

Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 27.02.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Lendzion wykonanej w Zakładzie Biotechnologii
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Od wprowadzenia do leczenia pierwszego leku syntetycznego – aspiryny minęło dopiero 123 lata. To czas bardzo krótki w dziejach ludzkości. Do tego momentu ludzie leczyli się tylko substancjami pochodzenia naturalnego. W czasie tych 123 lat przemysł farmaceutyczny rozwinął się bardzo szybko. Mamy aktualnie na rynku wręcz niewyobrażalnie dużą liczbę leków syntetycznych a pomimo tego wciąż wracamy do natury. Dlaczego? Bo stanowi dla nas zarówno źródło leków, jak i inspirację do projektowania nowych substancji aktywnych.

Poszukując wciąż nowych substancji o różnorodnej aktywności naukowcy poddają badaniom rośliny zarówno te bardziej znane i popularne, jak i te, o których istnieniu jeszcze 10 lat temu nie mówiło się wcale. Jedną z roślin, dość późno poznanych w naszym kraju, jest skorzonera. Inaczej nazywana jest wężymordem, z uwagi na historyczne stosowanie jako antidotum na jad żmii, zimowymi szparagami z uwagi na smak jak też ze względu na wygląd czarnym korzeniem. Skorzonera (*Scorzonera hispanica*) w Polsce jest rzadko uprawiana a szkoda, ponieważ korzeń stanowi źródło białka, błonnika pokarmowego, tłuszczów, węglowodanów. Zawiera wiele witamin w tym witaminę A, E, K oraz witaminy z grupy B. Dodatkowo, skorzonera należy do warzyw niskokalorycznych, co czyni ją jeszcze bardziej atrakcyjną. Nie dziwi więc fakt szerszego zainteresowania właściwościami tego warzywa. Dotychczas cała uwaga była skupiona na korzeniu, brak jest natomiast danych na temat składu chemicznego i właściwości biologicznych wyciągów pozyskanych z nasion. Stało się to przyczynkiem do powstania prezentowanej rozprawy doktorskiej pani Karoliny Lendzion. Jest to kolejna praca powstała pod kierownictwem prof. Anny Bielawskiej, która wskazuje trendy w poszukiwaniu

nowych surowców roślinnych, które mogą być wykorzystane w prewencji/leczeniu nowotworów.

Praca doktorska Pani Karoliny Lenzion została przedstawiona do recenzji w formie cyklu dwóch publikacji opublikowanych w latach 2021-2022, w wysokoimpaktowym czasopiśmie *International Journal of Molecular Science* o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 12,416 co odpowiada 280 pkt MNiSW/MEiN, opatrzonej 12 stronicowym komentarzem w języku polskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. W obu Doktorantka jest pierwszym autorem. Dołączone do komentarza oświadczenia współautorów wskazują na dominujący udział Doktorantki w wykonaniu badań oraz tworzeniu manuskryptów (55 i 85%). Komentarz zawiera *Wykaz stosowanych skrótów*, *Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej*, *Wprowadzenie*, *Cel pracy*, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników, *Wnioski*, *Literaturę*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Na końcu Doktorantka umieściła oświadczenia autorów prac oraz ankietę dorobku naukowego. Komentarz jest napisany poprawnym językiem. Oparty jest na 80 pozycjach literaturowych, właściwie dobranych i cytowanych.

W części wprowadzającej Autorka opisuje cele molekularne w terapii przeciwnowotworowej, wskazuje na celowość badania surowców roślinnych pod kątem ich zastosowania w terapii nowotworów oraz charakteryzuje aktywność biologiczną gatunków z rodzaju *Scorzonera* L. Ta część pracy w sposób wyczerpujący uzasadnia trafność podjętej tematyki badawczej.

