



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Gdańsk, 29.12.21r.

OCENA

pracy doktorskiej mgr Daniela Mirosława Grochowskiego
pt: „Badania fitochemiczne i ocena aktywności biologicznej
liści jeżyny popielicy *Rubus caesius*”

przedstawiona Radzie Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Pragnę podziękować Wysokiej Radzie Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Daniela Mirosława Grochowskiego zatytułowanej „Badania fitochemiczne i ocena aktywności biologicznej liści jeżyny popielicy *Rubus caesius*” przygotowanej w Zakładzie Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Michała Tomczyka, kierownika Zakładu.

Jedną z najstarszych form terapii i profilaktyki chorób jest stosowanie roślin leczniczych. W niektórych krajach świata z utrudnionym dostępem do usług medycznych ziołolecznictwo jest powszechnie praktykowane. Medycyna ludowa jest źródłem praktycznej wiedzy rozwijanej poprzez codzienne doświadczenie stosowania roślin leczniczych. Współczesna nauka sięga do tych źródeł poszukując nowych i efektywnych terapeutycznie surowców roślinnych lub izolowanych z nich związków chemicznych.

Liczne gatunki z rodzaju *Rubus* dostarczają surowców leczniczych wykorzystywanych głównie w medycynie ludowej – owoców, liści i młodych gałęzi (m. in. *Rubus idaeus* L. *Rubus occidentalis* L.). Spośród nich jedynie liście jeżyny krzewiastej (*Rubus fruticosus* L.)

są składnikami produktu leczniczego roślinnego jakim jest farmakopealna mieszanka ziołowa o działaniu przeciwbiegunkowym oraz posiadają jako surowiec leczniczy monografię w Farmakopei Polskiej XII.

Liście gatunku *Rubus caesius* L.- jeżyny popielicy (Rosaceae) były również wykorzystywane w lecznictwie tradycyjnym jako surowiec o działaniu przeciwbiegunkowym, przeciwcukrzycowym czy też przeciwzapalnym, głównie miejscowo, co stanowiło tło dla rozpoczęcia przez Doktoranta badań fitochemicznych i aktywności biologicznej tego surowca.

Jeżyna popielica, w przeciwieństwie np. do maliny właściwej czy zachodniej (podrodzaj *Idaeobatus*), należy od innego podrodzaju, mianowicie podrodzaju *Rubus* sekcji *Caesii*. Doktorant podkreśla, w opublikowanych pracach eksperymentalnych jak również we wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej, że rodzaj *Rubus* jest bardzo liczny i obejmuje około 700 gatunków.

Związkami chemicznymi - metabolitami wtórnymi charakterystycznymi dla surowców z rodzaju *Rubus* są antocyjany obecne w owocach, obok elagotanin i flawonoidów, występujących również w innych częściach roślin przedstawicieli tego rodzaju, mianowicie liściach i pędach, czy nasionach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje cykl 4. publikacji w tym 3. prac eksperymentalnych i 1. pracy przeglądowej, ściśle związanych z tematem, o łącznej wartości IF 13.775 i 190 punktach MNiSW. Są to:

publikacja 1. Grochowski D.M., Paduch R., Wiater A., Dudek A., Pleszczyńska M., Tomczykowa M., Granica S., Polak P., Tomczyk M., *In vitro* antiproliferative and antioxidant effects of extracts from *Rubus caesius* leaves and their quality evaluation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Vol. 2016, No. ID 5698685, 8 pages. IF₂₀₁₆ = 1.740, MNiSW = 30

publikacja 2. Grochowski D.M., Uysal S., Zengin G., Tomczyk M., *In vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties of *Rubus caesius* L. *International Journal of Environmental Health Research* 2019,29 (3), 237-245. IF₂₀₁₉ = 1.916, MNiSW = 70

publikacja 3. Grochowski D.M., Strawa J., M., Granica S., Tomczyk M., Secondary metabolites from *Rubus caesius*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2020, 92, 104111, 4 pages. IF₂₀₂₀ = 1.381, MNiSW = 40

publikacja 4. Grochowski D.M., Locatelli M., Granica S., Cacciagrano F., Tomczyk M., A review on the dietary flavonoid tiliroside. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018, 1395-142117 (5),. IF₂₀₁₈ = 8.738, MNiSW = 50.

