



UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Katedra i Zakład Biofarmacji

85-089 Bydgoszcz, ul. dr. A. Jurasza 2, Poland, tel. (+48 52) 585-3900; fax: (+48 52) 585-3804

e-mail: kizbiofarmacji@cm.umk.pl



Bydgoszcz, dnia 8 sierpnia 2016 roku

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Urszuli Czyżewskiej

pt.: „Ocena składu chemicznego, właściwości cytotoksycznych etanolowych ekstraktów z propolisu w hodowli komórek raka płaskonabłonkowego”.

Propolis, nazywany również kitem pszczelim, to naturalna substancja, lepka, żywiczna, która powstaje poprzez zmieszanie wydzieliny gruczołu gardłowo-przełykowego pszczół i żywic zebranych z różnych gatunków roślin, głównie z pączków niektórych drzew. Wykorzystywana jest przez te pracowite owady do zabezpieczenia wnętrza gniazda pszczelego przed bakteriami, grzybami i innymi mikroorganizmami. Propolis jest bardzo złożoną mieszaniną związków chemicznych o bardzo zróżnicowanym składzie, który zależy między innymi od położenia geograficznego, klimatu, rodzaju roślinności oraz od gatunku pszczół, przez które jest wytwarzany. Aktualnie w propolisie zidentyfikowano około 300 składników. Przeważają tam związki chemiczne, należące do takich grup, jak: flawonoidy, chalkony, kwasy organiczne oraz ich estry, stilbeny, lignany, terpeny czy fenylopropanoidy. Ze względu na pochodzenie i skład propolisu można dokonać podziału na propolis: czerwony, zielony, pacyficzny, kanaryjski, brzozy i topolowy. W naszym kraju i w całej Europie głównymi składnikami kitu pszczelego są żywice pochodzące z pączków topoli czarnej (*Populus nigra*), topoli osiki (*Populus tremula*) oraz brzozy brodawkowatej (*Betula verrucosa*), a ten rodzaj kitu pszczelego określany jest jako propolis topolowy. Jest on bardzo cennym źródłem polifenoli, w szczególności flawonoidów i kwasów fenolowych. Cenne właściwości propolisu zostały już dawno docenione w medycynie ludowej, gdzie wykorzystywane jest jego działanie antyseptyczne. Preparaty propolisu, takie jak globulki, tabletki, nalewki czy maści, są dostępne w aptekach i stosowane w leczeniu różnych schorzeń. Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania propolisem w leczeniu schorzeń jamy ustnej i przyzębia. Okazuje się on skuteczny w leczeniu owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej, języka i warg. Interesujące jest także, że ekstrakty etanolowe kitu pszczelego wykazują zdolność indukowania apoptozy (którą można przyrównać do kontrolowanego samobójstwa komórki) w różnych typach nowotworów złośliwych, jak np.: rak sutka, rak jelita grubego, rak tarczycy i trzustki, glejak czy rak krtani. Autorzy tych doniesień sugerują, że za efekt

farmakologiczny może odpowiadać synergiczne działanie składników wchodzących w skład kitu pszczelego. Ale poparcie tej tezy wymaga wykonania kompleksowej analizy aktywności nie tylko sporządzonych z propolisu ekstraktów, ale i pojedynczych substancji wchodzących w jego skład.

Jednym z poważnych schorzeń jamy ustnej jest rak płaskonabłonkowy. Występuje on najczęściej u osób starszych, zazwyczaj w piątej i kolejnych dekadach życia, częściej dotyka mężczyzn. W Polsce choroba ta zajmuje niechlubną ósmą pozycję pod względem częstości występowania nowotworów złośliwych i stanowi około 4% zachorowań na raka. Pomimo postępu, jaki dokonał się w farmacji i medycynie, do dziś brak jest skutecznej metody leczenia tej choroby, która często kończy się śmiercią pacjenta. Mimo szeroko zakrojonych badań nad sposobami leczenia raka płaskonabłonkowego brak jest w piśmiennictwie informacji o wpływie etanolowych ekstraktów propolisu oraz jego składników na płaskonabłonkowego raka języka. A właśnie tej tematyki dotyczy rozprawa doktorska mgr Urszuli Czyżewskiej, wykonana pod kierunkiem dr. hab. Wojciecha Mityka na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Z wielkim więc zainteresowaniem sięgnąłem po komputerowy wydruk pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma układ pracy eksperymentalnej. Tekst pracy został podzielony na 13 następujących po sobie części. Właściwą część rozprawy, obejmującą 72 ponumerowane strony, rozpoczynają: strona tytułowa oraz informacja o promotorze dysertacji. Następnie napotkamy podziękowania dla dr. hab. Wojciecha Mityka oraz dla pracowników z samodzielnej Pracowni Analizy Leków, z Zakładu Chemii Leków oraz dedykację dla najbliższej rodziny. Na kolejnej, piątej stronie, umieszczono informację, że praca była realizowana w ramach projektu statutowego, pt.: „Ocena składu oraz aktywności biologicznej związków chemicznych zawartych w propolisie i jego preparatach farmaceutycznych (nr projektu: 134-27502 F) oraz specjalnego stypendium naukowego z dotacji podmiotowej w ramach statusu KNOW nr 124/KNOW/15. Na kolejnej stronie umieszczono czytelny spis treści.

