



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

Zakład Bromatologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel./Fax.(85) 748-54-68; (85) 748-54-69

bromatos@umb.edu.pl

Białystok 03 lipca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Starzec pt.: „Badania związków wielofenolowych w gatunku *Cistus^x incanus L.*”

W obecnych czasach, pomimo postępu w farmakoterapii chorób, leczenie nie zawsze jest skuteczne, a stosowane leki często powodują wiele działań niepożądanych. Dlatego wciąż poszukuje się nowych sposobów leczenia, w tym możliwości wykorzystania aktywnych związków pochodzenia naturalnego, które skutecznie mogłyby być stosowane np. w leczeniu uzupełniającym, w łagodzeniu skutków ubocznych i wspomaganiu terapii. Fitoterapia jest stale rozwijającą się dziedziną.

Czystek (łac. *Cistus^x incanus L.*) jest krzewem uprawianym głównie w obszarze Morza Śródziemnego. W medycynie ludowej napar z czystka był wykorzystywany jako m.in. lek na biegunkę, gorączkę i choroby skórne. Obecnie, stosuje się go przy przeziębieniach oraz jako przeciwutleniacz w profilaktyce chorób o podłożu zapalnym. Przyjmowany jest w postaci naparu lub suplementów diety. Znalazł również zastosowanie w preparatach do stosowania zewnętrznego. Badania sugerują, że ekstrakt z *C. incanus* może być stosowany w leczeniu infekcji górnych i dolnych dróg oddechowych a także w profilaktyce chorób układu krążenia. Do tej pory przebadane zostały jego właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Ziele czystka, ze względu na zawartość wielu składników bioaktywnych, może korzystnie wielokierunkowo wpływać na organizm. Stanowi bogate źródło polifenoli, w szczególności flawonoidów (kwercetyna, kemferol, mirycetyna) oraz flawan-3-oli (katechiny, gallokatechiny, proantocyjanidyny). Ponadto, czystek zawiera terpeny, kwasy tłuszczowe, fitohormony i witaminy. Nie wszystkie związki czystka zostały jednak dotychczas przebadane i nie wszystkie jego właściwości są dostatecznie potwierdzone. Potrzebne są dalsze badania, aby jednoznacznie określić skuteczność oraz mechanizm działania *C. incanus*.

W związku z powyższym podjęty przez Panię mgr Anetę Starzec temat rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony. Doktorantka postanowiła przeprowadzić badania, których wyniki uzupełniłyby dotychczasowy zakres wiedzy o tym gatunku rośliny i w przyszłości mogłyby przynieść korzyści zdrowotne dla człowieka.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej mgr Anety Starzec było scharakteryzowanie składu chemicznego liści *C. incanus* w zakresie zawartości polifenoli, w

szczegółności uwzględniając wyodrębnienie i wyjaśnienie budowy związków o charakterze garbników hydrolizujących – elagotanoidów. Powyższy cel został zrealizowany przy pomocy technik chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych. Cele szczegółowe obejmowały: standaryzację metody ekstrakcji polifenoli z liści czystka szarego do rutynowych oznaczeń laboratoryjnych, zweryfikowanie składu glikozydów flawonoidowych i kwasów fenolowych liści *C. incanus*, oznaczenie zawartości poszczególnych związków garbnikowych, flawonoidowych i fenolokwasów, a także ich sumy oraz zawartości polifenoli i flawonoidów ogółem w dostępnych surowcach roślinnych, porównanie zawartości polifenoli, garbników (głównie elagotanoidów), flawonoidów i fenolokwasów w materiale pochodzącym z różnych miejsc uprawy, porównanie metod badawczych wykorzystywanych do oznaczeń zawartości polifenoli i flawonoidów w przetworach liści *C. incanus*. Dalszy cel obejmował ocenę wybranych właściwości biologicznych w warunkach *in vitro*, w tym ocenę aktywności antyoksydacyjnej oraz potencjalnych właściwości przeciwcukrzycowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej, w oparciu o zwarty tematycznie cykl 3 publikacji naukowych opublikowanych w latach 2020-2023, na który składa się jedna praca przeglądowa i 2 prace oryginalne, o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 13,320 i 370 pkt. MNiSW. W dwóch publikacjach stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej Pani mgr Aneta Starzec jest pierwszym autorem, natomiast w jednej jest trzecim autorem.

