

## A U T O R E F E R A T

1. Imię i nazwisko: **Paweł Olczyk**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- tytuł magistra farmacji, Śląska Akademia Medyczna, 1999 r.
- stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych, uzyskany na podstawie wyróżnionej rozprawy doktorskiej pt.: „*Wpływ Propolu T na wybrane składniki macierzy pozakomórkowej w przebiegu leczenia doświadczalnych ran oparzeniowych*”, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląska Akademia Medyczna, 2007
- tytuł specjalisty w zakresie farmacji aptecznej, Centrum Egzaminów Medycznych, Łódź, 2010

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

Od ukończenia studiów do chwili obecnej jestem pracownikiem Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (do 2007 roku: Śląska Akademia Medyczna):

- 1.10.1999 – 30.09.2007 – asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej
- 1.10.2007 – 30.07.2012 – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej
- 1.08.2012 – nadal – adiunkt w Zakładzie Farmacji Aptecznej, Katedry Technologii Postaci Leku

4. Osiągnięcie naukowe, wynikające z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

- a. Cykl publikacji pod wspólnym tytułem „**Ocena oddziaływania propolisu na przebudowę tkanki łącznej w trakcie regeneracji termicznych uszkodzeń skóry**”, (IF: łącznie **8.317**; punktacja KBN/MNiSW: łącznie **195**)

**P. Olczyk**, K. Komosińska-Vassev, E.M. Koźma, K. Winsz-Szczotka, J. Stojko, K. Klimek, K. Olczyk: Assessment of glucuronosyl epimerisation of dermatan sulfate chains in the course of burned wound healing. 2010. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 54, 625-629.

Impact Factor: **0.321**; punktacja KBN/MNiSW: **20**

*Wkład habilitanta\*: współautorstwo koncepcji pracy, udział w wykonaniu ilościowej analizy epimeryzacji glukuronozylowej siarczanów dermatanu w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu*

**P. Olczyk**, K. Komosińska-Vassev, K. Winsz-Szczotka, E. M. Koźma, G. Wisowski, J. Stojko, K. Klimek, K. Olczyk: Propolis modulates vitronectin, laminin, and heparan sulfate/heparin expression during experimental burn healing. 2012. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 13,932-941.

Impact Factor: **1.108**; punktacja KBN/MNiSW: **15**

*Wkład habilitanta\*: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu analiz ilościowych lamininy i witronektyny oraz – analiz ilościowych i jakościowych siarczanów heparanu/heparyn w przebiegu gojenia się doświadczalnych ran oparzeniowych, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje*

**P. Olczyk**, G. Wisowski, K. Komosińska-Vassev, J. Stojko, K. Klimek, M. Olczyk, E. M. Koźma: Propolis modifies collagen types I and III accumulation in the matrix of burnt tissue. 2013. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 423809, 1-10.

Impact Factor: **1.722**; punktacja KBN/MNiSW: **40**

*Wkład habilitanta\*: koncepcja pracy, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu analiz ilościowych i jakościowych kolagenów typu I i typu III w przebiegu gojenia się doświadczalnych uszkodzeń termicznych skóry, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje*

**P. Olczyk**, P. Ramos, K. Komosińska-Vassev, J. Stojko, B. Pilawa: Positive effect of propolis on free radicals in burn wounds. 2013. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 356737, 1-12.

Impact Factor: **1.722**; punktacja KBN/MNiSW: **40**

*Wkład habilitanta\*: projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w ocenie oddziaływania propolisu na ekspresję wolnych rodników w eksperymentalnych ranach oparzeniowych, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje*

**P. Olczyk**, P. Ramos, M. Bernaś, K. Komosińska-Vassev, J. Stojko, B. Pilawa: Microwave saturation of complex EPR spectra and free radicals of burnt skin treated with apitherapeutic agent. 2013. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 545201: 1-9.

Impact Factor: **1.722**; punktacja KBN/MNiSW: **40**

*Wkład habilitanta\*: projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w oszacowaniu nasycenia mikrofalowego widm spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz ekspresji wolnych rodników w ranach oparzeniowych*

*skóry poddanych działaniu apiterapeutyku, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje*

**P. Olczyk, P. Ramos, M. Bernaś, K. Komosińska-Vassev, J. Stojko, B. Pilawa:** Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to comparative examination of different groups of free radicals in thermal injuries treated with propolis and silver sulphadiazine. 2013. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 851940, 1-11.

Impact Factor: **1.722**; punktacja KBN/MNiSW: **40**

*Wkład habilitanta\*: projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w analizie spektralnej, w celu dekonwolucji wieloskładnikowych widm EPR uszkodzeń termicznych skóry traktowanych propolisem i solą srebrową sulfadiazyny, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje*

\*do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia wszystkich współautorów pracy, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

- b. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### **Cel naukowy:**

Propolis, naturalny produkt pszczoły o udowodnionej aktywności immunomodulującej, przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej, antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej, przeciw pasożytniczej i przeciwgrzybiczej, może stymulować reepitelizację oraz skracać okres gojenia (1, 2). Aktualnie, stosowana jako „złoty standard” w miejscowym leczeniu ran pooparzeniowych, sól srebrowa sulfadiazyny (SSD), odpowiedzialna jest za występowanie szeregu działań ubocznych (3). SSD może powodować nie tylko rozwój srebrowicy, niewydolność organów wewnętrznych (wątroby, śledziony, nerek) wywołaną ogólnoustrojową akumulacją srebra, czy – ze względu na obecność sulfadiazyny – stan zapalny skóry, rumień wielopostaciowy i ostrą anemię hemolityczną, lecz także – może wywierać działanie cytotoksyczne na keratynocyty i fibroblasty (3, 4). Opisane cytotoksyczne oddziaływanie może „efektywnie” wydłużać proces gojenia.

Naprawa uszkodzeń tkankowych – „fundamentalna” odpowiedź ustroju na zranienie, warunkująca zastąpienie uszkodzonych struktur żywą tkanką, przywracającą integralność skóry, może być „podzielona” na cztery fazy – hemostazę, zapalenie, proliferację oraz „remodeling” (5, 6). Omawiany proces stanowi wysoce skoordynowaną reakcję wielu typów komórek, odpowiedzialnych za syntezę szeregu cytokin, czynników wzrostowych, lecz także składników macierzy pozakomórkowej (ECM), w tym – glikozoaminoglikanów (GAGs) (7), niekolagenowych glikoprotein, tj. lamininy (LN) i witronektyny (VN) (8) oraz kolagenu typu I i typu III (5, 9). Rodzinę glikozoaminoglikanów podzielić należy na siarczany chondroityny/dermatanu (CS/DS), siarczany heparanu/heparyny (HS/H) czy siarczany keratanu (KS) oraz kwas hialuronowy (HA), regulujące komórkową adhezję, migrację, różnicowanie i proliferację, oraz

formowanie i metabolizm ECM (10, 11). Wymienione funkcje powiązane są z właściwościami GAGs, dotyczącymi wiązania i modulowania aktywności szerokiego repertuaru białek, tj. czynników wzrostowych, cytokin, morfogenów czy enzymów (12).

Akumulacja niekolagenowych glikoprotein – lamininy i witronektyny – w macierzy uszkodzeń termicznych w przebiegu gojenia, wymagana jest do regulacji migracji i proliferacji komórek epidermalnych i keratynocytów, adhezji fibroblastów czy kontrakcji ECM (13, 14, 15).

Kolageny (I i III – główne typy kolagenów skóry, syntetyzowane w przeważających ilościach w przebiegu procesu gojenia) stanowią strukturalnie i czynnościowo kluczowe molekuly, odpowiedzialne za formowanie rusztowania tkanki łącznej, uczestnicząc także w hemostazie, odpowiedzi zapalnej, oraz – wzroście, różnicowaniu czy migracji komórkowej (16, 17, 18). Białka te ponadto uczestniczą w regulacji czynności sygnałnej komórek, angiogenezie, ekspresji cytokin i czynników wzrostowych, oddziaływaniach z metaloproteinazami macierzy (MMPs) i ich tkankowymi inhibitorami, stanowiąc nieodłączny element procesu reepitelializacji (16, 17, 18).

Wolne rodniki powstają w macierzy ran oparzeniowych w procesie termolizy (19). W wyniku oddziaływania wysokich temperatur, rozpadowi ulegają wiązania chemiczne molekuł strukturalnych skóry, prowadząc do występowania cząsteczek posiadających niesparowane elektrony (20). W następstwie tego różne rodzaje wolnych rodników powstawać mogą w skórze jako kompartmentie obfitującym w liczne typy molekuł strukturalnych. Ze względu na zawartość niesparowanych elektronów, wspomniane cząsteczki lub ich fragmenty stanowią wysoce reaktywne i niestabilne molekuly. Mogą one determinować różne typy biochemicznych reakcji w skórze i sąsiadujących tkankach (21). Poszczególne substancje czynne, zawarte w propolisie były szczegółowo analizowane, jednakże niewiele prac opisuje wpływ omawianego apiterapeutyku – w szczególności na macierz pozakomórkową tkanki łącznej, oraz na ekspresję wolnych rodników, w przebiegu gojenia doświadczalnych uszkodzeń termicznych (2).

Dlatego też, zasadniczym celem cyklu prac objętych wspólnym tytułem: **„Ocena oddziaływania propolisu na przebudowę tkanki łącznej w trakcie regeneracji termicznych uszkodzeń skóry”** było:

1. Określenie leczniczej aktywności czynnika apiterapeutycznego względem procesu regeneracyjno-reparacyjnego, poprzez ilościową i/lub jakościową ocenę cząsteczek macierzy uszkodzeń termicznych, na podstawie:
  - a. oszacowania epimeryzacji glukuronozylowej siarczanów dermatanu (DS) (warunkującej strukturalną różnorodność DS, odpowiedzialnej za tworzenie swoistych sekwencji łańcuchowych o kluczowym znaczeniu w przebiegu procesu gojenia się ran), wyizolowanych z ran oparzeniowych, zgodnie z podatnością tych GAGs na enzymatyczną depolimeryzację, z następowym elektroforetycznym rozdziałem opornych na trawienie fragmentów łańcuchów glikanowych
  - b. charakterystyki zmian zawartości lamininy (LN), witronektyny (VN) i siarczanów heparanu/heparynu (HS/H), podczas gojenia eksperymentalnych ran oparzeniowych,