Całkowita liczba cytowań cyklu prac publikowanych w latach 2016-2020 jest wysoka i wynosi według Web of Science/SCOPUS, odpowiednio 39/41. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, ponadto dołączono informacje o udziałach pozostałych autorów, wskazujące na kluczową rolę Doktoranta w wykonywaniu eksperymentów, wnioskowaniu, przygotowywaniu prac do druku.

Przedmiotem prac eksperymentalnych są badania fitochemiczne, koncentrujące się na analizie jakościowej i ilościowej zespołów prostych fenoli i polifenoli w liściach gatunku *Rubus caesius* oraz ocena aktywności biologicznej surowca w różnych obszarach: działania antyoksydacyjnego, przeciwcukrzycowego, cytotoksycznego/przeciwnowotworowego oraz potencjalnego działania terapeutycznego w schorzeniach neurodegeneracyjnych i terapii przebarwień skóry.

W zakresie badań fitochemicznych Doktorant podjął się ambitnego zadania jakim jest izolacja związków czynnych biologicznie z badanego materiału roślinnego (publikacja 3). Izolacja z użyciem kolumnowej chromatografii preparatywnej, grawitacyjnej na poliamidzie, sefadeksie LH-20, żelu krzemionkowym i wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie chromatograficznej typu shell-core jest procesem złożonym, czasochłonnym i często charakteryzującym się niską wydajnością, co może w konsekwencji utrudniać badania strukturalne. Wydajność izolacji jest również związana z faktem obecności w badanej matrycy roślinnej w różnych stężeniach – wysokich lub niskich, oznaczanych metabolitów wtórnych. Matryca roślinna jest najczęściej bardzo złożona zarówno w zakresie jakościowym jak i ilościowym.

W rezultacie bardzo dobrze zaplanowanego i zarazem skomplikowanego procesu prac izolacyjnych, począwszy od wstępnego oczyszczenia surowca, selektywnej ekstrakcji (płuczka ultradźwiękowa/aceton:woda, Soxhlet/metanol) poprzez frakcjonowaną ekstrakcję rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (eter etylowy, octan etylu) do rozdzieleni różnymi technikami/metodami chromatografii kolumnowej Doktorant z liści jeżyny wyodrębnił 9. związków chemicznych, których struktury ustalił w oparciu o szeroko wykorzystywane obecnie narzędzie jakim jest magnetyczny rezonans jądrowy w tym widma jedno – i wielowymiarowe, widma masowe oraz UV i IR. Ponieważ w publikacji 3, nie przedstawiono szczegółowych danych z badań strukturalnych wyodrębnionych związków (związki są znane i izolowane również z innych matryc roślinnych) można jedynie

przypuszczać, że zostały one przedstawione w materiałach dodatkowych i uzupełniających do tej publikacji. Obecność 8. związków w liściach *R. caesius* Doktorant ujawnił jako pierwszy i potwierdził jednocześnie występowanie kwasu elagowego (publikacja 3). Wyodrębnione przez niego związki polifenolowe w większości są charakterystyczne dla przedstawicieli rodzaju *Rubus*, mianowicie z grupy flawonoidów: 3-O-glukuronidy kwercetyny i kemferolu, tilirozyd, rutyna oraz wolne aglikony – kwercetyna, kemferol oraz z grupy elagotanin – pedunkulagina, które Autor wyróżnia jako markery chemofenetyczne rodzaju *Rubus*. Natomiast wyodrębniony przez Doktoranta ester metylowy kwasu brewifolinokarboksylowego mógłby być markerem w obrębie rodzaju *Rubus*, podzielonego na liczne podrodzaje. Uważam, że może być to ciekawym wątkiem dalszych badań związanych z chemotaksonomią rodziny Rosaceae i rodzaju *Rubus* zwłaszcza, że Doktorant podkreśla fakt wykrycia związku dotychczas jedynie w jednym gatunku z rodzaju *Rubus* – *R. saxatilis*.

