



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak

Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 14. 07. 2023

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr farmacji Daniela Augustynowicza**

**pt.**

**„Analiza fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla L. sensu lato*”**

zrealizowanej w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB

pod opieką naukową Promotora, dr hab. Michała Tomczyka

**Uwagi dotyczące strony formalnej**

Zasadniczą częścią przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Daniela Augustynowicza jest zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, **co jest zgodne z aktualnymi wymaganiami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn. zm.), artykuł 187, pkt. 3 i 4.** Jego dopełnieniem jest 27 stronicowe opracowanie, wprowadzające w tematykę rozprawy, określające cele naukowe, sposób ich realizacji, uzyskane wyniki oraz ich dyskusję w odniesieniu do danych literaturowych (32 pozycje). W skład rozprawy włączono ponadto oświadczenia współautorów publikacji, a także krótką informację o całościowym dorobku naukowym Autora.

Jedną z trzech publikacji tworzących ww. zbiór, to artykuł przeglądowy, pozostałe są pracami oryginalnymi, które ukazały się drukiem w latach 2020-2023 w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w wykazie *Journal Citation Reports (JCR)*, tj. *Journal of Ethnopharmacology*, *Frontiers in Pharmacology* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Czasopisma te są bardzo cenione w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, szczególnie z zakresu fitochemii i fitofarmakologii, a wysokie standardy procesu recenzyjnego są rękojmią poziomu badań i ich akceptacji

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

przez środowisko naukowe. Przekłada się to również na znaczące parametry naukometryczne przedstawionych publikacji tworzących rozprawę doktorską mgr Daniela Augustynowicza, tj. sumaryczny wskaźnik oddziaływania *impact factor* wynoszący 17,391 oraz wysoką sumaryczną liczbę punktów MEiN: 380.

Ze względu na interdyscyplinarny charakter badań Doktoranta, wymagający współpracy z innymi wyspecjalizowanymi jednostkami naukowymi, artykuły tworzące cykl są wieloautorskie. W każdym przypadku mgr Daniel Augustynowicz jest pierwszym autorem, a Jego wiodąca rola w koncepcji i przeprowadzeniu badań nie budzi wątpliwości. Niezależnie od zadeklarowanego wkładu poszczególnych osób w powstanie ww. prac, określonych w tekście publikacji jako *Authors Contributions*, co jest wymogiem czasopism, w których je opublikowano, zawarte w rozprawie doktorskiej stosowne oświadczenia precyzują szerzej udział każdego współautora. Zatem oszacowany procentowo wkład własny Doktoranta, wynoszący 70% w przypadku artykułu przeglądowego oraz 60% w przypadku obu prac oryginalnych, ujętych w zbiorze publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, jest w pełni zasadny.

**Uwagi dotyczące podjętej tematyki i realizacji badań**

Rozprawa doktorska mgr Daniela Augustynowicza jest poświęcona istotnemu obszarowi badań w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, jakim jest poszukiwanie nowych substancji o potencjalnym zastosowaniu w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworowych. Szczególnie cennym obiektem poszukiwań są rośliny, które, niezależnie od wielowiekowego znaczenia w historii medycyny i farmacji, nadal odgrywają wiodącą rolę jako źródła leków onkologicznych. Biorąc jednak pod uwagę niedoskonałość stosowanych terapii, ich zróżnicowaną efektywność oraz działania niepożądane, badania podstawowe, ukierunkowane na poszukiwanie nowych substancji roślinnych o selektywnym działaniu cytotoksycznym, są bardzo potrzebne i w pełni zasadne.

Kluczowym elementem tych poszukiwań jest analiza profilu fitochemicznego ekstraktów roślinnych, połączona z badaniem aktywności, co umożliwi prześledzenie korelacji między zawartością różnych grup związków i efektem działania. Równie istotne jest gromadzenie danych jakościowych i ilościowych, dotyczących obecności wyspecjalizowanych metabolitów roślinnych w obrębie poszczególnych rodzajów czy rodzin, które usprawnia dereplikację, konieczną w procesie poszukiwania potencjalnie aktywnych związków w złożonych matrycach roślinnych.

Takie właśnie cele obrał Doktorant, podejmując analizę fitochemiczną i fitofarmakologiczną ekstraktów z kilkunastu gatunków rodzaju *Potentilla* L. (pięciornik), w kontekście zbadania ich potencjalnych korzyści w nowotworach jelita grubego, które są jednymi z najczęściej diagnozowanych w Polsce i na świecie. Problem badawczy jest w pełni zasadny i skutkujący dostarczeniem nowatorskich danych.



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Wybór linii komórkowych, tj. ludzkich komórek gruczolaka jelita grubego (linia LS180) oraz prawidłowych komórek nabłonkowych okrężnicy (linia CCD841 CoN), uważam za trafny, mając na uwadze nie tylko możliwość oceny selektywności działania, lecz również charakterystykę etnomedyczną pięciorników. Szereg gatunków stosowano bowiem leczniczo w różnych dolegliwościach przewodu pokarmowego, w tym także w nieokreślonych zmianach nowotworowych.

Dobrze zaprojektowana, szeroka analiza fitochemiczna, mająca na celu zdefiniowanie ilościowe i jakościowe przygotowanych ekstraktów acetonowo-wodnych z 16 gatunków rodzaju *Potentilla* L., wraz z opracowaniem skutecznej metody analitycznej, pozwalającej na rozdział związków zaliczanych do różnych grup polifenoli, stanowiła problem naukowy *per se*. Słusznym i ciekawym poznawczo zamierzeniem była też zaplanowana ocena znaczenia chemofenetycznego uzyskanych wyników.

W tym miejscu chciałabym wyróżnić przemyślaną decyzję, dotyczącą selekcji gatunków do badań. Jest to kluczowy etap w poszukiwaniach bioaktywnych związków pochodzenia naturalnego. Światowe dane literaturowe wskazują jednoznacznie, że wśród strategii, które przynoszą spodziewany efekt, pierwszorzędną rolę odgrywa selekcja oparta o przesłanki etnofarmakologiczne oraz botaniczna lub/i chemofenetyczna. Mgr Daniel Augustynowicz uwzględnił oba te podejścia. Rośliny rodzaju *Potentilla* L. *sensu lato* mają ugruntowaną pozycję leczniczą, można tu wskazać zwłaszcza gatunek farmakopealny *Potentilla erecta* (L.) Raeusch, a efektywność wielu innych jest przedmiotem badań farmakologicznych i klinicznych. Z kolei profil fitochemiczny rodzaju charakteryzuje mnogość związków polifenolowych, w tym garbników, flawonoidów i fenolokwasów, o szerokiej aktywności biologicznej, także w kontekście działania chemoprewencyjnego. Wiele gatunków w obrębie rodzaju pozostaje jednak nieprzebadanych, a skomplikowane relacje taksonomiczne i przetasowania oparte na analizach filogenetycznych plasują pięciorniki jako niemal wzorcowy przedmiot analiz fitochemicznych, chemofenetycznych i fitofarmakologicznych.

Aktualny stan wiedzy o rodzaju *Potentilla* L., z uwzględnieniem najnowszych badań opublikowanych w ostatniej dekadzie, został świetnie podsumowany przez Doktoranta w artykule przeglądowym (*Recent phytochemical and pharmacological advances in the genus Potentilla L. sensu lato – an update covering the period from 2009 to 2020*) wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej. Jest to obszerna publikacja, gromadząca bardzo dużą liczbę danych, wnikliwa i krytyczna, świadcząca o dogłębnej orientacji mgr Daniela Augustynowicza w światowych osiągnięciach dotyczących badań nad pięciornikami. Bez wątpienia omawiana praca przeglądowa stanowi doskonale źródło informacji o rodzaju *Potentilla* L. dla badaczy zajmujących się tą tematyką.

Szkoda, że w rozprawie publikacja ta została potraktowana nieco po macoszemu, wymieniona w cyklu prac na końcu, łamiąc porządek chronologiczny i logiczny. W mojej opinii zebranie tylu danych literaturowych i ich przedstawienie pozwoliło Doktorantowi



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

odnaleźć się w tematyce badawczej, a nade wszystko wytypować gatunki słabo lub w ogóle nie przebadane dla celów własnych prac eksperymentalnych, zatem rola tego artykułu przeglądowego jest znacząca i była raczej pierwszym a nie „ostatnim krokiem”, jak to ujął Doktorant, w toku przygotowywania rozprawy.

Wchodzące w skład omawianego zbioru artykułów publikacje eksperymentalne I i II są z kolei bardzo ściśle powiązane, oparte o ten sam schemat analiz, stanowiąc w zasadzie jedną spójną koncepcyjnie część, którą różnicuje materiał roślinny. W artykule, który ukazał się na łamach *Frontiers in Pharmacology*, jest to sześć gatunków pięciorników: *P. alba*, *P. argentea*, *P. grandiflora*, *P. norvegica*, *P. recta*, *P. rupestris*, natomiast w publikacji będącej kontynuacją tych badań, w *International Journal of Molecular Sciences*, kolejne dziesięć: *P. aurea*, *P. erecta*, *P. fruticosa*, *P. hyparctica*, *P. megalantha*, *P. nepalensis*, *P. pensylvanica*, *P. pulcherrima*, *P. rigoi*, *P. thuringiaca*. Słusznie więc Doktorant omawia w rozprawie wszystkie uzyskane wyniki, dyskutując ich wartość i perspektywy dalszych badań.

Wskazując osiągnięcia Doktoranta, będące efektem przeprowadzonych badań, chcę podkreślić, że mają one zarówno aspekt poznawczy, jak i aplikacyjny. W mojej opinii warto wyróżnić zwłaszcza:

- i. określenie jakościowego profilu fitochemicznego, uwzględniającego aż 217 związków, dla 16 gatunków rodzaju *Potentilla* L. *sensu lato*, co w sposób zasadniczy poszerza wiedzę nt. tego rodzaju;
- ii. wykazanie zbieżności profilu fitochemicznego pięciorników, zwłaszcza powtarzającej się grupy związków polifenolowych o potencjalnym znaczeniu markerów chemofenetycznych, w tym agrimoniny, pedunkulaginy, izomerów lewigatyny, tylirozydu, astragaliny, hiperozydu, rutyny, co uzupełnia dane z badań filogenetycznych, dotyczących rodzaju *Potentilla* L. *sensu lato*;
- iii. wykazanie po raz pierwszy w rodzaju *Potentilla* L. *sensu lato* obecności w częściach zielnych wszystkich analizowanych gatunków rzadkiej pochodnej fenoloamidowej, N<sup>1</sup>, N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-trikumaroilospermidyny, co jest nowatorskim odkryciem i stymuluje do dalszych badań tego związku w kontekście możliwości izolacyjnych i aktywności;
- iv. stwierdzenie selektywnego i dawkozależnego wpływu ekstraktów acetonowo-wodnych z analizowanych gatunków pięciorników na przeżywalność i proliferację ludzkich komórek gruczolakoraka jelita grubego (linia LS180), co może stanowić podstawę do zaprojektowania preparatów o aktywności chemoprewencyjnej;
- v. wykazanie zależności między składem ekstraktów a aktywnością, dla najsilniej działających wyciągów. I tak, w ocenie przeżywalności wartości IC<sub>50</sub> dla wyciągów z *Potentilla argentea*, *P. norvegica*, *P. recta* i *P. rupestris* mieściły się w granicach 32-38 µg/ml i korelowały z wysoką całkowitą zawartością garbników oraz jakościowo zidentyfikowaną w nich agrimoniną. Z kolei w ocenie aktywności antyproliferacyjnej, IC<sub>50</sub> dla



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

*P. alba*, *P. erecta* i *P. fruticosa* mieściło się w granicach 50-54 µg/ml i korelowało z wysoką całkowitą zawartością proantocyjanidyn;

vi. wykazanie przydatności ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z użyciem 70% wodnego roztworu acetonu, a następnie frakcjonowania ciecz-ciecz (LLE) do otrzymania wyciągów wzbogaconych w polifenole, co można wykorzystać do projektowania preparatów zawierających te bioaktywne związki

vii. opracowanie warunków analitycznych nowej i skutecznej metody oceny jakościowej związków, reprezentujących różne grupy roślinnych polifenoli, opartej na chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-PDA-HRMS), co ma walor dla przyszłych analiz fitochemicznych szerokiej grupy surowców roślinnych.