- z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego oraz enzymatycznej depolimeryzacji, z następowym rozdziałem elektroforetycznym
- c. oszacowania akumulacji kolagenu typu I i typu III w macierzy uszkodzeń termicznych, w oparciu o metodę rezonansu plazmonów powierzchniowych oraz na podstawie charakterystyki profilu komponentów kolagenowych
2. Oszacowanie wpływu propolisu na ekspresję wolnych rodników w macierzy pozakomórkowej, w przebiegu regeneracji uszkodzeń termicznych, w oparciu o:
- a. weryfikację hipotezy o korzystnym wpływie propolisu na gojenie ran oparzeniowych, w oparciu o zastosowanie absorpcji mikrofal przez próbki tkankowe umieszczone w polu magnetycznym; została zaproponowana innowacyjna procedura numeryczna analizy spektralnej
  - b. ocenę użyteczności nasycenia mikrofalowego widm spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do wyznaczania liczby grup wolnych rodników występujących w ranach oparzeniowych, traktowanych propolisem
  - c. znalezienie metody oznaczania rodzajów i koncentracji różnych grup wolnych rodników w łożysku ran oparzeniowych, po zastosowaniu wysokiej temperatury, podczas eksperymentalnego wywoływania ran oparzeniowych; różne grupy wolnych rodników były oceniane w skórze ran oparzeniowych leczonych propolisem i solą srebrową sulfadiazyny

Zastosowana w doświadczeniach maść propolisowa została zaakceptowana przez Polski Instytut Higieny i pozyskana z firmy ApiMed. 1 % krem soli srebrowej sulfadiazyny (SSD) pozyskany został z firmy Lek Polska. Cztery 16 tygodniowe świnię rasy polska biała zwisłoucha, zostały wybrane jako zwierzęta eksperymentalne, ze względu na liczne podobieństwa skóry omawianego gatunku zwierząt do skóry ludzkiej, takie jak zbliżona grubość i struktura naskórka oraz skóry właściwej, struktura połączenia naskórka ze skórą właściwą, struktura tkanki podskórnej, czy – liczba i rozmieszczenie naczyń krwionośnych (22, 23). Ponadto, ludzka i wieprzowa skóra wykazują podobieństwa pod względem szybkości proliferacji komórek nabłonkowych, typu syntetyzowanych przez komórki nabłonkowe białek keratynowych jak i lipidowego składu warstwy zrogowaciałej keratynocytów (22, 23). Rany pooparzeniowe skóry wykonano według standardowego modelu Hoekstra i wsp. (22). Świnię rasy polskiej białej zwisłouchy, przed – jak i w trakcie eksperymentu, przebywały w jednakowych warunkach zoohigienicznych, zgodnie ze standardami G.L.P., określonymi w polskim prawie weterynaryjnym. Biopsje, w trzech powtórzeniach, pobierane były (przed oparzeniem), jak również z miejsc wypełniających pole ran po uszkodzeniu termicznym według standardowego modelu Hoekstra i wsp. (22).

Izolacja GAGs przeprowadzona została z zastosowaniem metody Scotta (24), w modyfikacji Van Amerongena i wsp. (25). W skrócie, próbki tkankowe po homogenizacji z acetonem i zważeniu, zostały poddane trawieniu papainą celem oddzielenia łańcuchów glikozoaminoglikanów od białek rdzeniowych proteoglikanów. Z uzyskanych hydrolizatów wytrącono peptydy, za pomocą kwasu trichlorooctowego. Następnie GAGs

poddano dializie, precypitacji z etanolem, rozpuszczono w octanie potasu i powtórnie wytrącono. Całkowitą zawartość GAGs oceniano w oparciu pomiar stężenia kwasów heksuronowych (26). Próbki wyizolowanych GAGs zostały poddane elektroforezie na octanie celulozy, przed jak i po zastosowaniu enzymów swoiście eliminujących poszczególne typy tych związków, t.j. chondroitynazy ABC (pH 6.0) i chondroitynazy ABC (pH 8.0). Rozdział elektroforetyczny glikozoaminoglikanów został wykonany zgodnie z metodą opisaną przez Komosińską-Vassev i wsp. (28).

W wyniku oceny epimeryzacji siarczanów dermatanu oszacowano zawartość disacharydów DS, włączając IdoA (kwas iduronowy) oraz GlcA (kwas glukuronowy), poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 232 nm, wykazywanej przez nienasycone produkty degradacji tych GAGs, uzyskane działaniem odpowiednio, chondroitynazy ABC oraz chondroitynazą B (13, 29).

Ekstrakcja witronektyny i lamininy z próbek tkankowych prowadzona została w oparciu o metodę Takasaki i wsp. (30). Oceny zawartości lamininy i witronektyny w osadach białkowych dokonano z zastosowaniem mysich przeciwciał przeciwko lamininie, króliczych przeciwciał przeciw witronektynie, oraz odpowiednich drugorzędowych przeciwciał. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm, przy użyciu metody ELISA.

Ekstrakcję kolagenów typu I i typu III przeprowadzono w następujący sposób: próbki tkankowe, po ich homogenizacji z acetonem i zważeniu, poddano działaniu kwasu octowego, a następnie trawiono pepsyną. Lizaty tkankowe odwirowano, a uzyskane supernatanty zebrano i poddano liofilizacji (31). Przeciwciała przeciwko kolagenowi typu I i kolagenowi typu III poddano biotynylacji. Niezwiązaną biotynę usunięto, stosując dializę względem wody destylowanej i poddano liofilizacji. Wydajność reakcji biotynylacji przeciwciał sprawdzono testem EZ biotin Quantitation. Oceny zawartości kolagenu w materiale tkankowym, wyizolowanym z doświadczalnych ran oparzeniowych, dokonano z zastosowaniem techniki rezonansu plazmonów powierzchniowych (32, 33). Celem oceny profilu komponentów kolagenu typu I, uwolnionych działaniem pepsyny z macierzy ran oparzeniowych, uzyskane hydrolizaty tkankowe poddano elektroforezie w gradientowym żelu poliakryloamidowym, w obecności siarczanu dodecylosodowego (SDS-gradient PAGE), bez stosowania czynników redukujących wiązania dwusiarczkowe, zgodnie z metodą Laemmli (34). Dla oceny interferencji kolagenu typu III w uzyskane rozdziały elektroforetyczne, wybrane żełe poddano alternatywnej procedurze, obejmującej elektrotransfer rozdzielonych komponentów kolagenowych na błony Immobilon P, po czym – immunoblotting przeciwciał przeciwko kolagenowi typu III. Profil komponentów kolagenu typu III, uwolnionych działaniem pepsyny z macierzy ran oparzeniowych, oceniany był za pomocą SDS- gradient PAGE oraz poprzez zastosowanie techniki Western blotting. Komponenty kolagenowe obecne w hydrolizatach tkankowych zostały rozdzielone za pomocą elektroforezy w gradientowym żelu poliakryloamidowym, w obecności siarczanu dodecylosodowego i dithiothreitolu, poddano elektrotransferowi na błony Immobilon P. W dalszej kolejności błony zostały zablokowane i poddane działaniu polikonalnych króliczych przeciwciał.

Wolne rodniki ran oparzeniowych analizowano z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Widma mierzono za pomocą spektrometru EPR na pasmo X (9.3 GHz) z modulacją pola magnetycznego 100 kHz Firmy Radiopan (Poznań). Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM101 Firmy EPRAD (Poznań). Wpływ propolisu i soli srebrowej sulfadiazyny na koncentrację i właściwości wolnych rodników w ranach oparzeniowych oceniano po 0, 3, 5, 10, 15 i 21 dniach terapii. Dla porównania wykonano analizy widm EPR ran oparzeniowych traktowanych solą fizjologiczną i podłożem maści propolisowej. Widma EPR w postaci pierwszej pochodnej absorpcji rejestrowano przy mocach mikrofalowych z zakresu 2.2-70 mW. Dla widm EPR rejestrowanych przy mocy mikrofalowej 2.2 mW analizowano następujące parametry: współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$ , szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ), amplitudę ( $A$ ) oraz intensywność integralną ( $I$ ). Współczynnik  $g$  wyznaczono z warunku rezonansu (35, 36). Intensywność integralną ( $I$ ) obliczono poprzez dwukrotne całkowanie linii EPR (35, 36). Dodatkowo dla wybranych próbek (0, 5 i 21 dni po terapii) wyznaczono wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę ( $A$ ) i szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR ran oparzeniowych w celu określenia rodzaju poszerzenia (jednorodne lub niejednorodne) widm rezonansowych (35, 36). Analizowano dla tych próbek także wpływ mocy mikrofalowej na kształt linii EPR. Sprawdzone, czy parametry asymetrii  $A_1/A_2$  oraz  $B_1/B_2$  widm EPR zależą od mocy mikrofalowej. Zmiana symetrii linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej wskazuje na złożony układ wolnych rodników w próbce (35, 36). Koncentrację wolnych rodników w testowanych próbkach wyznaczono poprzez porównanie intensywności integralnej ich widm EPR z intensywnością integralną widm EPR wzorca – ultramaryny (35, 36). Jako drugi wzorzec zastosowano kryształ rubinu ( $Al_2O_3:Cr^{3+}$ ) na stałe zamocowany we wnęce rezonansowej. Wyznaczono ponadto liczbę grup wolnych rodników oraz ich koncentrację w ranach oparzeniowych po zakończeniu terapii (21 dni) propolisem i solą srebrową sulfadiazyny. Wyznaczono liczbę, kształt i parametry linii składowych w widmach EPR rejestrowanych bez efektu nasycenia przy niskiej mocy mikrofalowej wynoszącej 2.2 mW. Widma całkowite przybliżono za pomocą superpozycji dwóch (GG, LL, GL) oraz trzech (GGG, LLL, GGL, GLL) linii o różnym kształcie (G – linia Gaussa, L – Linia Lorentza). Znalezione najlepsze przybliżenia kształtu eksperymentalnych widm EPR liniami teoretycznymi. Dla linii składowych wyznaczono szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ), amplitudę ( $A$ ) oraz udział procentowy (%) intensywności linii w widmie całkowitym. Liczba linii składowych w widmie EPR oznacza liczbę różnych rodzajów wolnych rodników w próbce (35, 36). Koncentracje poszczególnych rodzajów wolnych rodników w próbkach wyznaczono korzystając ze znajomości koncentracji całkowitej oraz udziałów procentowych odpowiednich linii składowych w widmie wypadkowym. Zastosowano ciągłe nasycenie mikrofalowe widm EPR do wyznaczenia liczby grup wolnych rodników występujących w ranach oparzeniowych traktowanych propolisem po 5 dniach terapii. W analizach wykorzystano efekt odmiennego nasycenia mikrofalowego linii EPR różnych rodzajów wolnych rodników (35, 36). Doświadczalne widma EPR zarejestrowane przy mocach mikrofalowych [mW]: 2.2, 7.0, 11.1, 22.2, 35.1, 55.3 oraz 70.0, przybliżono sumą trzech linii składowych. Dokonano dekonwolucji widm

eksperymentalnych na następujące linie składowe: trzy linie Gaussa (GGG), trzy linie Lorentza (LLL), dwie linie Gaussa i jedną linię Lorentza (GGL), jedną linię Gaussa i dwie linie Lorentza (GLL). Wyznaczono szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ), amplitudę (A) oraz udział procentowy (%) intensywności linii składowych w widmie całkowitym.

Projekt badań uzyskał akceptację Okręgowej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, z siedzibą w Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach.

Piśmiennictwo:

1. McLennan, S.V., Bonner, J., Milne, S., Lo, L., Charlton, A., Kurup, S., Jia, J., Yue, D.K., Twigg, S.M. The anti-inflammatory agent propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Rep. Reg.* 2008; 16: 706–713.
2. Sforcin, J.M., Bankova, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 2011; 133: 253–260.
3. Brandt, O., Mildner, M., Egger, A.E., Groessl, M., Rix, U., Posch, M., Keppler, B.K., Strupp, C., Mueller, B., Stingl, G. Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomedicine.* 2012; 8: 478–488.
4. Sandri, G., Bonferoni, M.C., D'Autilia, F., Rossi, S., Ferrari, F., Grisoli, P., Sorrenti, M., Catenacci, L., Del Fante, C., Perotti, C., Caramella, C. Wound dressings based on silver sulfadiazine solid lipid nanoparticles for tissue repairing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013; 84: 84–90.
5. Yates, C.C., Hebda, P., Wells, A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. *Birth. Defects Res. C.* 2012; 96: 325–333.
6. Utz, E.R., Elster, E.A., Tadaki, D.K., Gage, F., Perdue, P.W., Forsberg, J.A., Stojadinovic, A., Hawksworth, J.S., Brown, T.S. Metalloproteinase expression is associated with traumatic wound failure. *J. Surg. Res.* 2010; 159: 633–639.
7. Siméon, A., Wegrowski, Y., Bontemps Y., Maquart, F.X. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2++</sup>. *J. Invest. Dermatol.* 2000;115: 962–968.
8. Schultz, G.S., Wysocki, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Rep. Reg.* 2009;17: 153–162.
9. Reinke, J.M., Sorg, H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012; 49: 35–43.
10. Afratis, N., Gialeli, Ch., Nikitovic, D. Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A.D., Pavão, M.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 2012; 279: 1177–1197.
11. Im, A., Kim, Y.S. Role of glycosaminoglycans in wound healing. *Arch. Pharm. Sci. Res.* 2009; 1: 106–114.
12. Vassal-Stermann, E., Durantou, A., Black, A.F., Azadigui, G., Demaude, J., Lortat-Jacob, H., Breton, L., Vivès, R.R. A New C-Xyloside induces modifications of GAG expression, structure and functional properties. *PLoS One.* 2012; 7: e47933.
13. Chen, Y., Shi-Wen, X., van Beek, J., Kennedy, L., McLeod, M., Renzoni, E.A., Bou-Gharios, G., Wilcox-Adelman, S., Goetinck, P.F., Eastwood, M., Black, C.M., Abraham, D.J., Leask, A. Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor- $\beta$ /activin-

- linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease. *Am. J. Pathol.* 2005;167:1699–1711.
14. Goh, Y.Y., Pal, M., Chong, H.C., Zhu, P., Tan, M.J., Punugu, L., Tan, C.K., Huang, R.L., Sze, S.K., Tang, M.B., Ding, J.L., Kersten, S., Tan, N.S. Angiopoietin-like 4 interacts with matrix proteins to modulate wound healing. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 32999–33009.
  15. Kikkawa, Y., Takaki, S., Matsuda, Y., Okabe, K., Taniguchi, M., Oomachi, K., Samejima, T., Katagiri, F., Hozumi, K., Nomizu, M. The influence of tribenoside on expression and deposition of epidermal laminins in HaCaT cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33: 307–310.
  16. Iyyam Pillai, S., Palsamy, P., Subramanian, S., Kandaswamy, M. Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharm. Biol.* 2010; 48: 1198 – 1206.
  17. Brett, D. A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds.* 2008; 20: 12.
  18. Rangaraj, A., Harding, K., Leaper, D. Role of collagen in wound management. *Wounds UK.* 2011; 7: 54 – 63.
  19. Shimizu, S., Tanaka, H., Sakaki, S., Yukioka T., Matsuda H., Shimazaki, S. Burn depth affects dermal interstitial fluid pressure, free radical production, and serum histamine levels in rats. *J. Trauma.* 2002; 52: 683–687.
  20. Park, B.H., Saxer, C., Srinivas, S.M., Nelson, J.S., de Boer, J.F. In vivo burn depth determination by high-speed fiber-based polarization sensitive optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 2001; 6: 474–479.
  21. Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I., Kohen, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed. Pharmacother.* 2007: 61; 412–422.
  22. Hoekstra, M. J., Hupkens, P., Dutrieux, R.P., Bosch, M.M.C., Brans, T.A., Kreis, R.W. A comparative burn wound model in the New Yorkshire pig for the histopathological evaluation of local therapeutic regimens: silver sulfadiazine cream as a standard. *Br. J. Plast. Surg.* 1993; 46: 585–589.
  23. Vranckx, J.J., Yao, F., Petrie, N., Augustinova, H., Hoeller, D., Visovatti, S., Slama, J., Eriksson, E. In vivo gene delivery of Ad-VEGF121 to full thickness wounds in aged pigs results in high levels of VEGF expression but not in accelerated healing. *Wound Repair Regen.* 2005; 13: 51–60.
  24. Scott, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues, in: Glick D. (Ed.), *Methods of biochemical analysis*, Wiley, New York, USA, 1960; 145–197.
  25. Van Amerongen, J.P., Lemmens, A.G., Tonino, G.J.M. Glycosaminoglycans in dental pulp,” in: Olgart I.K. (Ed.), *Dynamic aspects of dental pulp: molecular biology, pharmacology and pathophysiology*, Chapman and Hall, London, UK, 1990; 259–276.
  26. Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 1973; 54: 484–489.
  27. Gu, K., Linhardt, R. J., Laliberte, M., Gu K., Zimmermann, D.R. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glucuronidases from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem. J.* 1995; 312: 569–577.
  28. Komosinska-Vassev, K., Winsz-Szczotka, K., Kuznik-Trocha, K., Olczyk, P., Olczyk, K. Age-related changes of plasma glycosaminoglycans. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 46: 219–224.
  29. Ekmekçi, O.B., Ekmekçi, H. Vitronectin in atherosclerotic disease. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 368: 77–83.
  30. Takasaki, I., Chobanian, A.V., Brecher, P. Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:17686–17694.

31. Murata, K., Motayama, T., Kotake, C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. 1986. 60: 251–262.
32. Gouzy, M.F., Kess, M., Krämer, P.M. A SPR-based immunosensor for the detection of isoproturon. *Biosens Bioelectron*. 2009; 24: 1563–1568.
33. Sonezaki, S., Yagi, S., Ogawa, E., Kondo, A. Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *J. Immunol. Methods*. 2000; 238: 99–106.
34. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685.
35. Wertz, J.E., Bolton, J.R. *Electron spin resonance theory and practical applications*. New York, London, 1986.
36. Eaton, G. R., Eaton, S.S., Salikhov, K.M. *Foundations of modern EPR*, World Scientific. Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1998.

### Uzyskane wyniki:

1. **Wpływ propolisu na macierz pozakomórkową, w przebiegu regeneracji uszkodzeń termicznych skóry, związany zarówno z jakościowymi i ilościowymi zmianami glikozoaminoglikanów (GAGs), lamininy (LN), witronektyny (VN), kolagenów typu I i typu III, znajduje również swój wyraz w strukturalnej przebudowie omawianych makrocząsteczek.**

Stwierdzono, iż przeważającym ilościowo typem glikozoaminoglikanów – wyizolowanych ze zdrowej oraz z oparzonej skóry – był siarczan dermatanu (DS). Wzrost zawartości DS, w przebiegu gojenia (dni 0-15), szczególnie zaznaczony po zastosowaniu propolisu, poprzedzał postępujący spadek ilości DS po upływie 15 doby doświadczenia. Stosowanie soli srebrowej sulfadiazyny (SSD) prowadziło także do początkowego wzrostu zawartości omawianych GAGs, lecz utrzymującego się aż do ostatniej doby prowadzonego eksperymentu. Traktowanie rany NaCl lub podłożem maści propolisowej prowadziło do umiarkowanego wzrostu zawartości omawianych glikanów. Różnice zawartości DS pomiędzy pierwszym i ostatnim dniem doświadczenia były statystycznie istotne. Stwierdzono ponadto, iż charakter epimeryzacji glukuronozylowej łańcuchów DS macierzy ran oparzeniowych ulegał zmianie, w zależności od zastosowanego czynnika terapeutycznego. Obniżenie zawartości reszt kwasu iduronowego (IdoA), w przebiegu procesu gojenia (dni 0-15), macierzy uszkodzeń leczonych propolisem, wyprzedzało wzrost ekspresji IdoA począwszy od 15 dnia eksperymentu. Traktowanie ran SSD prowadziło do początkowej redukcji zawartości IdoA (dni 0-10), a następnie wzrostu zawartości omawianych reszt. Stosowanie podłoża maści propolisowej oraz NaCl przyczyniało się do wystąpienia umiarkowanych zmian zawartości IdoA. Różnice zawartości IdoA pomiędzy pierwszym i ostatnim dniem eksperymentu były statystycznie istotne. Wzrost zawartości reszt kwasu glukuronowego (GlcA) w trakcie procesu regeneracji (dni 0-15), najsilniej zaznaczony po aplikacji apiterapeutyku, poprzedzał obniżenie zawartości GlcA od 15 dnia eksperymentu. Zastosowanie SSD przyczyniało się do

zwiększenia zawartości GlcA do 10 dnia badań. W kolejnych dniach doświadczenia rany traktowane SSD charakteryzował spadek zawartości reszt GlcA. NaCl powodował obniżenie zawartości reszt GlcA. Traktowanie uszkodzeń termicznych podłożem maści propolisowej, powodowało umiarkowane zmiany zawartości reszt GlcA. [pozycja I.1 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

Analiza eksperymentalna pozwoliła na identyfikację niekolagenowych glikoprotein – witronektyny (VN) i lamininy (LN) jak również glikozoaminoglikanów, takich jak HS/H. Wzrost zawartości VN w przebiegu regeneracji ran oparzeniowych, najsilniej zaznaczony po aplikacji propolisu, poprzedzał redukcję ekspresji witronektyny począwszy od 3 dnia eksperymentu. Stosowanie SSD powodowało początkowy wzrost zawartości VN (dni 0-5), a następnie spadek zawartości omawianej, niekolagenowej glikoproteiny. Traktowanie ran oparzeniowych NaCl oraz podłożem maści propolisowej w umiarkowanym stopniu przyczyniało się do nieznacznie nasilonego wzrostu akumulacji VN, osiągającego maksymalne wartości w 10 dniu doświadczenia. Różnice zawartości VN pomiędzy pierwszym i ostatnim dniem doświadczenia były statystycznie istotne. Stwierdzono ponadto, iż w przebiegu procesu gojenia zawartość LN pozyskiwanej z oparzonych tkanek ulega zmianie w zależności od zastosowanego, eksperymentalnego czynnika. Najsilniej zaznaczony wzrost zawartości lamininy (dni 0-3), z następującą redukcją zawartości LN, zaobserwowany został w odniesieniu do ran oparzeniowych, leczonych propolisem. Zmiany zawartości LN o podobnej tendencji, stwierdzono w odniesieniu do ran opatranych SSD. Wykazano także trend w kierunku istotnych statystycznie zmian zawartości lamininy w tkankach traktowanych NaCl oraz podłożem maści propolisowej. W przebiegu kolejnych dni eksperymentu wykazano umiarkowane zmiany zawartości lamininy w porównaniu do tych, stwierdzonych w przypadku ran leczonych propolisem i SSD. Zmiany zawartości lamininy pomiędzy pierwszym i ostatnim dniem eksperymentu były statystycznie znamienne. Krótkotrwały wzrost zawartości HS/H w ranach oparzeniowych zaobserwowano jedynie w przypadku uszkodzeń termicznych leczonych propolisem. Opisowany wzrost obserwowany był wyłącznie w przypadku trzech pierwszych dni eksperymentu. W przypadku oparzeń traktowanych SSD, NaCl czy podłożem maści propolisowej nie zaobserwowano zmian zawartości HS/H. Stwierdzono ponadto występowanie, w przebiegu eksperymentalnego procesu gojenia, dodatniej korelacji w przypadkach: zawartości LN i VN wyizolowanych z ran oparzeniowych leczonych propolisem; LN wyizolowanej z ran oparzeniowych leczonych propolisem i VN wyekstrahowanej z ran oparzeniowych leczonych SSD; LN i VN wyizolowanych z ran oparzeniowych traktowanych SSD; LN i VN wyekstrahowanych z ran oparzeniowych traktowanych NaCl; LN wyekstrahowanej z ran oparzeniowych poddanych działaniu podłoża maści propolisowej i VN wyekstrahowanej z ran oparzeniowych traktowanych NaCl. Zaobserwowano także dodatnie korelacje pomiędzy: HS/H i VN wyizolowanymi z ran oparzeniowych leczonych propolisem; HS/H wyizolowanymi z ran oparzeniowych leczonych SSD a VN wyekstrahowaną z ran oparzeniowych leczonych propolisem. Dodatnie korelacje, charakteryzujące proces gojenia doświadczalnych ran oparzeniowych, stwierdzono również pomiędzy: HS/H i LN wyizolowanymi z ran

oparzeniowych leczonych propolisem; HS/H wyizolowanymi z ran oparzeniowych leczonych SSD i LN wyizolowaną z ran oparzeniowych leczonych propolisem; HS/H wyekstrahowanymi z ran oparzeniowych traktowanych podłożem maści propolisowej i LN wyizolowaną z ran oparzeniowych leczonych SSD [pozycja I.2 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

Próbki tkankowe, pozyskane ze zdrowej oraz uszkodzonej skóry wieprzowej stanowiły źródło kolagenów typu I oraz typu III. Ocena ekstrahowalności kolagenów typu I oraz typu III z uzyskanych ekstraktów oparta została na metodzie pomiaru rezonansu plazmonów powierzchniowych. Zgodnie z zaobserwowaną ekstrahowalnością kolagenu typu I, uwalnianie tego białka z macierzy uszkodzeń tkankowych zaopatrywanych propolisem i SSD, osiągnęło maksimum w ostatnim dniu eksperymentu. Leczenie ran oparzeniowych propolisem przyczyniło się do wzmożonego uwalniania komponentów reagujących z przeciwciałami przeciwko kolagenowi typu I, pomiędzy 5 a 10 dniem doświadczenia, w porównaniu do innych zastosowanych eksperymentalnych czynników. W odniesieniu do zranień traktowanych NaCl oraz podłożem maści propolisowej, różnice ekstrahowalności kolagenu typu I, pomiędzy 5 a 10 dniem doświadczenia, nie były statystycznie znamienne. Ponadto, apiterapeutyczna metoda leczenia oparzeń przyczyniała się do wystąpienia najwyższej całkowitej ekstrahowalności kolagenu typu I z macierzy ran oparzeniowych. Elektroforetyczna ocena kolagenu typu I prawidłowej i uszkodzonej skóry wieprzowej wykazała obecność podjednostek  $\alpha 1$  (I),  $\alpha 2$  (I), dimerów łańcuchów  $\alpha$  (komponentów  $\beta$ ) / trimerów łańcuchów  $\alpha$  (komponentów  $\gamma$ ) oraz heterogennych produktów rozpadu kolagenu typu I. Jednocześnie, kolagen typu III przejawiał znikomą interferencję, w opisane powyżej, a uzyskane w nieredukujących warunkach, profile elektroforetyczne komponentów kolagenu typu I, zauważalną jedynie w przypadku maksymalnej ekstrahowalności kolagenu typu III. Ostatnie spostrzeżenie wynikało z analizy immunoreaktywności przeciwciał przeciwko kolagenowi typu III z komponentami penetrującymi żel preparatywny, w nieobecności czynników redukujących wiązania disiarczkowe. Densytometryczna analiza otrzymanych żeli wykazała, iż propolis i SSD – w przebiegu początkowej fazy doświadczenia – stymulowały znaczący wzrost ekstrahowalności, z następującą stabilizacją uwalniania wspomnianych komponentów. W końcowej fazie doświadczenia, oparzenia leczone apiterapeutykami charakteryzowało maksymalne uwalnianie łańcuchów  $\alpha$  (I) i podjednostek  $\beta/\gamma$ . Uszkodzenia zaopatrywane propolisem cechowały się najwyższą całkowitą ekstrahowalnością łańcuchów  $\alpha$  (I) i podjednostek  $\beta/\gamma$ . Uwalnianie natomiast produktów rozpadu kolagenu typu I, z ran leczonych propolisem i SSD, po początkowej redukcji (dni 0-5), od 10 doby wykazywało istotne nasilenie. Z drugiej zaś strony, stała i maksymalną ekstrahowalnością produktów rozpadu kolagenu typu I, charakteryzowały się uszkodzenia poddane działaniu NaCl i podłoża maści propolisowej. Profile ekstrahowalności kolagenu typu III nacechowane były podobieństwem do tych zaobserwowanych w przypadku kolagenu typu I. Propolis jednakże wykazywał znacząco silniejszy wpływ, w porównaniu do SSD, na uwalnianie kolagenu typu III, co przejawiało się najwyższą ekstrahowalnością komponentów (dni

5, 10 i 15) reagujących z przeciwciałami dla kolagenu typu III. Ekstrahowalność kolagenu typu III z ran traktowanych NaCl i podłożem maści propolisowej nie zmieniała się w przebiegu całego eksperymentu. Maść propolisowa stymulowała ponadto najwyższą, w porównaniu do innych zastosowanych czynników, całkowitą ekstrahowalność kolagenu typu III z macierzy doświadczalnych ran oparzeniowych. Analiza uzyskanych profili elektroforetycznych wykazała obecność podjednostek  $\alpha 1$  (III), dimerów łańcuchów  $\alpha$  (komponentów  $\beta$ ) / trimerów łańcuchów  $\alpha$  (komponentów  $\gamma$ ) oraz heterogennych produktów rozpadu kolagenu typu III. Pomimo umiarkowanych różnic jakościowych, widocznych w uzyskanych profilach elektroforetycznych, znaczące różnice ilościowe charakteryzowały ekstrahowalność poszczególnych komponentów kolagenu typu III z macierzy ran oparzeniowych. Niezależnie od zastosowanego sposobu zaopatrywania ran, uwalnianie łańcuchów  $\alpha 1$  (III) oraz, w mniejszym stopniu, ich oligomerów, bezpośrednio uczestniczących w odbudowie utkania kolagenowego, koresponduje z ekstrahowalnością kolagenu typu III. Leczenie ran propolisem, w odróżnieniu od innych metod opatrywania uszkodzeń – SSD, podłoże maści propolisowej czy NaCl – znacząco wzmagало ekstrahowalność łańcuchów  $\alpha$  (III), podjednostek  $\beta/\gamma$  (III) oraz całkowite uwalnianie opisywanych komponentów, co z kolei determinowało akumulację kolagenu typu III w macierzy uszkodzeń termicznych. Z drugiej strony, należy podkreślić fakt zintensyfikowanej ekstrahowalności i całkowitego uwalniania produktów rozpadu kolagenu typu III z uszkodzeń leczonych propolisem i SSD, w porównaniu do ekstrahowalności i całkowitego uwalniania produktów rozpadu kolagenu typu III pod wpływem pozostałych czynników – NaCl i podłoża maści propolisowej [pozycja I.3 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

**2. Ocena wpływu propolisu na akumulację wolnych rodników w macierzy pozakomórkowej w przebiegu gojenia uszkodzeń termicznych – poprzez zastosowanie innowacyjnej procedury numerycznej analizy spektralnej, ocenę użyteczności nasycenia mikrofalowego widm spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), oznaczenie rodzajów i koncentracji różnych grup wolnych rodników, pozwoliła na ujawnienie istotnych i szczególnie korzystnych zmian ekspresji wolnych rodników w łożysku ran oparzeniowych leczonych propolisem.**

Wykazano, że w próbkach ran oparzeniowych traktowanych zarówno solą fizjologiczną, podłożem propolisu, propolisem, jak i solą srebrną sulfadiazyny, występują wolne rodniki, a ich koncentracja jest rzędu  $10^{22}$ - $10^{23}$  spin/g. Koncentracja wolnych rodników w próbkach ran oparzeniowych zmienia się wraz z czasem trwania terapii oraz zależy od stosowanego leku. Najważniejszym uzyskanym rezultatem ilościowym wykonanych badań spektroskopowych prezentowanych w publikacji jest wykazanie, że po zakończeniu terapii oparzeń (po 21 dniach) w przypadku propolisu, koncentracja wolnych rodników jest znacznie niższa aniżeli w przypadku leku

używanego standardowo jakim jest sól srebrowa sulfadiazyny. Wykonane w pracy analizy potwierdziły więc wyraźnie zalety terapeutyczne proponowanego do wykorzystania w leczeniu oparzeń leku naturalnego jakim jest propolis.

Dla wszystkich badanych próbek ran oparzeniowych rejestrowano szerokie widma EPR charakterystyczne dla silnych oddziaływań dipolowych niesparowanych elektronów oraz niewielkich odległości pomiędzy wolnymi rodnikami. Widma EPR testowanych próbek różnią się amplitudą (A), intensywnością integralną (I) oraz szerokością ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR zależnie od oddziałującego leku oraz czasu trwania terapii. Otrzymano wartość współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g bliską 2, co jest typowe dla organicznych wolnych rodników o niesparowanych elektronach, zlokalizowanych na atomach węgla (C) i tlenu (O).

