



**KATEDRA
I ZAKŁAD
BIOLOGII
Z GENETYKĄ**

**Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Katedra i Zakład Biologii z Genetyką
Ul. Chodźki 4A, 20 – 093 Lublin**

email: anna.kocka@umlub.pl

Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka-Kocka

Lublin 30.05.2022

Recenzja

Osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych i organizacyjnych w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego Panu dr n. farm. Sylwestrowi Ślusarczykowi na podstawie osiągnięcia naukowego pt. „Analiza fitochemiczna wybranych roślin leczniczych z uwzględnieniem ich wielokierunkowej bioaktywności”

Recenzja wykonana na zlecenie **Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**. Ocenę przeprowadziłam na podstawie dokumentów dostarczonych mi w formie papierowej i elektronicznej: 1. Autoreferatu 2. Wykazu osiągnięć naukowych albo artystycznych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny 3. Wykazu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z oświadczeniami współautorów, 4. Kopii dyplomu potwierdzająca uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, 5. Dokumentacji pozostałych osiągnięć naukowych, współpracy z instytucjami naukowymi, odbytych stażach w ośrodkach naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych oraz działań popularyzujących naukę pozwalającej na zapoznanie się z przebiegiem rozwoju naukowego i wydanie opinii w sprawie dotyczącej postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ocena formalna

Otrzymane materiały spełniają wymogi formalne określone ustawą Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2020 poz.85 ze zm.: Dz. U. z 2021 poz. 478) do uzyskania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Dane biograficzne i przebieg pracy zawodowej

Pan dr n. farm. Sylwester Ślusarczyk jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Tytuł zawodowy magistra farmacji uzyskał w 2001 roku. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych uzyskał w 2013 na podstawie rozprawy doktorskiej: „Właściwości przeciwpierwotniakowe, przeciwutleniające i hamujące aktywność enzymów prozapalnych *in vitro* substancji roślinnych z trzech gatunków *Salvia* oraz *Perovskia atriplicifolia*”.

W latach 2005-2013 Habilitant pracował jako asystent w Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu a od 2013 roku do chwili obecnej pracuje w tej samej jednostce na etacie adiunkta. W latach 2014-2017 pracował jako *PostDoc* w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów, Instytutu Upraw, Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Od 2001 roku do chwili obecnej pracuje w aptece czynnie jako farmaceuta.

Ocena merytoryczna

Osiągnięcia naukowego pt.: „Analiza fitochemiczna wybranych roślin leczniczych z uwzględnieniem ich wielokierunkowej bioaktywności”.

Osiągnięcie naukowe tworzą wyniki badań zawarte w cyklu 5 publikacji o łącznym IF = 14,1 MNiSW/KBN = 355 które powstały po uzyskaniu przez Habilitanta stopnia doktora nauk farmaceutycznych. W 4 pracach Habilitant jest pierwszym autorem, w jednej drugim autorem. Publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Natural Product Communication, International Journal of Molecular Sciences, Phytochemistry Letters, Molecules, Chemistry and Biodiversity*). Udział autora w pracach polegał na: opracowaniu koncepcji oraz planu pracy, wykonaniu większości badań, analizie i interpretacji wyników, napisaniu pracy, opracowaniu części graficznej oraz współudziale w korekcie edytorskiej pracy. Habilitant przedłożył stosowne oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim.

Oceniane prace naukowe są ze sobą logicznie powiązane, dotyczą niezwykle trudnego zagadnienia jakim jest analiza fitochemiczna matrycy roślinnej z wykorzystaniem technik spektralno-chromatograficznych, izolacja oraz określenie struktury wtórnych metabolitów roślinnych zawartych w matrycy roślinnej, która zazwyczaj charakteryzuje się ogromną różnorodnością chemiczną i zmiennością zarówno międzygatunkową jak i w obszarze tego samego gatunku. Tematyka prac badawczych eksploruje również interesujące zależności pomiędzy strukturą metabolitów roślinnych a ich aktywnością biologiczną.

W pierwszej pracy oryginalnej (P-1) Habilitant opracował metodę izolacji i identyfikacji głównych składników diterpenoidowych frakcji heksanowej o budowie norabietanu z korzeni *Perovskia atriplicifolia* Benth przy zastosowaniu techniki tandemowej LC-ESI-MS/MS. Z badanego materiału wyizolowane zostały: kryptotanszinon, 1-hydroksykryptotanszinon, miltiron, 1-oksomiltiron, tanszinon IIa, 1,2 didehydrotanszinon IIa, 1,2 didehydromiltironorazarukadiol oraz główny składnik frakcji fenolowej kwas rozmarynowy. Tożsamość tych związków potwierdzono metodami spektralnymi z wykorzystaniem techniki NMR. **Należy podkreślić, że większość związków została wyizolowana i zidentyfikowana po raz pierwszy dla tego gatunku.** Na podstawie uzyskanych wyników Habilitant wykazał, że *Perovskia atriplicifolia* Benth. może być obiecującym źródłem farmakologicznie czynnych diterpenów abietanoidowych w tym kryptotanszinonu.

Druga praca (P-2) jest kontynuacją badań rozpoczętych w publikacji pierwszej. Habilitant opracował protokół izolacji i wyodrębnił z frakcji heksanowej otrzymanej z korzeni *Perovskia atriplicifolia* Benth. **trzy opisane po raz pierwszy w naturze związki** z grupy diterpenów abietanoidowych: (1R)-1-acetoksytanszinon IIA, (15R)-1-oksoaegyptinon A, 1-oksoaegyptinon A, oraz izograndifoliol, **związek po raz pierwszy opisany dla tego gatunku.**

W trakcie optymalizacji metody izolacji związków Habilitant zastosował różne techniki chromatograficzne, w tym chromatografię otwartego złoża, chromatografię półpreparatywną oraz wysokosprawną chromatografię cieczową co potwierdza jego ogromną wiedzę i doświadczenie z zakresu chromatografii. Masę wyizolowanych związków ustalono z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru masowego HR-QTOF-MS. Strukturę wyodrębnionych związków Habilitant ustalił przy użyciu metod spektralnych (NMR jedno i wielowymiarowymi) oraz LC-ESI-MS/MS. W kolejnym etapie badań Habilitant wyznaczył *in vitro* zdolność hamowania aktywności acetylo i butyrylocholinesterazy. Dodatkowo badania te poszerzono o dokowanie molekularne w celu zrozumienia mechanizmów interakcji pomiędzy badanymi związkami a w/w enzymami. Habilitantowi udało się udowodnić, że wszystkie związki wykazują zdolność hamowania aktywności acetylo i butyrylocholinesterazy. **Trzy spośród badanych związków wykazały większą zdolność hamowania BChE niż użyta jako wzorzec pochodna galantaminy.** Natomiast siła hamowania AChE wszystkich badanych związków nie przekraczała 50% i była znacznie mniejsza niż substancji wzorcowej. Habilitant wykazał, że najsilniejszym i selektywnym inhibitorem BChE był izograndifoliol dla którego wartość $IC_{50} = 0,89 \mu M$ a procent hamowania wynosił 98,6. W ostatnim etapie badań Habilitant określił potencjalną toksyczność badanych związków korzystając z prognozy

specjalnej platformy internetowej ProTox-II. W wyniku przeprowadzonych analiz Habilitant wykazał, że żaden z związków nie powinien wykazywać cytotoksyczności.

Kolejnym osiągnięciem badawczym (P-3) Habilitanta było opracowanie i optymalizacja metody izolacji i identyfikacja związków polifenolowych z kłącza *Belamcandae chinensis* L. oraz określenie ich aktywności hamującej AChE i BChE. W toku badań przeprowadzono również dokowanie molekularne w celu poznania możliwych interakcji z tymi enzymami.

Habilitant wyizolował osiem związków należących do pochodnych z grupy izoflawonów były to: irisflorentyna, tectorygenina, iristektorigenina B, irigenina, irilina B, iridyna, tectorydyna, iristectorynaB, dwa stilbeny pikatanol i resweratrol oraz glikozyd ksantonu – mangiferyna. Strukturę wyodrębnionych związków potwierdzono metodami spektralnymi (NMR jedno i wielowymiarowymi) oraz LC-ESI-MS/MS.

Z użyciem HPLC-DAD-MS Habilitant opracował metodę pozwalającą na rozdział głównych składników analizowanego ekstraktu. Analiza danych otrzymanych z detektora DAD, MS, porównanie z dostępnymi wzorcami chemicznymi oraz piśmiennictwem pozwoliły na określenie struktury wszystkich jedenastu wykrytych związków. W celu lepszego zrozumienia mechanizmu działania hamującego aktywność AChE i BChE wykonano dokowanie molekularne związków o najwyższej aktywności: iriliny B, pikatanolu i resweratrolu. Wykazano, że badane związki blokują dostęp do kluczowych reszt biorących udział w normalnym funkcjonowaniu enzymu co może wyjaśnić hamujące działanie badanych związków.

W kolejnej pracy (P-4) Habilitant opracował metodę kompleksowej analizy jakościowej i ilościowej składu chemicznego wyciągów z różnych części gatunku *Coleus amboinicus* Lour. uprawianych w różnych strefach klimatycznych przy wykorzystaniu techniki analizy chromatograficznej LC-ESI-MS/MS. Następnie Habilitant ocenił potencjał antyoksydacyjny, zawartość składników pokarmowych i ich strawność. Habilitant porównał profile chemiczne surowca rosnącego w warunkach tropikalnych w Indonezji z tym który rósł w naszym klimacie na plantacji koło Poznania. Materiał zebrany w Polsce podzielono na liście, pędy, kwiaty i łodygi natomiast materiał ze strefy tropikalnej nie był tak sortowany.

Analiza jakościowa wyciągów z indonezyjskich upraw przeprowadzona z użyciem metody UHPLC-HRESI-MS wykazała, że zawierają one 34 główne związki, z których 11 to kwasy fenolowe, 10 należy do grupy flawonoidów a pozostałe 12 to diterpeny oraz jeden glikozyd monoterpenu (nepetazyd). W materiale z upraw polskich zidentyfikowano w liściach 22 związki (6 kwasów fenolowych, 13 flawonoidów i 3 diterpeny) w kwiatach 20 związków (8 kwasów fenolowych, 7 flawonoidów i 2 diterpeny) w korze 31 związków (18

kwasów fenolowych, 7 flawonoidów i 6 diterpenów) w łodygach 21 związków (8 kwasów fenolowych, 10 flawonoidów i 3 diterpeny). Większość z wykrytych związków została zidentyfikowana na podstawie widm fragmentacyjnych zgodnie z dostępnym piśmiennictwem oraz danymi zawartymi w dostępnych bazach. **Habilitant wykazał, że najwyższa zawartość związków polifenolowych występuje w liściach i kwiatach roślin uprawianych w Polsce.** Natomiast **materiał rosnący w Indonezji charakteryzują się dużą zawartością związków diterpenowych.** Na podstawie otrzymanych wyników Habilitant przeprowadził porównawczą wielowymiarową analizę danych z użyciem metod statystycznych: analizy głównych składowych (PCA) oraz analizę dyskryminacyjną (OPLS-DA). Wyniki analizy PCA tłumaczą 88,3% zmienności w obrębie próbek, widoczne jest tworzenie klastrów wyraźnie różnicujących próbki z Indonezji i Polski. Wszystkie ekstrakty z roślin uprawianych w Polsce dodatkowo korelowały z zawartością związków polifenolowych i wynikami testów potwierdzających ich silną aktywność antyoksydacyjną. Natomiast rośliny z upraw w Indonezji zawierały więcej białka w porównaniu do roślin uprawianych w Polsce.

Habilitant po raz pierwszy wykonał kompleksową analizę składu fitochemicznego gatunku *C. amboinicus*.

Ostatnia praca z cyklu (P-5) zawiera wyniki kompleksowej analizy jakościowej i ilościowej różnych wyciągów przygotowanych z surowca farmaceutycznego *Solidaginis Herba* przy użyciu analizy chromatograficznej LC-ESI-MS/MS oraz ocenę aktywności antyoksydacyjnej i potencjalnej mutagenności. Farmakopea Europea dopuszcza jako *Solidaginis Herba* dwa równoważne gatunki *S. gigantea* i *S. canadensis*. Habilitant określił profile chemiczne dla części nadziemnych i podziemnych obu gatunków, wykazał, że w częściach nadziemnych głównymi składnikami są glikozydy flawonoidów, których nie ma we frakcjach otrzymanych z części podziemnych. Pomędzy gatunkami występowały znaczne różnice ilościowe pomiędzy związkami we frakcjach polifenolowych. **Habilitant wykazał, że oba gatunki mają odmienny profil fitochemiczny i różnią się badaną aktywnością i nie powinny być traktowane jako gatunki równoważne.**

Podsumowując, **przedstawione osiągnięcie naukowe oceniam jednoznacznie pozytywnie.** Dr Sylwester Ślusarczyk we wskazanych do cyklu pracach naukowych właściwie formułuje hipotezy badawcze oraz właściwie dobiera narzędzia do ich weryfikacji, poprzez zastosowanie odpowiednich metod badawczych i statystycznych. Publikacje związane z osiągnięciem naukowym są współautorskie, z oświadczeń autora i współautorów wnioskuję, że udział Habilitanta w powstaniu wszystkich prac był znaczący, i spełniają one wymagania ustawowe osiągnięcia naukowego.

Ocena aktywności naukowej

Całkowity dorobek naukowy dr n. farm. Sylwestra Ślusarczyka obejmuje 36 publikacji z czego 6 przypada na okres przed uzyskaniem stopnia doktora $IF=8,22$, a 30 po jego uzyskaniu dla których IF bez cyklu $=76,581$ z cyklem $IF=90,707$. Całkowita liczba cytowań wynosi 349, bez autocytowań 317, a indeks Hirsha= 9 (według bazy *Web of Science Core Collection* z dnia 9.11.2021). 30 publikacji to prace oryginalne opublikowane w czasopismach z listy JCR a 6 pozostałych w czasopismach spoza listy.

Dorobek publikacyjny Habilitanta charakteryzuje wysoka spójność tematyki badawczej, walory naukowe oraz rozpoznawalność w środowisku naukowym wyznacza liczba cytowań jego prac.

Habilitant wykonał ponad 40 recenzji oryginalnych prac eksperymentalnych i prac przeglądowych dla czasopism z IF .

Na podkreślenie zasługuje fakt, że habilitant był kierownikiem projektu SONATA nr 2020/39/D/NZ9/01402 finansowanego przez NCN pt. „Elektroporacja pulsacyjna jako innowacyjna metoda w procesie tzw. dojenia korzeni, wykorzystana w adaptacji upraw roślin leczniczych w warunkach bezglebowych” 2021-2024, oraz kierownikiem projektu realizowanego w ramach badań statutowych Akademii Medycznej we Wrocławiu pt. „Analiza fitochemiczna składników fenolowych z gatunku *Lycopus lucidus* Turcz. Ex Bentham oraz ocena właściwości antyoksydacyjnych uzyskanych ekstraktów” co świadczy o jego umiejętności pozyskiwania funduszy na badania naukowe.

Ponadto był głównym wykonawcą lub wykonawcą w czterech innych projektach.

Do istotnych osiągnięć naukowych Habilitanta zaliczyć należy opracowanie metody identyfikacji toksyn cisu pospolitego *Taxus bacata* i ich metabolitów w płynach ustrojowych człowieka z zastosowaniem techniki HPLC-MS, która znalazła zastosowanie do potwierdzenia obecności tych związków w przebiegu zagrażającego życiu zatrucia samobójczego odwarem z liści cisu, u pacjenta hospitalizowanego na Oddziale Ratunkowym Szpitala Uniwersyteckiego we Wrocławiu.

Przedstawiając informację na temat istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni Habilitant wykazał współpracę naukową z: prof. Matthiasem Hamburgerem (Department of Pharmaceutical Biology, University of Basel, Switzerland) w zakresie badań parazytologicznych nad związkami pochodzenia roślinnego (*Salvia miltiorrhiza*, *Salvia yangi*, *Artemisia alba*), prof. Luísą Custódio (Centre of Marine Sciences, University of Algarve, Faculty of Sciences and Technology, Faro, Portugal,) w zakresie analiz HPLC-MS, identyfikacji jakościowej i ilościowej *Polygonum maritimum*, z prof. Ilkay E.

Orhan (Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, Turkey,) w zakresie analiz HPLC-MS, identyfikacji jakościowej i ilościowej (*Belamcanda chinensis*, *Perovskai atriplicifolia*, *Salvia glutinosa*) oraz współpracę krajową z wieloma ośrodkami naukowymi m.in. z: Katedrą Żywienia Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej z Poznania, Zakładem Biochemii i Jakości Plonów IUNG Puławy, Katedrą Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

W ramach podnoszenia swoich kwalifikacji zawodowych Habilitant odbył trzy staże krajowe: 1) w latach 2014-2017(Fuga-NCN) nr 2014/12/S/NZ9/00715 Krajowy Staż Naukowy po uzyskaniu stopnia dr. „Analiza metabolomiczna wybranych roślin leczniczych w oparciu o analityczne techniki spektroskopowe NMR oraz spektralne MS. Wielowymiarowa analiza zmienności, wtórnych metabolitów roślinnych pod wpływem czynników biotycznych i abiotycznych”, realizowany w Laboratorium Biochemii i Jakości Plonów w Instytucie Upraw Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach; 2) w roku 2007 - Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Farmakognozji pod kierownictwem prof. K. Głowniaka, Staż Ministerstwa Zdrowia (1 miesiąc); 3) w roku 2008-Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, K. i Z. Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin pod kierownictwem prof. J. Budzianowskiego. Staż Ministerstwa Zdrowia (1 miesiąc).

Oraz dwa zagraniczne staże naukowe: 1) w roku 2009 - (6 miesięcy) oraz 2) w roku 2012 - (miesiąc) oba staże zostały odbyte zostały w Laboratorium Biologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Bazylei, (Szwajcaria) pod kierownictwem prof. dr Matthiasa Hamburgera.

Podsumowując, dotychczasowy dorobek badawczo-naukowy dr n. farm. Sylwestra Ślusarczyka oceniam bardzo wysoko i stwierdzam, że całkowicie spełnia kryteria do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

Ocena działalności organizacyjnej, dydaktycznej oraz popularyzującej naukę

Dr n. farm. Sylwester Ślusarczyk jest nauczycielem akademickim zaangażowanym w prowadzenie i organizowanie zajęć dydaktycznych realizowanych w Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Prowadzi ćwiczenia z Biologii, Botaniki Farmaceutycznej dla studentów Farmacji i Analityki Medycznej oraz zajęcia fakultatywne. Był promotorem 6 obronionych doświadczalnych prac magisterskich oraz recenzentem 7 prac magisterskich. Habilitant pełnił również funkcję opiekuna prac doświadczalnych wykonywanych przez studentów odbywających staże w ramach praktyk IPSF i programu Erasmus z Indii, Niemiec, Turcji, Iranu i Ukrainy.

Dr n. farm. Sylwester Ślusarczyk pełnił funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim pani Izabeli Nawrot-Hadzik.

Habilitant był również członkiem komitetów organizacyjnych dwóch konferencji naukowych.

W ramach popularyzacji nauki dr Ślusarczyk brał czynny udział w organizowaniu i prowadzeniu warsztatów dla dzieci w ramach Uniwersytetu Dzieci, w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki prowadził wykłady i warsztaty w muzeum Farmacji we Wrocławiu, prowadził także autorski program dla dzieci ze szkoły w Łące Prudnickiej oraz warsztaty laboratoryjne dla klasy patronackiej z Liceum Ogólnokształcącego nr VII im K. K. Baczyńskiego we Wrocławiu.

Habilitant jest członkiem następujących towarzystw naukowych: *Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, *Gesellschaft für Arzneipflanzen und Naturstoff-Forschung*, *Phytochemical Society of Europe*, Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Podsumowanie

Bardzo wysoko oceniam całokształt dorobku naukowego Habilitanta i Jego aktywność naukową pod względem zarówno jakościowym jak i ilościowym. Pozytywnie oceniam również aktywność na polu organizacyjnym, dydaktycznym i popularyzującym naukę.

Osiągnięcie naukowe oraz całkowity dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny Habilitanta spełniają wymogi i kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego zgodnie z obowiązującymi w Polsce aktami prawnymi.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pana dr n. farm. Sylwestra Ślusarczyka do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka-Kocka
Specjalista Leku Roślinnego

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka-Kocka