3-olu, antocyjanów i innych np. amygdaliny. Obecność tego związku wykazała jedynie w surowcu wysuszonym – dlaczego ?. Czy są znane jakiegokolwiek dane wyjaśniające tradycyjny zbiór owoców po pierwszych przymrozkach a związane z występowaniem glikozydów cyjanogennych ?

Doktorantka określiła z użyciem metod chromatograficznych i spektrofotometrycznych zawartość poszczególnych grup związków polifenolowych, stwierdzając że głównymi składnikami wyjściowego ekstraktu metanolowo-wodnego otrzymanego ze świeżego materiału roślinnego były garbniki (skondensowane procyjanidyny), a następnie kwasy fenolowe, antocyjany i flawonoidy. Z kolei w ekstrakcie metanolowo-wodnym uzyskanym z wysuszonych owoców głównymi związkami były kwasy fenolowe i garbniki, następnie flawonoidy, natomiast antocyjany były obecne poniżej granic wykrywalności. Pewne wątpliwości dotyczą analizy związków antocyjanowych, ponieważ optymalnym ekstrahentem dla tych polifenoli, szczególnie w zakresie oceny ich zawartości w surowcu, jest zakwaszony alkohol, a Doktorantka analizowała wyciągi metanolowo-wodne. W odniesieniu do antocyjanów nasuwa się pytanie jakie znaczenie dla aktywności przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej mogą mieć te związki, szczególnie pochodne cyjanidyny w owocach śliwy tarniny? W badaniach Doktorantka wykazała, że ekstrakt i frakcja ze świeżego owocu bogata w antocyjany i procyjanidyny zapobiegała powstawaniu AGEs, a ich skuteczność była porównywalna lub wyższa niż referencyjnej aminoguanidyny (substancji o właściwościach przeciwlitycznych). Doktorantka w tekście pracy często używa terminu „analit” w

odniesieniu do frakcji czy ekstraktu, co zasadniczo jest błędne, ponieważ termin „analit” odnosi się do składnika próbki analitycznej – ekstraktu, roztworu itd.

Z innych ważnych dokonań Doktorantki należy wymienić izolację (preparatywna HPLC) i określenie struktur dwóch (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HMQC) z trzech rozpoznanych MPRs jako produktów procesu suszenia owoców tarniny powstających w wyniku reakcji Maillarda, mianowicie 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) i (5-hydroksymetylofur-2-ylo)-metoksymetanolu, obok 3-hydroksy-2,3-dihydromaltolu. Oceniała aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną HMF w zastosowanych modelach *in vitro*, nie wykazując działania przeciwcukrzycowego. Określiła zawartość MPRs w badanych owocach tarniny, uznając ją za dopuszczalną i bezpieczną.

Podstawową wartością recenzowanej pracy doktorskiej są badania aktywności biologicznej rozpoznanych w zakresie profili metabolicznych ekstraktów i otrzymanych z nich frakcji, oraz wybranych związków – jako przedstawicieli poszczególnych grup, w oparciu o przyjęte modele komórkowe i bezkomórkowe, co umożliwiło wnioskowanie o udziale poszczególnych grup w aktywności przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej oraz przeciwcukrzycowej badanego surowca. Określenie zakresu tych prac przez Doktorantkę było związane ze stosowaniem surowca – owocu tarniny w medycynie tradycyjnej.

Badania biologiczne objęły

- ocenę komórkowej aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej w modelu ludzkich neutrofilii i jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs), w tym neutrofilii stymulowanych *f*-MLP (*N*-formylo-metionylo-leucylo-fenylo-alaniną)(wzrost ROS), neutrofilii stymulowanych *f*-MLP+cytochalazyną B (wzrost uwalniania prozapalnego enzymu elastazy (ELA-2), neutrofilii stymulowanych LPS (wzrost wydzielania IL-8 i TNF- α), PBMCs stymulowanych LPS (sekrecja IL-6, TNF- α i IL-10)
- ocenę aktywności przeciwcukrzycowej w testach inhibicji enzymów glikolitycznych (α -glukozydazy i α -amylazy) oraz w teście zahamowania tworzenia zaawansowanych produktów glikacji (AGEs).
- weryfikację aktywności antyoksydacyjnej wobec najważniejszych niskocząsteczkowych ROS odpowiadających *in vivo* za generowanie stresu oksydacyjnego i jego konsekwencji funkcjonalnych, w tym m.in. powikłań naczyniowych cukrzycy, tj. $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^{\bullet} , HClO i HO^{\bullet} –

