



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Irma Podolak

Katedra i Zakład Farmakognozji

Kraków, 18. 07. 2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farmacji Filipa Oskara Graczyka

pt.

**„Analiza farmakognostyczno-chemiczna i fitofarmakologiczna owoców
Eleutherococcus senticosus (Rupr. et Maxim.) Maxim. jako nowego surowca
adaptogennego”**

zrealizowanej w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji Wydziału
Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

pod opieką naukową Promotora, dr hab. n. farm. Daniel Załuskiego, prof. UMK

Uwagi ogólne dotyczące strony formalnej

Pan mgr Filip Graczyk jest absolwentem kierunków analityka medyczna (rok 2019) oraz farmacja (rok 2022) Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK. Od 2020 roku jest zatrudniony w macierzystej uczelni w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji, gdzie wykonywał badania wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej. Ze względu na interdyscyplinarną tematykę były one wsparte szeroką współpracą z innymi ośrodkami naukowymi. Można tu wymienić szereg jednostek Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, tj. Katedrę i Zakład Biologii z Genetyką, Zakład Chemii Analitycznej, Zakład Farmakologii, a ponadto Katedrę Immunobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Katedrę Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk,

Katedra i Zakład Farmakognozji

30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 60, fax +48 12 620 55 75

e-mail: farmakog@cm-uj.krakow.pl, www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Wyższą Szkołę Inżynierii i Zdrowia w Warszawie, Instytut Nowych Syntez Chemicznych w Puławach, czy wreszcie ośrodek zagraniczny, Natural Products Laboratory Uniwersytetu w Leiden (Holandia).

Dysertacja doktorska mgr Filipa Graczyka zawiera obszernie, 57 stronicowe, opracowanie (wraz z literaturą, liczącą aż 87 pozycji, i spisem rycin), wprowadzające w tematykę badawczą, przedstawiające cele naukowe, badania własne, oraz dyskusję uzyskanych wyników. Stanowi ono bardzo dobry komentarz do treści zawartych w publikacjach, będących zasadniczą częścią przedłożonej do oceny rozprawy. Jest to zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, **co jest zgodne z aktualnymi wymaganiami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późn. zm.), artykuł 187, pkt. 3 i 4.** Wszystkie publikacje to prace oryginalne, z lat 2021-2022, dwie z nich ukazały się w czasopiśmie *Molecules* (MDPI), jedna w *Journal of Ethnopharmacology* (Elsevier). Warto podkreślić wysoki łączny współczynnik oddziaływania *impact factor* tych czasopism, który wynosi 15,049 oraz wysoką punktację MEiN (420 pkt.).

Należy podkreślić, że mgr Filip Graczyk jest pierwszym autorem zbioru artykułów, wchodzących w skład omawianej rozprawy doktorskiej. W swoim oświadczeniu o udziale w publikacjach, zamieszczonym w dysertacji, przedstawił zakres wykonanych samodzielnie prac oraz procentowo oszacowany wkład własny (od 58 do 65%). Opis ten jest w mojej opinii nieco zbyt ogólnikowy, niemniej oświadczenia pozostałych współautorów z ww. wielu ośrodków biorących udział w prowadzonych badaniach, **potwierdzają jednoznacznie wiodącą rolę Doktoranta.**

Poza kopiami publikacji, streszczeniem i oświadczeniami współautorów, w dysertacji ujęto konieczną do przeprowadzenia badań zgodę komisji bioetycznej UMK Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, spełniając tym samym wymogi formalne. W skład rozprawy włączono ponadto krótką informację o całościowym dorobku naukowym Autora.

Uwagi dotyczące podjętej tematyki i realizacji badań

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Filipa Graczyka, skupiona wokół jednej z cennych roślin o właściwościach prozdrowotnych tj. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., wpisuje się doskonale w obszar badań dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Eleuterokok kolczasty to azjatycki gatunek dostarczający surowca farmakopealnego *Eleutherococci radix* (FPXII). Ma on długą tradycję stosowania w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej oraz etnomedycynie Rosji i jest znany ze swojej



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

wielokierunkowej aktywności, określanej mianem adaptogennej. Jedną z istotnych cech adaptogenów jest redukcja stresu i korzystny wpływ na organizm o obniżonej odporności.

Konsekwencje dla zdrowia i psychicznego dobrostanu człowieka wynikające z napięć związanych z dynamiką rozwoju cywilizacyjnego i trudnościami adaptacyjnymi są problemem globalnym, a terapia schorzeń, w których etiopatogenezie znaczącą rolę odgrywa stres, jak m.in. nowotwory, zaburzenia odżywiania, depresja, stany lękowe, rodzi obciążenia dla systemu opieki zdrowotnej i przekłada się na określone koszty społeczne. W tym kontekście, zwrócenie większej uwagi na działania profilaktyczne, włączając w to wspomagającą funkcję surowców roślinnych o cechach adaptogenów, ma ogromne znaczenie.

Ze względu na udokumentowaną aktywność i efektywność korzeni eleuterokoka kolczastego, zapotrzebowanie światowego przemysłu zielarskiego na ten tradycyjnie stosowany surowiec jest ogromne, co przekłada się na nadmierną eksploatację naturalnych stanowisk gatunku i zagrożenie jego wytrzebieciem.

Zatem problem naukowy, którego rozwiązania podjął się mgr Filip Graczyk, w ramach pracy doktorskiej jest niezwykle istotny z punktu widzenia nauk farmaceutycznych. Przedmiotem rozprawy było bowiem wykazanie, w oparciu o analizę fitochemiczną i fitofarmakologiczną, czy *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., uprawiany w warunkach europejskich, może stanowić źródło pozyskiwanego w sposób zrównoważony i zgodny z zasadami zachowania gatunku, alternatywnego surowca adaptogennego, tj. owoców.

Szeroko zakrojone badania proponowanego nowego surowca obejmowały analizę fitochemiczną ukierunkowaną na wybrane, wyspecjalizowane metabolity, typowe dla gatunku *Eleutherococcus senticosus*, którym przypisuje się główną rolę w działaniu adaptogennym. Zatem analizowano obecność i zawartość eleuterozydów, szczególnie eleuterozydu B, E i E1, a także wybranych kwasów fenolowych. Ponadto, dysponując nowym materiałem roślinnym, dotychczas w niewielkim stopniu przebadanym, określono także skład olejku eterycznego, skład kwasów tłuszczowych w oleju oraz zawartość w nim tokoferoli i triterpenu – kwasu ursolowego. Analizie jakościowo-ilościowej poddano także przetwórkę wykonaną ze świeżych owoców, tj. intrakt, oznaczając w nim ponadto cukry, szczególnie mio-inozytol i mannitol. Wykonane badania potwierdzają, że Doktorant swobodnie porusza się w metodologii analizy fitochemicznej, poza oznaczeniami spektrofotometrycznymi, wykorzystywał wysokosprawną chromatografię cieczową, chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas, zróżnicowane metody ekstrakcyjne, w tym mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej.

W dalszej części badań, skupionych na ocenie fitofarmakologicznej intraktu z owoców *Eleutherococcus senticosus*, wykonano szereg specjalistycznych testów, określających główne cechy, rozpatrywane w przypadku potencjalnych adaptogenów, m.in. wpływ na przeżywalność i proliferację ludzkich leukocytów, produkcję cytokin, wzrost



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

odporności krwinek białych, zainfekowanych wirusem, aktywność antyoksydacyjną. Badania te przeprowadzono we współpracy z wymienionymi wcześniej jednostkami naukowymi. Dodatkowym aspektem prac fitofarmakologicznych było określenie efektywności *in vitro* intraktu z owoców eleuterokoka wobec szeregu enzymów, biorących udział w patogenezie stanu zapalnego i innych schorzeń (hialuronidaza, acetylocholinesteraza, tyrozynaza).

Prowadząc badania własne mgr Filip Graczyk wykazał się umiejętnością dobrego planowania i współpracy, korzystając z doświadczenia wyspecjalizowanych jednostek badawczych. W efekcie powstały wartościowe publikacje, będące trzonem ocenianej rozprawy. Przeprowadzone badania nie tylko dostarczają nowatorskich danych, lecz mają wyraźny walor aplikacyjny i stwarzają pole do dalszych prac badawczych i wdrożeniowych.

Wśród najważniejszych osiągnięć mgr Filipa Graczyka, można wymienić:

- i. Określenie po raz pierwszy składu owoców badanego gatunku, ze wskazaniem różnic między całymi owocami, owocnią i nasionami, ze szczególnym uwzględnieniem bioaktywnych eleuterozydów B i E i kwasów fenolowych;
- ii. Wykazanie, że z owoców eleuterokoka można uzyskać ekstrakty bogate w kwas ursolowy i δ -tokoferol;
- iii. Zaproponowanie procedury wytwarzania intraktu ze świeżych owoców eleuterokoka i jakościowo-ilościowe scharakteryzowanie fitochemiczne tego przetworu;
- iv. Określenie w modelu *in vitro* zdolności do indukcji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej leukocytów przez intrakt ze świeżych owoców eleuterokoka, oraz wykazanie jego niskiej toksyczności w modelu komórkowym HepG2 i FaDu, co pozwala rozważać ten przetwór jako potencjalny nowy środek o cechach adaptogennych;
- v. Wykazanie, że aktywność intraktu jest niezależna od obecności eleuterozydów B i E;
- vi. Określenie, dla intraktu z owoców eleuterokoka, zdolności do hamowania tyrozynazy i wskazanie potencjalnego zastosowania tego przetworu w preparatach rozjaśniających skórę.

Z punktu widzenia nauk farmaceutycznych na szczególne wyróżnienie zasługuje kompleksowe podejście do oceny potencjalnie nowego surowca farmakopealnego. Mając na uwadze przyszłe opracowanie monografii, Doktorant, poza badaniami fitochemiczno-fitofarmakologicznymi, wykonał bowiem także analizę farmakognostyczną owoców gatunku *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., wskazując na cechy mikro- i makroskopowe, istotne dla oceny czystości i jakości.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Wymienione powyżej osiągnięcia dowodzą oryginalności rozwiązań problemów naukowych przez Doktoranta i wskazują na nowatorski charakter badań, spełniając tym samym wymaganie sformułowane w artykule 187, pkt. 2 Ustawy.

Chcę podkreślić, że zarówno w tekście rozprawy, jak i w samych publikacjach, mgr Filip Graczyk szeroko komentuje uzyskane przez siebie wyniki na tle innych doniesień literaturowych, zwracając uwagę na rozbieżności i wskazując na możliwe wyjaśnienia oraz sugerując kierunki dalszych badań. Wyczerpująco potraktowano także przedstawienie gatunku *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., z wyszczególnieniem przesłanek do podjęcia prac własnych oraz opis zastosowanej metodyki. Zawarte w tekście rozprawy oraz trzech przedstawionych publikacjach **treści świadczą więc o szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta w dyscyplinie, którą reprezentuje, jak również potwierdzają umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, zatem oceniana rozprawa spełnia wymóg zawarty w art. 187, pkt.1 Ustawy.**

Niemniej w trakcie lektury nasunęło mi się kilka uwag oraz pytań. Sam tytuł rozprawy nie jest precyzyjny, albowiem podkreślono w nim analizę farmakognostyczną, która jest jedynie ułamkiem szerokich badań o charakterze fitochemicznym. Z kolei ocena fitofarmakologiczna w odniesieniu do potencjału adaptogennego, i nie tylko (testy inhibicji enzymów), dotyczy w zasadzie wyłącznie jednego konkretnego przetworu tj. intraktu. Mając na uwadze ogólny cel badań ciekawi mnie, czy, w opinii Doktoranta, badany gatunek jest łatwy do uprawy w warunkach europejskich i jaki jest plon owoców. W rozprawie zabrakło mi komentarza odnośnie różnic zawartości eleuterozydów, zaobserwowanych w badaniach własnych na owocach, w stosunku do wartości literaturowych dla korzeni i ich przetworów, podobnie mało precyzyjnie skomentowano różnice w składzie między wysuszonymi i świeżymi owocami (liofilizaty ekstraktów etanolowych).

Ponadto, skoro głównym zamierzeniem było wykazanie, czy owoce mogą stanowić alternatywny dla korzeni surowiec o takim profilu aktywności, nasuwa się pytanie, dlaczego nie ujęto w badaniach w celach porównawczych jakiegoś standardowo wykonanego wyciągu z *Eleutherococci radix*? Kolejne pytanie dotyczy przesłanek za podjęciem analiz aktywności hamującej tyrozinazę czy acetylocholinoesterazę, te kierunki trudno bowiem łączyć z działaniem adaptogennym.

Prosiłabym także o wyjaśnienie pewnych zapisów w tekście rozprawy, które nie są jasne.

1. Autor podaje wyniki analiz „oleju z owoców”, używają też sformułowania „w niniejszej pracy oceniono zawartość ...w oleju z nasion” (str.47) podczas gdy w metodyce w p. 7.5.4 mowa jest jedynie o wykonaniu ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami wysuszonych i sproszkowanych owoców przy użyciu heksanu jako rozpuszczalnika.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny


2. Dlaczego w odniesieniu do badań na komórkach A549 użyto sformułowania „efekt cytopatyczny” (str. 50)?
3. W jaki sposób określono stężenie cytotoksyczne CE_{50} na podstawie „odczytu mikroskopowego” (str. 33)?
4. Jakie zmiany w „morfologii komórek” są możliwe do stwierdzenia w teście z błękitem trypanu (str. 32)?

Powyższe uwagi i pytania wynikają z obowiązku recenzenta i nie wpływają na moją pozytywną opinię o rozprawie doktorskiej i osiągnięciach badawczych mgr Filipa Graczyka.

Podsumowanie i wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że **rozprawa mgr Filipa Oskara Graczyka spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (z późn. zm.)**. Badania, których efektem są publikacje zawarte w rozprawie doktorskiej, stanowią **istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, uzyskane wyniki dostarczają ciekawych danych o nowym surowcu farmakognostycznym i stanowią nowatorskie rozwiązanie postawionego problemu naukowego**. Wysoki poziom wiedzy i umiejętności Autora jest dodatkowo poparty dorobkiem i aktywnością nie wchodzącymi w zakres recenzowanej rozprawy doktorskiej (publikacja przeglądowa, IF = 5,756 i 140 pkt. MEiN; trzy doniesienia konferencyjne; udział i wyróżnienie w konkursie „Liderzy Innowacji Pomorza i Kujaw”; doświadczenie dydaktyczne).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Filipa Oskara Graczyka i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład
Farmakognozji UJ CM

prof. dr hab. Irma Podolak
p.o. kierownik

Irma Podolak