

Gdańsk, 8.02.2024

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani magister Katarzyny Bednarskiej

pt: "Potencjał wybranych środków wazoprotekcyjnych i substancji roślinnych do hamowania nieenzymatycznej glikacji oraz pułapkowania reaktywnych związków  $\alpha$ -dikarbonylowych"

wykonanej pod kierunkiem promotora

Prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej

przedstawionej

**Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego  
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

Pragnę podziękować Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Bednarskiej pt: „Potencjał wybranych środków wazoprotekcyjnych i substancji roślinnych do hamowania nieenzymatycznej glikacji oraz pułapkowania reaktywnych związków  $\alpha$ -dikarbonylowych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Feckiej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Leku Roślinnego UM im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Temat pracy doktorskiej mgr Katarzyny Bednarskiej jest niezwykle aktualny i włącza się w nurt badań poszukujących substancji mogących skutecznie zapobiegać czy też stanowić efektywne leki w terapii cukrzycy. Cukrzyca jest jednym z głównych i narastających problemów zdrowotnych, dotyczy ludzi w każdym wieku i we wszystkich krajach świata. Powoduje przewlekłe zaburzenie zdrowia i przedwczesną śmierć. Według Światowej Organizacji Zdrowia i wielu ośrodków badań epidemiologicznych w latach 2000-2025 nastąpi podwojenie liczby chorych, szczególnie na cukrzycę typu 2 na świecie jak i w Polsce.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi cykl opublikowanych i powiązanych tematycznie 4 artykułów naukowych, 3 prac eksperymentalnych i 1 badania klinicznego, mianowicie

1. **Bednarska K.**, Fecka I. Potential of Vasoprotectives to Inhibit Non-Enzymatic Protein Glycation, and Reactive Carbonyl and Oxygen Species Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(18), 10026; <https://doi.org/10.3390/ijms221810026>
2. **Bednarska K.**, Fecka I., Scheijen J.L.J.M., Sanne A., Vangrieken P., Schalkwijk C.G. *A Citrus and Pomegranate Complex Reduces Methylglyoxal in Healthy Elderly Subjects: Secondary Analysis of a Double-Blind Randomized Cross-Over Clinical Trial.* *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(17), 13168; <https://doi.org/10.3390/ijms241713168>
3. **Bednarska K.**, Kuś P., Fecka I. *Investigation of the Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Methylglyoxal Trapping Effect of Galega officinalis L. Herb In Vitro.* *Molecules* 2020, 25(24), 5810; <https://doi.org/10.3390/molecules25245810>
4. **Bednarska K.**, Fecka I. *Aspalathin and Other Rooibos Flavonoids Trapped  $\alpha$ -Dicarbonyls and Inhibited Formation of Advanced Glycation End Products In Vitro.* *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(23), 14738; <https://doi.org/10.3390/ijms232314738>

We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w 3 korespondencyjnym. Prace są w większości dwu-autorskie (publikacja 1 i 4) lub trzy-autorskie (praca 3) i jedna jest pracą wieloautorską (publikacja 2: sześćo-autorska). W 3 publikacjach (1,3 i 4) udział Doktorantki polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metodologii, wykonaniu walidacji metody i poszczególnych analiz, obróbce otrzymanych danych, wizualizacji, pozyskaniu funduszy, korespondencji z redakcją. Natomiast w publikacji 2 obejmował wykonanie analiz, nadzorowanie otrzymanych danych, przygotowanie pierwotnej wersji tekstu manuskryptu, wizualizację wyników, przetwarzanie uzyskanych danych. Oświadczenia o udziałach poszczególnych współautorów są dołączone. Potwierdzają one, że mgr Katarzyna Bednarska jest głównym twórcą oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, zdefiniowanego w celu pracy doktorskiej. Wszystkie prace są opublikowane w czasopismach o wysokiej, wartości IF, w tym 3 w *International Journal of Molecular Sciences* (2021 IF- 6,2 i 2022/2023 IF- 5,6) oraz 1 w *Molecules* (IF- 4,4). Sumaryczny IF wynosi 21,8 a łączna wartość punktów MNiSW/KBN 560. Wartym podkreślenia, w kontekście mojej opinii, o wysokiej wartości naukowej przedstawionej dysertacji, jest fakt, że *International Journal of Molecular Sciences* jest czasopismem z Q1 – pierwszego kwartyła, natomiast *Molecules* z kwartyła drugiego - Q2.