- weryfikację efektu protekcyjnego w stosunku do składników ludzkiego osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego ONOO–
Ponadto Doktorantka oceniła cytometrycznie bezpieczeństwo komórkowe (potencjalną cytotoksyczność) badanych ekstraktów i frakcji wobec neutrofilii i PBMCs.

Do najważniejszych wyników otrzymanych przez Doktorantkę w tym zakresie i zawartych w publikacjach z cyklu należy zaliczyć:

- ujawnienie wysokiego potencjału przeciwzapalnego i antyoksydacyjnego (w szczególności hamowanie sekrecji ROS, ELA-2 i TNF- α oraz nasilanie wydzielania IL-10) badanych ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych oraz modelowych związków czynnych w modelach ludzkich neutrofilii oraz PBMCs *ex vivo*;
- wykazanie wysokiej zdolności ekstraktów/frakcji oraz ich głównych składników do bezpośredniej inhibicji enzymów glikolitycznych (w szczególności α -glukozydazy) w modelach chemicznych *in vitro*
- wykazanie *in vitro*, zdolności do efektywnego zmiatania szerokiego spektrum oksydantów powstających *in vivo*, tj. O₂•–, H₂O₂, NO•, HClO i HO• ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych oraz ich modelowych związków czynnych
- wykazanie wysokiej zdolności powyżej wymienionych ekstraktów/frakcji oraz modelowych związków czynnych do hamowania nieenzymatycznej glikacji białek w modelu chemicznym *in vitro*;
- wykazanie ochronnego wpływu ekstraktów/frakcji z owoców świeżych oraz ich modelowych związków czynnych na białkowe i lipidowe składniki ludzkiego osocza oraz ich zdolności do zwiększania nieenzymatycznej pojemności antyoksydacyjnej osocza w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego ONOO–;
- wykazanie braku cytotoksyczności ekstraktów/frakcji z owoców świeżych i suszonych i ich markerów aktywnych wobec ludzkich neutrofilii i PBMCs .

Wykonanie badań biologicznych przez Doktorantkę wymagało z jej strony bardzo dużego zaangażowania oraz wiedzy, którą zdobyła podczas odbytych kursów i szkoleń oraz naukowych staży.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana z bardzo dużą starannością i nie odnotowałam w niej od strony redakcyjnej znaczących błędów. Zawarte na około 7 stronach wprowadzenie teoretyczne do rozprawy, nakreślające tło podjętej tematyki badawczej i formujące cel pracy obejmuje opis znaczenia surowców roślinnych i obecnych w nich związków czynnych, szczególnie antyoksydantów w profilaktyce i terapii wspomagającej leczenie chorób cywilizacyjnych na tle aktualnego stanu wiedzy o składzie chemicznym i badaniach aktywności owoców śliwy tarniny z uwzględnieniem jej zastosowań w medycynie ludowej. Zawiera ono również opis botaniczny gatunku i jego zakresu występowania, stanowiąc merytoryczne odniesienie do sformułowanego celu pracy. W kolejnej części, Doktorantka przedstawiła w punktach i w formie przejrzystego schematu realizację przyjętego planu badawczego, co znacznie ułatwiło lekturę pracy i przygotowanie recenzji. Na dalszych 7 stronach Doktorantka w sposób przejrzysty, scharakteryzowała w części doświadczalnej materiał roślinny i przygotowanie ekstraktów/frakcji do badań, następnie metodykę badań z uwzględnieniem opisu analizy profili chemicznych, analizy *in vitro* aktywności biologicznej w modelach komórkowych i bezkomórkowych, ocenę statystyczną wyników. Na 9 stronach scharakteryzowała przebieg realizacji celów badawczych – poprzez przedstawienie wyników i ich dyskusję, podsumowanie wyników na podstawie których sformułowała wnioski końcowe.