Wykazano metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego, że linie EPR wolnych rodników w ranach oparzeniowych są poszerzone jednorodnie. Dla wszystkich próbek obserwowano charakterystyczny wzrost szerokości linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej w zakresie od 2.2 mW do 70 mW. Oznacza to, że wolne rodniki w ranach oparzeniowych, niezależnie od stosowanego podczas terapii leku, są rozmieszczone jednorodnie w próbce. Wskazuje to na poprawnie przeprowadzony eksperyment, czyli jednorodne wprowadzenie substancji leczniczych do oparzonej skóry.

W pracy szczegółowo dyskutowano czas zachodzenia procesów relaksacji spin-sieć w układzie wolnorodnikowym znajdującym się w ranach oparzeniowych. Stwierdzono, że wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzą w ranach oparzeniowych traktowanych solą fizjologiczną i podłożem propolisu. Linie EPR tych próbek nasycają się przy niskich mocach mikrofalowych. Zastosowanie w leczeniu oparzeń propolisu i soli srebrowej sulfadiazyny powodowało szybkie procesy relaksacji spin-sieć w próbkach. Wolne rodniki w ranach oparzeniowych traktowanych propolisem i solą srebrową sulfadiazyny energię promieniowania mikrofalowego szybko przekazywały diamagnetycznym molekułom sieci, co objawiało się w postaci braku nasycenia mikrofalowego ich linii EPR w stosowanym zakresie mocy mikrofalowej.

Widma EPR wszystkich próbek ran oparzeniowych są asymetryczne, a parametry asymetrii ( $A_1/A_2$ ,  $B_1/B_2$ ) ulegają zmianom wraz z mocą mikrofalową stosowaną podczas pomiaru krzywych rezonansowych. Asymetria widm EPR wskazuje na ich złożony charakter wynikający z obecności kilku rodzajów wolnych rodników w ranach oparzeniowych. Przeprowadzony test potwierdził przypuszczenia, iż widmo EPR ran oparzeniowych jest superpozycją kilku linii składowych pochodzących od różnych grup wolnych rodników. Każda z linii składowych widma EPR zmienia się ze wzrostem mocy mikrofalowej w charakterystyczny dla siebie sposób, co powoduje obserwowane zmiany asymetrii widma [pozycja I.4 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

Zgodnie z oczekiwaniami potwierdzono więc generowanie różnych rodzajów wolnych rodników w procesie termolizy w ranach oparzeniowych. Podjęto zatem zaawansowane badania kształtu widm EPR, w celu uzyskania szczegółowych informacji o wieloskładnikowej strukturze układu wolnych rodników w ranach

oparzeniowych, a ich wyniki przedstawiono w kolejnych publikacjach [pozycja I.5 oraz I.6 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

Za pomocą analizy numerycznej kształtu wieloskładnikowych widm EPR rejestrowanych przy ciągłym nasyceniu mikrofalowym linii, wykazano występowanie trzech grup wolnych rodników w ranach oparzeniowych, leczonych przez 5 dni propolisem i solą srebrową sulfadiazyny. Wykorzystanie nasycenia mikrofalowego widm EPR ujawniło trzy linie składowe w widmach zmieniające się w odmienny sposób wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej w zakresie 2.2-70 mW. Wolne rodniki zlokalizowane w różnych strukturach chemicznych odpowiadają za poszczególne linie składowe testowanych próbek. W pracy tej zastosowano nowatorskie analizy spektroskopowe w odniesieniu do ran oparzeniowych. W niniejszej pracy wykonano zaawansowane analizy numeryczne krzywych widmowych z uwzględnieniem zmian kształtu widma EPR generowanego przez złożony układ wolnorodnikowy wraz ze zmianą mocy mikrofalowej. Zaproponowano zastosowanie nasycenia mikrofalowego w badaniach różnych rodzajów wolnych rodników w ranach oparzeniowych, ponieważ testy takie są wysoce przydatne dla widm EPR będących superpozycją kilku linii składowych występujących w polu magnetycznym o zbliżonej wartości indukcji magnetycznej, co ma miejsce w przypadku badanych próbek. Wyniki analizy numerycznej kształtu widm EPR rejestrowanych przy użyciu mocy promieniowania mikrofalowego [mW]: 2.2, 7.0, 11.1, 22.2, 35.1, 55.3 oraz 70, wykazały, że eksperymentalne widma EPR ran oparzeniowych traktowanych propolisem i solą srebrową sulfadiazyny można najlepiej przybliżyć krzywą, stanowiącą superpozycję jednej linii Gaussa i dwóch linii Lorentza. W przypadku takiego dopasowania krzywych doświadczalnych funkcjami teoretycznymi uzyskano najmniejsze błędy, dla wszystkich stosowanych mocy mikrofalowych. Wykazano, że parametry linii składowych widm EPR, amplituda ( $A$ ), szerokość linii ( $\Delta B_{pp}$ ), a także ich udziały w widmie całkowitym zmieniają się wraz z mocą mikrofalową zarówno dla próbek poddanych działaniu propolisu jak i soli srebrowej sulfadiazyny. W pracy tej przedstawiono takie parametry jak: amplitudę ( $A$ ) i szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii składowych Gaussa i Lorentza zarejestrowanych przy mocach mikrofalowych z zakresu 2.2-70 mW dla wolnych rodników ran oparzeniowych traktowanych propolisem i solą srebrową sulfadiazyny. Wykazano różnice we wpływie mocy mikrofalowej na udział procentowy linii Gaussa i Lorentza dla tych próbek. Wszystkie linie składowe widm EPR, niezależnie od mocy mikrofalowej, wykazywały duże wartości szerokości. Szerokie linie EPR wszystkich grup wolnych rodników w testowanych próbkach wskazują na silne oddziaływania dipolowe pomiędzy niesparowanymi elektronami. Zaobserwowano, że linie składowe widm EPR pochodzące od różnych grup wolnych rodników w ranach oparzeniowych nasycają się w charakterystyczny dla siebie sposób oraz osiągają nasycenie przy innych wartościach mocy mikrofalowej. Efekt ten jest odpowiedzialny za obserwowane zmiany kształtu i parametrów widm EPR wraz z mocą mikrofalową. Potwierdzono przydatność efektu nasycenia linii w badaniach wolnych rodników generowanych podczas oparzeń skóry. Uzyskane nowatorskie wyniki wskazują na przydatność zaawansowanych analiz numerycznych nasycanych

mikrofalowo widm EPR w badaniach złożonego układu wolnorodnikowego, powstającego w skórze w wyniku oparzeń. Ciągłe nasycenie mikrofalowe widm EPR oraz analizy kształtu linii można zaproponować jako metody użyteczne do oceny zmian wolnorodnikowych, spowodowanych aplikowaniem substancji leczniczych na oparzoną skórę [pozycja I.5 w „Wykazie opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3].

Numeryczne metody analizy spektralnej w celu dekonwolucji wieloskładnikowych widm EPR ran oparzeniowych ujawniły składowe ich złożonego układu wolnorodnikowego po zakończeniu terapii propolisem lub SSD. Opisano wykonane procedury numeryczne oraz pokazano linie składowe widm EPR ran oparzeniowych traktowanych dwoma stosowanymi lekami w czasie 21 dni. Stwierdzono, że dopasowanie numeryczne eksperymentalnych widm EPR testowanych próbek za pomocą superpozycji dwóch linii nie jest wystarczające. Rejestrowane widma EPR ran oparzeniowych i teoretyczne dwuskładnikowe krzywe będące sumą: dwóch linii Gaussa (GG), dwóch linii Lorentza (LL) oraz jednej linii Gaussa i jednej linii Lorentza (GL), różnią się znacznie. Wskazuje to na występowanie więcej niż dwóch grup wolnych rodników w ranach oparzeniowych. Dobre dopasowanie eksperymentalnych widm testowanych próbek uzyskano dla przybliżenia sumą trzech linii teoretycznych. Wykazano, że trzy grupy wolnych rodników występują w ranach oparzeniowych leczonych propolisem i SSD. Określono kształty ich linii EPR. Jedynie słabe dopasowanie otrzymano w przypadku trzech linii o następujących kształtach: suma trzech linii Gaussa (GGG), suma trzech linii Lorentza (LLL), suma jednej linii Lorentza i dwóch linii Gaussa (LGG). Najlepsze dopasowanie do rejestrowanych widm EPR ran oparzeniowych uzyskano w przypadku linii teoretycznej będącej sumą jednej linii Gaussa i dwóch linii Lorentza (GLL). Trzy grupy wolnych rodników badanych próbek odpowiadają za jedną linię Gaussa i dwie linie składowe Lorentza w wypadkowych widmach EPR ran oparzeniowych traktowanych odpowiednio propolisem i SSD. Linie EPR poszczególnych grup wolnych rodników różnią się kształtem, ponieważ zachodzą odmienne oddziaływania magnetyczne pomiędzy ich niesparowanymi elektronami. Wolne rodniki każdej grupy są zlokalizowane w różnych jednostkach molekularnych, więc wykazują odmienne oddziaływania. Lokalizacja wolnych rodników w różnorodnych strukturach chemicznych jest zgodna z oczekiwaniami, ponieważ termoliza powoduje złożone modyfikacje w ranach oparzeniowych. Procentowe udziały linii składowych w całkowitym widmie EPR ran oparzeniowych leczonych propolisem i solą srebrną sulfadiazyny są różne. Wszystkie składowe linie EPR są szerokie, co wskazuje na silne oddziaływania dipolowe pomiędzy wolnymi rodnikami w próbkach. Szerokości składowych Gaussa ran oparzeniowych traktowanych propolisem i SSD są takie same. Podobne oddziaływania dipolowe charakteryzują więc wolne rodniki odpowiedzialne za te linie w dwóch rodzajach badanych próbek. Składowe Lorentza są szersze dla ran oparzeniowych leczonych propolisem aniżeli dla próbek traktowanych SSD, więc silniejsze oddziaływania dipolowe w tych dwóch grupach wolnych rodników występują w oparzeniach poddanych działaniu propolisu. Uzyskano różne amplitudy

linii składowych widm EPR dla ran oparzeniowych po zakończeniu terapii propolisem oraz SSD. Różne ilości poszczególnych rodzajów wolnych rodników są odpowiedzialne za ten efekt. Wolne rodniki o szerszej linii Lorentza dominują w obydwu badanych próbkach. Największe udziały procentowe w całkowitym widmie EPR uzyskano w przypadku szerszych linii Lorentza dla ran oparzeniowych po terapii zarówno propolisem jak i SSD. Udziały procentowe składowych Gaussa i szerszej składowej Lorentza w widmie całkowitym ran oparzeniowych po traktowaniu propolisem są mniejsze aniżeli po leczeniu SSD. Procentowy udział węższej składowej Lorentza w całkowitych widmach EPR ran oparzeniowych poddanych działaniu propolisu jest większy aniżeli w przypadku próbek traktowanych solą srebrną sulfadiazyny. Najważniejszym wynikiem przeprowadzonych badań jest wykazanie, iż koncentracje wolnych rodników każdej z grup są mniejsze w ranach oparzeniowych po terapii lekiem naturalnym – propolisem w porównaniu do leku standardowego – SSD. Największe różnice w koncentracjach w próbkach traktowanych propolisem i SSD zaobserwowano dla wolnych rodników o szerokich liniach Gaussa i szerokich liniach Lorentza. Uzyskane rezultaty numerycznej analizy kształtu widm rezonansowych potwierdziły nasze oczekiwania złożonego charakteru widm EPR ran oparzeniowych po terapii propolisem i SSD oraz pokazują różnice w złożonym układzie wolnych rodników w testowanych próbkach [pozycja I.6 w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