Celem pracy było poszukiwanie/zidentyfikowanie nowych substancji o wysokim potencjale antyglykacyjnym i/lub pułapkującym  $\alpha$ -dikarbonyle [ $\alpha$ -DC (głównie metyloglioksal)] w porównaniu do uznanych związków o takiej aktywności (aminoguanidyny, metforminy, kwercetyny), które to zadanie Doktorantka zrealizowała perfekcyjnie, odnosząc



się w swoich badaniach nie tylko do konkretnych substancji pochodzenia roślinnego ale również uwzględniając ich obecność w przetworach z dwóch surowców roślinnych o potencjale hipoglikemizującym i antyoksydacyjnym, mianowicie ziela rutwicy *Galegae herba* (*Galega officinalis* L.) (zawierającego polifenole, pochodne guanidyny) oraz liści i wierzchołkowych części pędów aspalatu prostego (czerwonokrzew) (*Aspalathus linearis* (Burm. f.) R. Dahlgren), znanych jako herbata Rooibos fermentowana (czerwony rooibos) i niefermentowana (zielony rooibos) (polifenole). Postawiony i sformułowany przez Doktorantkę i Promotora pracy prof. dr hab. Izabelę Fecką, cel badawczy i jego cele cząstkowe były bardzo ambitne i ich realizacja wiązała się z wieloma nowymi wyzwaniami zarówno w sferze intelektualnej/naukowej jak również w obszarze umiejętności praktycznych /analitycznych. Wysoki poziom naukowej pracy zawdzięcza nie tylko głównej autorce – Kandydatce do stopnia doktora, ale jest on również związany z osobą promotora pracy – prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej, specjalizującej się w badaniach nad lekiem roślinnym i wyróżniającej się w tym obszarze znaczącymi osiągnięciami naukowymi.

Punktem wyjściowym do sformułowanego celu rozprawy było postawienie hipotezy, że środki wazoprotekcyjne, włączając syntetyczne i pochodzenia naturalnego środki flebotropowe, w tym związki flawonoidowe (należące do różnych grup – flawonole, flawony, flawanony, chalkony o charakterze aglikonów i ich formy glikozydowe, stosowane w terapii przewlekłej niewydolności żylnej, i ich niektóre analogi strukturalne) posiadają zdolność hamowania nieenzymatycznej glikacji i/lub neutralizowania reaktywnych  $\alpha$ -dikarbonyli. Doktorantka przebadła 13 związków flawonoidowych, zaliczanych do wspomnianych powyżej grup oraz 2 pochodne guanidyny wobec związków odniesienia: metforminy (leku przeciwcukrzycowego), dobesyłanu wapnia (leku stosowanego w mikroangiopatiach, w tym retinopatii cukrzycowej) oraz floroglucynolu. Kolejnym aspektem prowadzonych przez Doktorantkę badań była weryfikacja i porównanie potencjału antyoksydacyjnego (zmiatającego wolne rodniki oraz hamującego ich powstawanie) badanych związków, w kontekście potencjalnych własności hamowania utleniania cukrów prostych (glukozy, fruktozy), glikowanych biomolekuł i in. procesów, związanych z poziomem szkodliwych dla komórki końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE). Jednocześnie Doktorantka postanowiła, w oparciu o zaplanowane eksperymenty (modele *in vitro*) wyjaśnić mechanizmy leżące u podstaw efektu antyglykacyjnego (anty-AGE) oraz wskazać na elementy struktury chemicznej badanych związków, które są potencjalnie istotne dla zdolności wiązania MGO i innych  $\alpha$ -DC pochodzących głównie z metabolizmu węglowodanów. Efektem weryfikującym

osiągnięte w warunkach laboratoryjnych wyniki i wieńczącym cykl bardzo czasochłonných eksperymentów i analiz, było zaplanowanie i realizacja badania klinicznego dla związku (hesperydyny) o najwyższej aktywności antyglykacyjnej.

Przeprowadzone, w ramach prezentowanego osiągnięcia, badania są bardzo szerokie i złożone wykorzystujące różne modele *in vitro* i techniki analityczne, w tym przede wszystkim wysokosprawną chromatografię cieczową w sprzężeniu z detektorami DAD (UV-Vis), oraz spektrometrami mas z jonizacją ESI, w tym również tandemową spektrometrię mas MS/MS. Ich użycie umożliwiło m. in. badanie zdolności wiązania  $\alpha$ -dikarboonyli (MGO, GO) przez zarówno pojedyncze związki modelowe jak i składniki otrzymanych ekstraktów, rozpoznanie profilu fitochemicznego testowanych ekstraktów, oznaczanie stężeń  $\alpha$ -dikarboonyli (MGO, GO i 3-DG) w badaniu klinicznym. Przeprowadzenie badań w modelach *in vitro* z użyciem surowiczej albuminy wołowej (BSA) jako białka celowanego z wykorzystaniem metody spektrofluorymetrycznej umożliwiło śledzenie i ocenę reakcji wiązania  $\alpha$ -dikarboonyli przez wybrane związki lub przetwory substancji roślinnych oraz reakcji hamowania powstawania zaawansowanych końcowych produktów glikacji białek (AGE).

Doktorantka wykazała się wieloma umiejętnościami, zarówno w obszarze badań o charakterze farmakognostycznym jak i biochemicznym i klinicznym. Eksperymenty zostały zaplanowane zgodnie z obowiązującą „sztuką” w obszarach wymienionych i wykonane z ogromną starannością. Należy podkreślić, że przeprowadzenie tak wielu o różnym profilu badań i bardzo pogłębionej analizy wypracowanych wyników, jest efektem wyróżniającej się aktywności Doktorantki i jej dążenia do rozwoju i poszerzania zakresu posiadanych kompetencji zawodowych. Dowodem jest opis jej dotychczasowej ścieżki zawodowej oraz odbytych kursów zagranicznych i staży, szczególnie w zakresie badań klinicznych a także otrzymanych nagród i wyróżnień (Stypendium Rektora dla najlepszych studentów w roku akademickim 2018/2019; Stypendium Projakościowe Szkoły Doktorskiej za osiągnięcia w pracy naukowej w roku akademickim 2021/2022; I miejsca w kategorii prezentacji posterowych na Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie”, we Wrocławiu w latach 2020, 2021. Niewątpliwym sukcesem Doktorantki i bardzo wartościowym elementem rozprawy, o znaczeniu praktycznym (aplikacyjnym) są badania kliniczne, które przeprowadziła w ramach stażu naukowego w Katedrze Medycyny Wewnętrznej Uniwersytetu w Maastricht (Holandia) i wykazanie, że stosowanie produktu będącego kombinacją wyciągu z naowocni pomarańczy słodkiej (*Citrus × sinensis* (L.) Osbeck) i koncentratu soku z owocu granatowca właściwego (*Punica granatum*



L.) o standaryzowanej zawartości hesperydyny, obniża istotnie statystycznie stężenie metyloglioksalu w osoczu zdrowych osób w podeszłym wieku o 9.8%.

Sformułowane wnioski końcowe są dowodem na zrealizowanie zakładanego podstawowego celu pracy i celów cząstkowych. Wnoszą one m. in. nowe, ważne dane do ogólnej wiedzy o aktywności biologicznej związków flawonoidowych, które można uznać za substancje pułapkujące  $\alpha$ -dikarbonyle, a elementem struktury warunkującym ich aktywność, jak wykazała Doktorantka, jest układ floroglucynolu. Ponadto, Doktorantka słusznie wnioskuje, że takie związki flawonoidowe jak hesperetyna, hesperydyna, posiadające, jak udowodniła, właściwości antyglykacyjne i/lub pułapkujące  $\alpha$ -dikarbonyle, obok kwercetyny, mogą być w przyszłości potencjalnie wykorzystane w prewencji powikłań naczyniowych u pacjentów z cukrzycą lub w stanie przedcukrzycowym, a także w innych powikłaniach cukrzycy wynikających z akumulacji MGO i AGE. Podobnie badane przez Nią przetwory roślinne z *Galega officinalis* L. i *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R.Dahlgren zawierające flawonoidy, i inne polifenole lub pochodne guanidyny, o właściwościach hamujących nieenzymatyczną glikację, (m.in. przez wychwytywanie  $\alpha$ -dikarbonyli i właściwości przeciwutleniające) w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w profilaktyce schorzeń związanych z nadmiernym wytwarzaniem AGE i  $\alpha$ -dikarbonyli.

Wykazanie w oparciu o użyte związki modelowe (bioflawonoidy, pochodne guanidyny, dobesyłan wapnia), że składowymi efektu antyglykacyjnego są zdolność substancji do pułpkowania  $\alpha$ -dikarbonyli oraz aktywność przeciwutleniająca jest również cennym rezultatem tej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska od strony edytorskiej nie budzi zastrzeżeń. Obejmuje streszczenie, abstrakt w języku angielskim, wprowadzenie, cel podjętych badań, materiały i metody, najważniejsze wyniki i podsumowanie, wnioski i piśmiennictwo oraz osiągnięcia (etapy ścieżki zawodowej), kserokopie publikacji wchodzących w skład cyklu, oświadczenia współautorów i opis całkowitego dorobku naukowego. Mgr Katarzyna Bednarska jest współautorką jeszcze dodatkowych 3 publikacji, które są związane z tematyką rozprawy i nie zostały włączone do cyklu [3 publikacje w czasopiśmie *Molecules*, 2022 (2) i 2023 (1)].

We wprowadzeniu, obok ogólnej i krótkiej charakterystyki cukrzycy jako jednostki chorobowej, Doktorantka szeroko opisuje znaczenie MGO, którego zwiększone wytwarzanie w komórkach w warunkach hiperglikemii odgrywa kluczową rolę w rozwoju i progresji powikłań naczyniowych w cukrzycy. Nasuwa się pytanie, które kieruję do Doktorantki dotyczące naturalnych źródeł MGO: Jaki wpływ u pacjentów z cukrzycą/lub osób zdrowych

będzie miało stosowanie krótko- lub długoterminowe produktów naturalnych, o wysokiej zawartości MGO związku generalnie uznawanego za substancję o silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym? Kieruję również prośbę o wyjaśnienie takiego twierdzenia „leki wazoprotekcyjne i ich strukturalne analogi, szczególnie hesperetyna, hesperydyna i dobesyłan wapnia.....” ?

Podsumowując wyrażam opinię, że przedstawiona rozprawa doktorska, jej treść, forma prezentuje wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej mgr Katarzyny Bednarskiej w dyscyplinie nauki farmaceutyczne a osiągnięte wyniki, poprowadzenie ich dyskusji, wnioski końcowe świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W zakończeniu, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Bednarskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ( Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Bednarskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Bednarskiej kierując się jej wysoką wartością naukową.

Katedra i Zakład Farmakogenetyki  
i Ośrodkiem Badań Leczniczych  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a  
80-210 Gdańsk  
prof. dr hab. n. farm. Mirosława Złazka-Barenowska



kierownik