

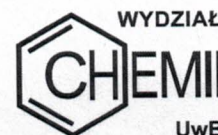


Dr hab. Edyta M. Nalewajko-Sieliwoniuk

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii

Katedra Chemii analitycznej i nieorganicznej



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎/ fax (+48-85) 738-8098; e-mail: e.nalewajko@uwb.edu.pl

Białystok, 01.02.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Marcina Stockiego** zatytułowanej „**Badania składu chemicznego pąków brzozy (*Betula L.*)**”

Wstęp

Rosnące zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi, a także wzrastające zainteresowanie pacjentów substancjami leczniczymi pochodzenia naturalnego sprawia, że uwaga naukowców jest coraz częściej skierowana na poszukiwane nowych roślinnych źródeł substancji bioaktywnych posiadających właściwości farmakologiczne. Brzoza (*Betula L.*) to rodzaj drzew i krzewów obejmujący około 50 gatunków. Gatunkami brzozy najczęściej występującymi na kontynencie eurazjatyckim są brzoza brodawkowata (*B. pendula*) oraz brzoza omszona (*B. pubescens*). Tkanki brzozy znajdują szerokie zastosowanie zarówno w gospodarce jak i w lecznictwie. Jednak dotychczas jedynie liście brzozy (*Betulae folium*) zostały ujęte w Farmakopei Europejskiej jako produkt leczniczy. Dane literaturowe wskazują, że pąki brzozy również stanowią cenny surowiec zielarski. Jednak, ze względu na niedostateczny poziom wiedzy na temat ich składu chemicznego oraz brak informacji jakie związki są odpowiedzialne za aktywność farmakologiczną tego surowca, jak dotąd nie podjęto prób jego standaryzacji. Ogranicza to ich potencjalne wykorzystanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym czy kosmetycznym. Z tego względu, wybór tematyki badawczej podjętej przez mgr Marcina Stockiego uważam za zasadny.

Ocena redakcyjnej strony pracy

Rozprawa doktorska mgr Marcina Stockiego ma formę klasycznej monografii, składa się z 12 rozdziałów i została przedstawiona na 217 stronach tekstu ilustrowanego 75 rysunkami i 23 tabelami, które zostały opatrzone wyczerpującymi opisami. Pod

względem edytorskim praca została przygotowana w sposób niezwykle staranny, a jej forma jest przejrzysta. Praca jest napisana poprawnym językiem, ilość literówek i błędów językowych jest bardzo niewielka.

Pracę rozpoczęto od prezentacji dorobku naukowego Doktoranta, następnie zamieszczono spis skrótów i symboli stosowanych w pracy, wstęp, przedstawiono przegląd literatury, omówiono cel pracy i badania własne, na końcu zamieszczono podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię zawierającą 131 pozycji literaturowych oraz spis tabel i rysunków. Do rozprawy dołączono również aneks, w którym znalazły się 4 dodatkowe tabele i 3 rysunki.

Ocena merytoryczna badań przedstawionych w rozprawie

W części literaturowej pracy (liczącej 46 stron) Doktorant zapoznaje czytelnika z podstawowymi zagadnieniami dotyczącymi pozycji brzozy w systematyce roślin, zasięgu jej występowania, zmienności morfologicznej i chemotaksonomii. Następnie szczegółowo omawia związki chemiczne występujące w pąkach brzozy oraz procedury wykorzystywane do ekstrakcji, analizy jakościowej oraz izolacji związków chemicznych znajdujących się w tkankach brzozy. W ostatnim rozdziale tej części pracy Doktorant przedstawia właściwości lecznicze substancji występujących w różnych tkankach brzozy (liściach, korze oraz pąkach). Część literaturowa pracy jest napisana w sposób zwięzły ale bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z badaniami opisanymi w pracy. Odnośniki literaturowe są starannie dobrane, a zamieszczony przegląd literatury świadczy o tym, że Doktorant wnikliwie zapoznał się z piśmiennictwem dotyczącym zagadnień prezentowanych w pracy i posiada dużą wiedzę w tym zakresie.

