

Śląski Uniwersytet
Medyczny w KatowicachWydział Nauk
Farmaceutycznych
w SosnowcuZakład
Farmacji Aptecznej
41-200 Sosnowiec, ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.pl
tel. (+48 32) 269-98-39
farmacja_apteczna@sum.edu.plKierownik Zakładu
prof. dr hab. n. farm.
Paweł Olczyk
polczyk@sum.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej p.t.: „The effect of rosemary and lemon balm extracts and rosmarinic acid on collagen type I metabolism in fibroblasts from Osteogenesis Imperfecta patients”, wykonanej przez Panią mgr Joannę Sutkowską-Skolimowską, pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Anny Galickiej.

Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.) – roślina o wielokierunkowym potencjale terapeutycznym – przejawia m.in. właściwości antyoksydacyjne, hipoglikemizujące, hipolipemizujące, hepatoprotekcyjne, moczopędne, neuroprotekcjne, przeciwbakteryjne, przeciwbólowe, przeciwdepresyjne, przeciwłękowe, przeciwhistaminowe, przeciw pasożytnicze, przeciwwirusowe, regulujące trawienie, spazmolityczne, tonizujące czy uspokajające. Aktywność antyoksydacyjną wykazuje także rozmaryn lekarski (*Rosmarinus officinalis* L.) – pluripotentny surowiec farmaceutyczny – cechujący się m.in. działaniem antyoksydacyjnym, detoksykującym, diuretycznym, hepatoprotekcyjnym, hipoglikemizującym, kardioprotekcyjnym, nefroprotekcyjnym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwmutagennym, przeciwnowotworowym, przeciwwrzodowym, protekcyjnym względem promieniowania UV i promieniowania jonizującego, stabilizacyjnym w odniesieniu do błon biologicznych. Stanowiący aktywny składnik wymienionych roślin leczniczych kwas rozmarynowy cechuje się znaczącym potencjałem – antyoksydacyjnym, hepatoprotekcyjne, kardioprotekcyjne, nefroprotekcjne, przeciwalergicznym, przeciwdepresyjne przeciwnowotworowym, przeciwzapalnym, stymulującym biosyntezę kolagenu, cechując się wysoce korzystnym wpływem w odniesieniu do schorzeń związanych z uogólnionym stanem zapalnym oraz zaburzeniem czynności układu immunologicznego, zaburzeniom biosyntezy i degradacji makrocząsteczek macierzy pozakomórkowej. Dlatego też próba zastosowania oraz oceny oddziaływania przez Doktorantkę ekstraktu z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.), ekstraktu z melisy (*Melissa officinalis* L.) czy kwasu rozmarynowego względem fibroblastów, stanowiących jedno z wiodących „źródeł” kolagenu typu I, którego zaburzona biosynteza jak i zmiany jakościowe czy też ilościowe towarzyszą schorzeniu Osteogenesis Imperfecta. Powyższym zagadnieniem poświęcony jest przedłożony do recenzji manuskrypt rozprawy doktorskiej, której temat, stanowiący rozwinięcie realizowanej – przez Autorkę pracy Panią mgr Joannę Sutkowską-Skolimowską we współpracy z Panią promotor dr hab. n. med. Annę Galicką – problematyki badawczej, uznać należy za trafny, zgodny z aktualnym stanem wiedzy i kierunkiem współczesnych badań biomedycznych. Rozprawę doktorską stanowią dwie, powiązane tematycznie publikacje eksperymentalne, zamieszczone na łamach prestiżowych, o międzynarodowym zasięgu czasopism, takich jak *Pharmaceutics* (wartość współczynnika Impact Factor = 6,525; punktacja MNiE = 100; rok 2021) i *International Journal of Molecular Sciences* (wartość współczynnika Impact Factor = 6,208; punktacja MNiE = 140; rok 2022), znajdujących się na tzw. Liście filadelfijskiej. Wartość współczynnika oddziaływania (IF) wynosi 12,733, zaś punktacja MNiE jest równa 240. Pani mgr Joanna Sutkowska-Skolimowska jest pierwszą Autorką przytoczonych publikacji. Wskazane przez Doktorantkę publikacje oryginalne uzupełnione zostały Oświadczeniami pierwszej Autorki jak i Współautorów (zgodnie z którymi wkład Pani mgr Joanny Sutkowskiej-Skolimowskiej w planowanie badań, w wykonywanie eksperymentów, w analizę statystyczną, interpretację wyników oraz redagowanie manuskryptów, który określiła na 60%) oraz określeniem źródła finansowania zaplanowanych doświadczeń (granty 11/IMSD/G/2019, 04/IMSD/G/2021 w ramach programu operacyjnego współfinansowanego z środków Unii Europejskiej).

