

Prof. dr hab. Wiesława Bylka

Poznań, 15 sierpnia 2023 r.

Emerytowany profesor Katedry i Zakładu Farmakognozji

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Recenzja pracy mgr farm. Filipa Oskara Graczyka pt.,,Analiza farmakognostyczno-chemiczna i fitofarmakologiczna owoców *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. jako nowego surowca adaptogennego” przedstawionej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu, w celu uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Miejsce realizacji pracy: Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Daniel Załuski prof. UMK

Przedmiotem pracy doktorskiej były owoce *Eleutherococcus senticosus*. Badania nad gatunkami z rodzaju *Eleutherococcus* realizowane są z interesującymi wynikami przez promotora pracy oraz Zespół z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji w Bydgoszczy. Realizacja dysertacji, w założonym zakresie, nie byłaby zatem możliwa bez zaangażowania i doświadczenia promotora.

W recenzowanej pracy Doktorant postawił hipotezę zakładającą, że owoce mogą być stosowane jako nowy surowiec adaptogeny, zamiennie z korzeniami. Prace mające na celu potwierdzenie powyższej hipotezy przebiegały wieloetapowo i obejmowały: ocenę farmakognostyczną i fitochemiczną owoców, ocenę fitochemiczną i farmakologiczną intraktu z owoców w modelu *in vitro*, z uwzględnieniem badań, których wyniki pomogłyby ocenić, czy owoce mogą stanowić surowiec o działaniu adaptogennym.

Podstawą pracy doktorskiej jest cykl, opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech prac naukowych, eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2021 – 2022 w czasopiśmie z IF: dwie prace w czasopiśmie *Molecules* IF:4.927 pkt MNiSW:140 (wyniki jednej z nich zostały wykorzystane częściowo) i jednej w *Journal of Ethnopharmacology* IF:5.195 pkt MNiSW:140 (łącznie IF:15.049 pkt MNiSW:420). Wyniki były także prezentowane na dwóch zjazdach międzynarodowych.

Dokumentacja składa się z komentarza obejmującego wstęp, cel pracy, badania własne, omówienie wyników badań i dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, spis rycin oraz z

kopii prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, ze zgody Komisji Biotycznej na przeprowadzenie badań, a także z oświadczeń Autora i Współautorów prac o udziale w badaniach, z których wynika znaczący udział Doktoranta w wykonaniu publikacji. We wszystkich pracach mgr Graczyk był pierwszym Autorem.

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się w czasopiśmie z listy JCR, przed opublikowaniem zostały oceniane pod względem merytorycznym przez recenzentów z wielu ośrodków naukowych, działających niezależnie. Jak recenzent rozprawy doktorskiej, których podstawę stanowią przedstawione prace, skupię się zatem na ocenie wyboru i znaczenia problematyki dysertacji, spójności tematycznej przedstawionych prac oraz na wyrażeniu opinii o nadesłanej dokumentacji, szczególnie autorskiego komentarza i innych zawartych w niej częściach.

Cel i zakres pracy jest jasno sprecyzowany i uzasadniony. Realizacja kolejnych badań uwzględniała wyniki poprzednich.

Zainteresowanie owocami wynika z nadmiernej eksploatacji korzeni eleuterokoka kolczastego, których skuteczność potwierdzona licznymi badaniami, również klinicznymi, jest konsekwencją obecności synergistycznie działających, o różnorodnej budowie chemicznej eleuterozydów (nmn 0,08% eleuterozydów B i E). Zwiększanie zdolności adaptacyjnej organizmu przez korzenie wynika z wiele mechanizmów, m.in. z wpływu na oś przysadka-nadnercze-podwzgórze, na syntezę ATP, na system immunostymulacyjny, zmniejszanie stanów zapalnych. Zbiór korzeni grozi wyginieniem gatunku w krajach Dalekiego Wschodu, ponadto istnieją doniesienia o tradycyjnym stosowaniu owoców jako środek tonizujący ośrodkowy układ nerwowy, adaptogenny, przeciwzapalny. Owoce zostały przebadane w niewielkim stopniu. Dotąd stwierdzono obecność flawonoidów, związków fenolowych, eleuterozydów B i E, licznych związków mineralnych, olejku lotnego, aktywność p-drobnoustrojową, cytotoksyczną, antyoksydacyjną. Rozszerzenie badań nad owocami w celu oceny spodziewanego działania adaptogennego jest więc uzasadnione.

Owoce *E. senticosus* zebrano w Ogrodzie Roślin Leczniczych i Kosmetycznych w Bydgoszczy. Założone zadania badawcze Doktorant rozpoczął od identyfikacji cech budowy anatomicznej, widocznych pod mikroskopem z przekroju poprzecznego oraz sproszkowanych wysuszonych owoców. Cechy te mogą być przydatne w potwierdzeniu tożsamości surowca.

W dalszej pracy wyróżnić można dwie części. Pierwsza obejmuje badanie ekstraktu etanolowego z całych wysuszonych owoców oraz nasion i owocni metodą HPLC-PDA. Wyniki wskazywały, że w całych owocach występuje najwyższa zawartość eleuterozydów B i

E, znaczna kwasu chlorogenowego. W owocach oznaczono: zawartość 38 składników, głównie monoterpenu i seskwiterpenów (badania metodą GC-MS fazy nadpowierzchniowej uzyskanej za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej); we frakcji heksanowej zawartość tokoferoli, chlorofili, karotenoidów, kwasu ursolowego (metoda HPLC-PDA) oraz kwasów tłuszczowych (głównie nienasyconych: ponad 18% linolenowego, mało kwasów nasyconych) (metoda GC-MS).

W drugiej części pracy zajęto się intraktem, otrzymanym ze świeżych owoców 40% etanolem, w temp. pokojowej przez 30 dni, w ciemności. W intrakcie nie występowały eleuterozydy B, E i E1, w znacznej ilości obecne są kwas kawowy i protokatechowy (analiza HPLC-PDA), obecny jest *mio*-inozytol oraz D-mannitol w ilości 267,5 oraz 492,5 mg/g, odpowiednio (analiza HPLC-RID, wobec 33 cukrów). Standardowymi metodami została oznaczona zawartość polifenoli, flawonoidów, sumy kwasów fenolowych. Zawartość tych grup związków okazała się znacznie niższa niż opisywana w literaturze dla korzeni. W ramach oceny aktywności biologicznej, która mogłaby być włączona w działanie adaptogenne, określono: potencjał antyoksydacyjny intraktu metodą z DPPH, ABTS, zdolność do chelatowania jonów żelaza Fe^{2+} z wykorzystaniem ferrozyny (słabszy niż opisywany dla korzeni), zdolność do inhibicji tyrozynazy wobec kwasu kojowego (słabsza niż korzeni), wpływ na hamowanie hialuronidazy wobec escyny (słabszy niż korzenie, ale co interesujące silniejszy od escyny), hamowanie acetylocholinoesterazy wobec fizostygminy (brak inhibicji). Mgr Graczyk wykazał, że intrakt nie powodował zmian w żywotności komórek w badaniu na linii komórkowej FaDu (raka płaskonabłonkowego) oraz linii komórkowej HepG2 (raka wątroby) (test MTT), co jest korzystną cechą dla surowca adaptogennego. Autor dysertacji dowodził, że intrakt a także eleuterozydy B i E powodują wzbudzanie nieswoistej, wrodzonej odporności. Ten wniosek wynikał z wpływu na stymulację leukocytów krwi obwodowej PBLw obecności wirusa VSV. Analizy rozpoczęto od kontroli działania badanych próbek na zastosowaną jako medium linię komórkową nowotworu płuc A549 (brak zmian cytopatycznych) oraz wykluczenia działania wirusobójczego samych próbek. Wyniki kolejnych analiz udowodniły, że intrakt powodował wzrost proliferacji leukocytów krwi obwodowej, natomiast eleuterozydy nie miały tego działania. Ocena wpływu na wzbudzanie odporności leukocytów zainfekowanych wirusem VSV, wskazywała, że w następstwie działania intraktu następował 3 - krotny spadek miana wirusa VSV w porównaniu z kontrolą, a wartość spadku wskazywała na wytworzenie częściowej odporności, podczas gdy zmiany pod wpływem eleuterozydów B i E nie były statystycznie istotne. W rezultacie badań działania intraktu oraz eleuterozydów B i E na

wybrane elementy systemu immunologicznego, wykazano, że stężenie IL-2 nie ulegało zmianie, natomiast pod wpływem inkraktu następował wzrost produkcji IL-10 o 328 pg/ml, eleuterozydy B i E działały znacznie słabiej (o 170,3 i 187 pg/ml, odpowiednio).