Trzy kolejne strony zawierają syntetyczne *Wprowadzenie*, zapoznające czytelnika z tematyką, której dotyczy rozprawa. Przedstawiono w nim informacje na temat propolisu, jego właściwości (w tym właściwości biologicznych) oraz zastosowania preparatów propolisowych w lecznictwie. Znaczny fragment tej części został poświęcony rakowi płaskonabłonkowemu jamy ustnej oraz jego leczeniu. Przedstawiono również aktualny stan wiedzy, dotyczący wpływu propolisu na różne typy komórek nowotworowych. Ta część pracy została poparta 43 pozycjami piśmiennictwa, obejmującego lata od 1994 do 2016.

Wszystkie te pozycje zostały dobrze dobrane i użyte w tekście. Świadczy to o dokładnym rozeznaniu tematyki badawczej, którą Doktorantka zajmowała się w swojej dysertacji.

Na stronie 10 przedstawiono *Cel pracy*, który zakładał wykonanie analiz składu chemicznego etanolowych ekstraktów z propolisu, z wykorzystaniem do tego celu techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS). W kolejnym etapie badań zaplanowano ocenę wpływu badanych ekstraktów na przeżywalność i proces apoptozy w komórkach raka płaskonabłonkowego języka (CAL-27). Badaniami objęto trzy etanolowe ekstrakty propolisu dostępne w aptekach, oznaczone roboczo jako EEP-1, EEP-2 i EEP-3, pochodzące od dwóch producentów krajowych. Cel pracy zakładał również wykonanie badań biologicznych dla pojedynczych substancji (chryzyna, kwas ferulowy, kwas kawowy, kwas *p*-kumarowy, galangina, pinobanksyna i pinocembryna) oraz ich mieszaniny.

Trzeba zaznaczyć, że cel został klarownie przedstawiony. Jednak, by go zrealizować, należało wykonać wiele pracochłonnych i specjalistycznych badań. Wyniki tych badań zostały przedstawione na kolejnych 26 stronach, gdzie załączono dwie prace oryginalne, opublikowane w czasopismach umieszczonych na tzw. liście filadelfijskiej, o sumarycznym współczynniku oddziaływania *impact factor* wynoszącym 4,86 punktów. W pracach tych przedstawiono opisy eksperymentów, użytą do badań aparaturę i wykaz zastosowanych substancji oraz dokonano dokładnego omówienia wyników.

Pierwsza z prac, opublikowana na łamach *Journal of Medicinal Food*¹, przedstawia wyniki badań nad składem jakościowym trzech handlowych próbek zawierających propolis pszczeli. W oparciu o technikę chromatografii gazowej ze spektrometrią mas wykryto 233 aktywne związki, między innymi: flawonoidy, chalkony, kwas cynamonowy i jego estry oraz wiele innych. Przeprowadzone badania potwierdziły również we wszystkich badanych próbkach obecność cynamonianu benzylu (silnego alergen). Wykazano, że zawartość polifenoli, w zależności od preparatu, wynosiła od 11,5 do 15,1%. Dokładna analiza badanych preparatów pokazała, że ich skład odpowiada propolisowi „topolowemu”, który występuje powszechnie w Europie.