### **Konkluzje:**

1. Propolis, w odróżnieniu od rutynowo stosowanego w miejscowym leczeniu oparzeń czynnika terapeutycznego, tj. soli srebrnej sulfadiazyny, przejawia korzystny wpływ na przemiany siarczanów dermatanu, cechujący się stymulowaniem biosyntezy reszt iduronianowych, w stopniu zbliżonym do tego, który charakteryzuje skórę zdrową. Uzyskane wyniki badań wskazują, iż preparat apiterapeutyczny modyfikując strukturę DS stymuluje gojenie ran oparzeniowych.
2. Czynniki apiterapeutyczne, modulując przemiany VN, LN, i HS/H, przyczyniające się do skuteczniejszej kontroli procesu gojenia na poziomie komórkowym – włączając migrację i proliferację komórek epidermalnych i keratynocytów oraz aktywację fibroblastów, warunkuje reepitelializację oraz wygojenie rany.
3. Ocena terapeutycznej aktywności propolisu, poprzez ilościową i jakościową analizę ekspresji i degradacji kolagenów typu I i typu III macierzy uszkodzeń termicznych, wskazuje, iż czynniki apiterapeutyczne warunkować może kreowanie "biochemicznego środowiska" sprzyjającego reepitelializacji.
4. Porównawcze badania EPR ewolucji wolnych rodników w ranach oparzeniowych podczas leczenia propolisem i solą srebrną sulfadiazyny wykazały, że wolne rodniki występują w ranach oparzeniowych niezależnie od zastosowanej substancji leczniczej oraz czasu jej oddziaływania. Udowodniono silny pozytywny wpływ propolisu na zawartość wolnych rodników w ranach oparzeniowych. Po zakończeniu terapii propolisem koncentracja wolnych rodników w ranach oparzeniowych jest znacznie

niższa aniżeli w ranach traktowanych lekiem standardowym, tj. solą srebrową sulfadiazyny. Potwierdzono przydatność spektroskopii EPR do badania wpływu leku na macierz ran oparzeniowych.

5. Wykazano, że w ranach oparzeniowych – po 5 dniach leczenia propolisem i solą srebrową sulfadiazyny występują trzy grupy wolnych rodników, a ich widma EPR stanowią superpozycję linii Gaussa i dwóch linii Lorentza. Dla próbek traktowanych propolisem stwierdzono mniejszy udział procentowy wolnych rodników odpowiedzialnych z szerszą linię Lorentza aniżeli w przypadku ran traktowanych solą srebrową sulfadiazyny. Potwierdzono przydatność nasycenia mikrofalowego widm EPR do badań złożonego układu wolnorodnikowego w ranach oparzeniowych.
6. Wykazano, że analiza numeryczna kształtu widm EPR jest pomocna do badania różnych grup wolnych rodników w ranach oparzeniowych. Ta sama liczba i kształty linii składowych charakteryzują widma EPR ran oparzeniowych po terapii propolisem lub solą srebrową sulfadiazyny, które są superpozycją jednej linii Gaussa i dwóch linii Lorentza. Wskazuje to na występowanie w testowanych próbkach trzech grup wolnych rodników. Wolne rodniki każdej z tych grup znaleziono w ranach oparzeniowych traktowanych propolisem oraz solą srebrową sulfadiazyny. Dla badanych próbek linie składowe różnią się parametrami. Najszersza linia Lorentza dominuje w rejestrowanych widmach EPR. Koncentracje każdego rodzaju wolnych rodników są mniejsze w ranach oparzeniowych traktowanych propolisem względem soli srebrowej sulfadiazyny.

#### OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

**Inne publikacje naukowe (nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, będącego podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego) w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR):**

1. K. Komosińska-Vassev, K. Olczyk, E. M. Koźma, K. Winsz-Szczotka, **P. Olczyk**, G. Wisowski: Graves' disease-associated changes in the serum lysosomal glycosidases activity and the glycosaminoglycan content. 2003. Clin. Chim. Acta, 331, 97-102.  
Impact Factor: **1.633**; punktacja KBN/MNiSW: **24**
2. K. Komosińska-Vassev, K. Olczyk, **P. Olczyk**, K. Winsz-Szczotka: Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. 2005. Diab. Res. Clin. Pract., 68, 207-216.  
Impact Factor: **1.236**; punktacja KBN/MNiSW: **20**
3. K. Komosińska-Vassev, K. Olczyk, E.M. Koźma, **P. Olczyk**, G. Wisowski, K. Winsz-Szczotka: Alterations of glycosaminoglycan metabolism in the development of diabetic complications in relation to metabolic control. 2005. Clin. Chem. Lab. Med., 43, 924-929.  
Impact Factor: **1.918**; punktacja KBN/MNiSW: **27**

4. K. Komosińska-Vassev, K. Winsz-Szczotka, K. Kuźnik-Trocha, **P. Olczyk**, K. Olczyk: Age-related changes of plasma glycosaminoglycans. 2008. Clin. Chem. Lab. Med., 46, 219-224.  
Impact Factor: **1.888**; punktacja KBN/MNiSW: **27**
5. K. Komosińska-Vassev, **P. Olczyk**, K. Winsz-Szczotka, K. Kuźnik-Trocha, K. Klimek, K. Olczyk: Age- and gender-dependent changes in connective tissue remodeling: physiological differences in circulating MMP-3, MMP-10, TIMP-1 and TIMP-2 level. 2011. Gerontology, 57, 44-52.  
Impact Factor: **2.777**; punktacja KBN/MNiSW: **25**
6. K. Komosińska-Vassev, **P. Olczyk**, K. Winsz-Szczotka, K. Klimek, K. Olczyk. Age- and gender-dependent changes in circulating concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$ , soluble tumor necrosis factor receptor-1 and sulfated glycosaminoglycan in healthy people. 2011. Clin. Chem. Lab. Med., 49, 121-127.  
Impact Factor: **2.150**; punktacja KBN/MNiSW: **30**
7. K. Komosińska-Vassev, **P. Olczyk**, K. Winsz-Szczotka, K. Kuźnik-Trocha, K. Klimek, K. Olczyk: Age- and gender-related alteration in plasma advanced oxidation protein products (AOPP) and glycosaminoglycan (GAG) concentrations in physiological ageing. 2012. Clin. Chem. Lab. Med., 50, 557-563.  
Impact Factor: **3.009**; punktacja KBN/MNiSW: **30**
8. K. Komosińska-Vassev, **P. Olczyk**, K. Winsz-Szczotka, K. Klimek, K. Olczyk: Plasma biomarkers of oxidative and AGE-mediated damage of proteins and glycosaminoglycans during healthy ageing: a possible association with ECM metabolism. 2012. Mech. Ageing Dev., 133, 538-548.  
Impact Factor: **3.264**; punktacja KBN/MNiSW: **35**
9. **P. Olczyk**, K. Komosińska-Vassev, K. Winsz-Szczotka, J. Stojko, K. Klimek, E. M. Koźma: Propolis induces chondroitin/dermatan sulphate and hyaluronic acid accumulation in the skin of burned wound. 2013. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 290675, 1-8.  
Impact Factor: **1.722**; punktacja KBN/MNiSW: **40**

#### **Analiza bibliometryczna dorobku naukowego**

Poza cyklem publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (łączna wartość IF **8.317**), mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje:

- **35 publikacji** o łącznej wartości IF **19.597** na które składa się **21 publikacji eksperymentalnych** (w tym **10** opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora), **12 publikacji poglądowych** (w tym **6** opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz **2 inne prace pełnotekstowe**
- **42 komunikaty**, na które składa się **13** komunikatów prezentowanych na międzynarodowych konferencjach i zjazdach naukowych, w tym **9** po uzyskaniu stopnia doktora oraz **29** komunikatów ze zjazdów krajowych (w tym **12** po uzyskaniu stopnia doktora).

Sumaryczny *impact factor* za całokształt dorobku naukowego wynosi – według listy Journal Citation Reports – **27.914 (453 punktów według punktacji KBN/MNiSW)**.

Analiza publikacji w bazie **Web of Science – Science Citation Index-Expanded** wykazała **73 cytowań (57 cytowań po wyłączeniu autocytowań)**.

Indeks Hirscha według bazy **Web of Science – Science Citation Index-Expanded** wynosi **5**.

Spośród **15** prac doświadczalnych, indeksowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, a składających się na mój dorobek naukowy, w **7** jestem pierwszym autorem (**73%**), a w **4** – drugim (**30%**).

