



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa 19.07.2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Daniela Augustynowicza

**pt.: "Analiza fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej wybranych
gatunków z rodzaju *Potentilla L. sensu lato*"**

Omawiana rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne została przygotowana w Zakładzie Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod opieką dr hab. Michała Tomczyka.

Surowce pochodzenia roślinnego stanowią ważne źródło związków o potencjalnie biologicznym. Wiele z obecnych na rynku leków bezpośrednio zawiera związki pochodzenia naturalnego bądź ich syntetyczne pochodne. Trend ten jest od lat obserwowany w lecznictwie i badaniach naukowych. Dobrym przykładem są stosowne powszechnie leki cytostatyczne. Niektóre z nich np. palitaksel czy winkrystyna są typowymi związkami pochodzenia roślinnego, które znalazły szerokie zastosowanie w lecznictwie.

Nowotwory stanowią jeden z głównych problemów zdrowia publicznego współczesnego społeczeństwa na całym świecie. Zgodnie ze statystykami WHO stanowią drugą pod kątem częstości przyczynę zgonów. Rak jelita grubego jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Czynniki rozwoju raka jelita grubego jest wiele. Do najbardziej istotnych zalicza się predyspozycje genetyczne oraz czynniki środowiskowe takie jak niska aktywność fizyczna, nadwaga, otyłość, niebalansowana dieta, nadmierne spożycie alkoholu czy palenie tytoniu. Poszukiwanie nowych substancji roślinnych przyjmowanych doustnie mogących mieć zastosowanie w profilaktyce lub leczeniu nowotworów przewodu



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 983
sgranica@wum.edu.pl

pokarmowego stanowi istotną alternatywę do terapii typu biologicznego czy z zastosowaniem leków czysto syntetycznych.

Rośliny z rodzaju *Potentilla* stanowią ważne źródło substancji roślinnych o potencjale terapeutycznym. We florze Polski w stanie dzikim można znaleźć ok. 30 gatunków zaliczanych do tego rodzaju. Jeden z nich *Potentilla erecta* (L.) Raeusch dostarczą farmakopealnej substancji roślinnej o dobrze udokumentowanym zastosowaniu we współczesnym leczeniu. Inne gatunki są stosowane lokalnie często na podstawie przesłanek ludowych. Badania nad składem chemicznym i potencjałem biologicznym surowców roślinnych z rodzaju *Potentilla* jest w pełni uzasadnione i niezbędne do stworzenia możliwości ich szerszego zastosowania w leczeniu w myśl strategii evidence based phytotherapy.

Podstawowym celem pracy była charakterystyka składu chemicznego nadziemnych oraz podziemnych części wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla* L. s. l., a także ocena ich aktywności biologicznej.

Rozprawa została przygotowana jako cykl powiązanych tematycznie trzech publikacji naukowych (dwóch oryginalnych i jednej przeglądowej) opublikowanych w renomowanych czasopismach zagranicznych z listy JCR. W skład pracy wchodzi następujące artykuły:

1. **Augustynowicz D.**, Lemieszek MK., Strawa JW., Wiater A., Tomczyk M. Anticancer potential of acetone extracts from selected *Potentilla* species against human colorectal cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13, 1027315. DOI: 10.3389/fphar.2022.1027315, IF: 5,988, punktacja MEiN: 100 pkt
2. **Augustynowicz D.**, Lemieszek MK., Strawa JW., Wiater A., Tomczyk M. Phytochemical profiling of extracts from rare *Potentilla* species and evaluation of their anticancer potential. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24, 4836. DOI: 10.3390/ijms24054836, IF: 6,208, punktacja MEiN: 140 pkt
3. **Augustynowicz D.**, Latte, KP., Tomczyk, M. Recent phytochemical and pharmacological advances in the genus *Potentilla* L. *sensu lato*—An update covering the period from 2009 to 2020. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021; 266, 113412. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113412, IF: 5,195, punktacja MEiN: 140 pkt

W dostępnej literaturze brakuje szczegółowych badań dotyczących wybranych substancji roślinnych zarówno od strony składu chemicznego przygotowywanych z nich wyciągów jak i ich potencjału biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwnowotworowej. Stąd też podjęta tematyka jest ciekawa a zaproponowane badania niezbędne do lepszego udokumentowania tradycyjnego zastosowania badanych roślin leczniczych.



Sumaryczny współczynnik oddziaływania przedłożonych prac to 17.391 co odpowiada 380 pkt MEiN. Każda z prac została opatrzona stosownym opisem wkładu Doktorantka oraz oświadczeniami współautorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich załączonych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem a jego wkład w powstanie każdej z nich był wiodący. Pod tym względem przedłożona rozprawa spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom w dziedzinie nauk medycznych i o nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych. W mojej ocenie osiągnięcia publikacyjne Pana mgr Danila Augustynowicza są bardzo dobre na tle innych prac doktorskich, z którymi miałem przyjemność zapoznawać się w ostatnich latach.

W publikacji nr 1 przyjętej do *Frontiers in Pharmacology* Doktorant zajął się badaniami fitochemicznymi oraz oceną aktywność przeciwnowotworowej ekstraktów acetonowych z części nadziemnych 6 gatunków pięciorników pochodzących z uprawy lub ze zbioru naturalnego. Badania dotyczyły oceny podstawowych parametrów chemicznych ekstraktów tj. zawartości sumy polifenoli, flawonoidów, garbników, proantocyjanidyn oraz kwasów fenolowych. Dodatkowo każda z próbek została poddana analizie chromatograficznej z użyciem techniki LC-PDA-HRMS. Wyniki potwierdziły obecność 83 głównych związków pochodzenia naturalnego w analizowanych próbkach należących do różnych grup fitochemicznych. Tak scharakteryzowane pod względem jakościowym i ilościowym wyciągi były badane w kontekście ich właściwości przeciwnowotworowych z użyciem dwóch linii komórkowych. Były to komórki gruczolakoraka jelita grubego LS180 oraz prawidłowe komórki nabłonkowe okrężnicy CCD841 CoN. Działanie przeciwnowotworowe sprawdzono z użyciem standardowych testów MTT, LDH i BrDU, a następnie wyznaczono wartości IC_{50} dla każdej z próbek. Doktorant uzyskał ciekawe wyniki dla ekstraktu przygotowanego z części nadziemnych *P. argentea* oraz *P. norvegica*. Obie próbki wykazały pewną selektywność w działaniu przeciwnowotworowym w stosunku do komórek nieprawidłowych względem kultur kontrolnych. Publikacja po raz pierwszy w sposób kompleksowy opisuje porównanie składu chemicznego badanych gatunków z rodzaju pięciornik oraz wskazuje na istotny potencjał przeciwnowotworowy przygotowanych ekstraktów potwierdzający częściowo tradycyjne stosowanie analizowanych roślin. Na podkreślenie zasługuje fakt załączenia dokładnych danych z



analiz fitochemicznych dla każdej z próbek, które mogą być bardzo użyteczne dla innych badaczy zajmujących się podobną tematyką.

Druga z prac włączona do cyklu doktorskiego została opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences*. Jej tematem była ocena aktywności przeciwnowotworowej kolejnych 10 wyciągów przygotowanych z rzadko występujących gatunków pięciorników. W większości były to rośliny obce dla flory Polski. Każdy z wyciągów został scharakteryzowany za pomocą prostych metod chemicznych na sumę poszczególnych grup związków oraz wszystkie próbki zostały poddane dokładnemu profilowaniu jakościowemu z użyciem chromatografii cieczowej. Wyniki prac fitochemicznych doprowadziły do wykrycia aż 198 głównych składników, należących w większości do grupy polifenoli. Badania biologiczne w kierunku aktywności hamującej wzrost nowotworów jelita grubego przeprowadzono we współpracy z grupami badawczymi z Lublina. Metodyka dotycząca prac biologicznych były zbliżona do tej przedstawionej w poprzedniej publikacji. Otrzymane wyniki pokazały, że najsilniejsza aktywność przeciwnowotworowa była obserwowana dla wyciągów acetonowych otrzymanych części podziemnych *P. alba* oraz liści *P. fruticosa*. Praca nie pozwoliła w sposób jednoznaczny powiązać obserwowanej aktywności z zawartością poszczególnych substancji pochodzenia naturalnego co wskazywałoby, które składniki wyciągu mogą być odpowiedzialne za działanie biologiczne.

Trzecia praca włączona do cyklu doktorskiego to artykuł przeglądowy opublikowany w renomowanym czasopiśmie zagranicznym *Journal of Ethnopharmacology*. Artykuł jest kontynuacją pracy wydanej przez Promotora dotyczącym tego samego zagadnienia w roku 2009. Doktorant dokonał dogłębnego przeglądu literatury dotyczącej składu chemicznego oraz aktywności biologicznych roślin z rodzaju *Potentilla* opublikowanej pomiędzy 2009 i 2020 rokiem. Praca jest przygotowana w sposób bardzo staranny i w mojej ocenie wyczerpujący. Potwierdza ona zarówno znajomość jak i dobre rozumienie tematyki badawczej podjętej przez Kandydata do stopnia. Artykuł jest doskonałym, źródłem wiedzy dla wszystkich badaczy zajmujących się składem chemicznym i aktywnością biologiczną wyciągów z roślin z rodzaju pięciornik.

Po lekturze przedłożonej rozprawy doktorskiej nie mam wątpliwości, że spełnia ona formalne i zwyczajowe kryteria stawiane tego typu opracowaniom.

Doktorant przedstawił w pracy oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i udowodnił swoją ogromną ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie uprawianej dyscypliny naukowej. Tym samym Doktorant spełnia wymogi formalne i merytoryczne przedstawione w Dziale V, art. 187 pkt 1-4 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r.).

W trakcie przygotowywania niniejszej recenzji nasunęło mi się kilka uwag i pytań. **Prosiłbym, aby Doktorant odniósł się do każdego z poniższych punktów.**

1. W literaturze istnieją doniesienia, że w przypadku ekstraktów zawierających polifenole badanie cytotoksyczności metodą MTT lub LDH może być zaburzone ze względu na silne właściwości redox związków występujących w wyciągach. Czy przeprowadzone badania w ocenie Doktoranta były wolne od wymienionego zagrożenia? Jeśli tak to, dlaczego? Jakich innych metod można by użyć, aby uniknąć ewentualnych interferencji?
2. Z dostępnej literatury wiadomo, że ksenobiotyki w tym ekstrakty roślinne podawane doustnie mogą podlegać różnaitemu metabolizmowi. Proszę o skomentowanie tego problemu w świetle przeprowadzonych badań biologicznych i ustosunkowanie się do kwestii biodostępności związków zawartych w badanych ekstraktach.
3. W ramach rozprawy dokonano charakterystyki fitochemicznej wyciągów przygotowanych z ponad 15 gatunków roślin z rodzaju pięciornik? Jakie główne grupy związków występowały w badanych próbkach? Proszę krótko podsumować różnice w składzie chemicznym obserwowane dla badanych wyciągów. Czy różnice te mogą mieć znaczenie chemotaksonomiczne/chemofenetyczne?
4. W pracy zabrakło mi poruszenia problemu zmienności składu w zależności od czasu zbioru, warunków klimatycznych itp. Uprzejmie proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w kontekście przeprowadzonych badań.
5. Jak Doktorant widzi przyszłą rolę chemoprewencyjną badanych surowców roślinnych?
6. Z jakiego powodu do większości badań wykorzystano ekstrakty acetonowe? Dlaczego nie podjęto się analizy składu oraz aktywności biologicznej ekstraktów

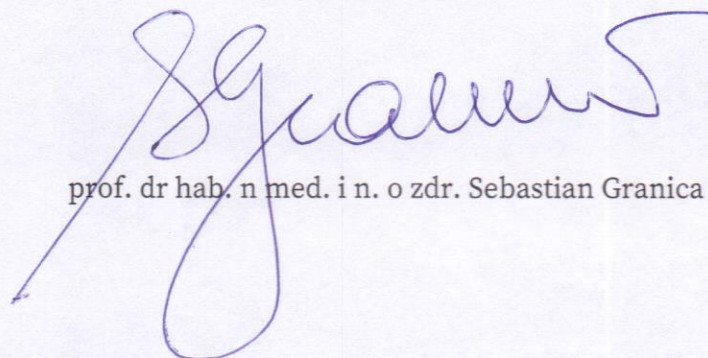


wodnych lub wodno-alkoholowych, które stanowią najczęstszą formę podawania pacjentom roślinnych substancji leczniczych?

Powyższe pytania i komentarze nie wpływają w sposób istotny na jakość recenzowanej pracy i wynikają w dużej mierze z zainteresowania tematyką badań prowadzonych przez Pana mgr Augustynowicza.

Przechodząc do podsumowania niniejszej recenzji stwierdzam, że przedłożona przez mgr Daniela Augustynowicza rozprawa doktorska pt.: "Analiza fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla L. sensu lato*" spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w związku z czym zwracam się do Komisji Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie mgr Daniela Augustynowicza do dalszych etapów prowadzonego postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednoznacznie popieram starania Doktoranta o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych przez Wysoki Senat Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionych przez Doktoranta osiągnięć naukowych zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie recenzowanej pracy.



prof. dr hab. n med. i n. o zdr. Sebastian Granica



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 983
sgranica@wum.edu.pl