**Wymienione powyżej osiągnięcia jednoznacznie dowodzą oryginalności rozwiązań problemów naukowych przez Doktoranta i wskazują na nowatorski charakter badań, spełniając tym samym wymaganie sformułowane w artykule 187, pkt. 2 Ustawy.**

Przedstawione w rozprawie etapy prac i zastosowana przez mgr Daniela Augustynowicza metodologia świadczą o umiejętności planowania badań i współpracy, jak również opanowaniu szeregu technik niezbędnych w prowadzeniu prac fitochemicznych na światowym poziomie. Bez wątplenia przyczyniło się do tego ogromne doświadczenie w analizie fitochemicznej zespołu, kierowanego przez dr hab. Michała Tomczyka, w którym Doktorant realizował swoje badania. Mgr Augustynowicz posługiwał się m.in. ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami, techniką frakcjonowania ciecz-ciecz (LLE), spektrofotometrią, chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-PDA-HRMS). Z kolei dzięki prowadzonym we współpracy z Zakładem Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie badaniach aktywności biologicznej na liniach komórkowych miał okazję zapoznania się z szeregiem testów, będących światowym standardem, jeśli chodzi o badania wpływu ekstraktów czy związków na żywotność i proliferację komórek.

Warto wyróżnić wykonanie badań w kierunku selektywności działania wobec komórek nowotworowych, poprzez włączenie do analiz linii prawidłowych komórek wywodzących się z tego samego narządu, w tym przypadku komórek nabłonka okrężnicy. Jest to bardzo istotne dla oceny toksyczności i możliwości wykorzystania w praktyce klinicznej, a jednocześnie niestety bardzo rzadko spotykane na etapie badań przedklinicznych *in vitro*.

W tym miejscu chcę też podkreślić swobodę, z jaką Doktorant porusza się w tematyce badawczej, co jest widoczne w rzetelnym i obiektywnym sposobie przedstawiania wyników, ich szerokiej dyskusji, zarówno w publikacjach, jak i w tekście rozprawy, w umiejętności formułowania wniosków oraz wytyczenia planów na rozwinięcie dalszych badań. Chcę wyróżnić zwłaszcza zwrócenie uwagi na zbadanie aktywności



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

metabolitów związków, którym w bieżących badaniach przypisano wpływ na obserwowany efekt, tj. garbników hydrolizujących i proantocyjanidyn. Logiczny tok myślenia i uważność mgr Augustynowicza obrazuje także układ rozprawy i język, jakim posługuje się Autor, podoba mi się zwłaszcza unikanie naukowego żargonu i nowomowy. Na wyróżnienie zasługuje też dopracowanie strony edytorskiej, gdzie trudno znaleźć jakieś większe uchybienia. Jedyne, na co mogłabym zwrócić uwagę to mało czytelna tabela 3, nie ułatwiająca odczytania podobieństw składu między poszczególnymi wyciągami oraz niespójna terminologia, stosowane jest zarówno określenie „wyspecjalizowane metabolity” a kiedy indziej „metabolity wtórne”.

Reasumując, zawarte w tekście rozprawy oraz publikacjach, tworzących jej trzon, **treści jednoznacznie świadczą o szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta w dyscyplinie, którą reprezentuje, jak również potwierdzają umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia tym samym wymóg zawarty w art. 187, pkt.1 Ustawy.**

W trakcie lektury nasunęło mi się kilka pytań:

1. Dlaczego, posiadając wzorce szeregu związków, nie oznaczono ilościowo dominujących, zidentyfikowanych składników, co pozwoliłoby na bardziej precyzyjne określenie zależności skład-aktywność, niż w oparciu o oznaczone metodami spektrofotometrycznymi tzw. całkowite zawartości, które są jedynie szacunkowe? W celu przebadania tych zależności, dysponując zawartością poszczególnych związków można by było zastosować model statystyczny, który koreluje grupę parametrów predykcji (w tym przypadku – zawartość substancji bioaktywnych) z grupą parametrów odpowiedzi (aktywność cytotoksyczna, antyproliferacyjna), uzyskując bardziej miarodajną ocenę.
2. Biorąc pod uwagę zamiar określenia znaczenia chemofenetycznego wyników analizy fitochemicznej, czy Doktorant rozważał wykorzystanie bardziej zaawansowanych metod statystycznych? Dysponując macierzą danych (cech dychotomicznych), reprezentujących zdarzenie obecności albo nieobecności jakiegoś związku chemicznego w badanych gatunkach można było pokusić się o ustalenie statystycznej istotności współwystępowania niektórych cech dychotomicznych, np. za pomocą testu Chi2 Pearsona.
3. Czy w przypadku rutyny i hiperozydu, flawonoidów bardzo rozpowszechnionych w przyrodzie, jest jakiś szczególny powód dla typowania ich jako markerów chemofenetycznych rodzaju *Potentilla* L.?
4. Czy dla nowo wykazanego w pięciornikach związku, tj. N<sup>1</sup>,N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-trikumaroilospermidyny, do identyfikacji posłużono się substancją wzorcową?
5. We wnioskach Autor wskazuje na „wysoką aktywność biologiczną opisywanych preparatów w szczególności wobec linii ludzkich komórek gruczołakoraka okrężnicy”,



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

tymczasem najniższa wartość  $IC_{50}$  to 32  $\mu\text{g/ml}$  (w teście MTT dla wyciągu z pięciornika norweskiego) a dla pozostałych wyciągów z reguły  $> 100\text{-}200 \mu\text{g/ml}$ ; jak się to ma do wytycznych NCI określających stężenia aktywne dla ekstraktów?

6. Czy w kontekście obserwacji własnych, dotyczących korelacji między wysoką całkowitą zawartością garbników a aktywnością ekstraktów, Doktorant mógłby skomentować pojawiające się w literaturze doniesienia o fałszywie pozytywnych względnie fałszywie negatywnych wynikach (zwłaszcza w teście MTT) związanych z obecnością różnych polifenoli?

7. Czym można wytłumaczyć rozbieżności w wynikach dla przeżywalności i cytotoksyczności wyciągów o zbliżonym składzie, gdzie  $IC_{50}$  waha się w bardzo szerokich granicach?

Pytania te wynikają z ciekawości i mam nadzieję będą okazją do dyskusji podczas obrony.

#### Podsumowanie i wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że badania, których efektem są publikacje zawarte w rozprawie doktorskiej mgr Daniela Augustynowicza, stanowią **istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, a uzyskane wyniki mogą być bazą do dalszych poszukiwań** fitochemiczno-farmakologicznych, nie tylko w obrębie roślin rodzaju *Potentilla* L. i rodziny Rosaceae. Jak podkreśliłam wcześniej, **rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (z późn. zm.)**. Wysoki poziom wiedzy i umiejętności Autora jest dodatkowo poparty dorobkiem naukowym, nie wchodzącym w zakres recenzowanej rozprawy doktorskiej, obejmującym dwie publikacje oryginalne o łącznym IF = 6,118 (200 pkt. MEiN) oraz 8 doniesień konferencyjnych.

**W związku z powyższym składam wniosek do Komisji o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Daniela Augustynowicza i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie rekomendując nadanie stopnia doktora przez Senat Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.** Ponadto, ze względu na jej wartość merytoryczną wnioskuję o wyróżnienie, choć już sama wartość sumaryczna *impact factor* artykułów oryginalnych, równa 12,196, spełnia wymogi określone w regulaminie wyróżniania rozpraw doktorskich w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku.

Irma Podolak