Celem pracy mgr Karoliny Lenzion było:

- otrzymanie oleju, ekstraktów i frakcji z nasion *Scorzonera hispanica*,
- analiza jakościowa i ilościowa składu chemicznego oleju oraz ekstraktów i frakcji z nasion *S. hispanica* z wykorzystaniem technik GC-MS oraz LC-PDA-MS a także
- ocena aktywności biologicznej oleju oraz otrzymanych ekstraktów wobec komórek raka piersi: estrogenozależnych komórek MCF-7 i estrogenoniezależnych komórek linii MDA-MB-231.

Ekstrakty z nasion przygotowano w dwóch oddzielnych procedurach. Pierwsza polegała na ekstrakcji surowca wspomaganą ultradźwiękami. Każdy z ekstraktów przygotowano poprzez pięciokrotne wytrawianie surowca ekstraktem, którym był metanol, 50% metanol, woda oraz 70% aceton. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano odpowiednie ekstrakty. Druga procedura ekstrakcyjna polegała na wykorzystaniu aparatu Soxhleta. Rozdrobniony surowiec poddano ekstrakcji ciągłej benzyną, a następnie chloroformem. Po ekstrakcji surowiec wysuszono i ekstrahowano pod chłodnicą zwrotną kolejno metanolem i 50%

metanolem. Połączone ekstrakty odparowano i zawieszono w wodzie. Następnie, wykonano ekstrakcji ciec-z-ciecz rozpuszczalnikami o rosnącej polarności: chloroformem, eterem dietylowym, octanem etylu i n-butanolem. Wodną pozostałość przefiltrowano i stanowiła ona dodatkową frakcję. Otrzymane ekstrakty i frakcje poddano następnie liofilizacji. Olej z nasion *Scorzonera hispanica*, uzyskano w wyniku trzykrotnego tłoczenia na zimno porcji nasion. Następnie produkt odwirowano i oddzielono od osadu. Zastosowanie różnych rozpuszczalników zarówno polarnych, jak i niepolarnych pozwoliło na otrzymanie ekstraktów o określonym składzie chemicznym.

Kolejnym etapem pracy była analiza metodami chromatograficznymi składu chemicznego ekstraktów, frakcji i oleju z nasion *Scorzonera hispanica*. Do analizy fitochemicznej ekstraktów i frakcji alkoholowych, wodnej, eterowej i acetonowej użyto techniki LC-PDA-MS. Potwierdzono obecność w ekstraktach i frakcjach kwasów fenolowych, kwasu p-kumarowego, a także flawonoidów (apigeniny i luteoliny) zarówno w formie wolnej, jak i związanej. Ilościowo najbardziej bogatą we flawonoidy i pochodne kawoilochinowe okazała się frakcja eterowa.

Do oceny składu produktów lipofilnych otrzymanych z surowca wykorzystano technikę GC-MS. Wykazano, że głównymi składnikami oleju są kwasy tłuszczowe (w tym nienasycone: linolenowy i oleinowy a także nasycony kwas palmitynowy,) oraz β -sitosterol. Znaczną ilością D-chiro-inozytolu oraz kwasu kawowego charakteryzował się ekstrakt metanolowy. Najbardziej znaczącą część składu produktu otrzymanego poprzez ekstrakcję benzyną stanowił kwas linolenowy. Głównym związkiem wchodzącym w skład ekstraktu chloroformowego były kwas linolenowy oraz glicerol. Dominującym składnikiem frakcji chloroformowej ekstraktu metanolowego był 3,4-dimetoksycynamonian metylu. We frakcji tej stwierdzono również znaczące ilości kwasu ferulowego i linolenowego.

Kolejnym etapem badań była ocena aktywności cytotoksycznej ekstraktów oraz poszczególnych frakcji, jak też oleju uzyskanego z nasion wobec dwóch linii komórek raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231. Do badań wykorzystano metodę Carmichaela z użyciem soli tetrazolowej MMT. Dodatkowo oceniono wpływ otrzymanych produktów z nasion na proces biosyntezy DNA poprzez pomiar [^3H]-tymidyny wbudowanej do DNA komórek. Celem stwierdzenia selektywności działania badania prowadzono również na linii komórek prawidłowych – fibroblastach skóry ludzkiej.

