



**Katedra i Zakład Farmakognozji
z Pracownią Roślin Leczniczych
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

tel./fax +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

Lublin, 06.12.2018

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk chemicznych mgr. Hossama Al-Suod zatytułowanej „**Complex analytics of biologically active compounds including cyclitols from plant materials**” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, dr h.c. mult., członek korespondencyjnego PAN. Pracę wykonano w Centrum Edukacyjno – Badawczym Metod Separacyjnych i Bioanalitycznych BioSep, Katedry Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Przedstawiona do oceny praca doktorska to logicznie powiązany tematycznie cykl pięciu publikacji z listy A czasopism punktowanych MNiSW o łącznym współczynniku IF równym 9,743. Są to prace:

- 1) Al-Suod, H., Ligor, M., Rațiu, I.-A., Rafińska, K., Górecki, R., Buszewski, B. A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. *Phytochemistry Letters*, 2017, 20, 507-519 (IF=1.575; MNiSW=20)
- 2) Al-Suod, H., Pomastowski, P., Ligor, M., Railean-Plugaru, V., Buszewski, B. New approach for fast identification of cyclitols by MALDI-TOF mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 2018, 29, 528-537 (IF=2.337; MNiSW=30)
- 3) Al-Suod, H., Rațiu, I.-A., Ligor, M., Ligor, T., Buszewski, B. Determination of sugars and cyclitols isolated from various morphological parts of *Medicago sativa* L. *Journal of Separation Science*, 2018, 41, 1118-1128 (IF=2.415; MNiSW=30)
- 4) Rațiu, I.A., Al-Suod, H., Ligor, M., Ligor, T., Railean-Plugaru, V., Buszewski, B. Complex investigation of extraction techniques applied for cyclitols and sugars isolation from different species of *Solidago* genus. *Electrophoresis*, 2018, 39, 1966-1974 (IF=2.569; MNiSW=30)
- 5) Al-Suod, H., Gadzała-Kopciuch, R., Buszewski, B. Simultaneous HPLC-ELSD determination of sugars and cyclitols in different parts of *Phacelia tanacetifolia* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2018, 80, 32-38 (IF=0.847; MNiSW=15)

Prowadzone badania finansowane były w ramach dwóch projektów naukowych:

- PLANTARIUM zatytułowany „Cultivated plants and natural products as a source of biologically active substances destined for the production of cosmetic and pharmaceutical products as well as diet supplements” (Biostrateg2/29805/9/NCBR/2016) Narodowe Centrum Badań i Rozwoju;
- PRELUDIUM-14 zatytułowany “Cyclitols as biologically active raw material obtained from Polish crops”)2017/27/N/ST4/00354) Narodowe Centrum Nauki.

Cyklitole to cykliczne alkohole wielowodorotlenowe biogenetycznie pochodzące od 6-fosforanu glukozy. Są to pochodne wielohydroksycykloheksanu (liczba grup –OH wynosi zazwyczaj 6). Związki z tej grupy są szeroko rozpowszechnione zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym. Odgrywają szczególnie ważną rolę w funkcjonowaniu komórek, są składnikami fosfolipidów oraz błon komórkowych. Najbardziej znany z nich, inozytol, występuje we wszystkich organizmach żywych, pełni funkcję witaminy dla wielu gatunków zwierząt, jest również substancją wzrostową dla grzybów niższych. Badania ostatnich lat dowodzą, iż pochodne inozytolu pełnią istotną rolę stymulacji owulacji, co przekłada się na płodność u kobiet z zespołem policystycznych jajników. Badania kliniczne wskazują też na skuteczność wspomnianych pochodnych w leczeniu dysfunkcji psychicznych jak ataki paniki, depresja, stany obsesyjno-kompulsywne. Szereg metabolitów wtórnych będących pochodnymi inozytolu odgrywa istotną rolę w obronie roślin przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi.

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było opracowanie efektywnej metody izolacji, identyfikacji oraz ilościowej analizy metabolitów wtórnych z uwzględnieniem cyklitolu z ważnych z punktu ekonomicznego polskich roślin leczniczych.

W toku prowadzonych badań mgr Hossam Al-Suod realizował wytyczone przez siebie cele jak:

- określenie zawartości cukrów i cyklitolu w różnych częściach *Medicago sativa* oraz *Phacelia tanacetifolia*
- poprawa parametrów oznaczeń techniką GC-MS i HPLC-ELSD
- opracowanie metody zatężania cyklitolu z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej SPE
- dobór optymalnych warunków ekstrakcji cyklitolu z uwzględnieniem wpływu zastosowanego rozpuszczalnika
- opracowanie szybkiej metody identyfikacji cyklitolu techniką MALDI-TOF-MS.

Cyklitole występują w materiale roślinnym w połączeniu z innymi składnikami aktywnymi, więc ich odizolowanie jest niebywale trudnym zadaniem. Doktorant w pierwszej przedstawionej publikacji włączony w cykl podjął się próby przeglądu literatury

podsumowując dostępne informacje dotyczące aktywności biologicznej, ale przede wszystkim scharakteryzował i porównał dotychczas stosowane techniki ekstrakcyjne i analityczne, metody analizy jakościowej oraz ilościowej. Opracowanie opublikowane na łamach *Phytochemistry Letters* jest doskonałym wstępem do realizowanych dalszych badań.

W trakcie analizy dostępnej literatury mgr Al-Suod zauważył potrzebę opracowania metody zapewniającej szybką analizę pochodnych cyklitoli. Doktorant po raz pierwszy opracował metodę opartą na zastosowaniu MALDI-TOF-MS. Dzięki temu nie tylko znacznie skrócono czas analizy oraz uniknięto konieczności uciążliwej derywatywacji, ale także z powodzeniem udało się rozróżnić od siebie enancjomery: D-chiro- oraz L-chiro-inozytol. Analizę poprzedziło zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej SPE, co pozwoliło na oczyszczenie próbek. Jako materiał badawczy Autor zastosował różne części lucerny, popularnej rośliny znanej ze swoich walorów odżywczych, powszechnie stosowanej m. in. jako pasza dla zwierząt. Wyniki przedstawiono w pracy D2 opublikowanej na łamach *Phytochemical Analysis*.

Zastosowana metoda umożliwiła rozróżnienie enancjomerów, co podkreśliłam już wcześniej, jednak nie było możliwości wykonania analizy ilościowej. Dlatego też Doktorant poszukując rozwiązań zastosował technikę GC-MS, znaną jako „złoty standard” w analizie ilościowej cukrów i cyklitoli. Po raz pierwszy więc oszacowano zawartość cukrów i cyklitoli w różnych częściach lucerny, wykazując jednocześnie, iż najbogatszymi w omawiane metabolity organami są korzenie. Należy podkreślić, iż najważniejszym osiągnięciem tej pracy jest zaproponowanie zmodyfikowanej metody derywatywacji, niezbędnej do ilościowego oznaczenia cukrów i cyklitoli. Wykazano, iż przedłużenie czasu z 45 do 150 minut zapewni zakończenie procesu. Wyniki opublikowano na łamach *Journal of Separation Science*.

W obu przypadkach ekstrakty do badań uzyskane zostały poprzez zastosowanie klasycznej ekstrakcji w aparacie Soxhleta z 96% etanolem jako rozpuszczalnikiem. Tradycyjna ekstrakcja w aparacie Soxhleta przez lata była metodą z wyboru do izolacji szeregu metabolitów z materiału roślinnego. Z uwagi na to, iż w ostatnim czasie cyklitole cieszą się coraz większym zainteresowaniem naukowców, głównie ze względu na ich interesujące właściwości farmakologiczne, niezbędne jest opracowanie metody ich szybkiej i efektywnej ekstrakcji ze złożonej matrycy roślinnej. Dobór odpowiednich metod ekstrakcji jest niezwykle ważnym zagadnieniem w fitochemii. Odpowiednio dobrana metoda gwarantuje maksymalny odzysk badanych substancji aktywnych w możliwie krótkim czasie i przy niskich nakładach finansowych. Poszukując techniki wydajniejszej od tradycyjnej, zapewniającej skrócenie czasu procesu, Autor porównał szereg klasycznych, jak i nowoczesnych technik (maceracja, ekstrakcja w aparacie Soxhleta, ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami, przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika PLE czy ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym SFE) ale też zbadał wpływ zastosowanego ekstrahenta. Jako

substancje do badań zastosowano nawłóć pospolitą – *Solidao virgaurea*. W toku badań wykazano, iż optymalny odzysk uzyskuje się przy zastosowaniu techniki PLE z wodą jako ekstrahentem. Zoptymalizowana metoda ekstrakcji w połączeniu z techniką SPE oraz GC-MS zastosowana została do ilościowego oznaczenia cukrów i cyklitolii w innych gatunkach nawłoci, także pochodzących z różnych terenów Polski, celem określenia wpływu warunków klimatycznych na zawartość wspomnianych metabolitów.

Wyniki jakie doktorant uzyskał w toku prowadzonych badań wykorzystane zostały do oznaczenia zawartości cukrów (7 pochodnych) oraz cyklitolii (3 pochodne) w różnych częściach facelii błękitnej, rośliny uprawianej na paszę, nawóz zielony, będącej doskonałą rośliną miododajną. Znając już wady i zalety techniki MALDI-TOF-MS oraz GC-MS, celem uniknięcia uciążliwej derywatywacji, Autor zaproponował technikę HPLC-ELSD, która okazała się być prostą, szybką, czułą i niezawodną, pozwalającą jednocześnie rozdzielić 10 związków w czasie 30 min. Ta część badań opublikowana została w *Biochemical Systematics and Ecology*.

Ponadto w ramach pracy doktorskiej mgr Al-Suod opracował nowy sposób oczyszczania próbki metodą ekstrakcji do fazy stałej SPE. Dotychczas stosowana metoda pozwalała na odseparowanie cyklitolii jedynie wraz z towarzyszącymi im cukrami. Celem selektywnej izolacji cyklitolii zsyntetyzowano nowy sorbent, który zapewnił selektywność, jednak z niewielkimi odzyskami na poziomie 50-53%. Poszukując nowych rozwiązań Doktorant wykazał, iż skutecznym jest dodatek drożdży, które w procesie fermentacji przekształcają większość cukrów. Pozostałe zaś usunięte być mogą na skutek zastosowania żywicy anionowymiennej. Otrzymane wyniki nie zostały dotychczas opublikowane, jednak już wiadomo, iż spotkają się z ogromnym zainteresowaniem środowiska naukowego.

Przetawione prace poprzedzone są krótkim wstępem. Autor przedstawił cel pracy, krótko opisał problemy badawcze oraz uzyskane wyniki. Całość zakończona jest krótkim podsumowaniem, spisem literatury oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Do pracy dołączone są oświadczenia współautorów, z których jednoznacznie wynika, iż udział Doktoranta w powstawaniu prac jest wiodący. Dołączone jest także oświadczenie samego Autora. Z oświadczeń wynika, iż prace powstały w oparciu o własne hipotezy badawcze Doktoranta, opracował on koncepcje badań, analizował uzyskane dane i wyciągał odpowiednie wnioski. Każdorazowo był też autorem pierwszej wersji manuskryptu.

Obowiązkiem recenzenta jest także krytyczny komentarz ocenianej pracy. Trudne jest to zadanie, kiedy na cykl składa się 5 bardzo dobrze opublikowanych prac, które już przeszły proces recenzji. Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka pytań:

- dlaczego pomimo tego, iż wykazano, że najlepszą techniką ekstrakcji była PLE z zastosowaniem wody jako ekstrahenta, w publikacji D2 i D3 zastosowano ekstrakcje w aparacie Soxhleta z 96% etanolem jako rozpuszczalnikiem?

- w pracy D3 oszacowano po raz pierwszy dystrybucję oznaczanych związków w różnych organach lucerny. Zakładam, iż wszystkie one zebrane zostały w tym samym stadium rozwoju rośliny. Wiadomym jest, iż w czasie kwitnienia np. zmienia się rozmieszczenie metabolitów wtórnych. Czy doktorant rozważał także wyliczenie zawartości badanych związków w jednym organie, ale zbieranym w różnych stadiach wegetacyjnych rośliny?

- dlaczego do optymalizacji procesu ekstrakcji (praca D4) wybrano rośliny z rodzaju *Solidago*? Nie ma o nich wzmianki w pracy przeglądowej D1. Jednocześnie w pracy D4 Autor sugeruje, co jest prawdą, iż na zawartość metabolitów wtórnych ogromny wpływ mają warunki klimatyczne. Niestety brakuje dyskusji w tym temacie. Jaka jest różnica w średnich temperaturach, poziomie opadów, rodzaju gleb na terenach, z których pochodzą zebrane egzemplarze?

Niestety, przy redagowaniu pracy Autor popełnił kilka błędów edytorskich, co oczywiście jest nieuniknione i w żaden sposób nie wpływa na jej wartość, ale z obowiązku recenzenta przytaczam je poniżej:

- str. 5 – tresses – powinno być stresses

- str.12 – autor napisał "... a new methodology for identification of cyclitols entitled „*New approach for fast identification of cyclitols by MALDI-TOF mass spectrometry*”. Nie jest o oczywiście tytuł metody, ale publikacji w której metoda ta została zaprezentowana.

Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Mgr Al-Suod skutecznie opanował umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazał dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Podjęcie przez Doktoranta niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego. Praca jest nowatorska, a otrzymane wyniki przedstawione zostały po raz pierwszy. Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. O dużej wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie wyników w postaci dobrej jakości artykułów w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, o czym wspominałam na wstępie recenzji.

Na koniec podkreślić chciałam całokształt pracy Doktoranta. Oprócz dorobku przedstawionego do oceny w ramach realizacji pracy doktorskiej mgr Al-Suod jest współautorem 3 innych prac. Podsumowując jego całkowity dorobek naukowy to 8 prac dających sumaryczny IF=17,202. Uzyskane wyniki prezentowane były w postaci 9 doniesień

konferencyjnych (postery lub prezentacje ustne). Doktorant nagrodzony został dwukrotnie pierwszą nagrodą za najlepszy poster na międzynarodowych konferencjach w Jordanii i Polsce.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie **wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii UMK w Toruniu o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Hossama Al-Suod do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie ze względu na zaangażowanie w pracę badawczą Doktoranta oraz wysoką wartość uzyskanych wyników pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską **do wyróżnienia**.

Krzyszyna Skalicka-
-Woźniak

dr hab. n farm. Krystyna Skalicka-Woźniak