



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy
Zakład Chemii Fizycznej
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

dr hab. n. farm. Dariusz Maciej Pisklak

Tel.: (+48 22) 57 20 950

E-mail: dpisklak@wum.edu.pl

Warszawa, 15.01.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Stockiego zatytułowanej
"Badanie składu chemicznego pąków brzozy (*Betula L.*) "

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, promotorem pracy jest prof. dr hab. Walerij Isidorow, zaś promotorem pomocniczym dr hab. Piotr Wałęjko.

Tematyka pracy związana jest z oznaczaniem jakościowym i ilościowym składu chemicznego ekstraktów z pąków brzozy brodawkowatej i brzozy omszonej jak również z oceną składu substancji lotnych wydzielanych przez pąki 22 gatunków oraz 2 odmian rodzaju *Betula*, w celu zastosowania w klasyfikacji chemotaksonomicznej.

Podjęta w rozprawie tematyka wpisuje się w profil badawczy związany z analizą jakościową i ilościową związków chemicznych zawartych w surowcach roślinnych oraz określaniu ich profilu aktywności farmakologicznej. Równocześnie oceniana praca wpasowuje się w kierunek fitoterapii – gemmoterapię, której celem jest lecznicze wykorzystywanie nierozwiniętych części roślin – kwiatów, liści czy łodyg. Gemmoterapia zakłada, że pąki roślinne zbudowane z tkanki merystematycznej, cechującej się wysoką aktywnością biosyntetyczną i występowaniem cienkiej ściany komórkowej, są częścią rośliny bogatą w substancje czynne, charakteryzującą się równocześnie efektywnością ich izolacji. Mimo, że pąkami roślin leczono już w starożytności, podejście takie popularne jest zaledwie w kilku europejskich krajach – we Francji, w Belgii, we Włoszech, zaś w Polsce ten kierunek fitoterapeutyczny dopiero się rozwija. O ile w wielu przypadkach, ze względu na pseudonaukowe rozważania na temat "energii życia zamkniętej w pączkach", kierunek ten traktowany jest nie do końca poważnie (analogicznie jak homeopatia), o tyle potraktowanie pąków roślinnych jako klasycznego surowca roślinnego, zawierającego niskocząsteczkowe związki chemiczne o potencjalnej aktywności biologicznej, ma w pełni naukowe uzasadnienie i w takim aspekcie realizowana była oceniana dysertacja.

Ocena tematyki badawczej

Zgodnie z Farmakopeą Polską i Farmakopeą Europejską pąki brzozy nie stanowią surowca farmakopealnego, ale dostępne są w postaci handlowej jako surowiec zielarski o działaniu diuretycznym i przeciwzapalnym. *Gemmae Betulae* jako surowiec wyszczególniony jest w Farmakopei Rosyjskiej i jest szeroko stosowane w medycynie tradycyjnej jako środek o szerokim spektrum działania (moczopędnym, wykrztuśnym, żółciopędnym, napotnym, przeciwbólowym, antyseptycznym). Równocześnie we wcześniejszych pracach zespołu Profesora Isidorova wykazano aktywność cytotoksyczną ekstraktu z pąków brzozy. Dlatego też, z jednej strony dostępność handlowa tego surowca a z drugiej strony szeroki profil potencjalnej aktywności farmakologicznej (w szczególności wykazanej aktywności cytotoksycznej) wymaga pełnej analizy fitochemicznej tego surowca. Ma to na celu nie tylko identyfikację związków biologicznie czynnych (i potencjalne pozyskanie nowych związków przeciwnowotworowych), ale również umożliwi standaryzację surowca (dostępnego w handlu) oraz ocenę jego toksyczności w celu zapewnienia bezpieczeństwa terapeutycznego. Równocześnie, co warto podkreślić, podjęty w dysertacji temat koncentruje się na krajowym powszechnie występującym, a w niewielkim stopniu przebadanym surowcu roślinnym, co mojej opinii stanowi dobrą alternatywę dla "modnych" badań nad roślinnymi surowcami "egzotycznymi". Również wybór surowca zielarskiego jako pąków, uważanych za surowiec o wysokiej zawartości substancji czynnych, uważam za bardzo uzasadniony. W pracy Doktorant przeanalizował skład chemiczny ekstraktów dwóch najpopularniejszych rodzimych gatunków brzozy *Betula pendula* i *Betula pubescens*. Ponadto w ramach niniejszej rozprawy doktorant przeprowadził analizę substancji lotnych wydzielanych przez pąki 22 gatunków oraz 2 rodzajów brzozy. Podejście takie, ze względu na trudności klasyfikacji gatunkowej oraz zmienność morfologiczną rodzaju *Betula*, może znaleźć zastosowanie w klasyfikacji chemotaksonomicznej.