Uzyskane wyniki badań skringowych pozwoliły na wytypowanie 3 najbardziej aktywnych produktów do dalszych badań. Zastosowano stężenia odpowiadające wartościom IC₂₅ oraz IC₅₀ uzyskanym w teście MTT. Związkiem referencyjnym była Cisplatyna użyta w stężeniach

50 i 100 μM . Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych wykazała frakcja chloroformowa. Co prawda uzyskane wartości IC_{50} są dość wysokie, ale w większości przypadków ekstrakty roślinne charakteryzują się znacznie niższą aktywnością niż leki syntetyczne czy poszczególne związki izolowane z roślin. Wynikać to może z faktu obecności w ekstraktach/frakcjach innych związków chemicznych, często niezidentyfikowanych, o działaniu antagonistycznym.

Kolejno, dokonano oceny wpływu badanego ekstraktu i frakcji (SH1, SH4, SH11) na proces indukcji apoptozy w komórkach raka piersi MCF-7 wykorzystując technikę cytometrii przepływową. Ponadto, oceniono ekspresję wybranych białek związanych z procesem apoptozy (Bax, BCL-2) i autofagii (LC3B, ATG5), a także biorącej udział w migracji, adhezji i apoptozie komórek - kinazy FAK. Zbadano wpływ ekstraktu SH1 i frakcji SH4 i SH11 na stężenie białek uczestniczących w szlakach sygnałowych komórki – kinazy białkowej B (Akt) i kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowej ERK1/2, a także wybranych cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) i interleukiny-8 (IL-8), oraz przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10).

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że ekstrakt metanolowy SH1 oraz frakcje: eterowa SH4 i chloroformowa SH11 wykazują zdolność do indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy, wpływają na ekspresję białek związanych z procesem apoptozy (BCL-2, Bax) i autofagii (ATG5, LC3B) oraz wykazują działanie hamujące na ekspresję kinazy Akt oraz ERK1/2 w komórkach raka piersi MCF-7. Dodatkowo, wykazują działanie przeciwzapalne hamując aktywność cytokin prozapalnych IL-8 i TNF- α i zwiększając stężenie cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w komórkach raka piersi linii MCF-7.

Uzyskane wyniki dały podstawę do sformułowania wniosku końcowego, iż nasiona *Scorzonera hispanica* są obiecującym surowcem roślinnym o szerokim spektrum potencjalnych zastosowań, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii wspomagającej leczenie raka piersi. Jednocześnie mgr Karolina Lendzion stwierdza bardzo słusznie, że konieczne są dalsze pogłębione badania zwłaszcza bezpieczeństwa stosowania nasion i produktów z nich powstałych.

Stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione cele.

Przeprowadziła bardzo szeroki, kompletny panel badań, które pozwoliły na wyciągnięcie miarodajnych wniosków, co do aktywności cytotoksycznej produktów z nasion skorzonery i ich potencjalnego zastosowania w prewencji nowotworów.

Jedyna uwaga jak nasunęła się podczas recenzji przedstawionej rozprawy doktorskiej dotyczy faktu, iż mając do dyspozycji wyniki badania składu poszczególnych frakcji, ekstraktów i oleju

Doktorantka nie spróbowała powiązać opisanej aktywności wobec linii komórkowych ze składnikami badanych próbek. Dlaczego?

Podsumowując, uważam, iż praca mgr Karoliny Lenzion jest przykładem dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Autorka wykazała się dużą wiedzą, umiejętnością wyciągania wniosków z prowadzonych interdyscyplinarnych badań.

Rozprawa doktorska Pani Karoliny Lenzion w pełni spełnia wymagania stawiane tego typu rozprawom naukowym, dlatego wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o nadanie mgr Karolinie Lenzion stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom rozprawy doktorskiej, nowatorstwo i wielodyscyplinarność przedstawionych badań pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Karoliny Lenzion do wyróżnienia.