

Kraków, 06.03.2023

---

UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE



---

Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Chemii Farmaceutycznej  
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9  
Tel. +48 12 620 54 50

---

Kierownik – prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej p.t. „Analiza fitochemiczna oraz badanie aktywności biologicznej nasion *Scorzonera hispanica* L. w komórkach raka piersi”, wykonanej przez mgr. Karolinę Lendzion, doktorantkę Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB pod kierunkiem promotora – prof. dr. hab. Anny Bielawskiej i promotora pomocniczego, dr hab. Agnieszki Gornowicz.

Recenzja została opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w oparciu o art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianym rozprawom doktorskim.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Lendzion to interdyscyplinarna praca badawcza plasująca się w centrum nauk farmaceutycznych i skoncentrowana na zagadnieniu poszukiwania nowych substancji biologicznie aktywnych. Rozprawa została przedstawiona w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opatrzonych kilkunastostronicowym autoreferatem, **co jest zgodne z wymaganiami ustawowymi dotyczącymi formy rozprawy doktorskiej (art. 187 pkt. 3)** i wychodzi naprzeciw najnowszym trendom w tym zakresie. Pierwsza z dwóch wchodzących w skład rozprawy publikacji jest artykułem przeglądowym, a druga pracą oryginalną. Warto zauważyć, że obie publikacje ukazały się w renomowanym anglojęzycznym czasopiśmie *International Journal of Molecular Science*, które ma zasięg międzynarodowy i posiada wysoki współczynnik

oddziaływania, *Impact Factor* = 6.208. Jako że czasopismo to jest recenzowane, należy podkreślić, że przedstawiony w rozprawie materiał został pozytywnie oceniony i przyjęty przez środowisko naukowe.

Autoreferat został uzupełniony spisem najważniejszej literatury, obejmującym 80 pozycji, a także oświadczeniami współautorów i wykazem osiągnięć naukowych Doktorantki. **Z oświadczeń tych jednoznacznie wynika wiodący wkład mgr Karoliny Lenzion w powstanie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej**, wskazując na jej udział w 85% i 55%, odpowiednio w publikacji przeglądowej i oryginalnej.

Na szczególne uznanie zasługuje wybór tematyki rozprawy, która włącza się w ciągle aktualny nurt poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych, w tym wypadku szczególnie w kontekście raka piersi. Pomimo istotnych postępów medycyny w zakresie jego leczenia, nowotwór ten pozostaje wciąż niezaspokojoną potrzebą medyczną i wszelkie działania mające na celu znalezienie rozwiązań terapeutycznych, użytecznych w jego zwalczaniu, są potrzebne i zasługują na poparcie.

Bardzo ciekawym jest także wybór przedmiotu badań, jakim są nasiona *Scorzonera hispanica* L., czyli wężymordu czarny korzeń. Roślina ta należy do rodzaju *Scorzonera*, który ma ugruntowaną pozycję w medycynie tradycyjnej, z uwagi na swoje właściwości odżywcze, a także skojarzenie z możliwą aktywnością terapeutyczną w leczeniu rozmaitych schorzeń. Nowoczesne badania fitochemiczne i farmakologiczne pozwoliły na identyfikację w składzie roślin z rodzaju *Scorzonera* wielu substancji chemicznych o potencjale terapeutycznym, co zostało doskonale podsumowane przez Doktorantkę w publikacji przeglądowej „*Phytochemical Composition and Biological Activities of Scorzonera Species*”, stanowiącej pierwszą część niniejszej rozprawy doktorskiej. W pracy tej zebrane zostały systematycznie wszystkie dostępne aktualnie informacje pochodzące z badań naukowych, dotyczące analizy składu oraz potencjalnej aktywności leczniczej surowców roślinnych z rodzaju *Scorzonera*, a także izolowanych z nich poszczególnych składników chemicznych. Publikacja jest bardzo szeroka i szczegółowa, stanowiąc istotny wkład w aktualny stan wiedzy na temat omawianego rodzaju roślin. O ile zebrane wyniki badań przedstawiają bardzo szerokie możliwości terapeutyczne związane z wykorzystaniem preparatów pochodzących z roślin z rodzaju *Scorzonera*, włącznie z aktywnością przeciwnowotworową, wskazują one również jasno na brak badań dotyczących aktywności preparatów z gatunku *Scorzonera hispanica* względem nowotworu piersi. Pozwoliło to na identyfikację niszy badawczej, która powinna być i została wypełniona poprzez realizację badań w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej,

opisanych w drugim artykule oryginalnym. Szerokie prace eksperymentalne zostały zawarte w publikacji pod tytułem „*LC-PDA-MS and GC-MS Analysis of Scorzonera hispanica Seeds and Their Effects on Human Breast Cancer Cell Lines*”.

Niekwestionowanym walorem ocenianej rozprawy jest mnogość technik badawczych zastosowanych przez Doktorantkę. Sięgają one od pozyskiwania materiału do badań z surowców roślinnych, różnymi technikami, poprzez ocenę jego składu jakościowego i ilościowego, z użyciem najnowocześniejszych technik analitycznych, po badania biologiczne oceniające żywotność komórek, a także eksplorujące biochemiczne mechanizmy działania, z użyciem nowoczesnych technik biologii molekularnej. Na podstawie zaprezentowanych badań można stwierdzić, że Doktorantka opanowała techniki ekstrakcji, frakcjonowania i pozyskiwania olejów oraz zapoznała się z technikami chromatografii cieczowej wysokosprawnej i chromatografii gazowej, sprzężonymi ze spektrometrią masową, zarówno w ujęciu jakościowym jak i ilościowym. Dla pozyskanego materiału przeprowadziła badania cytotoksyczności, prowadząc hodowle komórkowe i oceniając żywotność komórek. Przeprowadziła badania biosyntezy DNA, wiązania aneksyny V z użyciem cytometrii przepływowej, czy wreszcie analizowała ekspresję białek metodą *western blot*, oraz stężenie wybranych białek techniką ELISA. Wszystkie zastosowane techniki zostały szczegółowo opisane w rozdziałach poświęconych metodyce, w publikacji drugiej.

Zarówno szczegółowo przedstawione przez Doktorantkę w publikacji pierwszej tło naukowe rozprawy, jak i szeroko zaprezentowana w drugiej publikacji metodyka badawcza, **świadczą jednoznacznie o Jej wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej w zgłębianej dyscyplinie naukowej, a co za tym idzie stanowią bardzo istotny przyczynek do spełnienia wymogu zawartego w art. 187 pkt.1 Ustawy.** Tak dobre i szerokie przygotowanie Doktorantki było możliwe dzięki pracy w świetnym zespole naukowym prof. Anny Bielawskiej, a także dzięki szerokiej współpracy z innymi wybitnymi naukowcami z Wydziału Farmaceutycznego UMB.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- pozyskanie z nasion *Scorzonera hispanica* łącznie 12 preparatów, stanowiących zarówno ekstrakty (SH1-3 i 8-10), jak i frakcje (SH4-7 i 11) oraz olej (SH12),
- oznaczenie składu jakościowego i ilościowego tych preparatów, wskazującego na obecność związków z grupy flawonoidów (w tym luteoliny i apigeniny), pochodnych kwasu chinowego (w tym kwasów kawoilochinowego, dikawoilochinowego i trikawoilochinowego), kwasów

tłuszczowych (linolenowego i palmitynowego) oraz fitosteroli, w tym  $\beta$ -sitosterolu, a także 3,4-dimetoksycynamonianu metylu, D-chiro-inozytolu i kwasu kawowego,

- stwierdzenie aktywności cytotoksycznej ekstraktu metanolowego SH1 oraz frakcji eterowej SH4 i chloroformowej SH11, względem linii komórkowej MCF-7, a w przypadku frakcji SH11, także wobec linii MDA-MB-231. Najwyższą aktywnością wykazała się frakcja SH11, hamując wzrost linii MCF-7 i MDA-MB-231 w stężeniach, odpowiednio  $399.18 \pm 54.15 \mu\text{g/mL}$  i  $781.26 \pm 21.43 \mu\text{g/mL}$ ,

- ustalenie, że aktywność cytotoksyczna ekstraktu SH1 oraz frakcji SH4 i SH11 jest związana ze zdolnością do indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy, wpływem na ekspresję białek związanych z procesem apoptozy (BCL-2, Bax) i autofagii (ATG5, LC3B) oraz działaniem hamującym ekspresję kinazy Akt oraz ERK1/2 w komórkach raka piersi MCF-7.