W mojej opinii tematyka podjęta w rozprawie ma istotne znaczenie z punktu widzenia fitoterapeutycznego i stanowi podstawę do dalszych badań o profilu farmakologicznym. Równocześnie aspekt chemotaksonomiczny, ze względu na duże zróżnicowanie gatunkowe pod względem zawartości substancji czynnych w pąkach brzozy może w przyszłości znaleźć zastosowanie, nie tylko w klasyfikacji gatunkowej roślin z rodzaju *Betulae*, ale również surowca roślinnego z nich pochodzącego.

Ocena merytoryczna pracy.

W przedstawionej do recenzji rozprawie, z punktu widzenia tematyki można wyodrębnić dwa kierunki badań.

W pierwszym z nich Autor skoncentrował się na oznaczeniu zawartości substancji czynnych w pąkach dwóch gatunków brzozy. Wykorzystał w tym celu technikę ekstrakcji substancji czynnych z materiału roślinnego oraz analizę z wykorzystaniem techniki GS-MS. W celu wyizolowania pełnego

profilu związków występujących w analizowanym materiale zastosował pięcioetapową izolację substancji czynnych odpowiednią sekwencją rozpuszczalników o różnej polarności. Jako pierwszy etap zastosował nowoczesną i ekologiczną technikę ekstrakcji CO₂ w fazie nadkrytycznej. Co warto podkreślić, w tym aspekcie Doktorant zoptymalizował warunki ekstrakcji w wyniku czego zwiększył ośmiokrotnie efektywność pozyskania substancji czynnych z tego surowca względem warunków wcześniej opublikowanych w literaturze. W kolejnych etapach badań zastosował kolejno ekstrakcję heksanem, chloroformem a następnie macerację eterem dietylowym i mieszaniną woda-metanol. Najciekawsze z punktu fitochemicznego (a zarazem najbogatsze z punktu widzenia zawartości substancji czynnych) były ekstrakty uzyskane z wykorzystaniem ekstrakcji CO₂ i CHCl₃. W pierwszym z nich dominowały związki terpenowe, zaś w drugim - flawonoidy. Dla każdej z frakcji Doktorant dokonał identyfikacji większości występujących w nich związków chemicznych. Identyfikacja ta była oparta na podstawie indeksu retencji oraz charakterystycznych pików w widmach masowych (analizowane były masy (m/z) jonów molekularnych oraz wybranych jonów fragmentacyjnych). W kolejnym etapie badań dla frakcji triterpenowej doktorant dokonał rozdziału z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej i wyizolował cztery związki (przy czym dwa były nierozdzielonymi izomerami optycznymi), których strukturę potwierdził na podstawie widm ¹H i ¹³C NMR. W końcowym etapie wykonał oznaczenia ilościowe dwóch głównych związków triterpenowych (kwasu 3,4-seko-damar-4(29),20(21),24(25)-trien-3-owego oraz dipterokarpolu) oraz sześciu głównych związków flawonoidowych (5-hydroksy-4,7-dimetoksyflawanonu, sakunaretyny, kumatakeniny, cirsimarityny, ermaniny i santyny) we frakcji izolowanej przy pomocy CO₂ w fazie nadkrytycznej.