Kolejny etap badań ukierunkowany był na ocenę cytotoksyczności etanolowych ekstraktów propolisu oraz wybranych związków na komórki płaskonabłonkowego raka języka. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wszystkie badane związki chemiczne obniżały przeżywalność komórek raka. Wyznaczone wartości IC_{50} dla poszczególnych związków wynosiły odpowiednio: EEP-2 (224 µg/ml), EEP-3 (178 µg/ml), EEP-1 (159,2 µg/ml), kwas *p*-kumarowy (139,2 µg/ml), pinocembryna (135, 2 µg/ml), kwas kawowy (130,3 µg/ml), kwas ferulowy (99,6 µg/ml), chryzyna (54,1 µg/ml), galangina (44,5 µg/ml),

¹ U. Czyżewska, J. Konończuk, J. Teul, P. Drągowski, R. Pawlak-Morka, A. Surazyński, W. Mityk. Verification of Chemical Composition of Commercially Available Propolis Extracts by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Medicinal Food*. Apr 2015, 18(5): 584-591.

a dla mieszaniny polifenoli (składającej się z równowagowych ilości wymienionych związków) wartość ta była znacząco mniejsza i wynosiła 10,7 µg/ml. Ta ostatnia obserwacja wskazuje na synergiczne działanie związków polifenolowych na obniżenie przeżywalności komórek CAL-27. Analizując budowę chemiczną flawonoidów i kwasów fenolowych oraz wyniki badań wysunięto przypuszczenie, że cytotoksyczność tych związków na badane komórki raka języka może być związana z całkowitą liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce. Badania pokazały, że polifenole zawarte w badanych ekstraktach propolisu są grupą związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii płaskonabłonkowego raka języka, których aktywność opiera się na ich synergicznym działaniu. Wyniki przeprowadzonych pomiarów zachęcają do dalszych badań nad zastosowaniem preparatów opartych na propolisie w prewencji i terapii raka płaskonabłonkowego języka. Wyniki tych badań zostały opublikowane na łamach *PLOS ONE*².

W kolejnej, trzeciej pracy, zaakceptowanej do druku w *Postęпах fitoterapii*³, która została dołączona do dysertacji, przedstawiono zastosowanie technik rozdzielczych sprzężonych ze spektrometrią mas (wraz z wyjaśnioną zasadą działania detektora i jego odmianami) do badania składu propolisu i wytworzonych z niego produktów. Praca ta potwierdza dobre rozeznanie Doktorantki w tematyce badawczej.

Na stronach 54-57 Doktorantka dokonała syntetycznej dyskusji przeprowadzonych badań, którą podparła właściwie dobranym piśmiennictwem. W tej części rozprawy można dostrzec umiejętności mgr Urszuli Czyżewskiej do syntetycznej i wyważonej oceny szerokiego zakresu badań przedstawionych w trzech publikacjach. Sposób przedstawienia dyskusji nie budzi wątpliwości co do dobrego przygotowania Doktorantki i Jej predyspozycji do pracy badawczej, w tym do trafnego wyciągania wniosków, które przedstawiono w sześciu punktach, na kolejnej 58 stronie.

Konkluzje tam wysunięte są uzasadnione i mają odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach. Doktorantka wykazała, że badane preparaty z propolisu zawierają duże ilości polifenoli. Zawarte w ekstraktach flawonoidy, kwasy fenolowe oraz mieszanina polifenoli, wykazują aktywność cytotoksyczną wobec komórek CAL-27. Przy czym najwyższą aktywność posiadała mieszanina związków polifenolowych, co wskazuje na synergizm działania. Wszystkie te związki działały proapoptotycznie, jednak mieszanina polifenoli w największym stopniu indukowała apoptozę. Przedstawione wyniki wskazują na zasadność dalszych badań nad zastosowaniem propolisu w prewencji i terapii raka płaskonabłonkowego języka.

² U. Czyżewska, K. Siemionow, I. Zaręba, W. Mityk. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0157091 June 9, 2016

³ U. Czyżewska, W. Mityk. *Spektrometria mas w analizie składu propolisu. Postępy Fitoterapii* 2/2016

Na dalszych stronach (59-61) dostarczonego do oceny wydruku odnajdziemy dobrze napisane streszczenie w języku polskim i angielskim. To bardzo ważna część dysertacji, bowiem często to od niej zależy, czy znajdzie ona czytelnika. W przekonaniu recenzenta, zadanie to zostało spełnione.