Rozdział *Introduction* efektywnie wdraża czytelnika w problematykę dysertacji, syntetycznie charakteryzując schorzenie – Osteogenesis imperfecta, biosyntezę i degradację kolagenu typu I,

Śląski Uniwersytet
Medyczny w KatowicachWydział Nauk
Farmaceutycznych
w SosnowcuZakład
Farmacji Aptecznej
41-200 Sosnowiec, ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.pl
tel. (+48 32) 269-98-39
farmacja_apteczna@sum.edu.plKierownik Zakładu
prof. dr hab. n. farm.
Paweł Olczyk
polczyk@sum.edu.pl

mutacje genów kolagenu typu I czy też zagadnienia stresu siateczki śródplazmatycznej i szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres. Omawiany rozdział kończy Autorka syntetyczną charakterystyką farmakoterapii (algorytmów aktualnie stosowanych oraz potencjalnie proponowanych do wdrożenia w przyszłości) wrodzonej łamliwości kości. Z treścią wspomnianego rozdziału koresponduje cel pracy, który Autorka jasna sprecyzowała i przekonywująco uzasadniła. Dla realizacji ambitnego, nadrzędnego zadania badawczego, podjęła Pani Magister szereg działań doświadczalnych zaaprobowanego przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz – o realizacji których powiadomiono Komisję Bioetyczną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. I tak, nie ograniczyła się Doktorantka w – wymagających znacznego zaangażowania oraz – umiejętności praktycznych – doświadczeniach do zastosowania pięciu pierwotnych linii fibroblastów skóry „powiązanych” z wybranymi mutacjami [OI type I (exon 5, c. 459 del T); OI type II 1 (exon 38 Gly691Cys); OI type II 2 (exon 23, Gly352Ser); OI type III 1 (exon 45, Gly901Ser); OI type III 2 (exon 52, Ly1448Val)], fibroblastów pobranych od chorych z OI lecz także w celach kontrolnych uwzględniła wykorzystanie prawidłowych komórek linii CCD25Sk and CRL-1474, nie wykluczając przy tym implementacji fibroblastów pobranych od osób zdrowych. Opracowanie oraz fachowa analiza zastosowanych ekstraktów z rozmarynu oraz z melisy przeprowadzona została w oparciu o implementację techniki łączonej, z zakresu chemii analitycznej, obejmującej zastosowanie chromatografii cieczowej, detektora fotodiodowego i spektrometrii mas. Nie należy także pomijać innych – co wymaga i zasługuje na szczególne podkreślenie – zastosowania przez Doktorantkę licznych – wymagających interdyscyplinarnej wiedzy i wybitnych umiejętności praktycznych – metod/technik, do których zaliczyć należy m.in. test MTT, Real-time PCR, elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, western blot, ELISA, mikroskopię konfokalną, izolację frakcji subkomórkowych, zymografię, jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukey’a.

Autorka – stosując wymienioną i precyzyjnie dobraną, rozbudowaną procedurę eksperymentalną – wykazała m.in.: – redukcję bądź eliminację ilościowego zaburzenia puli kolagenu typu I (w odniesieniu do fibroblastów, których występowaniem cechują się organizmy chorych z wrodzoną łamliwością kości typu I), co znalazło wyraz w pobudzeniu biosyntezy omawianego białka łącznotkankowego oraz zmniejszeniu aktywności metaloproteinaz macierzowych (MMP-1, MMP-2 i MMP-9) – w wyniku zastosowania ekstraktu z rozmarynu, ekstraktu z melisy (stężenia 0,1 pg/ml, 1 pg/ml, 10 pg/ml) oraz kwasu rozmarynowego (stężenie 10 pM); – zmniejszenie akumulacji powstałego w wyniku mutacji kolagenu typu I, w odniesieniu do fibroblastów, których występowaniem cechują się organizmy chorych z wrodzoną łamliwością kości typu III i typu II [w wyniku zastosowania ekstraktu z rozmarynu (stężenia 50,00 pg/ml, 100,00 pg/ml)], indukcję zjawiska autofagii, wzrost wartości ilościowej relacji LC3-II:LC3-I, degradację receptora p62 oraz kolokalizację kolagenu typu I, lipidowej postaci białka LC3 (LC3-II) czy lizosomalnej błonowej glikoproteiny typ 2A; – redukcję ekspresji proapoptotycznego białka z rodziny Bcl-2 – Bax, białka homologicznego C/EBP (CHOP), rozszczepionej kaspazy 3, w wyniku zastosowania ekstraktu z rozmarynu (stężenia 50,00 pg/ml, 100,00 pg/ml). Zrealizowane doświadczenia pozwoliły na realizację nadrzędnego zadania badawczego określonego w celu pracy. Nowatorski charakter oraz niezaprzeczalna, innowacyjna naukowa wartość uzyskanych wyników umożliwiły opublikowanie artykułów – poprzedzone recenzjami wykonanymi przez międzynarodowy zespół ekspertów – w renomowanych czasopismach co istotnie podnosi ocenę merytoryczną dokonań Doktorantki. Natomiast, lektura rozprawy nasuwa pewne sugestie/wątpliwości, które tytułem wyłącznie przemyślenia przedstawiam, zważając, że podjęty przez Doktorantkę temat będzie bez cienia wątpliwości kontynuowany:

Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

Zakład
Farmacji Aptecznej
41-200 Sosnowiec, ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.pl
tel. (+48 32) 269-98-39
farmacja_apteczna@sum.edu.pl

Kierownik Zakładu
prof. dr hab. n. farm.
Paweł Olczyk
polczyk@sum.edu.pl



1. Sformułowane przez Doktorantkę konkluzje [nr 1 oraz nr 2 (pierwsze zdanie)] – określić należy mianem powtórzenia uzyskanych wyników badań;

2. Czerpiąc inspirację z dorobku (*J Pathol. 2002 Feb;196(2):235-7. doi: 10.1002/path.1030.*) Pani dr hab. n. med. Anny Galickiej – promotora rozprawy doktorskiej – uznanego eksperta zajmującego problematyką Osteogenezie Imperfecta – proponowałbym ocenę oddziaływania zastosowanych w doświadczeniach stanowiących podstawę rozprawy ekstraktów z rozmarynu, z melisy oraz kwasu rozmarynowego, także względem osteoblastów.

3. Proponowałbym ponadto rozszerzenie opisaną procedurę badawczą o ocenę wpływu zastosowanych w doświadczeniach ekstraktów z rozmarynu, z melisy oraz kwasu rozmarynowego o ekspresję inhibitorów tkankowych TIMP-1 i 2.

4. Zważywszy, iż, komórki hodowane na płaskich podłożach mogą cechować się zmodyfikowanym metabolizmem czy ekspresją genów, nie w pełni odwzorowując środowisko ustroju człowieka, proponowałbym rozważenie zastosowania hodowli trójwymiarowej, zapewniającej możliwość „funkcjonowania” komórek w środowisku znacząco zbliżonym do warunków ustroju ludzkiego;

5. Wyniki uzyskane w następstwie zastosowania metod – ELISA (ocena ilościowa prokolagenu typu I) oraz zymografia (ocena aktywności MMPs) – można by porównać z tymi uzyskanymi w następstwie zastosowania techniki rezonansu plazmonów powierzchniowych, zważywszy zalety tej ostatniej techniki (w tym m.in. wysoka czułość, możliwość oceny kinetycznej w czasie rzeczywistym, relatywnie niskie wykorzystanie materiału biologicznego).

6. Pomijając fakt ewolucji polskiego języka naukowego proponowałbym unikanie następujących sformułowań: „.....przyciągają szczególną uwagę farmaceutów...”; „.....poziomu ekspresji markerów proapoptotycznych...”; „.....poziom całkowitego białka....”.

Podsumowując omówiony cykl doświadczeń, współtworzących rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Sutkowskiej-Skolimowskiej, stwierdzam, iż wyniki badań Doktorantki cechując się aplikacyjnym charakterem – poprzez działania ukierunkowane na potencjalne zastosowanie surowców roślinnych oraz opracowanie innowacyjnych produktów leczniczych pochodzenia naturalnego w terapii wrodzonej łamliwości kości – reprezentują istotny i oryginalny wkład do współczesnych nauk farmaceutycznych i medycznych. Stwierdzam ponadto, iż rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Sutkowskiej-Skolimowskiej, nosząca tytuł: „*The effect of rosemary and lemon balm extracts and ras marinie acid on collagen type I metabolism in fibroblasts from Osteogenesis Imperfecta patients*” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022 r., poz. 574 ze zm.). Podkreślając interdyscyplinarny aspekt przeprowadzonych badań oraz aplikacyjny charakter uzyskanych wyników przez Doktorantkę, pod opieką Pani dr hab. n. med. Anny Galickiej, przedkładam Panu Dziekanowi Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej – Panu prof. dr hab. Wojciechowi Miłtykowi, wniosek nie tylko o dopuszczenie Pani mgr Joanny Sutkowskiej-Skolimowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, lecz także o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

prof. dr hab. n. farm. Paweł Olczyk