



UNIwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Chemii Leków
20-090 Lublin, ul. K. Jaczewskiego 4
tel. 81 448 73 82, fax 81 448 73 81
e.mail: anna.gumieniczek@umlub.pl



Lublin, 16.08.2016

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych
Pani mgr Urszuli Czyżewskiej
*pt. „Ocena składu chemicznego, właściwości cytotoksycznych
etanolowych ekstraktów z propolisu
w hodowli komórek raka płaskonabłonkowego”*
wykonanej w Samodzielnej Pracowni Analizy Leków
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Miłytyka

Cele badawcze postawione w recenzowanej pracy to ocena składu chemicznego (jakościowa oraz ilościowa) trzech ekstraktów z propolisu oraz zbadanie wpływu tych ekstraktów i związków wchodzących w ich skład (pojedynczo oraz w mieszaninie), na przeżywalność oraz na proces apoptozy w hodowli komórek płaskonabłonkowego raka języka CAL-27.

Rak płaskonabłonkowy języka to jeden z częściej występujących nowotworów jamy ustnej, cechujący się opornością na leczenie i często złym rokowaniem dla pacjenta. Stosowane obecnie schematy terapeutyczne to przede wszystkim zabiegi chirurgiczne i radioterapia, co w wielu przypadkach jest niewystarczające. Poszukiwanie związków aktywnych biologicznie, które mogłyby zwiększyć skuteczność terapii tego typu nowotworów jest niewątpliwie wyzwaniem, a temat recenzowanej pracy, z tego punktu widzenia, staje się bardzo aktualny i ważny.

Jeden z kierunków poszukiwania nowych aktywnych połączeń to badanie surowców naturalnych, które są bogatym źródłem unikalnych substancji chemicznych. Doktorantka zainteresowała się propolisem, który jest środkiem stosowanych od dawna, ale jednocześnie wciąż „tajemniczym” i bardzo złożonym pod względem chemicznym. Postawione pytania badawcze można posumować w następujący sposób: czy badane preparaty propolisu zawierają odpowiednią ilość wartościowych grup związków chemicznych, jakie są główne związki w nich występujące i w jakich ilościach występują, czy preparaty propolisu oraz ich poszczególne składniki wywierają wpływ na przeżywalność komórek nowotworowych

CAL-27, jaki może być ich mechanizm działania w komórkach nowotworowych, w jaki sposób działają poszczególne składniki tych preparatów oraz czy może występować działanie synergistyczne.

W ocenianej pracy zawarte są wszystkie wymagane rozdziały, a mianowicie: wstęp, cel pracy, trzy publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, dyskusja wyników, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, informacje o publikacjach Doktorantki oraz oświadczenia współautorów prac włączonych do rozprawy i piśmiennictwo.

Wstęp został poświęcony krótkiemu omówieniu literatury dotyczącej znanych, potwierdzonych przez praktykę, korzystnych działań preparatów propolisu oraz dotychczasowych badań nad ich aktywnością cytotoksyczną w komórkach nowotworowych i potencjalnych mechanizmów tej aktywności. Część wstępna, chociaż jest bardzo zwięzła, dostarcza ciekawych informacji dotyczących problematyki badawczej zawartej w pracy. Jest ona przemyślana, oparta na właściwie dobranych pozycjach literaturowych i jako całość bardzo dobrze wprowadza czytelnika do kolejnych części rozprawy. Jak wspomniano powyżej, podstawą dysertacji są trzy opublikowane prace naukowe, dwie oryginalne prace doświadczalne i jeden artykuł przeglądowy.

