

Bydgoszcz, 12 marca 2021 r.

---

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr farm. Katarzyny Antoniak**

### **Badania fitochemiczne i ocena właściwości biologicznych wybranych surowców roślinnych stosowanych w leczeniu łuszczycy**

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji

Kolegium Nauk Farmaceutycznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

pod kierunkiem **prof. dr hab. n. farm. Wiesławy Byłki**

i **dr n. farm. Marleny Dudek-Makuch** jako promotorki pomocniczej

Łuszczycyca jest chorobą skóry znaną od tysięcy lat, o której wzmianki można znaleźć już w słynnym papirusie medycznym nazwanym Papirusem Ebersa. Leczeniem łuszczycy zajmował się również Hipokrates. Ten prekursor współczesnej medycyny nie ukrywał trudności, jakie wiążą się z jego zawodem i ujął je w swym słynnym aforyzmie – „...życie krótkie, sztuka długa, sposobność przemijająca, doświadczenie złudne, wyrokowanie trudne...”. W ujęciu filozoficznym, można powiedzieć, że spostrzeżenia greckiego lekarza zawarte w przywołanej tu złotej myśli są cechami, które można przypisać łuszczycy, chorobie trudnej do wyleczenia nawet przez najbardziej doświadczonych lekarzy. Ojciec medycyny w leczeniu łuszczycy stosował rośliny i produkty pochodzenia roślinnego, takie jak dziegieć. Z całą pewnością można powiedzieć, że pomocy szukał na bezkresnych łąkach greckich hort, które były i są jednym ze źródeł cennego roślinnego surowca leczniczego.

Sugeruje się, że w Polsce na łuszczycę choruje ok. 1 mln ludzi, w Stanach Zjednoczonych ok. 7,4 mln. Wysoka zachorowalność stanowi wyzwanie dla naukowców do poszukiwania nowych, skutecznych struktur chemicznych o potencjale przeciwłuszczycowym, działających na różnych poziomach, m.in. molekularnym, biochemicznym czy genetycznym. Jednym ze źródeł takich związków jest natura. Surowce pochodzenia roślinnego, wyizolowane związki i/lub ich pochodne są od lat stosowane w prewencji i leczeniu chorób skóry. Z powodzeniem do realizacji takich celów używa się pochodnych kumaryn (5- czy 8-metoksypsoralen), kwasu salicylowego czy dziegciów.

Badania Doktorantki są kontynuacją działalności naukowej od lat prowadzonej w Katedrze Farmakognozji, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczącej poszukiwania struktur chemicznych pochodzenia roślinnego o wielokierunkowej aktywności z uwzględnieniem zastosowania w leczeniu chorób skóry. W świetle przedstawionych prac naukowych zasadne jest podjęcie przez Doktorantkę badań nad oceną *in vitro* przeciwłuszczycowego działania etanolowych ekstraktów z ziela przytulii czepnej, przytulii właściwej, uczezu trójlistkowego, korzenia szczawiu lancetowatego i lukrecji gładkiej. Źródła etnofarmakologiczne donoszą o stosowaniu przytulii czepnej, przytulii właściwej, uczezu trójlistkowego i lukrecji gładkiej w leczeniu łuszczycy. Z tego względu wybór tych gatunków jako obiektu badań uważam za bardzo ważny i uzasadniony. Surowce te od dawna były stosowane w polskiej tradycyjnej medycynie ludowej. Obecnie istnieje potrzeba naukowego potwierdzenia ich przeciwłuszczycowego wpływu na zmiany skórne ze wskazaniem mechanizmów działania.

Podstawę ocenianej rozprawy stanowi monografia o układzie edytorskim charakterystycznym dla tego typu prac, w której wydzielono: Część teoretyczną, Założenia i cel pracy, Część doświadczalną, Wyniki, Omówienie i dyskusja wyników, Podsumowanie wyników i wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Spis tabel i rycin, a także Piśmiennictwo. Rozprawa liczy 227 stron, zawiera 44 ryciny i 39 tabel. Bibliografia liczy 434 pozycje literaturowych.

W części teoretycznej Doktorantka scharakteryzowała patogenezę, objawy i leczenie łuszczycy. Przedstawiła najczęściej stosowane połączenia związków/ekstraktów roślinnych w leczeniu łuszczycy. Następnie szczegółowo opisała analizowane gatunki roślin, takie jak przytulia czepna, przytulia właściwa, uczepek trójlistkowy, lukrecja gładka i gatunki z rodzaju *Rumex* L. Przedstawiła rys historyczny w kontekście ich stosowania w lecznictwie, uwzględniła skład jakościowy i ilościowy wtórnych metabolitów, jak również badania aktywności biologicznej w modelu *in vitro*. Zawarła tu także przegląd literatury przedmiotu na temat badań klinicznych analizowanych surowców. Piśmiennictwo w pracy stanowi 434 pozycje, z których większość powstała w ciągu ostatnich 7 lat.

