



Zakład Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego

Katedra Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

tel. +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

Lublin, 21.07.2023 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne mgra Daniela Augustynowicza zatytułowanej „**Analiza fitochemiczna oraz ocena aktywności biologicznej wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla L. sensu lato.***”. Praca wykonana została w Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem dra hab. Michała Tomczyka.

Poznanie składu chemicznego roślin leczniczych jest niezwykle ważne i stanowi podstawę ich przyszłego zastosowania w nowoczesnej farmakoterapii. Dokładnie zaplanowane prace pozwalają nie tylko wytypować markery chemotaksonomiczne, określić przynależność gatunkową, ale także przeprowadzić badania biologiczne, aby uzasadnić celowość stosowania wybranych roślin w medycynie.

W swoich badaniach mgr Augustynowicz skierował swoją uwagę w kierunku niezwykle popularnego i rozpowszechnionego niemal na całej kuli ziemskiej rodzaju *Potentilla*. Liczne gatunki pięciornika uprawiane są jako rośliny ozdobne, ale na uwagę zasługuje ich działanie lecznicze. Od wieków znana i wykorzystywana jest ich aktywność w chorobach skóry czy przewodu pokarmowego. Obecnie wiemy, iż za działanie to odpowiada bogata frakcja polifenolowa. Ta grupa związków stała się obiektem badań Doktoranta, który za cel postawił sobie przeprowadzenie dokładnej analizy fitochemicznej nadziemnych oraz podziemnych części wybranych szesnastu gatunków z rodzaju *Potentilla L. s. l.*, a także ocenę ich aktywności biologicznej, a konkretnie wpływ ekstraktów otrzymanych z badanych gatunków na prawidłowe oraz nowotworowe linie komórkowe w obrębie przewodu pokarmowego.

Tematyka badawcza zaprezentowana w niniejszym opracowaniu wpisuje się w aktualne trendy badań w zakresie produktów naturalnych. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy są nowatorskie i mają bardzo duże znaczenie praktyczne. Uważam podjęcie przez Doktoranta niniejszego tematu badawczego, pod kierunkiem doświadczonego Promotora, za niezwykle ważne z punktu widzenia nauk farmaceutycznych i medycznych oraz w pełni uzasadnione.

Praca doktorska Pana Daniela Augustynowicza ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się na liście A wykazu Ministerstwa Edukacji i Nauki. Średni współczynnik oddziaływania tych prac wynosi 17,391 co daje 380 punktów MEiN, a Kandydat we wszystkich jest pierwszym autorem. Są to następujące pozycje:

- 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.
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.
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.
IF: 5,195, punktacja MEiN: 140 pkt

Mgr Daniel Augustynowicz dołączył kopie wszystkich artykułów oraz oświadczenia współautorów. W pracach wchodzących w skład recenzowanego cyklu Doktorant jest wiodącym wykonawcą. Każdorazowo brał udział we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, zaangażowany był w każdy z etapów eksperymentów, samodzielnie wykonał większość badań, zwłaszcza z zakresu analiz fitochemicznych.

Do publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dołączony jest krótki przewodnik, składający się w logiczną całość (tj. Wprowadzenie; Cel pracy; Realizacja celów naukowych, gdzie Doktorant krótko omawia materiały i stosowane metody badawcze, otrzymane wyniki i je dyskutuje oraz Wnioski). Spis bibliografii obejmuje 32 pozycje literaturowe, w większości najnowsze. Mgr Augustynowicz dołączył także wykaz skrótów oraz jednostronicowe streszczenia w formie abstraktu zarówno w języku polskim, jak i angielskim.

Na wyróżnienie zasługuje staranność w przygotowaniu dysertacji. Szczególnie w tym miejscu należy wyróżnić przejrzysty i zrozumiały język oraz opatrzenie całości materiału doskonałymi grafikami.

Po krótkim wstępie Doktorant dokładnie scharakteryzował sposób pozyskania i przygotowania materiału do badań, proces ekstrakcji i oczyszczania. Następnie wykonał analizę ilościową całkowitej zawartości polifenoli, garbników, proantocyjanidyn, flawonoidów i kwasów fenolowych z wykorzystaniem wybranych metod spektrofotometrycznych. W dalszej kolejności ekstrakty poddane zostały jakościowej analizie przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem z matrycą fotodiodową (PDA) oraz

z wysokorozdzielczym detektorem masowym (HRMS). Zoptymalizowana przez Doktoranta metoda analityczna pozwoliła na rozdzielenie i wykazanie obecności 217 metabolitów wtórnych o charakterze polifenoli, w tym garbników, flawonoidów oraz kwasów fenolowych. Niemal we wszystkich ekstraktach zidentyfikował On garbniki hydrolizujące z grupy elagotanin oraz galotanin jak agrimonina, pedunkulagina α i β , izomery lewigatyny oraz kwas elagowy czy kwas brewifolinokarboksyłowy będącymi produktami ich degradacji. Podkreślić należy, iż po raz pierwszy w rodzaju *Potentilla* Doktorant stwierdził obecność N-acylowanej pochodnej spermidyny, a mianowicie N1, N5, N10-trikumaroilospermidyny. W częściach nadziemnych oraz podziemnych pięciornika białego natomiast mgr Augustynowicz odnotował przewagę garbników skondensowanych, z dominującymi procyjanidynami di- oraz trimerycznymi. Badane wyciągi wodno – acetonowe były też bogatym źródłem kwasów fenolowych, w tym pochodnych kwasu kawowego, kumarowego, syringowego oraz galusowego. Ekstrakty z części nadziemnych charakteryzowały się wysoką zawartością związków flawonoidowych, pochodnych kwercetyny, kemferolu, izoramnetyny, apigeniny, trycyny oraz naryngeniny.

