



Gdańsk, 11.09.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Mileny Połumackanycz pt. "Ocena ilościowa i jakościowa składników wybranych surowców roślinnych i ich handlowych produktów" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Agnieszki Viapiana

Podstawa opracowania recenzji:

*Pismo prof. Dr hab. Wiesława Sawickiego – Przewodniczącego Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
w sprawie wykonania oceny rozprawy doktorskiej z dnia 13.07.2023*

Produkty pochodzenia roślinnego od wieków były wykorzystywane w różnych kulturach, stanowiąc integralną część tradycyjnych systemów leczenia. Jednak trend stosowania leków ziołowych ewoluje w odpowiedzi na różne czynniki, w tym zmiany preferencji konsumentów, postęp badań naukowych, zmiany w systemach opieki zdrowotnej oraz zwiększoną świadomość holistycznego podejścia do zdrowia. Obecnie preparaty pochodzenia roślinnego zyskują na popularności, ponieważ ludzie poszukują alternatywnych i uzupełniających podejść do opieki zdrowotnej. Wiele osób zwraca się po ziołolecznictwo z powodu różnych problemów zdrowotnych, takich jak między innymi stres, stany depresyjne, zaburzenia snu, choroby neurodegeneracyjne czy problemy trawienne. Dodatkowo, rosnąca ilość doniesień naukowych o nowych fitozwiązkach i ich potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych zwiększa zainteresowanie roślinami leczniczymi występującymi zarówno lokalnie, jak i w odległych rejonach świata. W konsekwencji na rynku za pośrednictwem różnych kanałów, w tym sklepów ze zdrową żywnością, sklepów internetowych czy aptek pojawiają się łatwo dostępne produkty pochodzenia roślinnego występujące w różnych postaciach i formach często bez odpowiedniej kontroli jakości gwarantującej bezpieczeństwo, autentyczność, obecność substancji bioaktywnych oraz skuteczność. Z tego względu podjęcie tematyki oceny wybranych parametrów jakościowych popularnych produktów ziołowych wydaje się uzasadnione. Dodatkowo w pracy podjęto próbę wskazania związków lub grup związków odpowiedzialnych za wybrane aktywności biologiczne. Jest to zagadnienie bardzo aktualne i jednocześnie niezwykle złożone. Jakkolwiek wszystkie generowane dane jakościowe dotyczące poszczególnych surowców roślinnych przybliżają naukowców do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za ich działanie terapeutyczne. Identyfikacja substancji

bioaktywnych w poszczególnych surowcach i produktach jest kluczowym zagadnieniem niezbędnym do walidacji wiarygodności tradycyjnych praktyk, odkrywania nowych zastosowań terapeutycznych, standaryzacji, kontroli jakości i autentyczności oraz zapewnienia bezpieczeństwa stosowania produktów roślinnych. Wyżej wymienione fakty pozwalają na pozytywną ocenę ważności tematyki dysertacji, zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych.

Przedstawiona do oceny praca składa się z 11 rozdziałów w układzie typowym dla prac przygotowanych na bazie cyklu publikacji. W opracowaniu liczącym 55 stron znajduje się: wykaz stosowanych skrótów i akronimów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wykaz pozostałych publikacji i doniesień konferencyjnych, wstęp, cele naukowe, opis materiału badawczego i stosowanych metod, omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy, wnioski oraz bibliografia. Dodatkowo do opracowania dołączono kopie artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej.

W krótkim wstępie Doktorantka przedstawiła w kontekście aktualnego stanu wiedzy uzasadnienie podjętej w rozprawie tematyki badawczej. Opis ten choć jednoznacznie wskazuje na jej ważność jest dosyć pobieżny. Między innymi przedstawiono w nim przykłady kilku flawonoidów w kontekście wybranych aktywności biologicznych pomijając kwasy fenolowe, które również były rozpatrywane podczas analiz celowanych wszystkich próbek roślin.

W kolejnym rozdziale Doktorantka wymieniła cele naukowe zarówno ten główny, jak i szczegółowe cele badawcze w odniesieniu do konkretnych artykułów z cyklu publikacji. Pewien niedosyt budzi brak postawionej hipotezy badawczej, której podjęcie powinno być uzasadnione w kontekście aktualnego stanu wiedzy.

W rozdziale "Część doświadczalna" przedstawiono charakterystykę materiału badawczego oraz zestawiono i pokrótce opisano metody stosowane podczas przygotowania próbek oraz analiz końcowych. Wybór roślin do badań uzasadniono ich popularnością wśród klientów aptek i sklepów zielarskich. Były to bardziej znane i stosowane w rejonie Europy Środkowej surowce takie jak dzika róża, morwa biała i czarna oraz werbena lekarska i cytrynowa. Pozostałe to mniej znane, ale zyskujące na popularności rośliny takie jak różeniec górski z Syberii oraz ashwagandha z Indii. Wybrane surowce występowały w formie tabletek, kapsułek, herbatek oraz suszu. Do analiz końcowych przygotowano próbki w postaci naparów, odwarów, nalewek oraz ekstraktów wodno-metanolowych. Takie podejście jest niezwykle istotne, gdyż uwzględnia specyfikę metabolomu typowego dla danej matrycy roślinnej i pozwala na określenie najbardziej efektywnego sposobu izolacji związków bioaktywnych. Metody i procedury wybrane do analiz porównawczych można uznać za rutynowe i typowe dla tego typu oznaczeń. Większość analiz oparta była głównie na technikach spektroskopowych i chromatograficznych.

W kolejnym rozdziale Doktorantka streściła cel, metody, wyniki i wnioski badań opisanych w poszczególnych artykułach będących podstawą rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska została przygotowana zgodnie z wytycznymi określonymi w art. 187. ust.3. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* w formie tematycznie spójnego cyklu 5 manuskryptów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* w latach 2020-2023 oraz znajdujących się na liście A *Wykazu czasopism naukowych Ministra Edukacji i Nauki*:

- D1. Połumackanycz M., Kauszba M., Konopacka A., Marzec-Wróblewska U., Wesołowski M., Waleron K., Buciński A., Viapiana A. Phenolic composition and biological properties of wild and commercial dog rose fruits and leaves. *Molecules* 2020, 25, 5272 (IF₂₀₂₀ 4.412; MEiN 140).
- D2. Połumackanycz M., Wesołowski M., Viapiana A. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2021, 76, 458-465 (IF₂₀₂₁ 4.124; MEiN 100).
- D3. Połumackanycz M., Koniecznyński P., Orhan I. E., Abaci N., Viapiana A. Chemical composition, antioxidant and anti-enzymatic activity of golden root (*Rhodiola rosea* L.) commercial samples. *Antioxidants* 2022, 11, 919 (IF₂₀₂₂ 7.0; MEiN 140).
- D4. Połumackanycz M., Petropoulos S. A.; Añibarro-Ortega M., Pinela J., Barros L., Plenis A., Viapiana A. Chemical composition and antioxidant properties of common and lemon verbena. *Antioxidants* 2022, 11, 2247 (IF₂₀₂₂ 7.0; MEiN 140).
- D5. Połumackanycz M., Petropoulos S. A., Śledziński T., Goyke E., Konopacka A., Plenis A., Viapiana A. *Withania somnifera* L.: phenolic compounds composition and biological activity of commercial samples and its aqueous and hydromethanolic extracts. *Antioxidants* 2023, 12, 550 (IF₂₀₂₂ 7.0; MEiN 140).

Łączna ilość punktów tych artykułów według wykazu czasopism MEiN z lipca 2023 r. wynosi 660 a sumaryczny współczynnik oddziaływania IF zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 29.536. Wszystkie przedstawione jako rozprawa artykuły to prace oryginalne, wieloautorskie. W dokumentacji niestety nie zawarto oświadczeń współautorów opublikowanych prac, jednak w każdej publikacji Doktorantka jest pierwszym autorem a Jej udział w wykonaniu badań, opracowaniu danych i przygotowaniu publikacji wydaje się wiodący i został wskazany w manuskryptach w sekcjach *Author Contributions*.

Każdy artykuł z cyklu prac dotyczył surowców pochodzących z jednej rodziny botanicznej. Były to rośliny z rodziny różowatych (D1), morwowatych (D2), gruboszowatych (D3), werbenowatych (D4) oraz psiankowatych (D5). Wszystkie przedstawione w cyklu publikacje przedstawiają analizy porównawcze. Dwie z nich dotyczą porównania wybranych parametrów jakościowych różnych produktów handlowych jednego gatunku tj. różeńca górskiego (D3) i ashwagandhy (D5). Kolejne dwie publikacje to porównanie surowców pochodzących ze zbioru naturalnego dwóch różnych gatunków należących do jednej rodziny

tj. morwy białej i czarnej (D2) oraz werbeny pospolitej i cytrynowej (D4). Jedną z publikacji dotyczących dzikiej róży (D1) opisywała analizy porównawcze zarówno handlowych preparatów, jak i surowca pochodzącego ze zbiorów naturalnych. W tym przypadku materiał badawczy uzupełniono dodatkowo o liście, które nie są typowym surowcem farmakognostycznym, a jak wykazano są również bogatym źródłem przeciwutleniaczy. Wszystkie surowce roślinne poddano analizie celowanej pod kątem zawartości wybranych związków fenolowych takich jak: kwasy fenolowe (7 pochodnych kwasu hydroksycynamonowego i 3 kwasu hydroksybenzoesowego) oraz flawonoidy (3 flawonole, 1 flawan-3-ol oraz 1 flawanon) przy wykorzystaniu zestawu HPLC sprzężonego z detektorami DAD i MS lub samym DAD. Dodatkowo we wszystkich surowcach za pomocą metod spektrofotometrycznych oznaczono poziom kwasu askorbinowego, całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych oraz całkowitą aktywność przeciwutleniającą stosując od 2 do 4 różnych testów. W przypadku niektórych surowców oznaczono także aktywność przeciwbakteryjną (dzika róża - D1 oraz ashwagandha - D5), zawartość pierwiastków metalicznych (różeńiec -D3) oraz zawartość wybranych składników odżywczych takich jak węglowodany, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe i tokoferole (werbena - D4). W przypadku dwóch surowców opisywanych w literaturze jako adaptogeny tj. różeńca (D3) i ashwagandy (D5) oznaczono również właściwości hamujące aktywność butyrylocholinoesterazy (BChE) i acetylocholinoesterazy (AChE) - enzymów katalizujących hydrolizę acetylocholiny, czyli związku pełniącego rolę neuroprzekaźnika w układzie nerwowym. Część z wymienionych analiz Doktorantka przeprowadziła we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi zarówno krajowymi (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy), jak i zagranicznymi (Uniwersytet Gazi w Ankarze w Turcji, Uniwersytet Thessali w Grecji oraz Instytut Politechniczny w Bragnaca w Portugalii) co wskazuje na umiejętność pracy w różnych zespołach badawczych.

W rozdziale "Wnioski" Doktorantka podsumowała obserwowane i potwierdzone analizami statystycznymi, występujące na różnym poziomie zależności, wskazując najsilniejszą dodatnią korelację pomiędzy zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą. Uzyskane wyniki pozwoliły jej również między innymi udowodnić działanie różeńca i ashwagandy jako inhibitorów AChE i BChE tym samym wskazując na ich potencjalne zastosowanie w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Na uwagę zasługuje również obserwacja dotycząca dzikiej róży wskazująca na możliwość zastosowania jej liści jako surowca zielarskiego ze względu na wysoką aktywność przeciwutleniającą i przeciwbakteryjną. Niewątpliwie wysoką wartością aplikacyjną charakteryzują się wyniki i wnioski dotyczące najbardziej efektywnego sposobu izolacji substancji bioaktywnych z matryc poszczególnych badanych roślin. Taka informacja z pewnością może być przydatna zarówno dla konsumentów co do formy przyjmowanego preparatu, jak i naukowców na etapie przygotowania próbek np. do badań metabolomicznych. Podsumowane przez Doktorantkę wnioski końcowe wskazują na realizację założonego celu oraz podkreślają elementy innowacji podjętej tematyki, której

aktualność i zasadność dodatkowo potwierdza spis cytowanej w pracy literatury. Spis ten zawiera 98 pozycji uszeregowanych zgodnie z kolejnością cytowań, ściśle związanych z tematyką rozprawy i w 50% opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat.

Opublikowane manuskrypty przedstawione do oceny jako rozprawa doktorska były już poddane weryfikacji przez niezależnych recenzentów renomowanych czasopism naukowych oraz stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej. Chciałabym podkreślić, że w ocenianej rozprawie nie dostrzegłam większych potknięć w opisie, nieścisłości sformułowań czy błędów edycyjnych. Zapytania do Doktorantki nie mają istotnego wpływu na moją pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy. Zasadnicze uwagi i komentarze dotyczące rozprawy doktorskiej mgr Mileny Połumackanycz przedstawiono poniżej. Uwagi stanowią zbiór pewnych otwartych sugestii do dyskusji podczas obrony.

- Proszę uzasadnić wybór praktycznie takich samych zestawów związków fenolowych do analiz celowanych dla 5 różnych matryc roślinnych. Czy w trakcie analiz HPLC nie były obserwowane inne typowe dla danej rodziny związku bioaktywne np. antocyjany w owocach róży, pochodne kemferolu i kwercetyny dla morwy, glikozydy alkoholu cynamonowego (salidrozyd, rosavin) dla różenia, glikozydy fenylopropanoidowe (werbaskozyd) dla werbeny czy witanolidy dla ashwagandhy?
- W przypadku surowców pochodzących ze zbioru naturalnego np. róży, morwy czy werbeny w opisie i artykułach nie podano metody suszenia tych roślin. Jest to jeden z kluczowych etapów obróbki surowca, od którego warunków zależy w dużym stopniu zachowanie natywnych form fitozwiązków w produkcie.
- W przypadku morwy liście pozyskano z Włoch, proszę skomentować jakość liści morwy białej z Włoch (D2) w porównaniu z herbatkami pochodzącymi z Polski, które były przedmiotem badań Doktorantki w publikacji z 2019 opublikowanej w *Molecules*, przedstawionej w dorobku, ale nie ujętej w cyklu artykułów.
- W rozprawie i publikacjach pojawia się stwierdzenie, że w próbkach oznaczano skład związków fenolowych (*phenolic compound composition*) czy jest to prawidłowe stwierdzenie, kiedy oznacza się tylko kilka wybranych związków fenolowych i niekoniecznie tych występujących na wysokim poziomie stężeń?
- Jaki mógłby być powód braku korelacji pomiędzy sumą zawartości oznaczonych techniką HPLC związków fenolowych a całkowitą zawartością związków fenolowych oznaczonych metodą spektrofotometryczną w liściach morwy (publikacja D2).
- Proszę wyjaśnić celowość szukania korelacji między parami poszczególnych analitów np. CA-RUT, MYR-NAR itd. (publikacja D2), czy fenoli z metalami np. Fe-CA itd. (publikacja D3).
- Na str. 20 i 21 do kwasów fenolowych zaliczono katechinę (CAT) czy jest to prawidłowa klasyfikacja?

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Mileny Połumackanycz, gdyż podjęta tematyka jest niezwykle aktualna a uzyskane wyniki cechują się aspektami nowości. Podczas realizacji doświadczeń Doktorantka umiejętnie wykorzystywała różne techniki analityczne oraz metody mikrobiologiczne co jest bez wątpienia mocną stroną tej pracy. Autorka wykazała, iż jest dobrym eksperymentatorem i potrafi interpretować otrzymane wyniki w sposób właściwy. Umiejętność prowadzenia złożonych, wielokierunkowych badań w efekcie pozwoliła na uzyskanie ważnych z naukowego punktu widzenia merytorycznych uogólnień, które z pewnością znajdą przełożenie aplikacyjne oraz będą podstawą do kontynuacji podjętej tematyki. Na uznanie niewątpliwie zasługuje również imponujący jak na tak wczesny etap kariery naukowej dorobek naukowy Doktorantki.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Mileny Połumackanycz stanowi oryginalne opracowanie naukowe spełniające wymogi ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jedn. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Mileny Połumackanycz do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

dr hab. inż. Barbara Kusznierewicz
Kusznierewicz Barbara
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
WYDZIAŁ CHEMICZNY
POLITECHNIKA GDAŃSKA