Publikacja I dotyczy oceny składu chemicznego trzech preparatów propolisu dostępnych w aptekach, metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W badaniach Doktorantka wykorzystała zmodyfikowaną przez siebie metodę GC-MS dostępną w piśmiennictwie, polegającą między innymi na upochodnieniu oznaczanych związków poprzez ich siliłowanie. Do identyfikacji poszczególnych składników propolisu wykorzystała dane dostępne w bibliotece widm NIST 08 i bibliotece indeksów retencji. W trzech badanych preparatach propolisu wykryła ponad 230 składników, z czego ponad 150 udało się jej zidentyfikować, a niektóre ocenić także półilościowo. Na tej podstawie Doktorantka mogła stwierdzić, że główne związki zawarte w badanych preparatach propolisu to flawonoidy i chalkony, kwasy cytrynowe i ich estry oraz glicerydy i terpenoidy. Jednocześnie, opierając się na danych literaturowych, mogła stwierdzić, że badane preparaty dzięki obecności tych grup związków, mogą wykazywać korzystne działanie biologiczne. Doktorantka zidentyfikowała między innymi wartościową pochodną kwasu kawowego znaną jako CAPE i galanginę. W badaniach, które są szeroko prowadzone przez wielu badaczy, obydwa związki wykazują działanie przeciwnowotworowe i cytotoksyczne. Także niektóre wykryte i zidentyfikowane w niniejszej pracy glicerydy wykazują działanie przeciwzapalne

i przeciwtleniające. W badaniach własnych mgr Czyżewska zwróciła uwagę na substancje chemiczne obecne w propolisie o potencjalnym działaniu uczulającym.

Opracowana metodyka może być wykorzystana do standaryzacji preparatów zawierających propolis, między innymi do określenia rodzaju zawartego w nich propolisu, do potwierdzenia odpowiedniej ilości związków aktywnych oraz do sprawdzenia zawartości związków o niekorzystnym działaniu uczulającym. Jednocześnie wyniki otrzymane na tym etapie pracy stały się podstawą do dalszych badań, w tym do badań nad aktywnością biologiczną poszczególnych składników propolisu oraz ich mieszanin.

Publikacja II dotyczy ilościowego oznaczania najważniejszych polifenoli zawartych w trzech badanych preparatach propolisu, metodą GC/MS, a następnie badania wpływu poszczególnych ekstraktów, pojedynczych substancji czynnych, tj. chryzyny, galanginy, pinobanksyny, pinocembryny, kwasu kawowego, kwasu p-kumarowego i kwasu ferulowego oraz ich mieszaniny, na żywotność komórek płaskonabłonkowego raka języka CAL-27. Doktorantka oceniła cytotoksyczność badanych prób, stosując test MTT, a następnie ich wpływ na proces apoptozy, wykorzystując metodę cytometrii przepływowej i mikroskopię immunofluorescencyjną.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że pozyskane z apteki preparaty zawierające propolis mogą różnić się sumaryczną zawartością związków polifenolowych, jak i zawartością poszczególnych substancji, ale wszystkie spełniają zakładane kryteria jakości. Badania wykonane w komórkach CAL-27 wykazały, że mieszanina związków polifenolowych (na podstawie wyznaczonych wartości IC_{50}) wykazuje największy wpływ na żywotność komórek, na indukowanie apoptozy oraz na aktywację kaspazy 3, 8 i 9. Biorąc to pod uwagę, Doktorantka wyprowadziła wniosek o synergistycznym działaniu mieszaniny polifenoli, a także o zależności działania przeciwnowotworowego od ich budowy chemicznej, zwracając uwagę na liczbę grup hydroksylowych w cząsteczce. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka mogła także wysunąć wniosek, że hamowanie wzrostu komórek CAL-27 przez polifenole obecne w propolisie, może być skorelowane z nasilaniem przez nie procesu apoptozy.

Publikacja III to praca przeglądowa na temat zastosowania spektrometrii mas w analizie preparatów propolisu. Opierając się na 36 pozycjach piśmiennictwa Doktorantka omawia dostępne dane literaturowe na temat składu jakościowego oraz ilościowego propolisu, zależnych między innymi od szaty roślinnej w miejscu zbioru czy gatunku pszczoł.