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy:

1. identyfikacja cech budowy anatomicznej owoców, przydatnych w ustaleniu ich tożsamości
2. oznaczenie zawartości związków w analizowanych owocach: eleuterozydów B i E oraz wybranych związków hydro- i lipofilnych, w tym dotąd nie stwierdzanych w owocach: mono- i seskwiterpenów, tokoferoli, karotenoidów, chlorofili, kwasów tłuszczowych; stwierdzenie składu i właściwości biologicznej inkraktu otrzymanego z badanych owoców. Jako najistotniejsze wyniki badania inkraktu wymienić można: wykrycie po raz pierwszy: *mio*-inozytolu i D-mannitolu; brak w inkrakcie eleuterozydów B i E; oznaczenie zawartości polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych; wykazanie na dwóch wcześniej nie badanych liniach komórkowych braku działania cytotoksycznego; ocena aktywności antyoksydacyjnej, hamującej hialuronidazę a także wcześniej nie badanego wpływu na tyrozynazę oraz acetylocholinoesterazę; wykazanie po raz pierwszy, że inkrakt wpływa u pobudzanie nieswoistej, wrodzonej odporności oraz że ta aktywność jest wynikiem obecności związków innych niż eleuterozydy B i E; udowodnienie po raz pierwszy wpływu inkraktu na wzrost wytwarzania przeciwwzpalnej interleukiny IL-10. Wykazana aktywność biologiczna może potwierdzać tradycyjne stosowanie w stanach zapalnych i może mieć znaczenie dla potencjalnej aktywności adaptogennej owoców.
3. Ciekawe jest wykrycie w owocach dużych ilości *mio*-inozytolu. *Mio*-inozytol jest obok D *chiro*-inozytolu najbardziej aktywnym biologicznie spośród 9 stereoisomerów inozytolu. Jest składnikiem płynów ustrojowych i błon komórkowych, niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego (wpływ na wychwytywanie zwrotny serotoniny), hormonalnego, ma właściwości p-zapalne i p-utleniające. W badaniach klinicznych udokumentowany jest wpływ suplementacji inozytolem na zmniejszenie objawów PCOS oraz na lepszą skuteczność leczenia depresji m. in. w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej, w przedmiesiączkowym zaburzeniu dystroficznym, dużym zaburzeniu depresyjnym, u pacjentów z depresją w schizofrenii. Nasuwa się wniosek, że inozytol może być istotny dla wyjaśnienia mechanizmu działania adaptogennego.

Zakres pracy i sposób jej realizacji wskazuje na umiejętność zaplanowania, determinację i skuteczność w wykonywaniu założonych badań oraz na zdolność do współpracy z różnymi ośrodkami naukowymi. Doktorant wykazał, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną, dobrze

opanovał warsztat badawczy, cechuje się umiejętnością realizowania założonych eksperymentów badawczych. Chciałabym podkreślić wielokierunkowość badań, co wymagało od Doktoranta znajomości różnych technik chromatograficznych, spektrofotometrycznych; użytecznych w analizach jakościowych i ilościowych materiału roślinnego; znajomości metod oceny aktywności biologicznej antyoksydacyjnej, hamującej enzymy, a także przygotowania do pracy z materiałem biologicznym, m. in. na liniach komórkowych. Podkreślić też chciałabym umiejętność interpretacji i dyskusji nad uzyskanymi wynikami wraz z ich analizą statystyczną. Sposób realizacji pracy wskazuje ponadto, że mgr Graczyk posiada przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Komentarz do pracy jest napisany zwięźle i w zrozumiały sposób, zredagowany starannie. O randze naukowej recenzowanej pracy świadczy opublikowanie wyników badań w czasopismach naukowych ze wskaźnikiem IF (łączny IF:15.049).

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji dysertacja magistra Graczyka jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej wnoszą istotny wkład do wiedzy dotyczącej owoców eleuterokoka kolczastego, jako surowca o potencjalnej aktywności adaptogennej.

Uwagi są następujące:

1. Nie zgadzam się z Doktorantem, że owoce eleuterokoka kolczastego mogą być stosowane zamiennie z korzeniami. Taki wniosek wymaga kolejnych badań nad wyjaśnieniem mechanizmu działania. Wpływ owoców na zwiększenie aktywności adaptacyjnej organizmu może być inny, owoce mogą mieć odmienny od korzeni profil aktywności adaptogennej, determinowany innym składem. Skłaniałabym się do wniosku, że uzyskane rezultaty zachęcają do dalszych badań nad wyjaśnieniem składu i mechanizmu działania owoców
3. Ciekawe mogły być wyniki badania inkraktu otrzymanego z owoców zebranych od przedstawicieli rosnących na Dalekim Wschodzie
2. Zabrakło mi szerszej dyskusji wyników badań własnych do otrzymanych przez Daniela Załuskiego i Współpracowników „Phytochemical Content and Pharma-Nutrition Study on Eleutherococcus senticosus Fruits Intractum” Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016; 2016: 9270691.

Oceniam, że recenzowana praca magistra Filipa Oskara Graczyka spełnia określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) w związku z art. 179

ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 2018 r. poz. 1669 ze zm.). ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o dopuszczenie rozprawy magistra Filipa Oskara Graczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Wiesława Bylko