

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Hossama Al-Soud
pt.: „Complex analytics of biologically active compounds including cyclitols from plant materials”

Formalna strona pracy

Rozprawa doktorska mgr Hossama Al-Soud została wykonana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii oraz w Centrum Metod Separacyjnych i Bioanalitycznych „BioSep” w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, członka korespondenta Polskiej Akademii Nauk.

Na ocenianą rozprawę doktorską składa się 5 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR):

1. Al-Soud H., Ligor M., Ratiu I.A., Rafińska K., Górecki R., Buszewski B., 2017. A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. *Phytochemistry Letters*, 20: 507-519 (IF=1,575; MNiSW=20) – praca przeglądowa;
2. Al-Soud H., Pomastowski P., Ligor M., Railean-Plugaru V., Buszewski B., 2018. New approach for fast identification of cyclitols by MALDI-TOF mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 29: 528-537 (IF=2,337; MNiSW=30);
3. Al-Soud H., Ratiu I.A., Ligor M., Ligor T., Buszewski B., 2018. Determination of sugars and cyclitols isolated from various morphological parts of *Medicago sativa* L. *Journal of Separation Science*, 41: 1118-1128 (IF=2,415; MNiSW=30);
4. Ratiu I.A., Al-Soud H., Ligor M., Ligor T., Railean-Plugaru V., Buszewski B., 2018. Complex investigation of extraction techniques applied for cyclitols and sugars isolation from different species of *Solidago* genus. *Electrophoresis*, 39: 1966-1974 (IF=2,569; MNiSW=30);
5. Al-Soud H., Gadzała-Kopciuch R., Buszewski B., 2018. Simultaneous HPLC-ELSD determination of sugars and cyclitols in different parts of *Phacelia tanacetifolia* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 80: 32-38 (IF=0,847; MNiSW=15).

Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) powyższych prac wynosi 9,742, a suma punktów (wg wykazu MNiSW) - 125, co w przypadku Osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora jest wynikiem bardzo dobrym.

Na rozprawę doktorską, oprócz kopii publikacji (50 stron), składa się zwięzłe opracowanie, w języku angielskim, zawierające (w sumie na 22 stronach maszynopisu): wstęp, cele i zadania badawcze (w tym listę wykorzystanych metod i technik analitycznych),

omówienie uzyskanych wyników, podsumowanie i wnioski, wykaz cytowanego piśmiennictwa, streszczenie w języku angielskim i polskim. Załączony został również wykaz osiągnięć akademickich – lista wszystkich publikacji, doniesień i komunikatów przedstawionych podczas konferencji naukowych oraz uzyskane wyróżnienia.

Wstęp pracy jest tylko syntetycznym wprowadzeniem do poruszanej problematyki badawczej, co uważam za w pełni uzasadnione, gdyż szczegółowy i wyczerpujący przegląd aktualnego piśmiennictwa został zawarty w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. Przedstawione badania zostały zrealizowane w oparciu o środki finansowe pochodzące z projektu badawczo-rozwojowego Plantarum pt. „*Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródło substancji biologicznie aktywnych przeznaczonych do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety*” (BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016) oraz z projektu NCN PRELUDIUM-14 pt. „*Cyclitols as biologically active raw material obtained from Polish crops*” (nr 2017/27/N/ST4/00354).

Opis merytoryczny rozprawy

Jednym z ważniejszych obszarów badawczych ostatnich lat jest identyfikacja naturalnych bioaktywnych związków roślinnych, o szerokim spektrum działania i potencjale aplikacyjnym, m.in. dla celów medycznych, kosmetycznych czy jako suplementów diety. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na pro-zdrowotne właściwości cyklitolu (cyklicznych wielowodorotlenowych pochodnych cukrów), związków powszechnie występujących w organizmach żywych (od bakterii po człowieka). Spośród cyklitolu na szczególną uwagę zasługuje *myo*-inozytol, który może być wykorzystany w leczeniu zaburzeń metabolicznych człowieka związanych z opornością na insulinę, zespołem policystycznych jajników, cukrzycą ciążową, lub w zapobieganiu/leczeniu niektórych powikłań cukrzycowych (neuropatii, nefropatii, zaćmy). *Myo*-inozytol wykazuje również działanie antyoksydacyjne i przeciw-zapalne, a jego izomery (*chiro*-inozytol, *scyllo*-inozytol), czy eterowe pochodne metylowe (D-pinitol, sekwoitol) wykazują szereg korzystnych właściwości, m.in. naśladują działanie insuliny (obniżają poziom cukru we krwi), wykazują działanie immunosupresyjne, antynowotworowe, zapobiegają powstawaniu β -amyloidów w komórkach nerwowych (w chorobie Alzheimerera), wpływają na regulację poziomu trójglicerydów i cholesterolu. Tym samym jednym z istotnych wyzwań analitycznych staje się poszukiwanie optymalnych metod identyfikacji, ekstrakcji i oznaczania zawartości cyklitolu w roślinach, szczególnie w gatunkach wykorzystywanych jako pokarm dla człowieka i pasza dla zwierząt

gospodarskich, jak też w ziołach i innych gatunkach roślin dziko-żyjących - jako potencjalnych źródłach dla pozyskiwania pożądanych cyklitoli. W tę tematykę wpisuje się oceniana rozprawa doktorska, zatytułowana „*Complex analytics of biologically active compounds including cyclitols from plant materials*”, co tłumaczę jako „Kompleksowa analityka biologicznie aktywnych komponentów, w tym cyklitoli z materiału roślinnego”.

Szczególne znaczenia nabiera pierwsza publikacja Doktoranta (pt. „*A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols*”, opublikowana w 2017 roku, *Phytochemistry Letters*, IF=1,575), będąca wyczerpującym aktualnym przeglądem piśmiennictwa nt. występowania w roślinach, metod ekstrakcji, oczyszczania, rozdziału, identyfikacji i oznaczeń ilościowych cyklitoli. Uważam tę pracę za jedno z bardziej wartościowych opracowań z ostatnich lat, obok dwóch prac przeglądowych: o fizjologicznej roli *myo*-inozytolu w roślinach w warunkach stresu abiotycznego (Valluru i Van den Ende, 2011. *Plant Science*) i drugiej – nt. możliwości terapeutycznego wykorzystania *myo*-inozytolu (Croze i Soulage, 2013. *Biochimie*). Wspomniana publikacja jest, jak dotychczas, jedyną tak szczegółowo charakteryzującą współczesne metody i techniki analityczne stosowane w badaniach roślinnych cyklitoli. Zdobyta przy opracowaniu tej publikacji wiedza Doktoranta niewątpliwie została wykorzystana dla określenia i realizacji głównego celu pracy doktorskiej, jakim było **opracowanie optymalnej metodologii dla izolacji, frakcjonowania, identyfikacji i ilościowych oznaczeń cyklitoli w wartościowych krajowych roślinach zielarskich**. Szczególna uwaga została również zwrócona na opracowanie nowej, prostej metody identyfikacji cyklitoli w roślinnych ekstraktach.

W związku z tym, że wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały poddane wnikliwej ocenie recenzentów na etapie edytorskim, moja rola jako recenzenta sprowadza się do oceny zgodności celu badań/zadań badawczych z osiągniętymi wynikami.

Dla realizacji celu badawczego Doktorant zaplanował aż 8 zadań badawczych, z których pierwsze, trzecie i siódme można połączyć w jedno – oznaczenie składu i zawartości cukrów i cyklitoli w różnych organach lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) i facelii błękitnej (*Phacelia tanacetifolia* Benth.). Wybór gatunków nie był przypadkowy - wynikał z ich właściwości leczniczych, ze względu na wysoką zawartość różnych związków bioaktywnych. Wyniki badań przeprowadzonych na lucernie opublikowano w *Journal of Separation Science* (IF=2,415, praca nr 3), a na facelii – w *Biochemical Systematics and Ecology* (IF=0,847, praca nr 5). Ekstrakcję cukrowców z wysuszonych tkanek lucerny przeprowadzono w aparacie Soxhleta, stosując jako rozpuszczalnik 96% etanol, a rozdział i detekcję cukrowców techniką GC-MS. Z kolei ekstrakty z facelii uzyskano stosując metodę przy podwyższonym

ciśnieniu (PLE), z wykorzystaniem wody jako rozpuszczalnika, a do analiz jakościowych i ilościowych zastosowano technikę HPLC-ELSD. W obu pracach do oczyszczania i wstępnego zateżanie ekstraktów zastosowano metodę SPE (na CHROMABOND®C18ec, a ekstraktów z facelii – dodatkowo na OASIS®HLB). Z powyższych prac wynika, że oprócz *myo*-inozytolu i *scyllo*-inozytolu, cyklitolu obecnych w obu gatunkach, facelia zawiera także *allo*-inozytol, natomiast lucerna – D-pinitol i D-*chiro*-inozytol. W facelii, wśród cyklitolu dominują *scyllo*- i *allo*-inozytol, a w lucernie - D-pinitol. Wykazanie wyższej zawartości D-pinitolu w korzeniach i łodygach lucerny, niż w liściach i kwiatach, może być przydatne dla wykorzystania tych organów do izolacji D-pinitolu na większą skalę. *Czy zdaniem Doktoranta identyfikacja cyklitolu w nasionach różnych gatunków roślin może być sposobem na wcześniejsze (przed wegetacją) wykrycie nieznanymi dotąd roślinnymi źródłami cyklitolu?*

Doktorant, skupiając się na analitycznych aspektach prowadzonych badań, wnioskując, że technika GC-MS, powszechnie stosowana do analiz jakościowych i ilościowych cukrów i cyklitolu z tkanek roślinnych, może być z powodzeniem zastąpiona przez HPLC-ELSD, której zaletą jest szybkość i prostota przygotowania próbek do analiz, wysoka czułość, powtarzalność rozdzielczości i niskie koszty. Co więcej, podczas analiz cukrów i cyklitolu techniką GC-MS Doktorant zwrócił uwagę na krytyczny etap przygotowania ekstraktów do analiz, jakim jest proces derywatywacji (upochadniania) cukrów/cyklitolu z wykorzystaniem odpowiedniego reagenta. Jako oddzielne zadanie (nr 2) wyróżnił poprawę dotychczas stosowanej metodologii – derywatywacji cukrów/cyklitolu z użyciem TMSI (1-[trimetylsilyl]imidazole). Jego zdaniem, wydłużenie czasu z 45 do 150 minut (w temp. 80°C), zapobiega powstawaniu podwójnych TMS-pochodnych analizowanych związków. Jednak ani w publikacjach, ani w rozprawie nie przedstawiono żadnych dowodów na powyższą obserwację, co skłania do polemiki. Na podstawie danych literaturowych oraz własnego doświadczenia w zakresie analiz niskocząsteczkowych cukrowców roślinnych uważam, że zastąpienie TMSI przez MSTFA do derywatywacji próbek (w temp. 70°C przez 30 minut) nie powoduje powstawania podwójnych pików cyklitolu na chromatogramach (przy rozdzielaczach w nisko-polarnej kolumnie kapilarnej tego samego typu jak RTx-5Ms, np. HP-5MS, ZB-5MSi) uzyskanych techniką GC-MS. Natomiast po derywatywacji z użyciem TMSI (przez 45 minut w 80°C) i rozdzielaczach w kolumnach niepolarnych nie powstają podwójne formy TMS-pochodnych cyklitolu (analizy GC-FID). *Jak Doktorant wytłumaczy powstawanie podwójnych TMS-pochodnych w jego analizach?*

Świadectwem dobrego opanowania warsztatu badawczego przez Doktoranta jest publikacja 4 (w *Electrophoresis*, IF=2,569), w której przedstawiono wyniki porównawczych

analiz efektywności pięciu metod ekstrakcji cyklitolu z suchych tkanek nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea* L.), tj.: maceracji, ekstrakcji w aparacie Soxhleta, ekstrakcji przy podwyższonym ciśnieniu (PLE), ekstrakcji z udziałem ultradźwięków (UAE) oraz ekstrakcji w płynie w stanie nadkrytycznym (SFE). Doktorant udowodnił, że najwyższą efektywnością wyróżnia się ekstrakcja przy podwyższonym ciśnieniu (PLE) z wykorzystaniem wody jako rozpuszczalnika, co czyni ją najbardziej przydatną dla pozyskiwania cyklitolu zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej. Stosując metodę PLE i GC-MS porównał też skład i zawartość cukrów i cyklitolu w pędach trzech gatunków nawłoci (pospolitej, kanadyjskiej i olbrzymiej), w tym także określił wpływ regionu uprawy (na przykładzie nawłoci olbrzymiej) na profil cyklitolu w tkankach. Po raz pierwszy wykazano obecność aż czterech cyklitolu (*myo-*, *scyllo-*, *chiro*-inozytolu i D-pinitolu) w pędach nawłoci, lecz stężenie cyklitolu jest tu znacznie niższe (<0,1% s.m.), niż w lucernie i facelii (do 1,4 i 0,4% s.m., odpowiednio). Wykazano, że region uprawy może znacząco wpływać na zawartość cukrów, a w mniejszym stopniu – cyklitolu.

Zupełną nowością przeprowadzonych badań było wykorzystanie, po raz pierwszy, spektrometrii mas MALDI-TOF do identyfikacji cyklitolu w ekstraktach z lucerny, bez ich uprzedniego rozdzielania chromatograficznego (zadanie 6, publikacja nr 2, w *Phytochemical Analysis*, IF=2,337). Szczególną korzyścią z takiego wykorzystania MALDI-TOF jest możliwość identyfikacji D- i L- enancjomerów *chiro*-inozytolu.

Innym, istotnym osiągnięciem może być zrealizowanie zadania 8, dotyczącego rozdzielania cukrów i cyklitolu razem obecnych w ekstraktach roślinnych. Postępowanie jest prowadzone dwukierunkowo: 1) poprzez opracowanie nowych złożów mieszanin sorbentów dla metody SPE oraz 2) wykorzystanie drożdży dla usuwania cukrowców z matrycy, bez strat cyklitolu, a następnie usuwania pozostałości cukrów na złożach anionitowych. Ta druga metodyka, jak podaje Doktorant, zakończyła się sukcesem i wyniki są opracowywane do kolejnej publikacji.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej podkreślam spójność tematyczną wszystkich prac, ich nowatorski charakter i wysoki potencjał aplikacyjny. Wszystkie prace oryginalne ukazały się w tym samym roku – 2018, co wskazuje na niezwykle intensywną pracę Doktoranta. Choć wszystkie publikacje są wielo-autorskie, to w 4 z nich Doktorant jest pierwszym autorem. Potwierdzenie dużego zaangażowania Doktoranta w wykonywanie analiz, opracowanie i interpretację uzyskanych wyników oraz przygotowanie każdej publikacji do druku można odnaleźć w oświadczeniach wszystkich współautorów publikacji, podpisanych i dołączonych do ocenianej rozprawy doktorskiej. Biorąc pod uwagę udział

Doktoranta w planowaniu i realizacji części eksperymentalnej badań, jak też w całościowym opracowaniu uzyskanych wyników badań uważam, że mgr Hossam Al-Soud dobrze opanował specjalistyczny warsztat badawczy, zdobył szereg umiejętności i szeroką wiedzę z zakresu analityki chemicznej i jest już dojrzałym naukowcem.

Wniosek końcowy

Rozprawę doktorską zatytułowaną „*Complex analytics of biologically active compounds including cyclitols from plant materials*” oceniam bardzo pozytywnie. Jestem przekonany, że zastosowane metody i techniki analityczne umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wyników, a wartość naukowa pracy jest wysoka i ma duży potencjał aplikacyjny. Sadzę, że przeprowadzenie tak szerokich analiz nie byłoby możliwe bez merytorycznego udziału i pomocy ze strony Opiekuna Naukowego – Pana profesora Bogusława Buszewskiego.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska nt. „*Complex analytics of biologically active compounds including cyclitols from plant materials*” i indywidualny wkład Doktoranta w jej powstanie spełniają wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2013 roku „*O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*” (Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Hossama Al-Soud i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoka wartość merytoryczną pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Z poważaniem


Lesław Bernard Lahuta