### **Działalność naukowo-badawcza**

#### **Główne kierunki pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**

Działalność naukowo-badawcza, prowadzona w początkowym okresie po ukończeniu studiów i podjęciu pracy zawodowej w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, dotyczyła tematyki szeroko pojętej biochemii farmaceutycznej i patobiochemii, obejmując badania na temat: sieciowania cząsteczek macierzy pozakomórkowej w przebiegu projektowania bioprotez oraz – oceny metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej i aktywności procesów wolnorodnikowych/przeciwutleniających w przebiegu stanów fizjologicznych czy wybranych jednostek chorobowych. Aktywność moja również związana była z wybranymi aspektami opieki farmaceutycznej, wraz z określeniem możliwości zastosowania ich w praktyce aptecznej. Mój dorobek naukowy powstały przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych (**10** prac eksperymentalnych, **6** prac poglądowych oraz **1** praca popularnonaukowa) obejmuje tematykę badawczą, dotyczącą:

#### **a. Oceny wpływu wybranych czynników na stabilizowane metodą fotooksydacji tkanki w przebiegu projektowania bioprotez**

Omawiana grupa publikacji, w całości powstała przed uzyskaniem przeze mnie stopnia doktora, zawiera sześć prac doświadczalnych [wg „Wykazu opublikowanych prac naukowych” – załącznik nr 3: III.1, III.2, III.3, III.4, III.5, III.7] i jedną pracę poglądową [IV. 1]. Publikacje doświadczalne dotyczą sieciowania białek, głównie kolagenu, metodą fotoutleniania (fotooksydacji). Wspomniana metoda jest alternatywnym w stosunku do metod chemicznych, sposobem utrwalania tkanek zwierzęcych, stosowanych do konstrukcji bioprotez. Poprzez tworzenie sztucznych międzycząsteczkowych wiązań kowalencyjnych zwiększa się bowiem trwałość takich biomateriałów. Jednakże, używane w celu sieciowania białek tkankowych, metody chemiczne powodują wzrost cytotoksyczności i sztywności bioprotez, a także ich skłonność do kalcyfikacji. Te niekorzystne efekty nie są jednak obserwowane po

zastosowaniu fotooksydacji czyli techniki modyfikacji struktury białek tkankowych przy zastosowaniu energii świetlnej, w obecności światłoczułego barwnika jako katalizatora reakcji. Omawiany cykl publikacji doświadczalnych poświęcony był wpływowi czynników fizykochemicznych, obejmujących rodzaj zastosowanego barwnika [III.1, III.4], typ światła [III.3, III.4], długość ekspozycji świetlnej [III.4] czy też obecność substancji dodatkowych, takich jak askorbinian [III.2, III.5] czy sorbitol [III.7] na efektywność sieciowania kolagenu różnych tkanek wieprzowych metodą fotooksydacji. Prace te w swej większości stanowiły odpowiedź na zapotrzebowanie Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii. Wchodząca w skład omawianego cyklu publikacji praca poglądowa stanowiła natomiast obszerną charakterystykę porównawczą różnych metod stabilizacji, zasobnego w kolagen materiału tkankowego, stosowanego do konstrukcji bioprotez [IV.1].

Prace na powyższy temat zostały opublikowane w czasopismach *Biotechnologia* [III.1, III.7], *Advances in Clinical and Experimental Medicine* [III.2], *Annales Academiae Medicae Silesiensis* [III.3], *Bio-Medical Materials and Engineering* [III.4], *Poradnik Farmaceutyczny* [III.5], *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [IV.1].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi:

punktacja KBN/MNiSW: **38**

#### **b. Oceny równowagi prooksydacyjno/antyoksydacyjnej ustroju w przebiegu cukrzycy typu 2**

Zarówno istnienie jak i następstwa stresu oksydacyjnego są istotnym elementem składowym molekularnych mechanizmów cukrzycy typu 2. Stąd też celem pracy, opublikowanej na łamach *Diabetes Research and Clinical Practice* była kompleksowa ocena systemu antyoksydacyjnego u chorych z cukrzycą typu 2, w zależności od stanu wyrównania metabolicznego choroby jak i obecności powikłań naczyniowych o charakterze mikro i/lub makroangiopatii [II.2]. Przeprowadzone badania, obejmujące ocenę zdolności obronnych ustroju osób z cukrzycą typu 2 przed skutkami nasilenia reakcji wolnorodnikowych wykazały wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wraz z jednoczesnym obniżeniem aktywności pozostałych enzymów układu antyoksydacyjnego tj. katalazy (CT), peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GR), jak i znacznego stopnia obniżenie całkowitego stężenia przeciwutleniaczy (TAS) w surowicy krwi. Zmiany aktywności systemu antyoksydacyjnego korespondowały ponadto – w przypadku oznaczeń dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz całkowitej zdolności przeciwutleniającej osocza – zarówno ze stopniem metabolicznego wyrównania cukrzycy, jak i obecnością późnych powikłań naczyniowych. Obserwowane zaburzenia potencjału antyoksydacyjnego ustroju u chorych z cukrzycą typu 2 wskazywać mogą na istotną rolę antyoksydantów w terapii omawianego schorzenia [II.2].

W poruszaną tematykę badawczą wpisuje praca poglądowa stanowiąca obszerną charakterystykę opisową molekularnych mechanizmów rozwoju mikroangiopatii

cukrzycowej [IV.2]. Prace wymienionego cyklu przedstawione zostały na łamach *Diabetes Research and Clinical Practice* [II.2], oraz – *Diabetologii Polskiej* [IV.2].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi:

IF: **1.236**, punktacja KBN/MNiSW: **23**

**c. Oceny przemian glikozoaminoglikanów w przebiegu wybranych jednostek chorobowych i fizjologicznego starzenia się ustroju**

Cykl rozpoczyna praca doświadczalna, opisująca zaburzenia metabolizmu GAGs w przebiegu hipertyreozy spowodowanej chorobą Gravesa i Basedowa [II.1]. Publikacja ta dotyczy dynamicznej oceny profilu GAGs surowicy krwi, w przebiegu wymienionej jednostki chorobowej, niepowikłanej rozwojem pozataarczycowych symptomów, tj. oftalmopatii i/lub obrzęku przedgoleniowego, przed rozpoczęciem terapii jak i po uzyskaniu stanu utrwalonej eutyreozy. Modyfikacja frakcji GAGs w surowicy chorych z nadczynnością tarczycy współistniała z istotnym wzrostem aktywności – degradujących te makrocząsteczki – lizosomalnych hydrolaz [II.1].

W omawianym cyklu prac analizowane były również zmiany metabolizmu GAGs u chorych z cukrzycą typu 2 [II.3]. Wykazano, iż cukrzyca typu 2 przebiega ze znamienym wzrostem całkowitego stężenia GAGs, szczególnie wyraźnym w przebiegu cukrzycy niewyrównanej i nasilającym się wraz z obecnością powikłań naczyniowych. Ilościowa przebudowa profilu GAGs surowicy istotnie korelowała przy tym z aktywnością lizosomalnych egzoglikozydaz, uczestniczących w wewnątrzkomórkowej degradacji omawianych glikanów. Wzrost aktywności badanych enzymów również wykazywał silny związek z nieprawidłową kontrolą metaboliczną pacjentów oraz obecnością późnych zmian naczyniowych. Uzyskane wyniki wskazują, iż cukrzyca związana jest z istotnymi zmianami metabolizmu komponentów glikozoaminoglikanowych, które to zmiany mogą mieć poważne konsekwencje metaboliczne leżące u podstaw obserwowanych w przebiegu choroby powikłań naczyniowych [II.3].

Uzupełnieniem omawianego cyklu jest praca oryginalna opisująca proces starzenia się, który związany jest z postępującymi i nieodwracalnymi zmianami degeneracyjnymi, dotyczącymi zarówno komórek jak i składników macierzy pozakomórkowej (ECM). Stwierdzono, iż w przebiegu starzenia dochodzi do postępującego wzrostu stężenia HA w osoczu krwi badanych osób [III.6].

Uzupełnieniem prac oryginalnych jest praca pogładowa, po raz pierwszy przybliżająca polskiemu czytelnikowi w tak szerokim zakresie wiedzę, dotyczącą metabolizmu i roli biologicznej wybranych GAGs [IV.6].

Wyniki powyższych badań opublikowane zostały na łamach *Clinica Chimica Acta* [II.1], *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [II.3], *Diagnostyki Laboratoryjnej* [III.6] oraz – *Czasopisma Aptekarskiego* [IV.6].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl nr 2:

IF: **3.551**, punktacja KBN/MNiSW: **59**

#### d. **Diagnostyczne i edukacyjne aspekty opieki farmaceutycznej**

W skład omawianej grupy publikacji wchodzi trzy prace [IV.3, IV.4, IV.5]. Pierwsza z publikacji poglądowych jest krytycznym omówieniem wartości diagnostycznej szerokiego spektrum oznaczeń biochemicznych, stosowanych w rozpoznawaniu i prognozowaniu przebiegu ostrego zapalenia trzustki [IV.3]. Kolejna dotyczy wpływu leków na wyniki badań diagnostycznych [IV.5]. Ostatnia publikacja charakteryzuje postępującą ewolucję przeddyplomowego kształcenia farmaceutów ukierunkowaną na opiekę farmaceutyczną jako integralną część praktyki zawodowej farmaceutów [IV.4]. Powyższe prace opublikowane zostały na łamach *Przeglądu Lekarskiego* [IV.3, IV.5] i *Poradnika Farmaceutycznego* [IV.4].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl:

punktacja KBN/MNiSW: **11**

W okresie przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowałem na łamach *Farmacji Polskiej* [V.1] artykuł dotyczący bazy dydaktycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląskiej Akademii Medycznej.

punktacja KBN/MNiSW: **6**

#### **Główne kierunki pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych konsekwentnie kontynuowałem badania nad problematyką, będącą przedmiotem moich wcześniejszych zainteresowań naukowych, a dotyczącą biochemii farmaceutycznej i patobiochemii tkanki łącznej, na procesie gojenia ran oraz – na wybranych aspektach opieki farmaceutycznej i kształceniu farmaceutów. Cykl publikacji powstały w tym czasie zawiera, poza osiągnięciem wskazanym jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego – **11** prac doświadczalnych i **6** prac poglądowych oraz **1** pracę popularnonaukową, wśród których wyodrębnić można grupy tematyczne, obejmujące badania, dotyczące:

##### **1. Roli komponentów macierzy pozakomórkowej jako biomarkerów starzenia się ustroju**

W ramach omawianego cyklu opublikowano pięć prac oryginalnych, dotyczących zaburzeń przemian glikozoaminoglikanów w przebiegu starzenia, [II.4, II.6, II.7, II.8, III.10] oraz jedną pracę eksperymentalną opisującą związaną z wiekiem ekspresję metaloproteinaz macierzowych, uczestniczących w degradacji składników macierzy pozakomórkowej [II.5]. Wykazano, że GAGs osocza krwi ulegają wraz z wiekiem zmianom ilościowym i jakościowym. Pierwsze z nich dotyczyły obniżenia całkowitego stężenia GAGs, wynikającego z redukcji osoczowego stężenia

siarczanów chondroityny (CS). Drugie zaś, wiązały się z sukcesywnym – w przebiegu starzenia – zmniejszeniem strukturalnej heterogenności CS i DS, zaś wzrostem heterogenności HS/H [II.4]. Powyższym zmianom towarzyszyła wzmożona aktywność procesów wolnorodnikowych, ocenianych na podstawie obniżającej się z wiekiem „rezerwy” tiolowej osocza [III.10].

Kolejne badania wykazały, iż starzenie się ustroju, związane z przebudową macierzy pozakomórkowej, znajduje swoje odzwierciedlenie w osoczym stężeniu siarczanowanych GAGs. Zmiany w metabolizmie ECM w przebiegu fizjologicznego procesu starzenia były uzależnione od stężenia we krwi TNF- $\alpha$ . Ponadto stężenie molekuł uczestniczących w procesach prozapalnych i przeciwzapalnych było zwiększone u osób w podeszłym wieku [II.6].

