



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej  
„Badania fitochemiczne i ocena właściwości biologicznych wybranych  
surowców roślinnych stosowanych w leczeniu łuszczycy”  
wykonanej przez mgr farm. Katarzynę Antoniak  
w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji  
Kolegium Nauk Farmaceutycznych w Poznaniu

### Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr farm. Katarzyny Antoniak, to interesujące opracowanie, którego celem jest naukowa ocena możliwości zastosowania pięciu surowców: *Galii aparine herba*, *Galii veri herba*, *Bidentis tripartitae herba*, *Rumicis hydrolapathi radix* i *Liquiritiae radix* w leczeniu łuszczycy.

Badania oparto o ocenę działania antyoksydacyjnego, wpływu na wytwarzanie czynników proangiogennych i prozapalnych, oraz na aktywność enzymów uczestniczących w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej, istotnych w inicjowaniu i podtrzymywaniu zmian łuszczycowych.

Podjęcie próby choćby tylko częściowego rozwiązania zakładanego problemu w ramach ocenianej pracy doktorskiej należy uznać za niezwykle ambitne.

Łuszczyca to przewlekła, zapalna choroba skóry. Jej etiologia wciąż pozostaje nie do końca poznana. Przypuszcza się, że rozwój choroby uzależniony jest między innymi od czynników genetycznych, immunologicznych i środowiskowych. Leczenie łuszczycy to proces długi i często nie efektywny, albowiem łuszczyca może nawracać. Opiera się na stosowaniu leków o działaniu ogólnym, działaniu miejscowym oraz na fototerapii (fotochemioterapii). W tym świetle poszukiwanie nowych, bezpiecznych produktów pochodzenia naturalnego – roślinnego, jest wysoce potrzebne.

Do badań wybrano pięć roślin: *Galium aparine* L. (przytulię czepną), *Galium verum* L. (przytulię właściwą), *Bidens tripartita* L. (uczep trójlistkowy), *Glycyrrhiza glabra* L. (lukrecję gładką), oraz *Rumex hydrolapathum* L. (szczaw lancetowaty), których zastosowanie tradycyjne wskazuje na ich możliwą skuteczność w leczeniu chorób dermatologicznych, w tym łuszczycy. W części teoretycznej przedstawiono dokładną charakterystykę botaniczno-, chemiczno-, farmakologiczną wybranych gatunków, ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania tradycyjnego, oraz potencjalnej toksyczności.



W przypadku *Glycyrrhiza glabra*, Doktorantka opublikowała profesjonalną charakterystykę chemiczno-farmakologiczną tego gatunku w postaci dwóch publikacji przeglądowych na łamach Postępów Fitoterapii (jedna praca w druku, druga zaakceptowana).

W części eksperymentalnej pracy dokonano oceny przydatności wybranych surowców we wspomaganie leczenia łuszczycy w oparciu o analizę aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i angiogennej, oraz oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli ekstraktów etanolowych. Ponadto przeprowadzono analizę olejków eterycznych pozyskiwanych z badanych surowców.

Materiał roślinny analizowany w ramach pracy doktorskiej pochodził z komercyjnych źródeł: *Galii aparine herba* (ziele przytulii czepnej) zakupiono w Zakładzie Zielarskim 'Aromatica' (Hajnówka, Polska), a pozostałe surowce: *Galii veri herba* (ziele przytulii właściwej), *Bidentis tripartitae herba* (ziele uczezu trójlistkowego), *Rumicis hydrolapathi radix* (korzeń szczawiu lancetowatego, korzeń kobyłaka) i *Liquiritiae radix* (korzeń lukrecji) w Zakładzie Konfekcjonowania Ziół 'FLOS' (Mokrsko, Polska). Do oznaczeń zawartości polifenoli oraz aktywności biologicznej z surowców wykonano ekstrakty etanolowe w łaźni ultradźwiękowej. Doktorantka dokładnie opisała metodykę oznaczania zawartości polifenoli metodą kolorymetryczną z zastosowaniem odczynnika Folin-Ciocalteu, oraz otrzymywanie olejków eterycznych metodą hydrodestylacji i analizę ich składu metodą GC-MS (badanie wykonane we współpracy z Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu). Sprawnie przedstawiono również metodykę przeprowadzonych badań biologicznych: aktywności antyoksydacyjnej (testy DPPH i FRAP), wpływu ekstraktów na aktywność hialuronidazy metodą turbidymetryczną, oraz ocenę aktywności angiogennej *in vitro* na komórkach śródbłonna naczyniowego HUVEC linii EA.hy926 (badanie wykonane we współpracy z Katedrą i Zakładem Patofizjologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu).

Szczegółowo opisana metodyka badań niewątpliwie potwierdza, dojrzałość naukową, umiejętności nawiązywania współpracy, oraz znajomość zastosowanych technik badawczych Doktorantki.

Wyniki oznaczeń zawartości związków polifenolowych, olejku eterycznego oraz aktywności biologicznej zostały dokładnie przedstawione, ponadto w badaniach zadbane o analizę statystyczną.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej





Oznaczenia metodą Folin-Ciocalteu całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach etanolowych z badanych surowców wykazały najwyższą ich zawartość w *Rumicis hydrolapathi radix* (327,79 mg GAE/g s.m. surowca), mniejsze w *Liquiritiae radix* (71,06), *Galii veri herba* (58,47), *Bidentis tripartitae herba* (32,70), oraz *Galii aparine herba* (19,14) (mg GAE/g s.m. surowca). W pracy nie podjęto oznaczeń jakościowych związków fenolowych. Domniemanie ich składu oparto na danych literaturowych wskazując m.in. flawonoidy, procyjanidyny, kumaryny, pochodne katechiny czy też kwasów fenolowych, jako związki odpowiedzialne za działanie antyoksydacyjne. Cennym, kolejnym etapem prac byłaby analiza związków aktywnych przy użyciu technik chromatograficznych.

Wyniki oznaczeń potencjału antyoksydacyjnego metodami DPPH i FRAP wykazały największą aktywność dla ekstraktów z *Rumicis hydrolapathi radix*; IC<sub>50</sub> dla DPPH wynosiło 0,07 mg/ml, a IC<sub>0,5</sub> dla FRAP wyniosło 0,02 mg/ml (wyrażone wartościami równoważników witaminy C). W badaniach stwierdzono zależność między całkowitą zawartością polifenoli w ekstraktach, a ich aktywnością antyoksydacyjną. Jednak potencjał antyoksydacyjny badanych surowców był słabszy w porównaniu do substancji referencyjnej - witaminy C.

Spośród badanych ekstraktów etanolowych, aktywność hialuronidazy najsilniej hamowały wyciągi z *Rumicis hydrolapathi radix* (IC<sub>50</sub> = 0,43 mg/ml) i z *Liquiritiae radix* (IC<sub>50</sub> = 0,45 mg/ml). Efekt hamujący tych ekstraktów był prawie dwukrotnie wyższy niż dla substancji wzorcowej - kemferolu (IC<sub>50</sub> = 0,78 mg/ml). Pozostałe ekstrakty wykazały kilkukrotnie słabszą aktywność.

Na szczególną uwagę zasługują innowacyjne wyniki oznaczeń *in vitro* aktywności angiogennej przeprowadzone na komórkach śródbłonna dla ekstraktów etanolowych z badanych surowców. W pracy po raz pierwszy przetestowano ich oddziaływanie na takie parametry jak: proliferacja, migracja i inwazyjność; etapy kluczowe w powstawaniu naczyń krwionośnych. Ponadto oceniono ich rolę w produkcji czynników pro- i anty-angiogennych oraz właściwości przeciwzapalne.

Stwierdzono, że badane ekstrakty roślinne mogą modyfikować proces angiogenezy na różnych etapach. *Galii veri herba*, oraz *Bidentis tripartitae herba* wykazały potencjalny charakter antyangiogeny, ponieważ zmniejszały proliferację, produkcję cytokin prozapalnych i stężenie proangiogenego czynnika HGF (czynnika wzrostu hepatocytów). Szczególnie silne działanie antyangiogenne stwierdzono dla *Bidentis tripartitae herba*, który w kluczowych etapach angiogenezy działał antyproliferacyjnie, antymigracyjnie i jednocześnie stosunkowo słabo antyinwazyjnie.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej





Należy również podkreślić, że dla trzech spośród badanych ekstraktów, wykazano także charakter proangiogeny. Ekstrakty z: *Galii veri herba*, *Bidentis tripartitae herba*, *Rumicis hydrolapathi radix* zmniejszały stężenie TIMP-1 (inhibitora metalopeptydazy 1) i jednocześnie zwiększały poziom MMP-9 (metalopeptydazy matrycowej 9) (niski stosunek między TIMP-1 i MMP-9 wiąże się z inwazyjnością proangiogeną i rozwojem nowego naczyń).

Oddzielnym, niezwykle interesującym etapem prac eksperymentalnych było pozyskanie, oraz analiza GC-MS olejków eterycznych. W wyniku hydrodestylacji surowców: *Galii aparine herba*, *Galii veri herba*, *Bidentis tripartitae herba*, *Rumicis hydrolapathi radix* i *Liquiritiae radix* otrzymano olejki eteryczne z wydajnością odpowiednio: 3,33, 2,60, 2,91, 3,03 i 3,03 ml/kg. Analiza GC-MS pozwoliła na oznaczenie w nich od 43 do 71 związków z grupy seskwiterpenów, monoterenów, diterpenów, pochodnych fenylopropanu (węglowodory, alkohole, aldehydy, tlenki i estry), oraz kwasów tłuszczowych. Dominującymi ilościowo związkami: w *Galii aparine herba* był 9-diazo-9H-fluoren (31,93%), w *Galii veri herba* - kwas palmitynowy (10,87%), w *Bidentis tripartitae herba* - trimetochinol (46,89%), w *Rumicis hydrolapathi radix* - kwas linolowy (50,38%) i kwas palmitynowy (25,99%), a w *Liquiritiae radix* - anetol (15,44%) i karwon (15,16%).

W ramach pracy nie przeprowadzono oceny aktywności biologicznej uzyskanych olejków, niemniej jednak jest to niezwykle ciekawy, potencjalny cel kolejnych badań nad aktywnością przeciwłuszczycową badanych gatunków. Doktorantka bardzo dokładnie przedyskutowała uzyskane wyniki oznaczeń jakościowych olejków z danymi literaturowymi. Ponadto zasugerowała ich możliwe aktywności farmakologiczne przygotowując interesujące zestawienie aktywności biologicznej głównych składników olejków oparte na danych literaturowych w tabeli (numer 39), oraz wyciągając stosowne wnioski.

Należy podkreślić, dużą dojrzałość naukową Doktorantki, która w 'Dyskusji', sprawnie przeanalizowała wyniki badań własnych i porównała je do danych zebranych z licznych prac naukowych o zasięgu światowym. W tej części wyeksponowano najistotniejsze i innowacyjne aspekty pracy. Ponadto w 'Podsumowaniu', bezpośrednio podkreślono, jak uzyskane wyniki mogą potencjalnie wpływać na aktywność wspomagającą leczenie łuszczycy badanymi surowcami roślinnymi.

Doktoranta w omówieniu i podsumowaniu wyników sprawnie przedstawiła najważniejsze (spośród licznych) wyniki uzyskane dla każdego z badanych surowców. Przeprowadzone badania wykazały, że wybrane surowce charakteryzują się różnymi właściwościami, a tym samym, ich mechanizm działania w terapii łuszczycy jest







odmienny. Ekstrakt z *Galii aparine herba* hamował proliferację i migrację komórek śródbłonka. Ekstrakt z *Galii veri herba* zmniejszał proliferację, oraz produkcję PDGF, HGF, IL-6 i IL-8 w komórkach śródbłonka. Wyciąg z *Bidentis tripartitae herba* hamował proliferację i migrację komórek śródbłonka i produkcję: HGF, IL-6 i IL-8. W ekstrakcie z *Liquiritiae radix* stwierdzono znaczną zawartość związków polifenolowych, ponadto wykazano jego aktywność hamującą hialuronidazę i produkcję IL-6. Najlepsze wyniki w stosunku do rozpatrywanych parametrów uzyskano dla ekstraktu z *Rumicis hydrolopathi radix*. Dla tego surowca stwierdzono najwyższą zawartość polifenoli, najsilniejszy potencjał antyoksydacyjny i najwyższą aktywność hamującą hialuronidazę. Ponadto ekstrakt zmniejszał migrację komórek śródbłonka, oraz produkcję PDGF, HGF i IL-8.

Wydział Farmaceutyczny

Metodyka zastosowana, zarówno w fitochemicznej części pracy, jak i w badaniach aktywności biologicznej ekstraktów nie budzi zastrzeżeń. Wyniki prac doświadczalnych są często nowatorskie i posiadają potencjalnie aplikacyjny charakter. Uzyskane wyniki badań udowodniły wysoką potencjalną wartość terapeutyczną badanych surowców, nie tylko w terapii łuszczycy, ale sugerują możliwość ich wykorzystania w innych jednostkach chorobowych.

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

#### Ocena edytorska pracy

Tekst rozprawy obejmuje 227 stron. Cytowane są aż 434 pozycje literaturowe, oraz 15 stron internetowych. W pracy zamieszczono 39 tabel oraz 44 ryciny.

Tekst poprzedzony jest rzeczowym wstępem, a zakończony streszczeniem w języku polskim i angielskim. Część teoretyczna obejmuje 39 stron i przedstawia patogenezę, objawy i sposoby leczenia łuszczycy, oraz charakterystykę botaniczno-farmakologiczną wszystkich badanych gatunków. Doktorantka rzeczowo przedstawiła podjętą tematykę umiejętnie wybierając najistotniejsze informacje z licznych źródeł naukowych, co świadczy o jej dojrzałości naukowej.

W części doświadczalnej zaprezentowano bardzo dokładnie zastosowaną metodykę i oraz przedstawiono wyniki w formie graficznej. Kolejno znajdujemy omówienie wyników, oraz rzetelnie przeprowadzoną dyskusję.

Tekst dysertacji kończy solidne podsumowanie (5 stron) w którym Doktorantka trafnie wyciąga najważniejsze wnioski oraz podkreśla innowacyjne aspekty przeprowadzonych badań.

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





Przy tak znacznych objętościach tekstu, zwykle trudne jest uniknięcie błędów edytorskich i stylistycznych. Jednak jest ich stosunkowo niedużo, dlatego zdecydowałam się ich nie wymieniać. Moje najważniejsze uwagi zamieszczam poniżej:

1. Proszę o wyjaśnienie nieściśłości. W części teoretycznej Doktorantka podaje, że badane były różne gatunki rodzaju *Rumex* znane pod nazwą „kobyłak”: szczaw tępolistny (*Rumex obtusifolius* L.), szczaw kędzierzawy (*Rumex crispus* L.), szczaw żółty (*Rumex patientia* L.), szczaw alpejski (*Rumex alpinus* L.) i szczaw lancetowaty (*Rumex hydrolapathum* L.). Natomiast w celach pracy sprecyzowano, że badano *Rumicis hydrolapathi radix*, więc korzeń tylko jednego z gatunków - *Rumex hydrolapathum*. Kolejno w pracy zastosowano jednoznaczne określenie: *Rumicis hydrolapathi radix* = korzeń szczawiu lancetowatego = korzeń kobyłaka, które wydaje się być nieprawidłowe.
2. W części teoretycznej w opisach roślin posłużono się jedynie „starszą” systematyką; na przykład, obecnie rodzina *Asteraceae* to Astrowate (nie Złożone), ponadto nazwy rodzin zarówno w języku polskim jak i łacińskim powinny być zapisane z dużej litery.
3. Sugerowałabym mniejsze multiplikowanie podrozdziałów; szczególnie w rozdziale dotyczącym metodyki badawczej (3).
4. W rozdziale 4, poza licznymi tabelami i rycinami, powinno znaleźć się dokładne omówienie uzyskanych wyników. Ten opis umieszczono dopiero w rozdziale 5; przy dyskusji.
5. Sugerowałabym sprecyzować jednostkę podawania zawartości związków z na „g surowca” do na „g s.m. (suchej masy) surowa”.
6. W opisie wyników oznaczeń FRAP jako jednostkę odniesienia zastosowano parametr ‘IC<sub>0,5</sub>’, a dla metody DPPH ‘IC<sub>50</sub>’; wyrażone, jako wartości równoważników witaminy C. Czy te parametry są tożsame? Dlaczego nie zastosowano tego samego zapisu w obu przypadkach?
7. Pewien rodzaj dysharmonii i trudność w czytaniu pracy sprawia niespójne, różne nazywanie badanych surowców, czy też roślin, wymiennie polskie i łacińskie.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Podsumowując, przedłożoną do oceny pracę oceniam wysoko. Stanowi ona bogate kompendium wiedzy o potencjalnej aktywności przeciwłuszczykowej znanych z wykorzystania tradycyjnego roślin pospolicie występujących w Polsce (*Galium*

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30





*aparine, Galium verum, Bidens tripartita, Rumex hydrolapathum*), oraz jednego gatunku południowoeuropejskiego (*Glycyrrhiza glabra*). Wyniki pracy udowadniają w sposób empiryczny, znane dotychczas w głównej mierze z wykorzystania tradycyjnego, właściwości biologiczne surowców. Wyniki badań, posiadają nie tylko istotne walory poznawcze, ale też aplikacyjny charakter. Praca nakreśla możliwości pozyskiwania i wykorzystania gatunków w leczeniu niezwykle trudnej choroby jaką jest łuszczyca.

### Ocena dorobku naukowego

Mgr farm. Katarzyna Antoniak jest pierwszym autorem jednej opublikowanej pracy eksperymentalnej (Farmacja Polska, MNiSW=20 pkt), jednej pracy przyjętej do druku (Postępy Fitoterapii, MNiSW=5 pkt), oraz jednego manuskryptu którego upublicznienie planowane jest w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym (Industrial Crops and Products). Ponadto, Doktorantka jest autorem czterech publikacji poglądowych (w tym jednej przyjętej do druku) dotyczących gatunku *Glycyrrhiza glabra*, oraz aktywności biologicznej olejków eterycznych. Wymienione wyżej prace bezpośrednio dotyczą tematyki rozprawy doktorskiej.

Na uwagę zasługuje pozostała aktywność naukowa Pani mgr. Katarzyny Antoniak. Jest Ona pierwszym autorem aż 15, oraz współautorem 2, publikacji poglądowych dotyczących tematyki ogólnofarmaceutycznej opublikowanych w takich czasopismach jak: Farmacja Polska, Postępy Fitoterapii, Panacea, Czasopismo Aptekarskie, Klinika Oczna, Magazyn Lekarza Okulisty, czy też Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. Na uwagę zasługują liczne prace dotyczące chorób oftalmologicznych i dermatologicznych, oraz przedstawiane w pracach informacje na temat aktywności i działania niepożądanego leków. Ciekawym nurtem zainteresowań Doktorantki są publikacje dotyczące aspektów botanicznych w twórczości Marii Konopnickiej. Ponadto Doktorantka jest współautorem monografii polskojęzycznej w podręczniku „Współczesna terapia dermatoz alergicznych”.

O dużej aktywności i odwadze naukowej Pani Katarzyny Antoniak świadczą trzy wystąpienia ustne na konferencjach naukowych, oraz sześć referatów wygłoszonych na posiedzeniach Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego w Łodzi. Na uwagę zasługują również wykłady szkoleniowe przeprowadzone w ramach Szkolenia Ciągłego Farmaceutów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z zakresu farmakoterapii chorób narządu wzroku.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30

Dotychczasowy dorobek naukowy i duża aktywność naukowa Pani Katarzyny Antoniak wskazują, że jest Ona dobrym kandydatem do uzyskania stopnia naukowego doktora. Sugerowałabym jednak większą aktywność w publikowaniu w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Pani Katarzyna Antoniak uzyskała tytuł magistra farmacji na Akademii Medycznej w Łodzi w 1996 roku, a w 2002 roku ukończyła specjalizację pierwszego stopnia w zakresie farmacji aptecznej. Pani Magister od 1997 czynnie wykonuje zawód farmaceuty; obecnie pracuje jako kierownik apteki ogólnodostępnej. Pani mgr. Katarzyna Antoniak w latach 2006-2009 pracowała jako asystent w Katedrze Farmakologii i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie prowadziła działalność naukową zajmując się oceną właściwości antyoksydacyjnych melatoniny wobec komórek śródbłonna HMEC-1, oraz działalność dydaktyczną na Wydziałach: Lekarskim, Lekarsko-Dentystycznym oraz Fizjoterapii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prowadząc kursy w języku polskim i angielskim. Ponadto, Pani Katarzyna Antoniak w 2012 roku obroniła pracę dyplomową na Podyplomowym Studium Translacji na Wydziale Filozoficznym Uniwersytetu Łódzkiego.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład

Botaniki Farmaceutycznej

Przedstawione bogate doświadczenie zawodowe, aktywność: naukowa, dydaktyczna i publikacyjna, niewątpliwie zasługują na szczególne podkreślenie, albowiem świadczą o wysokich kompetencjach Doktorantki.

### Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej ocenę rozprawy doktorskiej, oraz dorobku naukowego, zwracam się do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinińskiego w Poznaniu, z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr farm. Katarzyny Antoniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dn. 11.03.2021 r.

Katedra i Zakład Botaniki  
Farmaceutycznej UJ CM

*A. Szopa*  
dr hab. Agnieszka Szopa

30-688 Kraków

ul. Medyczna 9

tel. +48 12 620 54 30