W zakończeniu mojej recenzji pragnę mocno podkreślić, że Doktorantka posiada bardzo duży dorobek publikacyjny, w większości prezentowany na łamach zagranicznych czasopism naukowych w latach 2019-2022, dowodzi to jej głębokiego zaangażowania w naukę, i realizację tematów badawczych prowadzonych pod kierunkiem Kierownika Katedry i Zakładu Farmakognozji UM w Łodzi, dr hab. Moniki Olszewskiej, prof. UM. Jest autorką i współautorką 11 prac eksperymentalnych o łącznej wartości IF 46,337, z wykluczeniem 3 prac stanowiących jej pracę doktorską (z włączeniem wartość IF wynosi 61,406), w tym jest pierwszym autorem 1 publikacji dotyczącej badań kwasów triterpenowych o aktywności przeciwzapalnej w 3 surowcach roślinnych pochodzących z innego gatunku z rodzaju *Prunus*, mianowicie *P. padus* oraz drugim współautorem publikacji o optymalizacji warunków rozdzielania izomerycznych diglikozydów kemferolu z *P. spinosa*. Można zatem uznać, że mgr Anna Magiera posiada szeroką wiedzę farmakognostyczną w odniesieniu do przedstawicielei

rodzaju *Prunus*, i jest specjalistką w tym obszarze. Ponadto jest autorką (4) i współautorką (2) 6 prac przeglądowych, w większości opublikowanych na łamach Farmacji Polskiej, ale bardzo zróżnicowanych tematycznie i dotyczących 5 gatunków roślin leczniczych, prac o dużym potencjale poznawczym i znaczeniu dla praktyki zawodowej (rośliny lecznicze głównie egzotyczne *Terminalia chebula*, *T. arjuna*, *Marrubium vulgare*, *Vitex agnus-castus*, rodzaj *Grindelia*). Wyniki prac eksperymentalnych oraz opracowań przeglądowych (2 referaty ustne), w których realizacji uczestniczyła były prezentowane na 15 konferencjach krajowych i zagranicznych. Jej aktywność naukowa i zaangażowanie zostało docenione i wyróżnione przez Rektora UM w Łodzi 5 zespołowymi nagrodami naukowymi (I, II i III stopnia) w latach 2021, 2020, 2018. Ponadto trzykrotnie w latach 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021 została wyróżniona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przyznaniem stypendium dla najlepszego doktoranta. W latach 2018-2019 odbyła szereg staży naukowych krajowych (5), głównie w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii (lata 2018-2020) oraz Zakładzie Biologii i Farmakognozji (obecnie) (2022 r.) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, oraz wiele certyfikowanych kursów, szkoleń. Zakres tematyczny odbytych staży, szkoleń i kursów umożliwił Doktorantce bardzo dobre przygotowanie do prowadzenia zaplanowanych do realizacji w ramach pracy doktorskiej eksperymentów i doświadczeń.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Magiery stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi istotne elementy nowości do stanu wiedzy o kompozycji związków czynnych w owocach tarniny i ich potencjale biologicznym, szczególnie w kontekście potencjalnych zastosowań jako przeciwzapalnych m.in w terapii schorzeń zapalnych jelit oraz cukrzycy. Kandydatka wykazała się pogłębioną specjalistyczną wiedzą teoretyczną oraz praktyczną w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, włączając farmakognozę i lek pochodzenia roślinnego.

Rozprawa doktorska mgr Anny Magiery spełnia wymagania Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20.07.2018r. (dział V, rozdział 1 i 2, art. 186,187 pkt.1-4). Na tej podstawie wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Anny Magiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie będąc przekonaną o wysokiej wartości naukowej przedstawionej dysertacji, jej wkładu w rozwój wiedzy farmakognostycznej, w tym farmakognozji w ujęciu

klinicznym, oraz uwzględniając całokształt dorobku naukowego Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Magiery.

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL
Gdański Uniwersytet Medyczny


Kierownik
Katedra i Zakład Farmakognozji
i Farmacji Leczniczych
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska