

prof. dr hab. inż. Agnieszka Wróblewska
Katedra Inżynierii Materiałów Katalitycznych i Sorpcyjnych
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

wpłynęło dnia 15.09.2023

RPH/8728/2020



Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Kamili Dębia pt. „**Właściwości prozdrowotne naparów z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego (*Aegopodium podagraria* L.)**”

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Katarzyna Janda - Milczarek

Promotor pomocniczy: dr Jolanta Wolska

1. Aktualność i cel pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska poświęcona jest badaniom nad potencjałem antyoksydacyjnym i zawartością polifenoli, a także nad zawartością witaminy C, rutyny oraz wybranych pierwiastków w naparach otrzymanych z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego. Opisane w tej dysertacji napary, ze względu na zawartość w nich wartościowych składników odżywczych, mogą w przyszłości zostać wykorzystane w codziennej diecie człowieka. Ponadto, biorąc pod uwagę właściwości lecznicze podagrycznika pospolitego, napary te mogą stać się cennym składnikiem nowych preparatów o działaniu leczniczym.

Badania przedstawione w tej pracy są aktualne i dobrze wpisują się w nowoczesne trendy związane zarówno z odżywianiem człowieka, jak i z jego leczeniem. Trendy te są związane z powrotem do pozyskiwania i stosowania w odżywianiu oraz w leczeniu człowieka substancji biologicznie aktywnych pochodzenia roślinnego w miejsce substancji biologicznie aktywnych otrzymanych na drodze syntezy chemicznej. Dużą zaletą roślin, jako źródła związków biologicznie aktywnych, jest ich odnawialność oraz stosunkowo niska cena. Podagrycznik pospolity jest rośliną, która była stosowana w

medycynie ludowej, obecnie natomiast jest uważana za chwast i zapomniano o tym, że jest jadalna i ma cenne właściwości prozdrowotne, min. może ona stanowić cenny dodatek do zup i sałatek (podagrycznik jest przyprawą, która ma korzenny smak, a jego zapach przypomina zapach marchwi). Podagrycznik pospolity rośnie na obszarze całej Polski i nie należy do roślin rzadkich. Porasta on w dużych ilościach rowy oraz zarośla i można go samodzielnie zbierać z zachowaniem zalecanych terminów zbiorów odpowiednich części morfologicznych, a także przechowywać i przygotowywać napary. Biorąc to pod uwagę, roślina ta charakteryzuje się bardzo dużą dostępnością dla człowieka, jednocześnie jej zbiór i przygotowanie naparów nie generuje dużych kosztów.

W przyszłości badania przedstawione w tej pracy mogą stać się podstawą do przygotowania preparatów odżywczych, stanowiących uzupełnienie naszej codziennej diety o antyoksydanty oraz wybrane pierwiastki, a także preparatów o działaniu leczniczym, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób wywoływanych w naszym organizmie przez wolne rodniki, min. chorób neurodegradacyjnych. Ponadto biorąc pod uwagę znane od wieków działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwbakteryjne podagrycznika pospolitego, napary otrzymywane przez Doktorantkę lub wyodrębnione z naparów czyste substancje biologicznie aktywne, mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie w nowoczesnych systemach terapeutycznych, np. w transdermalnych systemach terapeutycznych stosowanych do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów oraz bólu mięśni. Inne zastosowanie naparów otrzymanych przez Doktorantkę może wiązać się z otrzymaniem preparatów do leczenia schorzeń skóry, np. trądziku, czy też preparatów przyspieszających gojenie się ran i podrażnień skóry.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie wyciągów wodnych w postaci naparów z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego (liście, kwiaty, owoce i kłącza) i wyznaczenie najkorzystniejszej temperatury wody do otrzymywania tych naparów oraz wskazanie części morfologicznej tej rośliny, odpowiedniej do otrzymania naparów o najkorzystniejszych właściwościach prozdrowotnych. Właściwości prozdrowotne naparów z podagrycznika pospolitego oceniano przez pomiar ich potencjału antyoksydacyjnego, a także pomiar zawartości w nich polifenoli, witaminy C, rutyny, potasu, fosforu, magnezu, wapnia i fluoru.

Cele postawione w niniejszej pracy zostały zrealizowane. Realizacja ich wymagała od Doktorantki wysokiego poziomu wiedzy na temat metod związanych z pozyskiwaniem z surowców roślinnych wyciągów zawierających związki biologicznie aktywne, znajomości

metod oznaczania właściwości antyoksydacyjnych takich wyciągów roślinnych, a także zawartości w nich polifenoli, witaminy C, rutyny i takich pierwiastków jak: potas, fosfor, magnez, wapń i fluor oraz znajomości metod statystycznych wykorzystywanych do komputerowego opracowania wyników badań.

2. Zakres pracy

Recenzowana praca napisana jest w układzie tradycyjnym i liczy 163 strony. Dysertacja jest ilustrowana 15 rycinami, zawiera 24 tabele i zacytowano w niej 419 pozycji literaturowych (przy czym 48% publikacji zawartych w spisie literatury to publikacje, które ukazały się w latach 2014-2023). Pierwszy punkt główny pracy pt.: „Wstęp”, który moim zdaniem jest wstępem literaturowym do pracy i powinien nazywać się częścią literaturową, poprzedza wykaz stosowanych przez Doktorantkę skrótów oraz streszczenia pracy doktorskiej napisane w języku polskim oraz w języku angielskim. W drugim punkcie głównym pracy Doktorantka prezentuje cel swojej pracy. Punkt zatytułowany „Sekcja eksperymentalna” stanowi trzeci, główny punkt pracy i przedstawia on aparaturę oraz surowce roślinne stosowane do przygotowywania naparów, a także opisuje sposób przygotowania naparów i metody oznaczania: potencjału antyoksydacyjnego tych naparów, a także zawartości w nich polifenoli, witaminy C, rutyny i takich pierwiastków jak: potas, fosfor, magnez, wapń i fluor. W czwartym punkcie głównym pracy przedstawione zostały wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, a w piątym i szóstym punkcie głównym pracy Doktorantka prezentuje podsumowanie wyników badań i dyskusję nad nimi. Siódmy punkt główny pracy stanowią wnioski, a po nich znajduje się punkt 8 - „Bibliografia”, zawierający wykaz literatury naukowej wykorzystanej przez Doktorantkę w pracy doktorskiej. Następne dwa punkty dysertacji zawierają: wykaz tabel i rycin zawartych w pracy. Punkt 11 pracy przedstawia „Wykaz autorskich publikacji naukowych i doniesień konferencyjnych związanych z tematyką pracy doktorskiej, natomiast ostatni punkt zatytułowany jest „Suplement” i zawiera 6 tabel – są to tabele z numerami od 19 do 24).

W pierwszym podpunkcie głównym „Wstępu” (punkt. 1.1. Podagrycznik pospolity (*Aegopodium podagraria* L.)) Doktorantka przedstawiła najpierw ogólną charakterystykę botaniczną podagrycznika pospolitego, uwzględniając w niej szerszy opis takich części

morfolologicznych tej rośliny jak: liście, kwiaty, owoce i kłącza. W następnej kolejności omówiła występowanie podagrycznika pospolitego oraz przedstawiła doniesienia literaturowe dotyczące badań składu tej rośliny, która jest uznawana za roślinę jadalną i może być wartościowym źródłem pożywienia dla człowieka, dostarczając do naszego organizmu substancje podstawowe i wtórne o bardzo zróżnicowanej budowie oraz makro- i mikroelementy. Doktorantka, na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury wskazała w tekście dysertacji, że badania nad oznaczeniem zawartości wyżej wymienionych składników w podagryczniku pospolitym są niepełne, gdyż nie były prowadzone osobno dla poszczególnych części morfolologicznych tej rośliny, a skład ten może się zmieniać właśnie z zależności od badanej części morfolologicznej podagrycznika pospolitego. Przeprowadzony przez Doktorantkę przegląd literatury wskazuje na to, że te składniki były dotąd głównie oznaczane w ziele podagrycznika pospolitego.

W dalszej części pierwszego podpunktu głównego „Wstępu” (punkt 1.1.) zostały przedstawione podstawowe grupy substancji, które do tej pory oznaczono w składzie podagrycznika pospolitego, należą do nich między innymi: flawonoidy, kwasy fenolowe i hydroksycynamonowe, tokoferole, garbniki, kumaryny, związki poliacetylenowe (falkarinol i falkarindiol), witaminy, związki terpenowe występujące jako składniki olejku eterycznego otrzymanywanego z tej rośliny oraz mikro- i makroelementy (składniki mineralne).

W składzie podagrycznika pospolitego zidentyfikowano między innymi: kwas kawowy i chlorogenowy, a także pochodne kwercetyny (hiperozyd i izokwercetynę) oraz pochodne kemferolu (min. trifolinę). Niestety na stronie 21 dysertacji Doktorantka wymienia jedynie te związki. Moim zdaniem korzystnie byłoby w tym miejscu pokazać wzory strukturalne: kwasu kawowego, kwasu chlorogenowego, kwercetyny i kemferolu oraz omówić szczegółowo zastawiania tych związków oraz ich pochodnych glikozydowych w medycynie (tzn. hiperozydu i izokwercetyny w przypadku kwercetyny i trifoliny w przypadku kemferolu), wskazując jednocześnie jakie działanie wykazują one na organizm ludzki. Jedynie w przypadku kwercetyny Doktorantka podała więcej informacji o jej działaniu leczniczym, ale znajdują się one w dalszej części pracy na stronie 36.

Następnie, w związku z tym, że jedną z ważnych substancji występujących w podagryczniku pospolitym jest witamina C, Doktorantka przedstawia jej wzór chemiczny i omawia działanie tej witaminy na organizm ludzki, zwracając uwagę na jej silne właściwości przeciwutleniające, a także na jej działanie ochronne zapobiegające

rozwojowi wielu chorób, w tym: chorób serca, chorób nowotworowych, czy chorób neurodegradacyjnych (np. choroby Alzheimera, czy choroby Parkinsona).

Kolejnym związkiem występującym w podagryczniku pospolitym jest rutyna, która należy do grupy glikozydów flawonoidowych, pochodnych kwercetyny. Doktorantka opisuje w dysertacji działanie tego związku na organizm ludzki (jest to między innymi działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne) oraz omawia szczegółowo budowę tego związku w powiązaniu z jego aktywnością przeciwutleniającą. Informacje na temat działania leczniczego rutyny zostały jeszcze uzupełnione przez Doktorantkę w dalszej części dysertacji na stronie 36.

Kolejną grupą związków występującą w podagryczniku pospolitym, którą opisuje Doktorantka, są związki poliacetylenowe takie jak: falkarinol i falkarindiol. Związki te wykazują między innymi działanie bakteriobójcze i grzybobójcze. Doktorantka opisując wymienione wyżej związki poliacetylenowe wskazuje na to, że istnieją doniesienia literaturowe o tym, że poliacetyleny wykazują też działanie antyalergiczne i przeciwzapalne. W tej części pracy doktorskiej zabrakło mi jednak wzorów chemicznych falkarinolu i falkarindiolu oraz szerszych informacji literaturowych o ich działaniu antynowotworowym - Doktorantka napisała jeszcze o tym działaniu antynowotworowym związków poliacetylenowych zawartych w podagryczniku pospolitym na stronie 39 dysertacji, ale nie opisuje szerzej tego zagadnienia w odniesieniu do różnych nowotworów, jedynie wymienia nowotwór prostaty jako nowotwór w leczeniu którego podagrycznik pospolity okazał się skuteczny.

Następnie Doktorantka przedstawiła główne związki terpenowe występujące jako składniki olejku eterycznego otrzymywanego z tej rośliny. Do tych związków terpenowych należą między innymi: sabinen, alfa- i beta-pinen, myrcen, p-cymen, aldehyd perillowy, beta-felandren, beta-kariofilen czy ocymen. W tej części pracy również zabrakło wzorów omawianych związków i opisu ich działania na organizm ludzki, a są to bardzo cenne związki stosowane w różnych terapiach w medycynie.

Jako ostatnie składniki występujące w podagryczniku pospolitym zostały wymienione makro- i mikroelementy, tzn. cynk, żelazo, miedź, chrom, mangan, kobalt, wapń, potas i fluor. Doktorantka krótko omówiła również wpływ tych składników mineralnych na zdrowie człowieka.

W dalszej części pierwszego podpunktu głównego „Wstępu” (punkt 1.1.) zostały omówione właściwości prozdrowotne i lecznicze podagrycznika pospolitego. Szczególnie

interesujące są właściwości przeciwutleniające tej rośliny, co może w przyszłości pozwolić zastosować wyciągi z tej rośliny w terapii takich chorób jak: choroby naczyniowo-sercowe, nowotwory, cukrzyca, czy choroby neurodegradacyjne. Ponadto roślina ta wykazuje działanie przeciwreumatyczne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, moczopędne, uspokajające i przyspieszające gojenie się ran.

W następnych dwóch podpunktach „Wstępu” (podpunkt 1.2. „Reaktywne formy tlenu (RFT)” i 1.3 „Stres oksydacyjny”) zostały omówione zagadnienia związane z działaniem reaktywnych form tlenu na nasz organizm. W podpunktach tych Doktorantka wskazuje na to, że organizm ludzki wykształcił mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, jednak gdy te mechanizmy zostaną zaburzone, to działanie reaktywnych form tlenu na nasz organizm może wywołać stres oksydacyjny. Prowadzi to do uszkodzenia lipidów, kwasów nukleinowych oraz białek i powoduje szybsze starzenie się naszego organizmu, a także zwiększa ryzyko wystąpienia wielu chorób, np. chorób nowotworowych, miażdżycy, cukrzycy, udarów, zaburzeń neurodegradacyjnych, zaćmy czy chorób serca. Dlatego właściwości przeciwutleniające wybranych grup związków mogą być pomocne w zapobieganiu i w leczeniu chorób wywoływanych przez wolne rodniki. Takie związki o działaniu przeciwutleniającym są między innymi zawarte w owocach i warzywach, ale ciągle poszukuje się roślin, które mogą stać się dla nas bogatym źródłem antyutleniaczy. Jak podkreśla Doktorantka, badania naukowe przeprowadzone do tej pory nad właściwościami leczniczymi podagrycznika pospolitego wskazują na to, że może on być dla człowieka cennym źródłem substancji o działaniu przeciwutleniającym. Po uważnym zapoznaniu się z treścią podpunktu 1.2. trzeba jednak stwierdzić, że w pierwszym akapicie tego podpunktu pojawiają się błędy związane z nazewnictwem reaktywnych form tlenu. Przede wszystkim w atmosferze tlen występuje w stanie wolnym w postaci cząsteczek dwuatomowych O_2 i trójatomowych – ozonu O_3 . Z tego względu pierwsze zdanie nie jest poprawne, a forma tlenu pokazana w nawiasie nie jest rodnikiem. Niżej, w tym samym akapicie Doktorantka wymienia wolne rodniki, błędnie zaliczając do nich H_2O_2 czyli nadtlenek wodoru, którego cząsteczka nie ma charakteru rodnikowego.

Ostatni podpunkt „Wstępu” (podpunkt 1.4. „Bezpieczeństwo stosowania podagrycznika pospolitego (*Aegopodium podagraria* L.)”) zawiera informację o tym, że badania naukowe prowadzone nad toksycznością tej rośliny, wskazują na to, że napary otrzymywane z podagrycznika charakteryzują się niską toksycznością. Potwierdza to przypuszczenia, że roślina ta, dzięki swojej niskiej toksyczności oraz zawartości wielu składników

biologicznie czynnych, może w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu wielu chorób, wywoływanych między innymi przez wolne rodniki.

Uważam, że przedstawiony przez Doktorantkę przegląd literaturowy w pełni uzasadnia podjęcie badań zaprezentowanych w tej dysertacji.

Drugi punkt główny przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zawiera omówienie celów pracy. Cele te zostały już przeze mnie przedstawione szczegółowo w pierwszym punkcie recenzji. Uważam, że zostały one dobrze sformułowane i uzasadnione przez Doktorantkę.

W trzecim punkcie głównym pracy pt. „SEKCJA EKSPERYMENTALNA” zostały omówione szczegółowo surowce roślinne stosowane do badań w tej dysertacji. Podagrycznik pospolity był zbierany na obszarze województwa zachodniopomorskiego w roku 2016, w okresie od wiosny do późnej jesieni. Zebrane części morfologiczne podagrycznika, takie jak: liście (zbierane wiosną przed pojawieniem się kwiatów w okresie od kwietnia do maja), kwiaty (zbierane w lipcu), owoce (zbierane w sierpniu) i kłaczka (zbierane w październiku), starannie oczyszczano z zanieczyszczeń glebowych przez mycie wodą. Następnie były one zamrażane w temperaturze -20°C i przechowywane w monitorowanej zamrażarce. Pozbawione zanieczyszczeń części morfologiczne podagrycznika pospolitego poddawano procesowi liofilizacji w liofilizatorze w temperaturze -20°C i pod ciśnieniem $0,735\text{ mmHg}$. Po wysuszeniu przygotowywano z nich jednorodny proszek przy użyciu homogenizatora do żywności. W trzecim punkcie głównym pracy Doktorantka szczegółowo opisała również sposób przygotowania naparów z liści, kwiatów, owoców i kłaczy podagrycznika pospolitego. Napary przygotowywano w kolbach Erlenmeyera w temperaturach: 25°C , 70°C , 80°C i 90°C . Na $0,5\text{g}$ surowca roślinnego stosowano 100 ml wody dejonizowanej. Czas przygotowania naparów wynosił 10 minut , przy czym napary przygotowywano w wytrząsarce orbitalnej przy prędkości obrotowej 180 obr./min . Po przygotowaniu naparów usuwano z nich materiał roślinny i chłodzono. W kolejnym podpunkcie punktu 3, Doktorantka przedstawiła aparaturę i odczynniki, które stosowała podczas do badań. Doktorantka szczegółowo opisała również wszystkie procedury pomiarowe, które stosowała w pracy, były to: sposób oznaczania potencjału antyoksydacyjnego metodą DPPH, oznaczanie ogólnej zawartości polifenoli z użyciem metody Folin-Ciocalteu,

oznaczanie zawartości witaminy C metodą spektrofotometryczną w obecności 2,6-dichlorofenoloindofenolu, spektrofotometryczne oznaczanie rutyny, oznaczanie zawartości mikro- i makroelementów metodą ICP-OES (emisyjna spektrometria atomowa z indukcyjnie sprzężoną plazmą) oraz oznaczanie zawartości fluorków metodą potencjometryczną przy użyciu elektrody jonoselektywnej.

Uważam, że zastosowane przez Doktorantkę metody badawcze są wystarczające do opisu wyników badań przeprowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej. W tym miejscu warto było jednak wspomnieć jaki program został wykorzystany przez Doktorantkę do analizy statystycznej uzyskanych wyników badań.

W czwartym punkcie głównym dysertacji Doktorantka przedstawiła na Rycinach 7 do 15 uzyskane wyniki badań. Rycina 7 pokazuje wyniki badań nad potencjałem antyoksydacyjnym naparów pozyskanych z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego i w różnych temperaturach. Badania te wykazały, że najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowały się napary otrzymane z kwiatów (maksymalnie około 60% inhibicji rodnika DPPH) i liści (maksymalnie około 50% inhibicji rodnika DPPH). Przy czym, najwyższe wartości potencjału antyoksydacyjnego posiadały napary przygotowane w temperaturze 90°C. Analiza wyników uzyskanych na tym etapie badań wskazała, że temperatura wody użytej do przygotowania naparów i część morfologiczna rośliny oraz interakcja obu tych parametrów miały istotny wpływ na potencjał antyoksydacyjny naparów.

Badania nad zawartością polifenoli w naparach wykazały, że część morfologiczna rośliny była zmienną wejściową (parametrem), decydującym o zawartości tych związków w naparach. Zaobserwowano jednocześnie, że wraz ze wzrostem temperatury wody użytej do przygotowania naparu, wzrastała zawartość polifenoli w naparach ze wszystkich części morfologicznych podagrycznika (Rycina 8). Podobnie jak w badaniach nad potencjałem antyoksydacyjnym to kwiaty, zastosowane jako surowiec do otrzymania naparów, pozwoliły uzyskać najwyższą zawartość polifenoli w naparach, która wynosiła około 211 mg GAE/L (temperatura wody użytej do przygotowania naparu wynosiła 90°C). Duża zawartość polifenoli znajdowała się również w naparach z liści (około 157 mg GAE/L w przypadku, gdy temperatura wody użytej do przygotowania naparu wynosiła 90°C).

Wyniki badań nad zawartością witaminy C w naparach zostały przedstawione na Rycinie 9. Najwyższą zawartość witaminy C oznaczono w naparach otrzymanych z owoców podagrycznika pospolitego dla temperatur wody użytej do przygotowania naparów wynoszących odpowiednio: 70°C i 80°C. Analiza badań przeprowadzonych dla poszczególnych części tej rośliny pokazała, że wraz ze wzrostem temperatury wody użytej do przygotowania naparów, wzrastała zawartość witaminy C w większości naparów. Analiza wyników uzyskanych na tym etapie badań wskazała, że zarówno temperatura wody użytej do przygotowania naparów, jak i część morfologiczna rośliny oraz interakcja obu tych parametrów miały istotny wpływ na zawartość witaminy C w naparze.

Wyniki badań nad zawartością rutyny w naparach zostały przedstawione na Rycinie 10. Największą zawartość rutyny oznaczono w naparach z liści (około 54 mg/L w dla temperatury wody użytej do przygotowania naparów wynoszącej 90°C) i z kwiatów (około 46 mg/L w dla temperatury wody użytej do przygotowania naparów wynoszącej 90°C). Ponadto porównanie uzyskanych wyników wskazuje na to, że zastosowanie wody o temperaturze wynoszącej 90°C, pozwala uzyskać napary charakteryzujące się najwyższą zawartością rutyny dla każdej, badanej części morfologicznej podagrycznika pospolitego. Analiza uzyskanych wyników wskazała, że zarówno część morfologiczna, jak i temperatura wody użytej do przygotowania naparów, miały istotny wpływ na zawartość rutyny w przygotowanych przez Doktorantkę naparach.

Wyniki związane z zawartością potasu, fosforu, magnezu, wapnia i fluoru w naparach z podagrycznika pospolitego zostały przedstawione na Rycinach 11-15. Analiza uzyskanych na tym etapie dysertacji wyników wskazuje, że największą zawartością potasu (najwyższą zawartość potasu wynoszącą około 326 mg/L oznaczono w naparze przygotowanym z wykorzystaniem wody o temperaturze 70°C), fosforu (najwyższą zawartość fosforu wynoszącą około 23 mg/L oznaczono w naparze przygotowanym z wykorzystaniem wody o temperaturze 70°C) i wapnia (najwyższą zawartość wapnia wynoszącą około 7 mg/L oznaczono w naparze przygotowanym z wykorzystaniem wody o temperaturze 70°C) charakteryzowały się napary otrzymane z liści, a napary z kwiatów były bogate w magnez (najwyższą zawartość magnezu wynoszącą około 15 mg/L oznaczono w naparze przygotowanym z wykorzystaniem wody o temperaturze 90°C), natomiast napary owoców charakteryzowały się największą zawartością fluoru (najwyższą zawartość fluoru wynoszącą 0,33 mg/L oznaczono w naparze

przygotowanym z wykorzystaniem wody o temperaturze 80°C). Ponadto badania tego etapu dysertacji wykazały, że najniższą zawartością potasu, magnezu, wapnia i fluoru charakteryzowały się napary przygotowane z kłączy podagrycznika pospolitego.

Następne 2 punkty główne pracy, czyli punkty 5 i 6 to punkty zatytułowane: „POSDUMOWANIE” i „DYSKUSJA”. Punkty te prezentują szersze omówienie uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań w powiązaniu z ich analizą statystyczną, dyskusję nad nimi oraz odniesienie tych wyników do dotychczasowego stanu wiedzy. Doktorantka wskazuje w tej części pracy na to, że napary są najprostszą formą preparatów roślinnych, które można samodzielnie i w prosty sposób przygotować w domu z użyciem wody jako rozpuszczalnika substancji biologicznie aktywnych. Spożycie naparów wzrasta systematycznie w ostatnich latach i mogą one w przyszłości stać się podstawowymi preparatami o działaniu prozdrowotnym i leczniczym, min. bardzo interesujące wydaje się działanie przeciwutleniające naparów pozyskiwanych z roślin. Dlatego ważne jest badanie składu takich naparów roślinnych i określanie zawartości w nich odpowiednich substancji biologicznie aktywnych, aby dokładnie określić możliwe działanie prozdrowotne i lecznicze takich naparów. Doktorantka wskazuje na to, że wybrane do badań w tej dysertacji parametry są tylko częścią parametrów, które należy wziąć pod uwagę w badaniach składu naparów roślinnych i ich właściwości antyoksydacyjnych. Wskazuje tutaj również pośrednio na nowe kierunki badań nad naparami z podagrycznika pospolitego, które w przyszłości powinny dotyczyć badań nad naparami o wyższym stężeniu substancji aktywnych oraz istotne wydaje się zbadanie w szerokim zakresie wpływu czasu przygotowywania naparu i temperatury wody. Doktorantka zwraca uwagę na to, że również inne czynniki (oprócz temperatury przygotowania naparu i części morfologicznej rośliny), np. czynniki środowiskowe, mogą mieć istotny wpływ na zawartość substancji aktywnych w naparach. Zbierając rośliny lecznicze, należy więc zwracać dużą uwagę na miejsce ich zbioru, które powinno znajdować się z daleka od zakładów przemysłowych i dróg, aby napary nie zawierały substancji niebezpiecznych dla zdrowia człowieka. Istotne znaczenie dla zawartości substancji aktywnych ma również gatunek zbieranej rośliny. Bardzo duże znaczenie ma sposób przetwarzania i suszenia materiału roślinnego. W tej części pracy Doktorantka podkreśla również zalety liofilizacji jako metody przetwarzania roślin, która wydłuża okres przydatności roślin do spożycia i może ograniczać zmiany zawartości substancji aktywnych w materiale roślinnym.

Doktorantka, porównując swoje wyniki nad potencjałem antyoksydacyjnym naparów z podagrycznika pospolitego z wynikami badań antyoksydacyjnych opisywanymi w literaturze naukowej dla tej rośliny, wskazuje na to, że są one bardzo zgodne. Doktorantka wiąże większy potencjał antyoksydacyjny naparów otrzymanych w tej pracy z użyciem wody o wyższej temperaturze, z większym współczynnikiem dyfuzji substancji aktywnych z materiału roślinnego i z lepszą rozpuszczalnością substancji aktywnych w wodzie o wyższej temperaturze. Badania Doktorantki potwierdziły również informacje o tym, że na potencjał antyoksydacyjny naparów z kwiatów podagrycznika pospolitego, dla których w tej dysertacji oznaczano największą zdolność potencjału antyoksydacyjnego, istotny wpływ ma temperatura. Moim zdaniem należy tutaj podkreślić, że mimo iż potencjał antyoksydacyjny naparów otrzymywanych z liści, owoców i kłaczy podagrycznika pospolitego był niższy od potencjału antyoksydacyjnego naparów z kwiatów, to wpływ temperatury wody użytej do przygotowania naparów był tutaj bardziej widoczny, szczególnie w przypadku naparów otrzymanych z owoców i z kłaczy. Jednocześnie napary z kwiatów otrzymywane przez Doktorantkę charakteryzowały się też najwyższą zawartością związków polifenolowych, które jak opisuje to literatura naukowa, mają istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą naparów. Podobny wniosek opisano w literaturze naukowej dla naparów przygotowanych z zielonej herbaty. Również w przypadku tej rośliny zaobserwowano wysoką aktywność przeciwutleniającą naparów otrzymanych z kwiatów.

W przypadku badań zawartości witaminy C w naparach z podagrycznika pospolitego, najwyższą zawartość tej witaminy oznaczono dla naparów otrzymanych z owoców i kłaczy. Przy czym wyższe temperatury przygotowania naparów sprzyjały wzrostowi zawartości witaminy C w naparach. Podobnie znaczący wpływ temperatury na zawartość witaminy C w naparach zaobserwowano dla naparów przygotowywanych z zielonej herbaty i owoców dzikiej róży. W przypadku witaminy C, dobierając najkorzystniejszą temperaturę wody do przygotowania naparów, należy również brać pod uwagę trwałość tej witaminy w podwyższonych temperaturach.

W przypadku rutyny, najwyższą jej zawartość Doktorantka zaobserwowała dla naparów otrzymanych z liści i kwiatów, a najniższą w naparach otrzymanych z kłaczy. Istotne znaczenie dla zawartości rutyny w naparach miała temperatura parzenia naparów. Najkorzystniejszymi temperaturami wody stosowanej do przygotowania naparów były temperatury w zakresie 70-90°C. Biorąc pod uwagę opisywane w literaturze zdolności

antyoksydacyjne rutyny, napary otrzymane z liści i kwiatów podagrycznika pospolitego mogą stanowić bogate jej źródło dla organizmu człowieka. Badania nad pozyskiwaniem rutyny z materiału roślinnego opisywane w literaturze wskazują jednak, że istotne znaczenie dla ekstrakcji tego związku mają nie tylko temperatura i rodzaj części morfologicznej rośliny, ale również rodzaj użytego rozpuszczalnika i czas ekstrakcji. Myślę, że o badania tych parametrów należałoby w przyszłości rozwinąć badania prowadzone przez Doktorantkę. Stanowiłby one znakomite uzupełnienie uzyskanych w tej dysertacji wyników.

Doktorantka w naparach uzyskanych z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego oznaczała również zawartość: potasu, fosforu, magnezu, wapnia i fluoru. Te składniki mineralne pełnią ważną rolę w wielu procesach biochemicznych zachodzących w naszym organizmie i powinny stanowić ważny składnik naszej diety. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są zgodne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi otrzymywania naparów ziołowych, które wskazują na to, że temperatura wody użytej do przygotowania naparu ma istotne znaczenie dla zawartości składników mineralnych w tych preparatach ziołowych. Dostępna literatura naukowa wskazuje również na to, że istotne znaczenie dla tej zawartości ma też czas przygotowywania naparu. W związku z tym, w przypadku podagrycznika pospolitego też mógłby mieć on duże znaczenie. Mimo, że w literaturze naukowej znajdują się doniesienia na temat zawartości różnych pierwiastków w poszczególnych częściach morfologicznych podagrycznika pospolitego, to nie wykazano w nich zależności między temperaturą przygotowywania ekstraktów, a zawartością poszczególnych pierwiastków. Z tego względu badania Doktorantki są bardzo celowe i powinny być kontynuowane w przyszłości. Ponadto warto w przyszłości rozwinąć przeprowadzone przez Doktorantkę badania, o wyniki oznaczeń zawartości także innych pierwiastków, takich jak na przykład: cynk, miedź, selen, czy żelazo, które także mają ogromne znaczenie dla naszego organizmu.

Punkt 7 pracy prezentuje wnioski wynikające z badań Doktorantki, które zostały opisane w sposób ogólny w postaci 5 punktów. W mojej ocenie omówienie wyników i wnioski zostały przedstawione w sposób poprawny i zostały powiązane z istniejącym stanem wiedzy w badanych przez Doktorantkę zagadnieniach. W omówieniu wyników zabrakło mi jednak wskazania przez Doktorantkę dalszych kierunków badań nad pozyskiwaniem substancji aktywnych z podagrycznika pospolitego. Badania takie mogłyby dotyczyć zarówno badań wpływu innych parametrów na zawartość substancji

aktywnych w naparach, jak również opracowania metody otrzymywania innych preparatów ziołowych z wykorzystaniem podagrycznika pospolitego, które również mogłyby mieć zastosowanie jako składniki diety człowieka.

Wyniki badań przedstawione przez Doktorantkę w tej dysertacji zostały opracowane w formie 1 artykułu z listy JCR (IF=0,725) i 2 doniesień konferencyjnych.

3. Ocena pracy

Do oryginalnych osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej należy zaliczyć:

- 1) potwierdzenie, że takie części morfologiczne podagrycznika pospolitego jak: liście, kwiaty, owoce i kłącza mogą być cennym surowcem do przygotowania naparów o działaniu przeciwutleniającym, które w swoim składzie zawierają takie cenne związki biologicznie aktywne, jak: polifenole, rutyna, witamina C, a także takie pierwiastki, jak: potas, fosfor, magnez, wapń i fluor,
- 2) wykazanie, że zarówno temperatura wody użytej do przygotowania naparów, jak i części morfologiczna podagrycznika pospolitego użyta do badań miały wpływ na wielkość potencjału antyoksydacyjnego naparów, a także na zawartości w nich polifenoli, rutyny, witaminy C i takich pierwiastków, jak: potas, fosfor, magnez, wapń i fluor,
- 3) wykazanie, że najlepszym źródłem polifenoli jest napar przygotowany z kwiatów podagrycznika pospolitego z użyciem wody o temperaturze 90°C, który jednocześnie charakteryzuje się najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym,
- 4) wykazanie, że najlepszym źródłem witaminy C są napary przygotowane z owoców podagrycznika pospolitego z użyciem wody o temperaturze 70°C i 80°C.
- 5) wykazanie, że najlepszym źródłem rutyny jest napar przygotowany z liści podagrycznika pospolitego z użyciem wody o temperaturze 90°C.

Opracowanie i analiza uzyskanych wyników badań wskazują na to, że Doktorantka jest dobrze przygotowana do prowadzenia badań doświadczalnych. Recenzowaną pracę cechuje staranność formy i jasne formułowanie wniosków, jednak odnosząc się do pracy należy wnieść kilka uwag:

- 1) W tekście dysertacji bardzo często pojawia się sformułowanie „napary przygotowane wodą”. Moim zdaniem poprawne jest określenie „napary przygotowane z użyciem wody”.
- 2) Nazwy takich metod instrumentalnych, jak: HPLC-DAD, ICP-OES i RP-HPLC nie zostały poprawnie przetłumaczone przez Doktorantkę na język polski. HPLC-DAD to wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową, ICP-OES to emisyjna spektrometria atomowa z indukcyjnie sprzężoną plazmą, a RP-HPLC to wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układach faz.
- 3) Na stronie 20 dysertacji pojawia się zdanie, w którym nie wszystkie wymienione substancje należą do grupy polifenoli. Zdanie to brzmi następująco: „Dużą aktywność biologiczną przypisuje się obecności związków czynnych, takich jak polifenole, do których należą m.in. flawonoidy, kwasy fenolowe i hydroksycynamonowe, tokoferole, garbniki, kumaryny, związki poliacetylenowe, składniki olejków eterycznych, mikro- i makroelementy (Nizioł-Łukaszewska i in. 2020; Tovchiga 2016b; Tovchiga i in. 2017).”
- 4) Zdanie na stronie 20 zostało sformułowane w taki sposób, że jego treść wskazuje na to, że polifenole obecne w żywności pochodzenia naturalnego, sprzyjają rozwojowi takich chorób jak: cukrzyca, nowotwory, osteoporoza, choroby neurodegradacyjne i choroby układu krążenia. Zdanie to brzmi następująco: „Odpowiedzialne za te właściwości szeroko rozpowszechnione w żywności pochodzenia roślinnego są polifenole. Długotrwałe spożywanie pokarmów bogatych w te składniki może korzystnie wpływać na różne schorzenia, takie jak cukrzyca, rak, osteoporoza, choroby neurodegeneracyjne i choroby układu krążenia.”.
- 5) Wcześniej już wspomniałam w mojej recenzji, że korzystnie byłoby na stronie 21 pokazać wzory strukturalne: kwasu kawowego, kwasu chlorogenowego, kwercetyny i kemferolu oraz omówić szerzej zastawiania tych związków i ich

pochodnych glikozydowych (hiperozyd i izokwercetyna w przypadku kwercetyny i trifolina w przypadku kemferolu) w medycynie, podkreślając jednocześnie jakie działanie wykazują one na organizm ludzki.

- 6) Na str. 22 pracy pojawia się następujące zdanie: „Suplementacja kwasem askorbinowym może zwiększyć absorpcję bioaktywnych związków, takich jak kwercetyna-3-rutinozyd, kwas 5-kafeoilochinowy lub żelazo, w organizmie”. Nie jest ono poprawne, ponieważ żelazo jest pierwiastkiem chemicznym, a nie związkiem chemicznym. Podobnie we wnioskach do dysertacji pojawia się zdanie: „Badanie wpływu temperatury infuzji i różnych części morfologicznych rośliny pozwoliło określić optymalne warunki ekstrakcji w celu uzyskania naparów o maksymalnej zawartości badanych związków i potencjale przeciwutleniającym.” W zdaniu tym należy uwzględnić nie tylko związki chemiczne, ale również pierwiastki.
- 7) Na Rycinie 3 znajdującej się na stronie 24 należy uzupełnić numerację atomów węgla zgodnie z opisem budowy tego związku znajdującym się na stronie 23.
- 8) Wcześniej już wspomniałam w mojej recenzji o tym, że na stronie 25 zabrakło wzorów chemicznych falkarinolu i falkarindiolu. Prezentacja tych wzorów pozwoliłaby na wyjaśnienie dużej aktywności biologicznej obu tych związków. Ponadto, w literaturze naukowej istnieją doniesienia o znaczącej aktywności antynowotworowej falkarinolu i falkarindiolu, ale nie zostało to zagadnienie dostatecznie rozwinięte w dysertacji. Informacje o działaniu antynowotworowym falkarinolu można na przykład znaleźć w następujących artykułach: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 8290 i *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* 8 (2023) 100271.
- 9) Podobnie Doktorantka nie przedstawiła wzorów związków terpenowych występujących w olejku eterycznym pozyskanym podagrycznika pospolitego oraz nie omówiła zastosowań tych związków w medycynie.
- 10) W podpunkcie 1.2. zatytułowanym „Reaktywne formy tlenu (RFT)” należy poprawnie opisać, w jakiej postaci tlen występuje w atmosferze oraz jakie formy aktywne tlenu mogą powstawać, ściśle rozdzielając reaktywne formy tlenu, które są rodnikami od tych, które rodnikami nie są, np. cząsteczka

nadtlenku wodoru nie ma charakteru rodnikowego, co zostało błędnie podane w podpunkcie 1.2.

- 11) W punkcie 3.2.2. dysertacji Doktorantka nie dla wszystkich stosowanych odczynników podała ich czystość oraz dostawcę.
- 12) Rycina 6C dotyczy metody redukcji jonów Cu^{2+} do jonów Cu^+ poprzez działanie witaminy C w obecności kuproiny, związku kompleksowego, który reaguje z utworzonymi jonami Cu^+ tworząc barwny kompleks. Po lewej stronie rysunku 6C mamy więc jony Cu^+ i kuproinę, która nie została poprawnie podpisana przez Doktorantkę.
- 13) W kilku miejscach podpunktu 3.2.3.3. nazwa 2,6-dichlorofenoloindofenolu nie jest poprawnie napisana, np. w czwartym wierszu tego podpunktu i na Rycinie 6b. Również nazwa skrótu tego związku powinna zostać ujednolicona w całej pracy, gdyż raz jest to skrót w postaci „DCPiPP”, a innym razem w postaci „DCPiP”.
- 14) Substancji oznaczanych ilościowo w naparach w ramach tej dysertacji nie można nazywać parametrami, natomiast zawartości tych substancji w naparach można nazwać wielkościami wyjściowymi, czyli wielkościami, które uzyskujemy w wyniku przeprowadzanych pomiarów (lub analiz). Parametrami (wielkościami wejściowymi) badanymi w ramach pracy Doktorantki były: temperatura wody użytej do przygotowania naparu i rodzaj części morfologicznej podagrycznika pospolitego. Z tego powodu zdania przedstawione poniżej nie zostały poprawnie sformułowane (zdania pochodzą ze str. 84): „Zawartość rutyny była zależna od części morfologicznej oraz temperatury (odpowiednio $p < 0,000001$ i $p = 0,000137$), a pozostałe parametry (polifenole, K, P, Mg, Ca i F) tylko od jednego czynnika: temperatury lub części morfologicznej.” i „Może to sugerować, że proces ekstrakcji badanych parametrów zależał wprost proporcjonalnie od temperatury wody użytej do przygotowania naparów.”
- 15) W zdaniu pojawiającym się na stronie 101 („W naparach z kwiatów, niezależnie od temperatury, zawartość fluorków wynosiła 0,3 mg/L, natomiast w kłączkach 0,1mg/L.”), w pierwszej części zdania poprawnie zamiast naparów

z kwiatów należało wymienić napary z owoców, wówczas to zdanie byłoby poprawne.

Inne uwagi (głównie edytorskie):

- 1) Na stronie 17 pojawia się zdanie: „Podagrycznik pospolity, znany również zieleń biskupim.....”. Zamiast słowa „znany” powinno się tu pojawiać słowo „zwany”.
- 2) Zdanie pojawiające się na stronie 18 dysertacji nie jest zrozumiałe: „Zatem wiedza na temat składu fitochemicznego tej rośliny jest ograniczona i niewystarczająca, przy czym wykazuje ona znaczne zróżnicowanie w zakresie zawartości składników chemicznych, co sprawia, że jest bogata w liczne substancje biologicznie aktywne.”.
- 3) W zdaniu na stronie 20 pojawia się słowo „fenylopropany” dla określenia grupy związków występujących w podagryczniku pospolitym: „Zaobserwowano obecność wyspecjalizowanych metabolitów, z których powstawały takie związki jak: laktony, furanokumaryny, kumaryny monoterpene, poliacetyleny, lotne fenylopropany czy ftalidy (Sousa, Cunha, i Fernandes-Ferreira 2021).”.
- 4) W zdaniu znajdującym się na stronach 27 i 28, zamiast słowa „spostrzegania”, powinno być słowo „spostrzeżenia”: „Lokalna wiedza, zwana także tradycyjną wiedzą ekologiczną, dotyczyła zrównoważonego wykorzystania rodzimych zasobów i obejmowała kompleksowy system adaptacyjny, w którym przekazywano spostrzeżenia, przekonania i praktyki.”.
- 5) Na stronie 35 znajduje się następujące zdanie: „Przez wieki właściwości różnych roślin zielarskich były stosowane w leczeniu wielu infekcji bakteryjnych (Wijesundara i Rupasinghe 2019).”. W zdaniu tym w odniesieniu do właściwości roślin zielarskich zamiast słowa „stosowane” powinno być użyte słowo „wykorzystywane”.
- 6) Na tej samej stronie, inne zdanie nie jest poprawnie sformułowane: „Rośliny wytwarzają dużą liczbę metabolitów wtórnych, które wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową i dają możliwość nowym środkom przeciwbakteryjnym (Stefanovic i in. 2012).”.

- 7) Na stronie 64 pojawia się określenie „rzadkie pierwiastki ziem”, poprawnie Doktorantka powinna napisać „pierwiastki ziem rzadkich”.
- 8) Zdanie pojawiające się na stronie 95 nie jest zrozumiałe: „Co więcej, powszechnie uważa się, że spożywanie naparów z kwiatów zapewnia lepsze korzyści zdrowotne w porównaniu do zielonej herbaty (Chan 2011).”.
- 9) Podobnie zdanie na stronie 100: „Wyniki badań wskazują, że zarówno liście jak i kwiaty są bogate w rutynę, a napary sporządzone wodą w temperaturach powyżej 70°C stanowią wysokie źródło tego flawonoidu.”
- 10) We fragmencie pracy przedstawionym przeze mnie poniżej najprawdopodobniej Doktorantce chodziło o procesy pozyskiwania rutyny z roślin, a nie odzyskiwania: „Etap ekstrakcji odgrywa kluczową rolę w procesie odzyskiwania związków bioaktywnych z naturalnych źródeł. Proces ten musi spełniać wiele wymagań, takich jak wszechstronność, łatwość użycia, wydajność, opłacalność, a także powinien maksymalnie wydobywać i utrzymywać wysoką zawartość bioaktywnych związków z materiałów roślinnych (Thoo i in. 2013). Niemniej jednak Kim i in. (Kim i in. 2005) stwierdzili, że wydajność ekstrakcji rutyny zmienia się w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika, a za optymalną temperaturę dla uzyskania wysokiej wydajności odzysku rutyny uznano ekstrakcję w zakresie 60°C – 80°C.”.
- 11) Zestawienie pozycji literaturowych w punkcie 8 pracy zatytułowanym „Bibliografia” nie jest poprawnie przygotowane. Należałoby w nim ujednoczyć sposób zapisu imion (pełne imię czy skrót imienia, położenie imienia przed czy po nazwisku?) i nazw czasopism (pełna nazwa czy skrót?), ponadto w przypadku niektórych czasopism nie podano numeru tomu i zakresu stron. Ujednoczeniu powinien też ulec rodzaj użytego pisma i wielkość liter (wielkie czy małe litery?).

Powyższe uwagi zostały poczynione z obowiązku recenzenta i nie podważają w żaden sposób pozytywnej oceny przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Należy podkreślić duży wkład pracy włożony przez Doktorantkę w realizację rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

i potwierdza, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Jednocześnie praca ta potwierdza posiadanie przez Panią mgr inż. Kamilę Dębia ogólnej wiedzy teoretycznej związanej z dyscypliną naukową, jaką jest dyscyplina nauki o zdrowiu.

4. Wniosek końcowy

W posumowaniu niniejszej recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kamili Dębia pt. „Właściwości prozdrowotne naparów z różnych części morfologicznych podagrycznika pospolitego (*Aegopodium podagraria* L.)” ma charakter nowatorski i wnosi wiele istotnych wartości poznawczych oraz oryginalnych wniosków. Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Kamili Dębia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Szczecin, dnia 12 września 2023 roku