Badania własne Doktorant opisał na 80 stronach (rozdziały 8-12). Ta część pracy ma tradycyjny układ i rozpoczyna się od przedstawienia jasno sformułowanego celu pracy, tj. określenia składu chemicznego pąków różnych gatunków brzozy (*Betula L.*), a w szczególności brzozy brodawkowatej (*B. pendula*) oraz brzozy omszonej (*B. pubescens*). W mojej ocenie cel ten został przez Doktoranta w pełni zrealizowany. Autor wykazał przy tym umiejętność właściwego zaplanowania eksperymentu i posługiwania się nowoczesnymi technikami badawczymi.

Kolejne rozdziały części eksperymentalnej pracy dotyczą opisu wykorzystywanej bazy doświadczalnej, sposobu pozyskania materiału badawczego oraz metodyki badań.

Badaniami objęto 10 różnych ekstraktów z pąków brzozy omszonej (*B. pubescens*) i brzozy brodawkowatej (*B. pendula*), które otrzymano, stosując pięcioetapową ekstrakcję sekwencyjną za pomocą: CO₂ w stanie nadkrytycznym (scCO₂), *n*-heksanu, chloroformu, eteru dietylowego oraz mieszaniny metanol:woda (4:1). Dzięki zastosowaniu zoptymalizowanych warunków ekstrakcji scCO₂ (300 bar, 50°C) wyciągi z pąków *B. pubescens* i *B. pendula* uzyskano z wysoką wydajnością, wynoszącą odpowiednio 19,73±1,72% i 25,27±1,27%, a łączna wydajność procesu ekstrakcji sekwencyjnej wyniosła 57,44% i 42,90%.

W kolejnych rozdziałach pracy podjęto próbę identyfikacji związków chemicznych zawartych w/w ekstraktach z pąków brzozy za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Identyfikację substancji prowadzono na podstawie widm mas oraz indeksów retencji. W pięciu wyciągach z pąków *B. pubescens* i *B. pendula* wykryto łącznie 481 związków chemicznych. Z czego 197 substancji występowało w obu gatunkach brzozy, 149 tylko w *B. pubescens*, a 135 wyłącznie w *B. pendula*. Na podstawie wyników uzyskanych metodą GC-MS oraz przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H oraz ¹³C NMR zidentyfikowano 284 substancje występujące w wyciągach z pąków brzozy, które należały do różnych grup związków chemicznych (seskwiterpenów, triterpenów, flawonoidów, cukrów, związków alifatycznych i aromatycznych). Z czego 136 substancji zostało wykrytych w pąkach brzozy (*Betula L.*) po raz pierwszy. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pąki *B. pendula* charakteryzują się wyższą zawartością triterpenów, zaś pąki *B. pubescens* zawierają większe ilości flawonoidów i seskwiterpenów.

Celem podjętych badań było również wyizolowanie za pomocą technik chromatografii preparatywnej, a następnie identyfikacja (z wykorzystaniem spektroskopii NMR) trzech związków triterpenowych, które stanowiły jedne z głównych składników ekstraktów scCO₂ z pąków brzozy, a ich struktury chemiczne nie zostały w pełni zidentyfikowane na podstawie analiz GC-MS. Doktorant przeprowadził również ilościowe oznaczenie wybranych triterpenów i flawonoidów w ekstraktach scCO₂ z pąków brzozy.

W kolejnym etapie rozprawy, na podstawie analiz HS-SPME/GC-MS, przeprowadzono identyfikację substancji lotnych emitowanych przez pąki 22 gatunków oraz 2 odmian brzozy. Doktorant zidentyfikował 200 związków chemicznych (były to między innymi monoterpény, C13-norizoprenoidy, seskwiterpény, nor-seskwiterpény,

związki alifatyczne i aromatyczne), z czego 99 substancji zostało wykrytych w pąkach brzozy (*Betula L.*) po raz pierwszy. Dodatkowo, na uwagę zasługuje fakt, że identyfikacja związków lotnych emitowanych przez pąki 19 gatunków brzozy została przeprowadzona i opisana w literaturze po raz pierwszy. Uzyskane wyniki badań mogą zostać wykorzystane do celów wygodnej i szybkiej identyfikacji chemotaksonomicznej rodzaju brzoza.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i uwag do Doktoranta:

1. Na str. 24 Autor pisze, że (cytuje): „Kłopotliwe może być na przykład rozróżnienie dwóch najbardziej rozpowszechnionych na kontynencie eurazjatyckim gatunków brzozy - *B. pendula* oraz *B. pubescens*”. Czy Autor sam pozyskiwał surowiec do badań? Na jakiej podstawie była dokonywana identyfikacja badanych gatunków brzozy? Z ilu roślin należących do tego samego gatunku był pobierany surowiec do badań?
2. Czy skład chemiczny surowca może się zmieniać w zależności od warunków glebowych i meteorologicznych?
3. Na str. 106 Doktorant napisał, że w wyciągu z pąków *B. pubescens* wykrył kumatakeninę i sakuranetynę, które nie występowały w składzie chemicznym ekstraktu z *B. pendula*, podczas gdy w Tabeli 8 podane są zawartości tych substancji w ekstraktach uzyskanych za pomocą ekstrakcji scCO₂ pąków *B. pendula*. Pewne niezgodności dotyczą również danych przedstawionych w Tabeli 10. W opisie na str. 110 Doktorant napisał, że sakuranetynę wykryto wyłącznie w chloroformowym wyciągu z pąków *B. pubescens*, podczas gdy w Tabeli 10 podana jest zawartość tej substancji również w ekstrakcie z *B. pendula*. Ponadto, santyna, podobnie jak cirsimarytyna, również powinna być zaliczona do głównych składników chloroformowych ekstraktów z pąków *B. pubescens* i *B. pendula* (str. 110, Tabela 10), ponieważ zawartości obu substancji w tych ekstraktach są zbliżone.
4. Stężenia roztworów wzorcowych zamieszczone w Tabeli 5 powinny być podane z taką samą liczbą cyfr znaczących.
5. W Tabeli 7 Doktorant nie podał wartości odchylenia standardowego wydajności ekstrakcji pąków brzozy za pomocą *n*-heksanu, chloroformu, eteru dietylowego oraz mieszaniny metanol:woda (4:1), natomiast w tabelach 8, 19, 21 i 2S brakuje wartości odchylenia standardowego przy podaniu procentowego udziału badanej substancji w całkowitym prądzie jonowym (TIC).

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska zawiera bardzo obszerny materiał doświadczalny, a Doktorant wykazał się dużą skrupulatnością i starannością w opracowaniu tak obszernego zbioru wyników. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Marcina Stockiego są ciekawe i zawierają wiele elementów nowości naukowej. Zebrany przez Doktoranta materiał badawczy stał się podstawą 7 oryginalnych prac opublikowanych w takich czasopismach jak *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *Trees - Structure and Function*, *Molecules*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, *Biochemical Systematics and Ecology* czy *Przemysł Chemiczny*. Sumaryczny IF publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 14,645 (suma punktów MEiN: 435). Wyniki badań przedstawione w rozprawie były również prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Dodatkowo, Doktorant jest współautorem 14 artykułów o sumarycznym IF wynoszącym 35,899 (suma punktów MEiN: 475), dwóch publikacji nie posiadających współczynnika IF (suma punktów MEiN: 25) oraz jednej pracy w monografii pokonferencyjnej. Mgr Marcin Stocki jest współautorem patentu oraz był wykonawcą w 4 grantach finansowanych ze środków NCN, Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich i Cyfrowej Polski oraz kierownikiem 2 projektów badawczych finansowanych w ramach konkursów z dotacji celowych na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych służących rozwojowi młodych naukowców na Politechnice Białostockiej. Na uwagę zasługuje również fakt, że Doktorant ukończył studia podyplomowe na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz odbył miesięczny staż naukowy na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Mississippi (USA).

Wniosek końcowy

Doktorant wykazał się ogólną wiedzą z obszaru chemii produktów naturalnych oraz pracowitością i samodzielnością w prowadzeniu badań naukowych i ich interpretacji. Jego rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami. W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie mgr Marcina Stockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Edyta Nalewajka-Sielwoniak