W następnej kolejności omawia podstawy techniczne spektrometrii mas, takie jak rodzaje jonizacji, analizatorów mas oraz detektorów stosowanych w analizie preparatów zawierających propolis, a także w opisanych w literaturze oznaczeniach poszczególnych substancji czynnych występujących w propolisie. W każdym z tych zagadnień technicznych Doktorantka zwraca uwagę na wady i zalety proponowanych rozwiązań, a także na sposób dostosowania odpowiednich parametrów do rodzaju analizy. Praca ta jest nie tylko przeglądem metod MS zastosowanych w analizie propolisu. Część dotycząca technicznych i metodycznych aspektów spektrometrii mas może być ciekawa dla osób rozpoczynających pracę z tym coraz szerzej stosowanym rodzajem detekcji.

Obie prace doświadczalne oraz praca przeglądowa pokazują, że Pani mgr Czyżewska ma szeroką wiedzę dotyczącą nowoczesnych technik analitycznych, a także technik bioanalitycznych, stosowanych w ocenie aktywności przeciwnowotworowej nowych cząsteczek. O wysokiej wartości przeprowadzonych badań świadczy ich opublikowanie wyników w czasopismach o stosunkowo wysokiej wartości współczynnika IF. Prace te musiały być bardzo dobrze ocenione i uznane za interesujące z punktu widzenia środowiska naukowego.

Dołączona do pracy dyskusja nt. aktywności biologicznej ekstraktów z propolisu jest dobrze napisana, chociaż, według mnie, mogłaby zawierać więcej odniesień do innych podobnych prac dostępnych w piśmiennictwie. Pracę można było także uzupełnić poprzez podanie struktur chemicznych badanych związków, co wzbogaciłoby dyskusję na temat zależności przeciwnowotworowego działania poszczególnych polifenoli od ich budowy. Rozumiem jednak, że Doktorantka chciała uniknąć zbyt wielu powtórzeń z treścią dołączonych publikacji.

Jako recenzent nie znalazłam w pracy większych uchybień, poza kilkoma literówkami. Jako osoba zainteresowana analizą środków leczniczych chciałabym dopytać o szczegóły dotyczące metody ilościowego oznaczania wybranych związków, w tym szczegóły dotyczące walidacji metody.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że Pani mgr Urszula Czyżewska przeprowadziła wiele różnorodnych badań, co wskazuje na Jej bardzo dobre umiejętności analityczne. Jednocześnie właściwa interpretacja wyników świadczy o Jej bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym. Praca Pani mgr Czyżewskiej jest ciekawa w aspekcie teoretycznym, a jednocześnie posiada wyraźny charakter aplikacyjny, co oceniam bardzo pozytywnie.

Otrzymane przez Nią wyniki uzupełniają i wzbogacają w istotny sposób obszar wiedzy o aktywności przeciwnowotworowej propolisu i jego składników. Wyniki te mogą być interesujące dla specjalistów z różnych działów farmacji i medycyny. Należy podkreślić, że dotychczas nie badano wpływu ekstraktów propolisowych na wzrost i rozwój komórek płaskonabłonkowego raka języka, co potwierdza oryginalność przeprowadzonych badań.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość pracy oraz opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach branżowych, jestem przekonana, że praca pt. *„Ocena składu chemicznego, właściwości cytotoksycznych etanolowych ekstraktów z propolisu w hodowli komórek raka płaskonabłonkowego”* spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i z przyjemnością wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Praca mgr Urszuli Czyżewskiej prezentuje wysoki poziom naukowy i dotyczy ważnego problemu, jakim jest terapia nowotworów jamy ustnej. W niektórych aspektach jest pracą nowatorską, wykonaną z użyciem nowoczesnych narzędzi. Jednocześnie jest to cykl publikacji o sumarycznej wartości IF > 4, co, zgodnie z Regulaminem wyróżniania prac doktorskich na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB, upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Wydziału z wnioskiem o jej wyróżnienie, co niniejszym czynię.

Lublin, 16-08-2016

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Leków
prof. dr hab. Anna Gumienczyk