W pracy wykazano, że pąki brzozy, pod względem zawartości metabolitów wtórnych, są niezwykle bogatym surowcem roślinnym. Zawartość substancji czynnych w suchej masie surowca wynosiła około 50 %, przy czym nieznacznie wyższe wyniki otrzymano dla pąków *Betula pubescens*. Potwierdza to tezę dotyczącą bogactwa substancji czynnych zawartych w pąkach roślinnych. Pąki brzozy okazały się również bogate pod względem różnorodności metabolitów wtórnych zawartych w omawianych tkankach. W pracy zidentyfikowano 284 związki należące do różnych grup chemicznych (głównie seskwiterpeny, triterpeny, flawonoidy). Głównym składnikiem w ekstraktach scCO₂ pochodzących z pąków obu gatunków wie był triterpen kwas 3,4-seko-damar-4(29),20(21),24(25)-trien-3-owy, a jego procentowa zawartość w ekstrakcie z pąków *B. pendula* wynosiła ponad 25%. Zgodnie z moją wiedzą, aktualnie w literaturze brak jest informacji na temat aktywności biologicznej tego związku. Jako, że jest głównym składnikiem analizowanego ekstraktu, zaś ekstrakt posiada udokumentowaną w literaturze aktywność cytotoksyczną, warto przebadać ten związek w kierunku szerokiego profilu aktywności cytotoksycznej. Równocześnie w ramach pracy doktorskiej wspomniany związek został wyizolowany w postaci czystej co stanowi gotowy materiał do prowadzenia badań farmakologicznych.

Doktorant wykazał również, że zawartość substancji czynnych w pąkach *Betula pendula* i *Betula pubescens* pod względem klasyfikacji grup chemicznych związków jest zróżnicowana pomiędzy gatunkami i o ile w *B. pendula* dominują związki triterpenowe o tyle w *B. pubescens* występuje najwyższa

zawartość związków seskwiterpenowych. Może to być podstawa do kwalifikowania obu tych surowców jako oddzielnych surowców zielarskich (co postuluje we wnioskach Doktorant).

Szkoda, że w aspekcie analizy składu ekstraktów Doktorant nie pokusił się o dyskusję dotyczącą potencjalnych możliwości zastosowań głównych związków wyizolowanych z obu gatunków pąków brzozy, ponieważ te są bardzo interesujące z punktu widzenia aktywności farmakologicznej. W tym przypadku obiecujące są zarówno frakcje terpenowe, jak i flawonoidowe. O ile w dysertacji Doktorant wspomniał o aktywności przeciwnowotworowej frakcji terpenowej, o tyle potencjalne zastosowanie frakcji flawonoidowej zostało pominięte. W mojej ocenie przede wszystkim warto by było się odnieść do pracy (której współautorem jest Doktorant), w której wykazano aktywność cytotoksyczną santyny i cirsimartyny. W przypadku ermaniny i kumatakeniny również wykazano aktywność przeciwnowotworową, przy czym dla ermaniny potwierdzona jest również aktywność przeciwbakteryjna przeciwko prątkom gruźlicy. W mojej opinii, zamieszczenie takiej dyskusji zwiększyłoby, z punktu widzenia praktycznego oraz farmaceutycznego, atrakcyjność prezentowanych wyników.

Drugi kierunek badań związany był z identyfikacją oraz oceną zawartości substancji lotnych wydzielanych przez pąki różnych gatunków *Betula*. Wydaje się, że motywacją do podjętego tematu były również wyniki uzyskane w pierwszym etapie pracy, wskazujące na znaczne zróżnicowanie fitochemiczne pąków pochodzących z analizowanych wcześniej dwóch gatunków brzozy. W tej części pracy Doktorant do pobierania próbek zastosował metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej, zaś w analizie zastosował technikę GC-MS. W ramach pracy doktorskiej zidentyfikował 200 związków z różnych grup chemicznych, przy czym 99 z nich zidentyfikowane zostało w pąkach brzozy po raz pierwszy. Wykazał, że zawartość tych substancji różni się znacznie międzygatunkowo, a na podstawie braku lub obecności poszczególnych grup chemicznych zaklasyfikował analizowane gatunki brzozy do trzech kategorii. Uważam, że ten aspekt pracy może stanowić podstawę do opracowania metod klasyfikacji gatunkowej, co jest szczególnie istotne ze względu na znaczne zróżnicowanie międzygatunkowe zawartości substancji czynnych w pąkach, a co może stanowić wyzwanie w analizie pochodzenia surowca roślinnego. Tego typu badania nie były wcześniej opublikowane, dodatkowo uważam, że ten aspekt pracy jest również rozwojowy. W ramach kontynuacji pracy warto pokusić się o ocenę zawartości substancji lotnych w surowcu suszonym i korelację tych wyników z ich zawartością w ekstrakcie. Może pozwolić na opracowanie szybkich metod standaryzacji surowca.

Analizując przedstawioną do oceny dysertację nasuwają się również pytania, uwagi oraz sugestie natury merytorycznej, które przedstawiam poniżej:

- W jaki sposób była klasyfikowana przynależność gatunkowa obu surowców roślinnych pozyskanych ze stanu dzikiego? We wstępie Autor wspomina o trudnościach klasyfikacyjnych w obrębie tej rodziny ze względu na zmienność morfologiczną oraz możliwość występowania hybryd międzygatunkowych.

- W jakim okresie zbierany był surowiec? W przypadku surowców roślinnych okres zbioru może mieć kluczowy wpływ na skład substancji czynnych w nim występujących. Niestety nie znalazłem w pracy żadnych informacji na ten temat.

- W celu potwierdzenia struktury głównych związków triterpenowych wchodzących w skład ekstraktu zastosowano spektroskopię ^1H i ^{13}C NMR. W pracy nie zamieszczono jednak zarejestrowanych widm ^{13}C NMR. Równocześnie warto by zamieścić w tabelach porównanie danych eksperymentalnych i literaturowych, szczególnie w przypadku widm ^{13}C NMR, które by potwierdziły słuszność wnioskowania Autora.

- Dlaczego w analizie ilościowej związków flawonoidowych nie została wykorzystana frakcja ekstrahowana chloroformem? Wydaje się, że jest ona znacznie bogatsza w tę grupę związków.

W mojej ocenie przedstawione powyżej uwagi nie wpływają w sposób istotny na pozytywną ocenę badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej. Równocześnie opublikowanie wyników doktoratu w czasopiśmie z listy filadelfijskiej ułatwia nie tylko ocenę merytoryczną, ale potwierdza również wysoki poziom naukowy przedstawionej do recenzji dysertacji.

Ocena formalna i metodyczna pracy

Oceniając aspekt formalny rozprawy doktorskiej, temat pracy w pełni odpowiada zrealizowanemu projektowi badawczemu, cel jest jasno sformułowany i rzetelnie zrealizowany, zaś wnioski w pełni odpowiadają uzyskanym wynikom eksperymentalnym. Układ rozprawy jest spójny i logiczny, praca liczy 217 strony i zredagowana jest w sposób klasyczny z wyraźnym podziałem na część literaturową oraz część eksperymentalną. W części literaturowej Autor opisał szczegółowo profil związków chemicznych, które mogą występować w pąkach brzozy oraz pokrótce przedstawił procedury stosowane w izolacji, analizie i identyfikacji związków czynnych pochodzących z rodzaju *Betula*. Pewien niedosyt budzi tylko zbyt skrótowy opis potencjalnych właściwości leczniczych związków występujących w pąkach brzozy, co wynika między innymi z niewielkiej liczby prac badawczych w tym zakresie. Jednak o ile Autor odniósł się do pozycji literatury naukowej, to dodatkowe zamieszczenie w tym rozdziale paru zdań podsumowujących wyniki tych prac ułatwiłoby ocenę potencjału terapeutycznego tego surowca i byłoby jeszcze mocniejszym uzasadnieniem celowości podjętej tematyki badawczej. Bez wątplenia część literaturowa pracy świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu oraz dogłębnej analizie literaturowej tematyki, jaką Autor wykonał przygotowując rozprawę doktorską. W części eksperymentalnej Autor w sposób szczegółowy opisał tok analityczny zastosowany w pracy oraz przedyskutował uzyskane wyniki. Wartościowym, w mojej ocenie, było zebranie uzyskanych w pracy wyników w postaci tabeli (Tab 2S, Tab3.2S), w których dla każdego związku podano indeksy retencji, masę jonu molekularnego i głównych jonów fragmentacyjnych oraz zawartość %TIC w poszczególnych ekstrahowanych frakcjach. Ułatwia to nie tylko porównanie składu poszczególnych ekstraktów (ze względu na olbrzymią ilość

prezentowych wyników), ale również stanowi spójne opracowanie, które może zostać wykorzystane przez innych autorów zajmujących się analizą fitochemiczną.

W mojej ocenie praca jest napisana bardzo starannie, poprawnie językowo, zaś bogata szata graficzna w postaci licznych rysunków i tabel ułatwia analizę uzyskanych wyników. W pracy zamieszczonych jest 131 pozycji literaturowych, zacytowanych w sposób ujednolicony z prawidłowymi odniesieniami do tekstu pracy, właściwie odnoszących się do tematyki rozprawy oraz stanowiących podstawę do napisania części literaturowej dysertacji i uzasadniających podjęcie tematu badawczego.

Chciałbym również przedstawić pewne drobne uwagi i sugestie o charakterze technicznym i językowym, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy:

- w obszernych tabelach umieszczonych w aneksie do pracy zamieszczenie oprócz nazwy chemicznej danego związku, numeracji przyjętej w pracy ułatwiłoby analizę uzyskanych wyników.

- w podpisie do rysunku 2 lepiej byłoby użyć sformułowania „schemat reakcji platifilozydu z 2,4-dinitrohydrayna” (str. 26).

- związek eukaliptol odpowiada numerowi 25 (a nie 28) na rysunku 5 (str. 27).

- w opisie widm NMR (str. 122) sformułowanie "dobrze wykształconych singletów" lepiej jest zamienić na dobrze rozdzielonych singletów.

Analiza pozostałego dorobku Doktoranta

Analizując całokształt dorobku naukowego Doktoranta warto podkreślić szeroką aktywność naukową mgr Marcina Stockiego niezwiązaną z realizacją pracy doktorskiej. Świadczy o tym liczba 14 publikacji z listy filadelfijskiej nie wchodzących tematycznie w skład dysertacji, z których 8 zostało opublikowanych w czasopiśmie ze współczynnikiem IF powyżej 2. Znaczna część tych prac związana jest z badaniami z zakresu analizy fitochemicznej, co wskazuje na bardzo wysoką aktywność naukową Doktoranta, jak również na znacznie szerszy zakres zainteresowań badawczych mgr Stockiego. Co warto podkreślić Doktorant również aktywnie prezentował wyniki swoich prac zarówno na konferencjach międzynarodowych, jak i krajowych. Należy również wspomnieć, że Doktorant był wykonawcą w czterech projektach naukowych finansowanych ze środków zewnętrznych (w tym w dwóch projektach OPUS), jak również dwukrotnie był kierownikiem projektów realizowanych ze środków Politechniki Białostockiej. Wszystko to świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia dalszych prac badawczych i jest gwarantem kontynuacji rozwoju naukowego Pana magistra Marcina Stockiego.

Podsumowując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym opracowaniem i zawiera elementy nowości naukowej, a przedstawione w niniejszej recenzji uwagi nie wpływają na wysoki, w mojej ocenie, poziom przedstawionej do oceny dysertacji. Na podstawie przedstawionej do oceny dysertacji stwierdzam, że rozprawa doktorska pana magistra Marcina Stockiego, zgodnie

z obowiązującą ustawą, spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę istotną z punktu naukowego tematykę rozprawy, wysoki poziom przedstawionej pracy doktorskiej oraz to, że wyniki badawcze zostały opublikowane w czasopiśmie zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku IF wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej Magistra Marcina Stockiego.

Pisklak Dariusz Maciej

dr hab n. farm. Dariusz Maciej Pisklak