Strony od 62 do 65 zawierają *Listę publikacji* i *Listę doniesień zjazdowych*, których Doktorantka jest współautorką. Prac tych, nie wliczając trzech prac wchodzących w skład dysertacji, jest 12, z czego 10 to prace oryginalne opublikowane w czasopiśmie umieszczonych na tak zwanej „liście filadelfijskiej”, a ich sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact factor* wynosi 23,34. Wraz z publikacjami wchodzącymi w skład dysertacji wartość ta przyjmuje 28,2 punktów. Doktorantka ma ponadto w swoim dorobku 12 komunikatów przedstawionych na zjazdach i konferencjach naukowych. Podsumowując, dorobek naukowy Kandydatki do stopnia doktora nauk farmaceutycznych można uznać za więcej niż wystarczający.

Na następnych dwóch kartach odnajdziemy *Curriculum vitae*, a na kolejnych pięciu *Piśmiennictwo* liczące 58 starannie dobranych i właściwie użytych w tekście pracy pozycji.

Na ostatnich 10 stronach zamieszczono odpowiednie oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, informujące o ich udziale. Warto wspomnieć, że we wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i zarazem autorem korespondującym.

Należy przyznać, że praca, pomimo złożonej i trudnej tematyki, została napisana starannie, zrozumiałym w odbiorze językiem. Jednak, pomimo korekty autorskiej, w pracy zauważono drobne błędy. Z obowiązku recenzenckiego wymienię kilka z nich. Na stronie ósmej, wers 4, napisano „Etanolowe ekstrakty pozyskane z propolisu (EEP) działają cytotoksyczne” zamiast „cytotoksycznie”. Na stronie 9, w wersji 8, należałoby poprawić: „Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej cechuje złe rokowania...” na: „cechuje złe rokowanie”. Strona 59, wers ostatni, powinno być napisane „indukują apoptozę na drodze wewnętrznej i zewnętrznej” a jest: „nad drogę”. Z kolei w ostatnim zdaniu streszczenia: „w terapii przeciwnowotworowej w raka płaskonabłonkowego języka” niepotrzebnie występuje litera „w”.

Analizując kolejność poszczególnych części dysertacji uważam, że część zatytułowana *Piśmiennictwo* powinna być umieszczona przed częścią *Lista publikacji*. Mam również uwagę do przyjętej w rozprawie zasady numeracji stron. Bowiem chronologicznie rozpoczęta kończy się na stronie 11, po czym występują numery stron zamieszczonych publikacji, bądź strony nieponumerowane, a właściwa numeracja powraca od strony numer 54. Zastosowany sposób numeracji nie ułatwia poruszania się po tekście pracy.

Wracając do wykonanych badań należy podkreślić, że zostały one zaplanowane i wykonane prawidłowo. Jednak zabrakło mi szczegółów odnoszących się do walidacji metod chromatograficznych, zastosowanych do analizy etanolowych ekstraktów propolisowych. Być może było to już dyskutowane z recenzentami oceniającymi te badania przed ich opublikowaniem. Mam jednak nadzieję, że przedstawienie tej informacji stanie się przyczynkiem do ciekawej dyskusji podczas obrony pracy.

Chciałbym w tym miejscu zaznaczyć, że wymienione uwagi nie wpływają negatywnie na moją całościową opinię o pracy, którą oceniam wysoko. Po dokładnej analizie tekstu rozprawy stwierdzam, że została ona napisana dobrym, mimo złożonej tematyki, zrozumiałym w odbiorze językiem i stanowi oryginalne osiągnięcie mgr Urszuli Czyżewskiej, wnoszące nowe dane do prezentowanej tematyki badawczej. Cel pracy został jasno zdefiniowany, badania prawidłowo zaplanowano i wykonano. Dyskusja jest dojrzała, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Kandydatki ubiegającej się o stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych, poparta jest wynikami eksperymentów i aktualnym piśmiennictwem specjalistycznym. Opublikowanie wyników badań w uznanych czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym jest tego potwierdzeniem.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wnoszę zatem do Pani Dziekan i Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Urszuli Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na wspomnianą już wysoką całościową ocenę, ważność poruszanej w pracy tematyki badawczej oraz umiejętne połączenie analizy chromatograficznej z szeroko zakrojonymi badaniami biologicznymi, wnoszącymi nowe, istotne dane do prezentowanej tematyki badawczej (świadczą o tym między innymi publikacje wchodzące w skład dysertacji), składam do Pani Dziekan i Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o wyróżnienie dysertacji mgr Urszuli Czyżewskiej, pt.: „Ocena składu chemicznego, właściwości cytotoksycznych etanolowych ekstraktów z propolisu w hodowli komórek raka płaskonabłonkowego”.

Kierownik
Katedry i Zakładu Biofarmacji
prof. dr hab. Adam Bucinśki