Doktorantka jest także współautorem dwóch innych publikacji, z których jedna tematycznie koresponduje z cyklem publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Całkowity wskaźnik IF pełnotekstowych publikacji, zgodnie z załączoną analizą bibliometryczną, wynosi 18,247 i 440 pkt. MNiSW. Ponadto mgr Aneta Starzec jest współautorem 22 streszczeń konferencyjnych.

W załącznikach rozprawy doktorskiej, oprócz kopii pełnotekstowych publikacji, zamieszczono oświadczenie osoby ubiegającej się o stopień doktora, oświadczenia współautorów oraz oświadczenia promotora rozprawy. Załączone oświadczenia nie budzą wątpliwości, że wkład Doktorantki zarówno w część eksperymentalną, jak i w powstanie powyższych publikacji jest wiodący.

Cel główny pracy został zrealizowany w oparciu o cele szczegółowe zawarte w poszczególnych publikacjach. Przed przystąpieniem do badań doświadczalnych Doktorantka dokonała przeglądu piśmiennictwa dotyczącego składu chemicznego i właściwości prozdrowotnych *C. incanus*, który opublikowała w publikacji 1. Z uwagi na fakt, że w danych literaturowych brakowało pełnych informacji na temat składu polifenoli czystka oraz wskazania, które składniki lub grupy związków wpływają na określone właściwości prozdrowotne Doktorantka postanowiła przeprowadzić badania, których wyniki uzupełniłyby ten zakres wiedzy. W badaniach własnych (publikacja 2) wśród wydzielonych elagotanoidów Doktorantka potwierdziła obecność opisanej wcześniej punikalaginy oraz nieznanych w tym gatunku terflawiny A (T2) i elagotanoidu T3 (określanego dotychczas jako galusan punikalaginy), którego struktura nie była w pełni zdefiniowana. Na podstawie analizy spektroskopowej zaproponowano strukturę T3 oraz nadano jej nazwę cystuzyna. Jest to

nowy, nie opisany wcześniej, elagotanoid *C. incanus*. W publikacji 3 obejmującej badanie składu chemicznego 52 komercyjnie dostępnych produktów *C. incanus* metodami chromatograficznymi wykazano obecność 54 związków polifenolowych, w tym garbniki hydrolizujące – elagotanoidy (izomery HHDP-glukozy, punikaliny, punikalaginy, terflawiny A, cystuzyny), fenolokwasów (kwasu galusowego, kwasu elagowego i ich pochodnych glikozydowych), flawan-3-oli (katechiny, epikatechiny, galokatechiny, galusanu galokatechiny) oraz licznych flawonoidów (glikozydów mirycetyny, kemferolu i kwercetyny). Określona została zawartość polifenoli, właściwości antyoksydacyjne oraz zdolność hamowania aktywności α -glukozydazy. Spośród badanych związków elagotanoidy wykazywały najsilniejsze działanie hamujące α -glukozydazę, wynoszące prawie 100%.

Zastosowana w pracy metodyka badań (ekstrakcja i rozdzielenie polifenoli liści *C. incanus* w skali preparatywnej, przygotowanie wyciągów wodno-metanolowych, zastosowanie substancji wzorcowych i materiałów odniesienia, użyte metody spektroskopowe i spektrometryczne, metody chromatograficzne oraz spektrofotometryczne) oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników nie budzą wątpliwości, tym bardziej, że wyniki badań zostały opublikowane, po pozytywnym procesie recenzenckim czasopism naukowych.

Doktorantka wykazała, że produkty pochodzenia tureckiego charakteryzowały się najwyższą zawartością polifenoli, związków flawonoidowych, a tym samym najwyższą aktywnością antyoksydacyjną w teście ABTS, w porównaniu do produktów z pozostałych państw. Uprzejmie proszę o ustosunkowanie się jak można ten fakt wyjaśnić?

Dysertację kończą cztery jasno sformułowane wnioski, wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Liście *C. incanus* są bogatym źródłem związków polifenolowych, wśród których głównymi są elagotanoidy (punikalagina, cystuzyna, terflawina A), flawonoidy (glikozydy mirycetyny, kwercetyny, kemferolu) i fenolokwasy (kwas galusowy, kwas elagowy). Pochodne flawan 3-oli występowały w zdecydowanie mniejszych ilościach, choć istnieją wcześniejsze doniesienia o ich obecności.
2. Dotychczas znany skład związków polifenolowych *C. incanus* został uzupełniony o nowy związek z grupy garbników hydrolizujących – elagotanoid cystuzynę.
3. Przeprowadzone na dużej grupie produktów (próbek materiału roślinnego) badania potwierdziły, że przetwory z liści *C. incanus* charakteryzują się silnym działaniem antyoksydacyjnym, które jest dodatnio skorelowane z zawartością związków polifenolowych, w szczególności poziomem flawonoidów i elagotanoidów.
4. Wyciągi wodno-metanolowe z *C. incanus* oraz jego indywidualne składniki w modelu *in vitro* wykazały zdolność hamowania α -glukozydazy, enzymu związanego z metabolizmem węglowodanów, co może mieć istotne znaczenie dla właściwości antyhiperglikemicznych przetworów z tego surowca roślinnego. Wśród poznanych składników *C. incanus* najwyższy efekt hamujący przypisano elagotanoidom i produktom ich degradacji hydrolitycznej.

Na uwagę zasługuje estetyka przygotowanej dysertacji, zarówno część wprowadzająca, postawione cele badawcze, opis metodyki, omówienie najważniejszych

wyników i dyskusja oraz załączone streszczenie graficzne ułatwiają czytającemu przeanalizowanie najważniejszych rezultatów z wykonanych badań. Jedynie tabela I zawierająca wykaz produktów *C. incanus* użytych do badań mogłaby być bardziej usystematyzowana. Nie wiadomo według jakiego kryterium badane produkty zostały pogrupowane, ani według formy (suplement diety, susz, herbatka, luzem, torebki), ani według nazwy producenta czy kraju pochodzenia.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka uwag:

- warto byłoby umieścić wykaz stosowanych skrótów,
- określenie „Testy antyoksydacyjne” jest skrótem myślowym, poprawniej byłoby zatytułować ten podrozdział np. „Ocena aktywności antyoksydacyjnej”,
- w tabeli II z wynikami korelacji warto było zaznaczyć istotności statystyczne,
- błędy literowe: str. 7 „w śród”, str. 22 „mM GEA/g s.m.”, prawdopodobnie chodziło o mM GAE/g s.m., str. 32 „mieszaniR”


Powyższe uwagi nie mają wpływu na wartość merytoryczną rozprawy, którą oceniam wysoko.

Na końcu rozprawy doktorskiej podane są dodatkowe informacje o Doktorantce, Jej doświadczenie zawodowe, udział w kursach, stażach i szkoleniach, informacja o udziale w projektach naukowych, działalności dydaktycznej i popularyzującej naukę oraz zainteresowaniach.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane z badań wyniki i wnioski niewątpliwie posiadają aspekt poznawczy i praktyczny. Realizacja tak wielu zaplanowanych badań wymagała od Doktorantki dużego nakładu pracy i pełnego zaangażowania w realizowane badania. Uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia ustawowe, z uwzględnieniem art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Anety Starzec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, walory poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników oraz dorobek naukowy Doktorantki - przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o cykl publikacji, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, wnioskuje o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr Anety Starzec.

KIEROWNIK
Zakładu Bromatologii


dr hab. n. farm. Katarzyna Socha