W badaniach biologicznych Doktorant skupił się na określeniu aktywności ekstraktów w kierunku komórek gruczolakoraka jelita grubego i komórek nabłonkowych okrężnicy. Wstępny etap pozwolił stwierdzić, iż wszystkie badane ekstrakty zmniejszały żywotność zarówno komórek normalnych, jak i nowotworowych w sposób zależny od dawki, jednakże komórki gruczolakoraka były bardziej wrażliwe i wiązało się to z hamowaniem syntezy DNA. Cytotoksyczność ekstraktów ściśle korelowała z zawartością garbników, szczególnie w ekstraktach z przewagą garbników hydrolizujących.

Istotność i ważność prowadzonych przez siebie badań Doktorant podparł dodatkowo przygotowując artykuł przeglądowy obejmujący lata 2009-2020, w którym zebrał dostępną wiedzę dotyczącą zastosowania roślin oraz otrzymanych z nich preparatów w medycynie tradycyjnej, podsumował zidentyfikowane dotychczas w obrębie gatunków z rodzaju *Potentilla* metabolity wtórne oraz podsumował przeprowadzone dotychczas badania biologiczne. Dopełnieniem pracy przeglądowej było zestawienie danych dotyczących bezpieczeństwa stosowania oraz toksyczności preparatów otrzymanych z roślin z badanego rodzaju. Praca opublikowana została na łamach prestiżowego *Journal of Ethnopharmacology* i bardzo szybko zaczęła być cytowana.

Zakres prac badawczych oceniam pozytywnie, posiadają one charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny. Wyniki badań zakończone zostały słusznymi wnioskami, świadczącymi o rozwojowym charakterze badań i kompetencjach Kandydata. Wyniki są niezwykle wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwy element nowatorstwa i stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, a całość opracowania dowodzi bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Kandydata.

Realizacja poszczególnych zadań badawczych umożliwiła zdobycie odpowiedniego warsztatu badawczego obejmującego szeroki wachlarz technik zarówno chromatograficznych i spektrofotometrycznych (chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas), ale

także badań biologicznych *in vitro*. Świadczy to o wszechstronności Doktoranta i dobrej znajomości tematyki oraz o obyciu i doświadczeniu w pracy laboratoryjnej.

Jako Recenzentowi pozostaje mi zadać kilka pytań nasuwających się po lekturze ocenianej rozprawy doktorskiej, a mających na celu poszerzenie dyskusji:

- dlaczego do badań Autor zdecydował się przygotować 70% roztwory wodne acetonu,
- w podrozdziale 4.4 Dyskusji Autor ponawia omówienie wyników, które zaprezentowane są już we wcześniejszych częściach opracowania (rozdział 4.4.3 czy 4.3.4). Może zamiast tego warto byłoby wyniki przedyskutować w szerszym kontekście z dostępną literaturą,
- czy Doktorant mógłby skomentować istotność procesu standaryzacji przetworów roślinnych, w szczególności biorąc pod uwagę określenie zawartości konkretnych związków odpowiedzialnych za działanie biologiczne,
- Autor wskazuje kilka związków jako potencjalnie aktywne i odpowiedzialne za wysoką aktywność, w szczególności wobec linii ludzkich komórek gruczołakoraka okrężnicy. Zarówno agrimonina, jak i tylirozyd są związkami dostępnymi komercyjnie. Czy Autor podjął próbę określenia dokładnego mechanizmu działania, zwłaszcza iż dostępna literatura wskazuje poniekąd kierunek badań. Czy planowane są, lub być może podjęte już zostały, prace mające na celu izolację pojedynczych ciał czynnych z najbardziej obiecujących ekstraktów?

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. Przedstawiony do oceny cykl prac jest spójny, badania własne Doktorant zaplanował dobrze i konsekwentnie zrealizował. Wysoką wartość wykonanych badań obrazują artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Mgr Augustynowicz jest młodym, ale doświadczonym pracownikiem naukowym i ciągle rozwija się. Tematyka badawcza jest kontynuowana, co widać w przedstawionym pozostałym dorobku naukowym.

Wnioski końcowe

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Daniela Augustynowicza spełnia wymogi formalne i merytoryczne określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z powyższym zwracam się do Komisji przewodu doktorskiego o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów w postępowaniu i jednocześnie do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników i ich znaczenie aplikacyjne, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak

Krystyna Skalicka-Woźniak
KIEROWNIK
Zakładu Chemii Produktów
Pochodzenia Naturalnego
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak