



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

Lublin, 12.02.2024 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień, z tytułowaniem „**Wielofunkcyjne układy dostarczania roślinnych związków aktywnych o działaniu neuroprotekcynym**”.

Praca wykonana została w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Biomateriałów Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pod merytoryczną opieką prof. dr hab. n. farm. Judyty Cieleckiej-Piontek.

Oceniana praca doktorska jest cyklem siedmiu artykułów spójnych tematycznie, opublikowanych w latach 2021-2023 w recenzowanych czasopismach o łącznej punktacji IF=42,208, co daje 940 pkt MEiN. Jedna z nich to praca przeglądowa, a sześć pozostałych to prace oryginalne. Są to następujące pozycje:

1. **Stasiłowicz A**, Tomala A, Podolak I, Cielecka-Piontek J. *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):778. (IF=6,208; MNiSW=140)
2. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Gołębiowski M, Płazińska A, Płaziński W, Miklaszewski A, Żarowski M, Adamska-Jernaś Z, Cielecka-Piontek J. The Systems of naringenin with solubilizers expand its capability to prevent neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):755. (IF=5,6; MNiSW=140)
3. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Rosiak N, Płazińska A, Płaziński W, Miklaszewski A, Tykarska E, Cielecka-Piontek J. Cyclodextrin derivatives as promising solubilizers to enhance the biological activity of rosmarinic acid. *Pharmaceutics.* 2022;14(10):2098. (IF=5,6; MNiSW=140)
4. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Rosiak N, Miklaszewski A, Cielecka-Piontek J. Screening of the Anti-neurodegenerative activity of caffeic acid after introduction into inorganic metal delivery systems to increase its solubility as the result of a mechanosynthetic approach. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9218. (IF=5,4; MNiSW=100)
5. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Cielecka-Piontek J. Hop flower supercritical carbon dioxide extracts coupled with carriers with solubilizing properties—antioxidant

activity and neuroprotective potential. *Antioxidants*. 2023;12(9):1722. (IF=7,0; MNiSW=140)

6. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Sip S, Szulc P, Walkowiak J, Cielecka-Piontek J. The antioxidant and neuroprotective potential of leaves and inflorescences extracts of selected hemp varieties obtained with scCO₂. *Antioxidants*. 2023;12(10):1827. (IF=7,0; MNiSW=140)

7. **Stasiłowicz-Krzemień A**, Szulc P, Cielecka-Piontek J. Co-dispersion delivery systems with solubilizing carriers improving the solubility and permeability of cannabinoids (cannabidiol, cannabidiolic acid, and cannabichromene) from *Cannabis sativa* (Henola variety) inflorescences. *Pharmaceutics*. 2023;15(9):2280. (IF=5,4; MNiSW=140).

Szczególną uwagę należy zwrócić na zdolność pozyskiwania finansowania na badania ze źródeł zewnętrznych. W tym wypadku badania przedstawione w ocenianym cyklu finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki, gdyż Doktorantka pozyskała grant Preludium nr UMO-2021/41/N/NZ7/01125 oraz była wykonawcą w projekcie OPUS UMO-2020/37/B/NZ7/03975. Potwierdza to Jej wysoki poziom naukowy oraz ważność i znaczenie poruszanego tematu.

Prace są wieloautorskie. Doktorantka dołączyła oświadczenia współautorów o ich roli oraz wkładzie merytorycznym. We wszystkich publikacjach mgr farm. Anna Stasiłowicz-Krzemień jest autorem korespondującym, zaś z oświadczeń można wywnioskować, iż jej rola była wiodąca. Jest współautorem koncepcji i planu pracy, zaangażowana była w każdy z etapów eksperymentów, samodzielnie wykonała większość badań oraz brała udział w przygotowywaniu manuskryptów.

Rozprawa, oprócz kopii publikacji oraz oświadczenia współautorów, zawiera informacje o dotychczasowej aktywności naukowej Doktorantki, prezentację przedmiotu badań wraz z odniesieniami literaturowymi, streszczenie w języku polskim i angielskim.

W krótkim wstępie, który jest wprowadzeniem do prac stanowiących podstawę postępowania, Autorka porusza rosnący problem chorób neurodegeneracyjnych, podkreślając iż obecnie nie ma leczenia, które byłoby w stanie zahamować ich rozwój. Stąd ważne jest skupienie uwagi na prewencji. Tutaj bardzo dużą rolę odgrywa suplementacja związkami pochodzenia naturalnego, ze szczególnym uwzględnieniem polifenoli. Sporym ograniczeniem jest jednak słaba rozpuszczalność tych substancji. Dlatego też w swojej pracy mgr Anna Stasiłowicz-Krzemień koncentruje się na poprawie rozpuszczalności oraz przenikalności związków pochodzenia roślinnego, a w szczególności polifenoli oraz poprawie ich aktywności neuroprotekcynowej. Jako substancje modelowe Autorka wybrała flawonoid naryngeninę, kwasy fenolowe: rozmarynowy i kawowy oraz ekstrakty zawierające kannabinoidy (kannabidiol, kwas kannabidiolowy, kannabichromen) czy prenylowane flawonoidy (ksantohumol) oraz β -kwasy (lupulon).

W przypadku naryngeniny i kwasu rozmarynowego zastosowanie nośników w postaci cyklodekstryn oraz wprowadzenia wodorowęglanu sodu jako miejscowego modyfikatora pH do układu (dla naryngeniny), skutkowało wyraźną poprawą rozpuszczalności, zwiększeniem przenikalności i lepszym działaniem neuroprotekcijnym (co wykazano w badaniach *in vitro* antyoksydacyjnych czy hamującym aktywności cholinesteraz). W przypadku kwasu kawowego jako czynnik warunkujący poprawę rozpuszczalności i silniejsze działanie neuroprotekcyjne wskazano układ dostarczania angażujący sole nieorganiczne. Poprawę przenikalności uzyskano także, kiedy ekstrakt z szyszek chmielu powiązано z odpowiednio dobranym nośnikiem. Jako markery do oznaczeń wybrano ksantohumol oraz lupulon. Autorka dokładnie opisuje i dyskutuje czynniki determinujące opisane zmiany, co świadczy o Jej szerokiej wiedzy i wszechstronnym podejściu do tematu.

Doktorantka postanowiła także zająć się określeniem aktywności neuroprotekcyjnej ekstraktów wybranych odmian konopi otrzymywanych w wyniku zastosowania scCO₂. Doskonałym wprowadzeniem do badań jest praca przeglądowa, gdzie mgr Stasiłowicz-Krzemień dokonuje przeglądu badań klinicznych dla zarejestrowanych preparatów oraz charakteryzuje potencjalne zastosowania konopi. Tak dokładna analiza dostępnej literatury stworzyła możliwość zaplanowania dalszych prac eksperymentalnych. W wyniku prowadzonych badań udało się wytypować odmianę, której ekstrakt wykazywał najsilniejsze działanie oraz skorelować to z zawartością kanabinoidów. Dla najaktywniej działającego ekstraktu przygotowane także zostały układy dostarczania mające na celu poprawę rozpuszczalności poszczególnych składników.

Całość pracy przygotowana jest bardzo starannie. Niewątpliwie największym osiągnięciem recenzowanego cyklu jest wykazanie możliwości dla poprawy biodostępności substancji aktywnych pochodzenia naturalnego poprzez utworzenie układów inkluzyjnych, zmianę struktury związku czy jego formy krystalicznej. Opracowane przez Doktorantkę układy mogą zostać zastosowane w praktyce na większą skalę.

Prace składające się na oceniany cykl są opublikowane, poddane więc były rzetelnej analizie merytorycznej dokonanej przez zespół międzynarodowych ekspertów. W tym miejscu jednak chciałabym zadać kilka pytań, jakie nasunęły się po lekturze ocenianej rozprawy doktorskiej, a mające na celu poszerzenie dyskusji w czasie publicznej obrony:

- Publikacja 5 – Autorka wykonała ekstrakcje nadkrytyczną, a następnie materiał poekstrakcyjny poddała dwukrotnej ekstrakcji 70% etanolem z zastosowaniem łaźni ultradźwiękowej. Dlaczego Autorka nie zdecydowała się na kontynuowanie ekstrakcji nadkrytycznej z użyciem etanolu jako modyfikatora?
- W rozdziale „Perspektywy dalszych badań” Doktorantka podkreśla, iż ostatnim etapem weryfikującym skuteczność zaproponowanych rozwiązań powinny być badania dostępności biologicznej *in vivo* na modelach zwierzęcych, z czym absolutnie się zgadzam. Jak miałyby one wyglądać i czy ma Pani już zaplanowane takie badania?

- Interesujące są badania wskazujące na wysoką aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z konopi. Czy Doktorantka wie, jaka może być zawartość flawonoidów czy kwasów fenolowych, które mogą mieć wpływ na to działanie, a o czym wspomina Pani w dyskusji prowadzonej w publikacji? Czy oznaczona zawartość CBD, którego zawartość skorelowana została z działaniem przeciwutleniającym, jest wystarczająca aby aktywność ta utrzymała się w organizmie człowieka?
- Będąc w temacie kanabinoidów chciałem zapytać Doktorantkę, czy nie widzi niebezpieczeństwa, iż poprawa rozpuszczalności lipofilowych kanabinoidów może pociągnąć za sobą istotne działania niepożądane, jak widoczne jest to obecnie w przypadku kurkuminy (działanie hepatotoksyczne).
- Czy uważa Pani, iż hamowanie cholinesteraz przez kanabinoidy widoczne w badaniach *in vivo* naprawdę może przełożyć się na efekty obserwowane w organizmie człowieka, czy jednak ewentualne działanie neuroprotektoryjne będzie związane z działaniem na receptory układu endokanabinoidowego?

Recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Zawiera ona rozwiązania bardzo interesujących oraz ważnych problemów naukowych, wnosi do nauki znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich. Zakres podjętych w dysertacji prac badawczych jest szeroki. Umiejętności, jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona przygotowana do podejmowania dalszych, samodzielnych wyzwań badawczych. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na sylwetkę Pani mgr Stasiłowicz-Krzemień. Oprócz prac jakie znalazły się w ocenianym cyklu, jest ona także współautorem 15 innych publikacji. Pełni rolę kierownika wspomnianego projektu Preludium oraz była/jest wykonawcą w 5 innych projektach jak np. Tango i Erostars-2 (NCBiR), Sonata (NCN), Projekt aplikacyjny POIR. Trzykrotnie prezentowała wyniki swoich prac na konferencjach międzynarodowych w formie krótkich wykładów oraz jest współautorem ponad 20 doniesień w formie posterów. Mrg Anna Stasiłowicz-Krzemień ciągle kształci się i podnosi swoje kompetencje, a za swoją pracę była wielokrotnie nagradzana. W tym miejscu wspomnieć należy Stypendium naukowe Marszałka Województwa Wielkopolskiego, nagrody za wystąpienia ustne na konferencjach międzynarodowych, Nagrodę zespołową Rektora UM, zespołową dla Kół Naukowych. Cały ten imponujący dorobek naukowy to efekt jedynie 4 lat pracy, gdyż Doktorantka od 02.2020 r. jest zatrudniona na stanowisku asystenta KiZ Farmakognozji i Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wnioski końcowe

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr farm. Anny Stasiłowicz-Krzemień spełnia wymogi formalne i merytoryczne określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Otrzymane wyniki mają charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny. Są

niezwykle wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwy element nowatorstwa i wnoszą wkład w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej.

Tym samym wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów w postępowaniu i jednocześnie o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników i ich znaczenie aplikacyjne, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Krzyszyna Skalicka-
KIEROWNIK

Zakładu Chemii Produktów
Pochodzenia Naturalnego
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wojciech

prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak