

dr hab. Rafał Różalski, prof. UMK
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Karłowicza 24,
85-092 Bydgoszcz,
tel +48 52 5853749, +48 525853745
e-mail: rafalr@cm.umk.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani magister **Joanny Sutkowskiej - Skolimowskiej** pt.: „ **The effect of rosemary and lemon balm extracts and rosmarinic acid on collagen type I metabolism in fibroblasts from Osteogenesis Imperfecta patients**”

(Wpływ ekstraktów z rozmarynu i melisy oraz kwasu rozmarynowego na metabolizm kolagenu typu I w fibroblastach chorych na Osteogenesis Imperfecta) wykonanej w Zakładzie Chemii Medycznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem pani dr hab. n. med. Anny Galickiej.

Wrodzona łamliwość kości (Osteogenesis imperfecta) jest uwarunkowaną genetycznie chorobą tkanki łącznej, która wynika z nieprawidłowej budowy kolagenu i/lub niewystarczającej ilości kolagenu w tkance kostnej. Manifestuje się to między innymi zwiększoną łamliwością kości, deformacją szkieletu, jak również objawami pozaszkieletowymi takimi jak zaburzenia słuchu, nieprawidłowości w uzębieniu, wady sercowo-oddechowe i wiele innych. W zależności od typu choroba może przybierać postać od łagodnej poprzez postępująco-deformującą, aż do letalnej. Ze względu na podłoże genetyczne (w większości przypadków przyczyną są mutacje w genach

kolagenu typu I - *COL1A1* i *COL1A2*) terapia ma głównie charakter objawowy i polega na zapobieganiu złamaniom i ewentualnym ich leczeniu. Stosowane do tej pory bisfosfoniany oraz terapie eksperymentalne związane z wykorzystaniem między innymi czynnika wzrostu czy przeciwciał monoklonalnych wydają się mało efektywne. Konieczne jest poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych, których efekty mogą zdecydowanie poprawiać komfort życia chorych. Tym zagadnieniom poświęcona jest przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, która opiera się na dwóch oryginalnych artykułach, opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

1. Sutkowska Joanna, Hupert Natalia, Gawron Katarzyna, Strawa W. Jakub, Tomczyk Michał, Forlino Antonella, Galicka Anna. The stimulating effect of rosmarinic acid and extracts from rosemary and lemon balm on collagen type I biosynthesis in osteogenesis imperfecta type I skin fibroblasts. *Pharmaceutics*; 2021, 13, 7, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070938>
2. Sutkowska-Skolimowska, J.; Brańska-Januszewska, J.; Strawa, J.W.; Ostrowska, H.; Botor, M.; Gawron, K.; Galicka, A. Rosemary extract-induced autophagy and decrease in accumulation of collagen type I in osteogenesis imperfecta skin fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 10341. <https://doi.org/10.3390/ijms231810341> Supplementary Materials: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231810341/s1>.

Łączny współczynnik oddziaływania dla opublikowanych prac wynosi 12,733, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 240. W obu publikacjach Pani magister Joanna Sutkowska-Skolimowska jest pierwszym autorem. Głównym celem pracy jest ocena wpływu kwasu rozmarynowego oraz ekstraktów z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.) i melisy (*Melissa officinalis* L.) na biosyntezę, wydzielanie i degradację kolagenu typu I w fibroblastach skóry pacjentów z wrodzoną łamliwością kości typu I, II i III.

Dysertacja napisana jest w języku angielskim i składa się ze 108 stron. W pierwszej części Autorka wprowadza czytelnika w podstawowe zagadnienia dotyczące Osteogenesis Imperfecta, metabolizmu kolagenu oraz mutacji w genach związanych z kolagenem typu I. Zwraca również uwagę na procesy związane ze stresem w reticulum endoplazmatycznym i aktywacją szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres.

Całość kończy się krótkim podrozdziałem dotyczącym terapii wrodzonej łamliwości kości i w moim odczuciu jest to fragment wprowadzenia potraktowany zbyt skrótowo. Zdaję sobie sprawę, że temat ten jest szczegółowo przedstawiony w pracy przeglądowej (Botor, M.; Fus-Kujawa, A.; Uroczynska, M.; Stepień, K.L.; Galicka, A.; Gawron, K.; Sieron, A.L. Osteogenesis imperfecta: Current and prospective therapies. *Biomolecules* 2021, 11, 1493.), którą autorka cytuje zarówno w autoreferacie, jak również w pracy opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, jednak pozostaje tu lekki niedosyt. Muszę natomiast dodać, że niedosyt ten jest w dużej mierze zrekompenzowany w dalszych rozdziałach, m. in. w dyskusji, gdzie Doktorantka wraca do zagadnień związanych z leczeniem chorych z wrodzoną łamliwością kości.

W kolejnych rozdziałach Autorka przedstawia założenia i hipotezy badawcze poparte rozbudowanym wstępem, a następnie opisuje wykorzystane linie fibroblastów, warunki ich inkubacji i wymienia techniki badawcze, którymi posługiwała się w zaplanowanych badaniach. Następnie w sposób klarowny omawia najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie przeprowadzonych eksperymentów ze wskazaniem z której publikacji pochodzą. W dalszej kolejności wyniki są bardzo szczegółowo przedyskutowane w odniesieniu do najnowszych badań i ostatecznie najważniejsze obserwacje i wnioski zostają przedstawione w 6 punktach (strona 25). Całość uzupełniają bibliografia składająca się z 75 pozycji oraz streszczenie w języku angielskim oraz polskim.