W wyniku kolejnych badań stwierdzono, iż zmiany zachodzące wraz z wiekiem w ECM, znajdują swoje odzwierciedlenie w surowicznym stężeniu CS i HA. Wykazano ponadto istnienie silnej korelacji pomiędzy zaawansowanymi produktami utleniania białek i komponentami ECM, co wskazało, iż białkowe i niebiałkowe składniki macierzy tkanki łącznej, w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju, stanowią cel oddziaływania stresu oksydacyjnego [II.7].

Ocena CS i DS, najliczniejszej osoczej frakcji GAGs, sugeruje – w aspekcie ich związku ze stanem równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej oraz procesów glikacji, iż wspomniane GAGs stanowią potencjalne biomarkery starzenia się ustroju. Identyfikacja potencjalnie użytecznych markerów odzwierciedlających stan czynnościowy tkanki łącznej, poprzez analizę relatywnie łatwo osiągalnego materiału biologicznego, umożliwiać może ocenę dynamiki procesu starzenia, diagnozowanie oraz – terapię schorzeń związanych z wiekiem [II.8].

Związane z wiekiem zmiany ekspresji metaloproteinaz macierzowych oraz ich inhibitorów, kluczowych w degradacji komponentów macierzy, mogą w znaczącym stopniu wpływać na strukturę i funkcje tkanek w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju [II.5].

Wyniki powyższych badań przedstawiono na łamach *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [II.4, II.6, II.7], *Gerontology* [II.5], *Mechanisms of Ageing and Development* [II.8], *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [III.10].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl:

IF: **13.088**, punktacja KBN/MNiSW: **153**

## **2. Oszacowania oddziaływania preparatu zawierającego kit pszczeli na proces gojenia się doświadczalnych ran pooparzeniowych skóry**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem publikacji, obejmujących 4 prace doświadczalne, zamieszczone w *Farmacji Polskiej* [III.9, III.12], w *Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym* [III.8], w *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [II.9] oraz 4 prace poglądowe, opublikowane na łamach *Farmacji Polskiej* [IV.7], *Annales Academiae Medicae Silesiensis* [IV.8], *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [IV.10] oraz *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [IV.11].

Tematyką wiodącą tego cyklu była ocena wpływu maści propolisowej, opartej na naturalnym produkcie pszczelim, na przebieg procesu naprawczego doświadczalnych ran oparzeniowych skóry wieprzowej. Ocena kliniczna, histopatologiczna oraz mikrobiologiczna gojenia się ran oparzeniowych, zaopatrywanych Propolem T dowiodła, iż apiterapeutyk – w porównaniu z powszechnie stosowaną solą srebrową sulfadiazyny (SSD) – istotnie przyspiesza procesy regeneracyjno-reparacyjne uszkodzeń tkankowych oraz sprzyja uzyskaniu korzystnych warunków mikrobiologicznych w miejscu uszkodzenia, manifestujących się większego stopnia redukcją liczby drobnoustrojów i wyższą skutecznością bakterioobójczą [III.8, III.9]. Kolejny artykuł, oparty na badaniach biochemicznych [II.9], wskazuje, iż propolis stymulował występowanie znaczących zmian zawartości całkowitych glikozoaminoglikanów, CS/DS oraz HA w łożysku ran oparzeniowych. Wpływ propolisu na siarczany/chondroityny, główną frakcję GAGs łożyska ran, charakteryzował się istotnym nasileniem zawartości 4-O-siarczanowanych disacharydów w strukturze CS/DS oraz nieznaczną ekspresją 6-O-siarczanowanych disacharydów. Propolis ponadto przyczyniał się do występowania zwiększonej zawartości podwójnie siarczanowanych disacharydów, szczególnie 2,4-O-siarczanowanych w strukturze CS/DS, w przebiegu doświadczalnej naprawy uszkodzeń tkankowych. Ilościowe i jakościowe zmiany akumulacji GAGs, obserwowane po zastosowaniu soli srebrowej sulfadiazyny charakteryzowały się mniejszym nasileniem. Uzyskane wyniki badań wskazują, iż propolis nasila proces gojenia oparzeń, poprzez wzmoczenie akumulacji GAGs w łożysku uszkodzeń, kluczowej dla ziarninowania, wzrostu tkanek czy „zamknięcia rany”. Ponadto, opisywany apiterapeutyk wzmaga modyfikację struktury siarczanów chondroityny/dermatanu, warunkującą wiązanie czynników wzrostowych, odgrywających kluczową rolę w procesie regeneracyjno-reparacyjnym [II.9].

Jak wykazały kolejne, wstępne badania biochemiczne [III.12], zastosowanie Propolu T w leczeniu doświadczalnych ran oparzeniowych stymulowało również znaczący wzrost zawartości glikoprotein niekolagenowych w początkowej fazie procesu gojenia. Pozytywne skutki stosowania Propolu T w leczeniu ran oparzeniowych, zweryfikowane oceną histopatologiczną, mikrobiologiczną i biochemiczną, wskazały na przydatność tego apiterapeutyku w miejscowym leczeniu oparzeń [III.12].

Uzupełnieniem prac oryginalnych są prace pogładowe, po raz pierwszy przybliżające wiedzę, dotyczącą metabolizmu i roli biologicznej różnych GAGs w przebiegu naprawy uszkodzeń tkankowych [IV.10, IV.11] oraz możliwości zastosowania propolisu w miejscowej terapii oparzeń [IV.7, IV.8].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl:

IF: 1.722, punktacja KBN/MNiSW: 82

### **3. Praktyczne i edukacyjne aspekty opieki farmaceutycznej**

W skład omawianej grupy publikacji wchodzi trzy prace zamieszczone, odpowiednio, w *Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym* [IV.9], w *Przeglądzie Lekarskim* [IV.12]

oraz w *Farmacji Polskiej* [III.11]. Pierwsza z publikacji poglądowych omawia możliwości zastosowania terapeutycznego monitorowania leków w praktyce klinicznej i farmaceutycznej [IV.9]. Kolejna publikacja charakteryzuje wybrane aspekty patogenezy i badań diagnostycznych w osteoporozie [IV.12]. Ostatni artykuł charakteryzuje doradztwo farmaceutyczne w przebiegu samoleczenia, w wybranych aptekach województwa śląskiego [III.11].

Nowe trendy w programach dydaktycznych oraz cele strategiczne kształcenia podyplomowego farmaceutów w Polsce, obejmujące kursy specjalizacyjne, obowiązkowe kształcenie ustawiczne oraz studia doktoranckie – były wielokrotnie prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych, organizowanych przez European Association of Faculties of Pharmacy, (Francja 2008, Norwegia 2009, Włochy 2010) oraz na Kongresach farmacji i nauk farmaceutycznych, organizowanych przez International Pharmaceutical Federation (Turcja 2009, Indie 2011).

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl:  
punktacja KBN/MNiSW: **15**

Do mojego dorobku publikacyjnego zaliczyć należy także artykuł charakteryzujący aktywizację środowiska seniorów farmacji na polu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego [V.2], a opublikowany na łamach czasopisma *Apothecarius*.

#### **Kierowanie krajowymi projektami badawczymi:**

Ocena metabolizmu glikozoaminoglikanów w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2003** (NN-2-346/03); **2006** (NN-2-020/06). Ocena stopnia i sposobu siarczanowania glikozoaminoglikanów w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2007** (NN-2-093/07). Ocena zakresu epimeryzacji glukuronozylowej siarczanów dermatanu w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2008** (KNW-2-097/08). Dynamika zmian zawartości lamininy oraz witronektyny w przebiegu gojenia się doświadczalnych ran oparzeniowych, **2009** (KNW-2-138/09). Ocena zmian aktywności metaloproteaz macierzy w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2010** (KNW-2-043/10), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

#### **Udział w projektach badawczych jako członek zespołu badawczego:**

1. Biochemiczna ocena kolagenu i elastyny wieprzowych tkanek układu sercowo-naczyniowego poddanych procesowi fotooksydacji, **1999** (NN-560-123/99); **2000** (NN-2-029/00); **2001** (NN-1-146/01), Śląska Akademia Medyczna
2. Ocena metabolizmu glikozoaminoglikanów u chorych z ostrym zapaleniem trzustki, **2001** (NN-560-15/01), Śląska Akademia Medyczna

3. Ocena zawartości kwasu hialuronowego w osoczu krwi osób z ostrym zapaleniem trzustki, **2002** (NN-5-051/02), Śląska Akademia Medyczna
4. Glikozaaminoglikany osocza krwi chorych z ostrym zapaleniem trzustki, **2004** (NN-5-205/04), Śląska Akademia Medyczna
5. Ocena wydalania glikozaaminoglikanów w przebiegu procesów starzenia, **2005** (NN-2-174/05); **2006** (NN-2-023/06), Śląska Akademia Medyczna
6. Ocena insulinowrażliwości u osób otyłych z cukrzycą typu 2 leczonych długodziałającymi analogami insuliny, **2013** (KNW-1-098/N/3/0), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

### **Nagrody za działalność naukowo-badawczą**

1. II miejsce w XXI Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich, **1999**, Sosnowiec.
2. Nagrody JM Rektora Śląskiej Akademii Medycznej (od 2007 roku – Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach) za działalność naukową
  - a. nagroda **I stopnia zespołowa** za publikacje dotyczące *wskazania zmian składu i struktury proteoglikanów macierzy pozakomórkowej w procesach naprawczych oraz procesach włóknienia powięzi; poznania metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej; poznania roli zaburzeń równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz oceny wpływu tych zaburzeń na metabolizm proteoglikanów*, **2006**, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
  - b. nagroda **II stopnia zespołowa** za *poznanie metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju*, **2009**, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
  - c. nagroda **I stopnia zespołowa** za publikacje dotyczące *oceny mechanizmów, regulujących proces jakościowej przebudowy składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu procesu fizjologicznego starzenia się ustroju*, **2012**, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Wygłoszone wykłady autorskie na krajowych i międzynarodowych zjazdach lub konferencjach**

1. **P. Olczyk.**, K. Winsz-Szczotka., K. Komosińska-Vassev., E.M Koźma., K. Olczyk, E. Kucharz., Cz. Marcisz.: The alterations of serum glycosaminoglycan profile in Graves` disease patients. The Third Polish-Slovak Conference on Internal Medicine, Ann.Acad.Med.Siles.,Supl.33, ŚAM, Katowice 2002, str. 35-36.
2. **P. Olczyk.:** Diagnostyczne aspekty opieki farmaceutycznej w cukrzycy (Warsztaty).  
1 Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa - "Prowadzenie opieki farmaceutycznej", Paszkówka k/Krakowa 2009, Materiały Zjazdowe, str. 1-26.

*Paweł Olczyk*