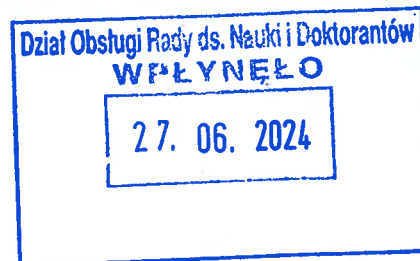




Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach



Sosnowiec, 24.06.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Ilona Kaczmarczyk-Żebrowska
Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii
Wydział Nauk Farmaceutycznych
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Natalii Dobros
pt. „Analiza profilu związków o charakterze polifenolowym
i aktywności biologicznej wybranych gatunków z rodziny
***Lamiaceae* i *Hypericaceae*”**

Promotor: dr hab. Katarzyna Paradowska (Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego)

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Zawada (Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego)

Spośród roślin z rodzaju lawenda (*Lavandula* L.) głównym obiektem badań naukowych, a także zastosowania w farmacji, kosmetyce/perfumerii czy przemyśle spożywczym jest lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia* Mill.). W krajach europejskich najważniejszym surowcem zielarskim wykorzystywanym z tej rośliny leczniczej jest kwiatostan będący bogatym źródłem olejku eterycznego o udokumentowanymi badaniami naukowymi działaniu uspokajającym i ułatwiającym zasypianie, a także przeciwłękowym, przeciwzapalnym czy przeciwdrobnoustrojowym. W ostatnich latach zwrócono także uwagę na związki chemiczne, które choć nie są składnikami lawendowego olejku eterycznego, także występują w kwiatostanach lawendy m.in. polifenole. Do tej pory w literaturze naukowej opisano przede wszystkim działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne polifenoli występujących w ekstraktach pozyskiwanych z kwiatostanów lawendy. W Polsce od kilku lat uprawiany jest oprócz lawendy wąskolistnej także mieszańiec międzygatunkowy - lawenda pośrednia (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). Ze względu na popularność zapachu lawendowego olejku eterycznego

opracowuje się odmiany różnych gatunków *Lavandula*, które różnią się pomiędzy sobą jako chemotypy.

Do jednych z najbardziej popularnych roślin leczniczych w Polsce, oprócz lawendy wąskolistnej, należy także dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.). Surowcem zielarskim dziurawca zwyczajnego jest ziele, w którym wskazuje się naftodiantrony, pochodne fluoroglucony oraz polifenole jako związki chemiczne odpowiedzialne za efekt leczniczy ziela. W zależności od użytego ekstrahenta wyciągi z ziela dziurawca mogą wykazywać działanie przeciwdepresyjne (ekstrakty etanolowe), rozkurczowe w układzie pokarmowym (ekstrakty wodne) czy regenerujące skórę (maceraty olejowe). W innych rejonach świata rosną inne gatunki z rodzaju *Hypericum*, które mogą wykazywać podobny potencjał terapeutyczny jak dziurawiec zwyczajny np. dziurawiec łuskowaty (*H. prolificum* L.) czy dziurawiec barwierski (*H. androsaemum* L.).

Badania naukowe prowadzone nad składem chemicznym oraz właściwościami biologicznymi mało poznanych roślin dają nadzieję na wyodrębnienie skutecznych surowców zielarskich mogących być orężem w walce z chorobami cywilizacyjnymi, w których jako czynniki sprawcze bierze się szczególnie pod uwagę stres oksydacyjny i związany z nimi stan zapalny (m.in. choroby układu krążenia, nowotworowe czy neurodegeneracyjne).

Zagadnieniem tym zajęła się w swojej rozprawie doktorskiej mgr Natalia Dobros, która postanowiła otrzymać ekstrakty z kwiatostanów odmian 2 gatunków lawendy: lawendy wąskolistnej (odmiany Betty's Blue, Elizabeth, Hidcote i Blue Mountain White) i lawendy pośredniej (odmiany Alba, Grosso i Gros Bleu) oraz z ziela 3 gatunków dziurawca: dziurawca zwyczajnego, dziurawca łuskowatego i dziurawca barwierskiego, a następnie poddać je analizie fitochemicznej i badaniom własności biologicznych.

Oceniana rozprawa doktorska mgr Natalii Dobros liczy 229 stron tekstu i składa się z 10 rozdziałów. Przedstawione w rozdziale I cele rozprawy doktorskiej oraz koncepcja badań są przejrzyste, a zastosowane procedury doświadczalne opisane w rozdziale III umożliwiają realizację założonego celu pracy. Treść pracy odpowiada tematowi określone w tytule.

W rozdziale II, który stanowi Przegląd piśmiennictwa, Doktorantka m.in. scharakteryzowała zgodnie z naukową wiedzą botaniczną, fitochemiczną i fitofarmakologiczną rośliny z rodzaju *Lavandula* L. i z rodzaju *Hypericum* L., które są przedmiotem jej badań. Opisała również podstawowe tradycyjne i nowoczesne metody otrzymywania ekstraktów roślinnych,

metody analizy ich składu oraz procedury pozwalające na ocenę działania biologicznego, zwracając szczególną uwagę na badania aktywności antyoksydacyjnej *in vitro*, aktywności przeciwzapalnej *in vitro* i wpływu toksycznego w warunkach *in vivo*. Każdy podrozdział „części literaturowej”, co uważam za bardzo cenne, wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z kolejnym etapem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Materiałem badawczym były kwiatostany 4 odmian lawendy wąskolistnej (Betty's Blue, Elizabeth, Hidcote i Blue Mountain White) oraz 3 odmian lawendy pośredniej (Alba, Grosso i Gros Bleu) zebrane w stadium pąka z plantacji „Przystanek Lawenda” (Borowiczki-Pieńki) oraz ziele dziurawca zwyczajnego, ziele dziurawca łuskowatego i ziele dziurawca barwierskiego zebranych z Podlaskiego Ogrodu Ziołowego (Koryciny). Nadanie okazom numerów identyfikacyjnych przez Herbarium Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dało zielone światło do przeprowadzenia kolejnych etapów badań, na które składają się następujące eksperymenty:

1. dobór metody suszenia materiału roślinnego pod względem jak największej zawartości polifenoli,
2. wykonanie ekstraktów różnymi metodami (przy zastosowaniu różnej temperatury ekstrakcji) tj. maceracji, dekokcji, ekstrakcji wspomagannej ultradźwiękami przy użyciu 50% etanolu lub 70% metanolu oraz ekstrakcji nadkrytycznym CO₂,
3. jakościowe i ilościowe badania fitochemiczne na zawartość polifenoli w otrzymanych wcześniej ekstraktach
 - spektroskopia absorpcyjna z zakresu UV-Vis do oceny całkowitej zawartości polifenoli, w tym flawonoidów,
 - metody chromatograficzne (HPLC i LC-MS) do określenia obecności i zawartości wybranych związków,
 - spektroskopia NMR do analizy sygnałów diagnostycznych różnicujących wybrane ekstrakty na podstawie widm ¹H i ¹³C NMR oraz korelacji homo- i heterojądrowych,
4. ocena wpływu wyciągów na równowagę oksydacyjno-redukcyjną z wykorzystaniem testów chemicznych, w tym metody DPPH (przy użyciu spektroskopii EPR) i metody FRAP (z użyciem spektroskopii absorpcyjnej z zakresu UV-Vis),
5. badania własności biologicznych

– przeciwzapalnych, jako zdolność do inhibicji enzymu cyklooksygenaza-2 z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej; związkiem odniesienia był celekoksyb (selektywny inhibitor cyklooksygenazy-2),

- toksycznych w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem zarodków danio pręgowanego.

Otrzymane wyniki Doktorantka poddała analizie statystycznej (jednokierunkowej analizie wariancji ANOVA i regresji wielorakiej, w tym analizie PCA).

Należy zwrócić uwagę na utrzymanie przez Doktorantkę należytej kolejności, jaka powinna być brana pod uwagę w tego rodzaju projektach. Najpierw trzeba nabrać pewności co do tożsamości badanej rośliny, dalej przeanalizować jej skład chemiczny, a następnie dokonać oceny własności fizykochemicznych i biologicznych.

Analizując w rozdziale IV uzyskane wyniki Doktorantka porównała je z dostępnymi danymi literaturowymi, a następnie wysunęła w rozdziale V słuszne wnioski. I tak, biorąc pod uwagę wpływ metody suszenia surowca roślinnego na zawartość związków chemicznych w później otrzymanych ekstraktach mgr Natalia Dobros wykonała próby z zastosowaniem liofilizacji, suszenia w inkubatorze oraz tradycyjnego suszenia ziela zebranego w pęczki na przykładzie dziurawca zwyczajnego. Na podstawie analizy metodą Folina-Ciocalteu Doktorantka stwierdziła, że największa całkowita zawartość polifenoli znajduje się w materiale liofilizowanym, dlatego też tę metodę wykorzystowała do suszenia materiału roślinnego wykorzystywanego do swoich dalszych badań.

W dalszym etapie badań Doktorantka wykazała, że dla wszystkich badanych odmian 2 gatunków lawendy i 3 gatunków dziurawca najlepszą metodą ekstrakcji polifenoli, czyli związków o charakterze antyoksydantów, jest ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami z wykorzystaniem jako ekstrahentów: 50% etanolu i 70% metanolu (zwłaszcza przy temperaturze ekstrakcji wynoszącej 70°C). Natomiast ze względu na proces gotowania w temperaturze 100°C odwary nie charakteryzowały się zadawalającą zawartością polifenoli. Także w wyciągach otrzymanych metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ zidentyfikowano przede wszystkim związki lipofilowe tj. kumarynę, herniarynę czy kwasy tłuszczowe.

Fitochemiczna analiza jakościowa ekstraktów otrzymanych z odmian obu gatunków lawendy potwierdziła podobny profil związków polifenolowych, jednak analiza ilościowa wskazała na różnice w obecności konkretnych polifenoli w zależności od odmiany lawendy. Polifenole tj. kwasy fenolowe i flawonoidy obecne były w ekstraktach pozyskanych z lawendy wąskolistnej, jednak ekstrakty z lawendy pośredniej zawierały przede wszystkim związki z grupy

kumaryn. W odmianie Betty's Blue dominował kwas rozmarynowy i moryna, w odmianie Elizabeth i Hidcote – kwas rozmarynowy i glikozyd kwasu ferulowego, w odmianie Blue Mountain White – glikozyd kwasu ferulowego, a w ekstraktach z odmian Alba, Grosso i Gros Bleu stwierdzono przede wszystkim kumarynę i herniarynę.

W przypadku analizy fitochemicznej ekstraktu z zieleńca dziurawca łuskowatego Doktorantka wykazała, że dominuje w nim kwas chlorogenowy i hiperozyd, natomiast w ekstrakcie z zieleńca barwierskiego w największej ilości występuje kwas chlorogenowy, a w ekstrakcie z zieleńca zwyczajnego - hiperozyd i rutozyd. Co ciekawe, całkowita zawartość polifenoli była najmniejsza w zieleńcu dziurawca zwyczajnego w porównaniu do zieleńca łuskowatego i zieleńca barwierskiego.

Wyniki powyższych badań mogą posłużyć w przyszłości do opracowania metody identyfikacji oraz standaryzacji poszczególnych odmian lawendy wąskolistnej i lawendy pośredniej oraz różnych gatunków zieleńca.

W dalszej kolejności sporządzone przez mgr Natalię Dobros ekstrakty posłużyły do przeprowadzenia testów chemicznych pozwalających na ocenę ich aktywności antyoksydacyjnej. Uzyskane wyniki wskazują, że kwas rozmarynowy i kwas kawowy odpowiadają za aktywność antyoksydacyjną większości ekstraktów otrzymanych z lawendy. Z kolei aktywność antyoksydacyjna ekstraktów pozyskanych z zieleńca wynika z obecności kwasu chlorogenowego i kwercytriny.

Kolejny etap badań wykazał, że maceracja i ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami z wykorzystaniem 50% etanolu to najbardziej optymalne metody ekstrakcji związków odpowiedzialnych za aktywność przeciwzapalną. W większości badanych ekstraktów z lawendy moryna i kwas rozmarynowy to związki wykazujące efekt przeciwzapalny, dla ekstraktów z zieleńca są to kwas chlorogenowy, hiperozyd i kwercetyna. Niestety właściwości przeciwzapalne wszystkich badanych ekstraktów okazały się słabsze niż związku odniesienia – celekoksybu.

Dokonana przez Doktorantkę ocena toksyczności wybranych ekstraktów pozwoliła wyznaczyć zakres stężeń powodujących oraz niepowodujących zmiany rozwojowe u zarodków danio przegowanego.

Przeprowadzone badania mgr Natalia Dobros podsumowała w rozdziale V, wskazując m.in., że zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna otrzymanych

ekstraktów zależą od badanej przez Doktorantkę odmiany lub gatunku rośliny, jak również od zastosowanej metody ekstrakcji.

Tekst pracy doktorskiej Doktorantka podparła piśmiennictwem naukowym liczącym w rozdziale IX „Piśmiennictwo” aż 226 pozycji literaturowych, które są związane z zakresem podjętych badań i w zdecydowanej większości opublikowane po 2015 roku.

Co szczególnie warte podkreślenia:

1. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Natalia Dobros jako pierwsza określiła profil związków polifenolowych oraz aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną 1 odmiany lawendy wąskolistnej – Hidcote i 2 odmian lawendy pośredniej - Alba i Grosso oraz oceniła właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne ekstraktów z dziurawca łuskowatego;

2. Rozprawa doktorska mgr Natalii Dobros jest obszerna, z dużą ilością przeprowadzonych eksperymentów, szczególnie z zakresu fitochemii, co niewątpliwie wymagało od Doktorantki dużego nakładu czasu na zaplanowanie, przygotowanie i przeprowadzenie eksperymentów oraz na przeanalizowanie obszernej ilości uzyskanych wyników;

3. Szczegółowa analiza statystyczna pozwoliła na dokładną ocenę wzajemnych zależności pomiędzy dużą liczbą uzyskanych wyników;

4. Użyte metody badawcze oraz uzyskane wyniki badań są bardzo dobrze i szczegółowo udokumentowane w rozdziale III i IV pracy. Według rozdziału VII praca zawiera aż 105 rysunków, a w rozdziale VIII wymieniono 33 tabele. Ponadto tekst pracy został napisany w sposób zrozumiały dla czytelnika, a sama praca jest bardzo estetyczna oraz jasno opracowana graficznie, co ułatwia analizę dużej ilości uzyskanych wyników.

Podsumowując, otrzymane przez mgr Natalię Dobros wyniki badań poszerzają dotychczasową wiedzę o roślinach z rodzaju lawenda i rodzaju dziurawiec, mogą być wskazówką do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów, zwłaszcza farmakologicznych oceniających możliwość zastosowania wybranych ekstraktów o jak największym potencjale fitoterapeutycznym. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Natalii Dobros jest oryginalna, nowatorska, naukowo atrakcyjna, ma charakter poznawczy oraz potencjał aplikacyjny.

W trakcie czytania pracy doktorskiej mgr Natalii Dobros nasuwają się następujące pytania, na które prosiłabym odpowiedzieć podczas obrony pracy doktorskiej:

1. Dlaczego z kwiatostanów lawendy oraz z ziela dziurawca wykonano odwary a nie napary?
Wiadomym jest przecież, że na ogół z kwiatów, liści lub ziela sporządza się napary; stosunek surowiec zielarski:woda = 1:10 (m/m). Natomiast odwary są sporządzane głównie ze zdrewniałych nadziemnych części rośliny, korzeni, nasion czy owoców; stosunek j.w.
2. Odwary należą do bardzo nietrwałych przetworów zielarskich i powinny być spożyte do 12 godz. od sporządzenia. Zatem jaki czas minął od wykonania odwarów do przeprowadzenia oznaczeń fitochemicznych?
3. Jaki jest DER dla uzyskanych ekstraktów?

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko i z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Natalii Dobros spełnia warunki określone w Art.13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

Wobec powyższego mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Natalii Dobros do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakognozji i Fitochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Iłona Kaczmarczyk-Zebrowska
prof. dr hab. n. med. k.h. o zdr.
Iłona Kaczmarczyk-Zebrowska