Drugą część rozprawy doktorskiej stanowią kopie dwóch publikacji wraz z suplementami na podstawie których powstała oceniana praca, oświadczenia i zgody współautorów publikacji oraz dokumenty Komisji Bioetycznej potwierdzające zgodę na wykorzystanie fibroblastów skóry ludzkiej chorych na Osteogenesis Imperfecta w przeprowadzonych badaniach. Część trzecią dysertacji stanowi wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki.

Oceniając rozprawę doktorską Pani magister Joanny Sutkowskiej – Skolimowskiej nie mam wątpliwości, że wykazuje ona cechy nowości naukowej. Artykuły będące podstawą pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF=12), co oznacza, że wykonane badania zostały już wcześniej pozytywnie ocenione przez kilku niezależnych recenzentów. Zamieszczone w wykazie osiągnięć informacje wskazują ponadto, że wyniki

eksperymentów były prezentowane i dyskutowane na wielu konferencjach zarówno w Polsce, jak i za granicą.

W pierwszej z prac autorzy wykazali między innymi, że ekstrakty z rozmarynu i melisy w stężeniach 0,1, 1 i 10 $\mu\text{g/ml}$ oraz kwas rozmarynowy w stężeniach 0,1, 1 i 10 μM znacząco zmniejszyły lub całkowicie wyeliminowały ilościowy defekt kolagenu typu I w fibroblastach z Osteogenesis Imperfecta typu I poprzez stymulujący wpływ na biosyntezę kolagenu. Jednocześnie zaobserwowano hamujący wpływ na aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Z kolei badania przeprowadzone i zaprezentowane w drugiej pracy wykazały, że ekstrakt z rozmarynu w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$ istotnie obniżał poziom nagromadzonego zmutowanego kolagenu typu I w fibroblastach pacjentów z ciężką postacią Osteogenesis Imperfecta typu III i śmiertelną Osteogenesis Imperfecta typu II poprzez indukcję autofagii. Zaobserwowano również złagodzenie stresu komórkowego na podstawie spadku ekspresji białek szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres (ang. Unfolded Protein Response - UPR). Zostało to potwierdzone przez znaczne obniżenie poziomu ekspresji markerów proapoptotycznych pod wpływem ekstraktu z rozmarynu.

Mam kilka pytań i uwag, z prośbą o ustosunkowanie się Doktorantki podczas obrony pracy:

1. Skład jakościowy oraz stężenie kwasu rozmarynowego w balsamach był oznaczany za pomocą zestawu chromatografii cieczowej wyposażonego w detektor UV (Photodiode Array) oraz detektor spektrometrii mas. Który rodzaj detekcji został wykorzystany do oznaczeń ilościowych kwasu rozmarynowego? Nie znalazłem takiej informacji w opisie metody.
2. Stężenie kwasu rozmarynowego jest wyrażone w μM , natomiast stężenie ekstraktów z rozmarynu i melisy w $\mu\text{g/mL}$. Zastanawiam się czy dla lepszego porównania wpływu samego kwasu rozmarynowego nie należałoby podać jego zawartości w kolejnych punktach w przypadku ekstraktów?
3. W streszczeniu w języku polskim zastosowano skróty pochodzące z języka angielskiego? Czy nie warto byłoby użyć nazw polskich ze względu na dbałość o język i potencjalnego czytelnika, który może być mało zorientowany w zagadnieniach prezentowanej pracy. Zdaję sobie sprawę, że wiązałoby się to z przygotowaniem drugiej listy skrótów i nazw, jednak znacznie poprawiłoby odbiór tekstu.

4. W przypadku listy skrótów wkradł się błąd dotyczący hydroksylaz. Zarówno 3 - hydroksylaza, jak i 4 - hydroksylaza są oznaczone tym samym skrótem.
5. We wnioskach końcowych Doktorantka słusznie podkreśla, że ujawnione właściwości kwasu rozmarynowego i ekstraktów z rozmarynu i melisy muszą zostać potwierdzone w eksperymentach in vivo. Czy takie badania są przez Panią planowane i jeśli tak - na jakim modelu?

Powyższe pytania i uwagi nie wpływają na wysoką ocenę przy doktorskiej. Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał kliniczny kwasu rozmarynowego oraz ekstraktów z rozmarynu i melisy w leczeniu wrodzonej łamliwości kości. Eksperymenty zostały dobrze zaplanowane i wykonane. Na uwagę zwraca szeroki wachlarz technik badawczych wykorzystanych przez Doktorantkę. Uważam, że przedstawiona do oceny dysertacja wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki farmaceutycznej. Wysoko oceniam wartość merytoryczną przeprowadzonych badań i samodzielność naukową Doktorantki.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668) i zwracam się Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani magister Joanny Sutkowskiej - Skolimowskiej do dalszych etapów postępowania celem nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutycznej.

Bydgoszcz, 25.10.2022 r.

Rafał Różalski