Cel pracy, czyli uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy ekstrakty z powyższych gatunków mogą stymulować rozwój/przebieg łuszczycy na poziomie komórkowym,

molekularnym i biochemicznym, został sformułowany w sposób czytelny i logiczny. Cel nadrzędny został osiągnięty poprzez realizację celów podrzędnych, uwzględniających analizę fitochemiczną (badanie zawartości polifenoli, chromatografia gazowa składu olejku eterycznego) i biologiczną (określenie działania antyoksydacyjnego, określenie cytotoksycznego wpływu ekstraktów na wybrane linie komórkowe – komórki śródbłonna naczyniowego HUVEC linii EA.hy926, ocena mediatorów angiogenezy i stanu zapalnego – PDGF, HGF, IL-8, TIMP-1 i MMP-9).

Pani mgr farm. Katarzyna Antoniak celem przygotowania do części eksperymentalnej dokonała przeglądu surowców i związków biologicznie czynnych stosowanych w leczeniu chorób skóry, czego efektem była seria publikacji zatytułowanych "Leki roślinne w wybranych schorzeniach skórnych" (2011). Publikacja ta stanowi źródło informacji w zakresie podjętej tematyki, dowodzi dobrego przygotowania Doktorantki do zaplanowanych zadań badawczych, od początkowej fazy planowania doświadczeń i stawiania hipotez, aż do wykonania pracochłonnych etapów badań, m.in. biologicznych badań *in vitro*. To obszerne opracowanie pomogło Doktorantce w wyborze kierunku badań, jak również w wyborze surowców o potencjalnej aktywności przeciwłuszczycowej. Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat metodyczny. Na płaszczyźnie metodologicznej, planując eksperymenty, poruszała się swobodnie w obszarze zaawansowanych technik analitycznych, wykorzystując je w badaniach biologicznych. Stosowała techniki chromatograficzne (chromatografia gazowa, GC) jak również techniki z zakresu hodowli komórkowych i biochemii. Doktorantka jako priorytetowy kierunek badań, stosując szeroki panel testów, wybrała analizę biologiczną, co jest zasadne i prowadzi do otrzymania naukowej podstawy słuszności stosowania wybranych surowców w fitoterapii łuszczycy.

Głównym przedmiotem badań Doktorantki były surowce roślinne, części nadziemne i podziemne, takie jak ziele przytulii czepnej (*Galii aparine herba*), ziele przytulii właściwej (*Galli veri herba*), ziele uczezu trójlistkowego (*Bidentis tripartitae herba*), korzeń szczawiu lancetowatego (*Rumicis hydrolapathi radix*), korzeń lukrecji (*Liquiritiae radix*). W celu uzyskania etanolowych ekstraktów zastosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE).

W pierwszym etapie badań określono zawartość polifenoli. Na podstawie analizy wyników badań zauważono, że części podziemne zawierały najwięcej związków polifenolowych (korzeń kobyłaka i lukrecji). Z kolei surowcem o najwyższej zawartości olejku eterycznego było ziele przytulii czepnej. Warto zwrócić uwagę na wnikliwą charakterystykę składników olejków eterycznych, które mogą warunkować działanie przeciwłuszczycowe surowców.

Istotnym elementem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy ekstrakty stymulują aktywność hialuronidazy, enzymu uczestniczącego w rozwoju wielu stanów patologicznych, np. stanu zapalnego czy zmniejszenia integralności komórek skóry efektem czego jest ułatwienie przenikania mikroorganizmów do jej wnętrza. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że ekstrakty z korzeni najsilniej hamowały aktywność enzymu, uzyskana wartość  $IC_{50}$  wyniosła 0.43 i 0.45 mg/ml dla szczawiu lancetowatego i lukrecji

gładkiej. Można zasugerować, że na inhibicję miały wpływ związki polifenolowe. W dostępnej literaturze można odnaleźć informacje na temat korelacji pomiędzy zawartością polifenoli a inhibicją hialuronidazy.