Oceniając bardzo pozytywnie wyniki prac izolacyjnych Doktoranta, doceniając jego zaangażowanie oraz przeprowadzenie skomplikowanego i czasochłonnego procesu, jakim jest separacja metabolitów wtórnych z surowca roślinnego, nasuwa się pytanie dlaczego ich rezultatem nie było wyodrębnienie sangwiny H-6, elagotaniminy specyficznej dla przedstawicieli rodzaju *Rubus*. Obecność tego związku w liściach jeżyny popielicy Doktorant ujawnił metodą HPLC-DAD-MS³ w wyciągach metanolowych, wodnych i wodno-metanolowych jako związku dominującego. Na listach dostępnych standardów związek ten nie figuruje, podobnie jak wyodrębniona przez Doktoranta pedunkulagina.

W warunkach opracowanej metody HPLC-DAD-MS³ dla analizy jakościowej liści jeżyny popielicy, Doktorant w badanym materiale roślinnym rozpoznał 35 związków z grupy prostych fenoli oraz polifenoli, w tym flawonoidów oraz elagotanin (publikacja 1). Wobec standardów potwierdził obecność 7 związków, dla pozostałych przedstawił struktury przypuszczalne (niektóre pochodne flawonoidowe i pochodne kwasu elagowego). Brakuje dyskusji, w tekście publikacji 1 oraz manuskrypcie rozprawy, otrzymanych danych z widm UV oraz MS³, stanowiących bazę dla identyfikacji poszczególnych związków, rozdzielonych w procesie chromatograficznym. W związku z tym nasuwają się pytania, który ze związków przypuszczalnie rozpoznanych jako elagotanimina, może być pedunkulagina, który ze związków flawonoidowych rozpoznanych jako diglikozyd kwercetyny może jednak być rutyną, co stanowiło podstawę do rozpoznania takich związków flawonoidowych jak pentozoglukuronid kwercetyny i pentozoglukuronid kemferolu (tabela 1 w publikacji 1, str.32/33)?. Jednocześnie

należy zwrócić uwagę na błędną treść tabeli 1 zamieszczonej w manuskrypcie rozprawy (str. 13, związki o liczbach porządkowych 18, 19 oraz 25, 27) w odniesieniu do tabeli 1 w publikacji 1.

W prezentacji i omówieniu opublikowanych wyników badań w tekście rozprawy, zastosowano te same oznaczenia otrzymywanych w różnych procesach ekstrakcyjnych wyciągów i frakcji, pochodzących z dwóch różnych publikacji (publikacja 1 i 3), co stanowiło pewną trudność w ocenie wyników pracy i uniemożliwiało ich właściwą interpretację bez bezpośredniego odniesienia się do materiałów źródłowych - opublikowanych już prac Doktoranta.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta prac fitochemicznych, należy podkreślić znaczącą liczbę wydzielonych związków czynnych, oraz rozpoznanie chromatograficzne z użyciem nowoczesnych technik sprzężenia HPLC z detektorami DAD i tandemowej spektrometrii mas MS^3 profilu metabolicznego liścia jeżyny popielicy, w tym analizę kompozycji związków czynnych w różnych ekstraktach (wodnym, metanolowym, 50% metanolu) oraz frakcjach – eteru etylowego, octanu etylu i butanolu otrzymanych z badanego surowca (6 różnych matryc roślinnych).

Realizując temat doktorski, Kandydat podjął się ambitnego zadania rozpoznania możliwości zastosowania w przyszłości badanego surowca/ lub izolowanych z niego związków, w profilaktyce czy terapii chorób cywilizacyjnych – cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych, chorób nowotworowych, chorób skóry, stanów zapalnych.

W części rozprawy obejmującej badania aktywności biologicznej liścia jeżyny popielicy należy zwrócić uwagę na próbę, powiązania przez Doktoranta oznaczonej w badanych ekstraktach i frakcjach z surowca, zawartości całkowitej związków polifenolowych i flawonoidowych (metody spektrofotometryczne) oraz ich profili metabolicznych (otrzymanych metodą HPLC) z wynikami badań właściwości: antyoksydacyjnych (publikacja 1, 2), hamujących aktywność enzymatyczną – tyrozynazy, α -amylazy, α -glukozydazy, acetylo- (AChE) oraz butyrylocholinoesterazy (BChE) (publikacja 2). Pozwoliło to na sformułowanie interesujących wniosków uzasadniających kontynuowanie badań nad liściem jeżyny popielicy w kierunku wyjaśnienia aktywności biologicznej poszczególnych frakcji na tle bardziej szczegółowych badań ich składu chemicznego i profili ilościowych. Interesującą sugestią jest m. in. wskazanie na sangwinę H-6 jako związek czynny liścia jeżyny popielicy przypuszczalnie odpowiadający za aktywność hamującą tyrozynazę.

Doktorant bardzo szeroko scharakteryzował potencjał antyoksydacyjny badanego surowca w zakresie właściwości zmiatania wolnych rodników oraz hamowania ich powstawania, wykonując 6 różnych testów dla każdej z 6 badanych frakcji, obejmujących zarówno antyoksydanty o charakterze fenolowym jak i związki liścia jeżyny nieposiadające struktury fenolowej. Aktywność antyoksydacyjna jest jednym z najważniejszych kierunków działania surowców roślinnych, wykazując bezpośredni związek m.in. z aktywnością przeciwzapalną, neuro- i hepato-protektyną, rozwojem chorób nowotworowych, układu krążenia, cukrzycy i in.

Niezwykle cenną pozycją w cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską Kandydata jest praca przeglądowa o tilirozydzie, jednym ze związków chemicznych uznanych przez Kandydata za marker chemofenetyczny rodzaju *Rubus*. Stanowi ona bardzo wnikliwe studium różnorodnej aktywności biologicznej tilirozydu, mechanizmów działania na różnych poziomach: biochemicznym, molekularnym (publikacja 4). Lektura tej publikacji uświadamia, że współczesna nauka i rozwój wielu dyscyplin naukowych, biochemii, biologii molekularnej, dostarczył od wieków oczekiwanych dowodów wpływu na kondycję zdrowotną i skuteczność terapeutyczną substancji roślinnych.

Konstrukcja manuskryptu stanowiącego rozprawę doktorską jest przejrzysta i obejmuje 9 rozdziałów, stanowiących m. in. wprowadzenie z przeglądem literatury jako tłem do sformułowanego tematu rozprawy, cel pracy, opis skrócony realizacji tematu, podsumowanie i dyskusję oraz kopie publikacji wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej. Strona edytorska manuskryptu nie budzi zastrzeżeń. Autor nie uniknął nielicznych błędów stylistycznych i błędów w stosowanej terminologii. Wymienione niedociągnięcia nie mają wpływu na wysoką jakość przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Daniela Mirosława Grochowskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi znaczące elementy nowości do stanu wiedzy o kompozycji związków czynnych liścia *Rubus caesius* i jego potencjale biologicznym oraz chemotaksonomii rodziny *Rosaceae*. Kandydat wykazał się ogólną wiedzą teoretyczną oraz praktyczną w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Ponadto ujawnił umiejętności efektywnej współpracy z ośrodkami naukowymi krajowymi oraz zagranicznymi.

Rozprawa doktorska mgr Daniela Mirosława Grochowskiego spełnia wymagania Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20.07.2018r. (dział V, rozdział 1 i 2,

art. 186,187 pkt.1-4). Na tej podstawie wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Daniela Mirosława Grochowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL
Gdański Uniwersytet Medyczny