- stwierdzenie aktywności przeciwzapalnej ekstraktu SH1 oraz frakcji SH4 i SH11, związanej z inhibicją cytokin prozapalnych IL-8 i TNF- $\alpha$  i zwiększanie stężenia cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w komórkach raka piersi linii MCF-7.

Wskazane powyżej osiągnięcia mają charakter nowatorski i w sposób jednoznaczny potwierdzają, że **w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej dokonano sformułowania, a następnie oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wypełniając tym samym wymagania art. 187 pkt. 2.**

Uważam, że całokształt przedstawionych przez Doktorantkę wyników oraz prawidłowo przeprowadzona dyskusja **dotatkowo potwierdzają jej szeroką wiedzę teoretyczną w zgłębianej dyscyplinie naukowej, a także wskazują, że wykazuje ona umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, wypełniając tym samym całkowicie wymagania art. 187, pkt. 1.**

Umieszczone w końcowej części pracy wypunktowane wnioski oraz zwięzłe streszczenie dobrze oddają najważniejsze tezy pracy i ułatwiają ich rekapitulację.

Podkreślenia wymaga także nienaganne przygotowanie ocenianej rozprawy, której wysokiej wartości naukowej towarzyszy wysoka jakość w zakresie edycji.

Podczas zapoznawania się z tą bardzo interesującą rozprawą nasunęło mi się kilka pytań, które mogłyby posłużyć jako temat do dyskusji podczas obrony:



1. Stężenia aktywne składników ekstraktów i frakcji wywołujące aktywność przeciwnowotworową zostały w dysertacji przedstawione w formie mikrogram na mililitr. Jakim mniej więcej stężeniom molowym mogą one odpowiadać, biorąc pod uwagę średnią masę molową składników? Jak te stężenia mają się do wcześniej opisanych w literaturze stężeń aktywnych przeciwnowotworowo składników roślin z rodzaju *Scorzonera* badanych pod kątem aktywności przeciwnowotworowej? Czy na tej podstawie można by przedyskutować wrażliwość raka piersi na składniki *Scorzonera*, w porównaniu z innymi nowotworami?
2. W jakiej formie preparaty *Scorzonera hispanica* mogłyby być podawane pacjentowi, aby zapewnić optymalny efekt wspomagający terapię raka piersi?
3. Jakie konkretnie substancje składowe ekstraktów i frakcji mogą być odpowiedzialne za obserwowane działanie? Która ich grupa może być „najbardziej podejrzana” o taką aktywność?
4. Czy Doktorantka ma jakąś koncepcję dotyczącą możliwego molekularnego punktu uchwytu składników badanych ekstraktów i frakcji? Poprzez interakcje z jakimi celami biologicznymi możliwe jest uzyskanie obserwowanych zmian w ekspresji białek proapoptotycznych i cytokin zapalnych?

Reasumując, stwierdzam, że **oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład Doktorantki w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych**, stanowiąc ważne uzupełnienie badań wcześniejszych oraz inspirację do dalszych eksploracji w poruszonym temacie. Tak jak wyżej szczegółowo wskazałem, **spełnia ona wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.)**.

**Mając na uwadze wszystko powyższe, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Lendzion i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Co więcej, z uwagi na wysoką wartość przedłożonej dysertacji, zaawansowaną metodykę badawczą, oryginalność wyników oraz fakt całościowego opublikowania w renomowanym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania, składam także wniosek o jej wyróżnienie.**

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM  
Zakład Chemii Leków  
prof. dr hab. Marcin Kołaczowski  
kierownik