W kolejnym etapie badań Doktorantka określiła wpływ ekstraktów na żywotność komórek śródbłonna, co pozwoliło na wytypowanie do dalszych badań minimalnego stężenia nietoksycznego. Przytulia czepna i szczaw lancetowaty najsilniej hamowały migrację i inwazyjność komórek śródbłonna, co jest zjawiskiem pożądanym w procesie rozwoju łuszczycy, któremu towarzyszy niekontrolowany rozrost naczyń krwionośnych. Ważnym efektem prowadzonych badań było potwierdzenie hamującego działania ekstraktu z przytulii właściwej i szczawiu lancetowatego na syntezę czynników proangiogennych PDGF i HGF. Ponadto przytulia właściwa istotnie statystycznie zmniejszała produkcję prozapalnej interleukiny 6 i 8. Warto zaznaczyć, że przytulia właściwa aktywowała produkcję TIMP-1 (tkankowego inhibitora metalloproteinazy), co wpłynęło na zmniejszenie ilości MMP-9 (metalloproteinazy 9) w komórce. Uzyskane rezultaty zachęcają do prowadzenia badań w warunkach *in vivo*. Potwierdzenie przeciwluszczykowego działania trzech wyselekcjonowanych ekstraktów, m.in. z przytulii czepnej i właściwej oraz szczawiu lancetowatego w modelu zwierzęcym być może stworzy podstawy do poszerzenia działalności naukowej w kierunku badań klinicznych. Pozwoli to na określenie bezpieczeństwa stosowania tych ekstraktów.

Tematyka realizowana przez Doktorantkę cechuje się dużym nowatorstwem, dostarcza dowodów naukowych potwierdzających słuszność stosowania analizowanych surowców w etnomedycynie chorób skóry. Jednocześnie jest dowodem na wykorzystanie natury jako źródła związków o potencjale leczniczym w postaci izolatów lub ich pochodnych. Uzyskane wyniki, oprócz wartości czysto poznawczej, mają wartość aplikacyjną. W opinii Recenzenta, ważnym krokiem, w dalszej pracy naukowej Doktorantki, byłoby ukierunkowanie kolejnych badań na profil aplikacyjny i uwzględnienie wybranych surowców jako substancji czynnych formułacji leczniczych stosowanych zewnętrznie w leczeniu czy profilaktyce łuszczycy.

W czasie pracy badawczej Doktorantka zgromadziła istotny dorobek naukowy w postaci 21 publikacji o charakterze poglądowym, 2 o charakterze eksperymentalnym i 1 rozdział podręcznikowy o łącznej liczbie punktów wg MNiSW równej 92. W 22 publikacjach Pani mgr farm. Katarzyna Antoniak jest pierwszym Autorem. Ponadto uczestniczyła w 3 konferencjach naukowych i wygłosiła 6 referatów na posiedzeniach Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Warto także podkreślić uwzględnienie aspektu artystycznego w pracach Doktorantki, czy to publikacjach poglądowych, czy podczas wygłaszanych referatów. Rośliny od wieków były źródłem inspiracji dla artystek i artystów, zarówno pisarzy jak i malarzy, często pojawiały się w sposób dyskretny, a jednocześnie piękny. Motywy roślinne, o silnym nacechowaniu semantycznym, znajdziemy już w Biblii, a wśród polskich mistrzów pióra w twórczości chociażby Adama Mickiewicza, Elizy Orzeszkowej, Kazimierza Przerwy-Tetmajera czy Marii Konopnickiej. To właśnie twórczość Marii Konopnickiej była inspiracją dla Pani mgr farm. K. Antoniak do poszukiwania w jej dziełach aspektów roślinnych, efektem

czego były 2 publikacje zatytułowane “Kwiaty, drzewa i zioła w twórczości Marii Konopnickiej”.

Ocena rozprawy doktorskiej nie byłaby pełna bez wskazania słabszych stron i postawienia pytań. Doktorantka do analiz fitochemicznych i biologicznych stosowała testy oparte o pomiary kolorymetryczne oraz fluorescencyjne. Nasuwa się pytanie, czy w tych testach uwzględniono pomiary kolorymetryczne i fluorescencyjne dla samych ekstraktów? Związki w nich zawarte mogą dawać fałszywie dodatni wynik i zawyżać lub zaniżać ostateczny rezultat – w zależności od zasady metody i przeliczeń.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej. Przedstawiona praca świadczy o ogromnym zaangażowaniu Autorki w rozwiązanie problemu badawczego i osiągnięcie założonego celu. Stanowi dużą wartość naukową i poszerza wiedzę z zakresu związków roślinnych o potencjale przeciwłuszczycowym.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr farm. Katarzyny Antoniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedry Botaniki Farmaceutycznej  
i Farmakognozji  
*Zaluski*  
dr hab. Damiel Zaluski, prof. UMK