



**Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk**

Prof.dr hab. J. Renata Ochocka

Gdańsk, 28.06.2024

**Ocena pracy doktorskiej mgr Natalii Dobros
„ Analiza profilu związków o charakterze polifenolowym i aktywności
biologicznej wybranych gatunków z rodziny *Lamiaceae* i *Hypericaceae*”**

Ocena ta dokonana została zgodnie z pismem z dnia 06. 05. 2024 roku, prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także zgodnie z wymogami aktualnie obowiązującego prawa (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce*).

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr Natalii Dobros, wykonana pod merytoryczną opieką Pani dr hab. Katarzyny Paradowskiej oraz promotora pomocniczego dr Katarzyny Zawady z Zakładu Chemii Organicznej i Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, to obszerna praca dotycząca gatunków roślin z dwóch rodzajów: *Lavandula* i *Hypericum*, które mają długą tradycję stosowania w farmacji i w medycynie, od antyku do czasów współczesnych.

Autorka uzasadniając cel pracy wskazuje przede wszystkim na poszukiwanie naturalnych, bezpiecznych i efektywnie działających przeciwzapalnie i antyoksydacyjnie związków o charakterze polifenolowym z siedmiu odmian lawendy i trzech gatunków dziurawca.

Doktorantka uzasadniła, że mimo bogatego piśmiennictwa i prowadzonych badań nad gatunkami wymienionych rodzajów, brak jest danych o aktywności

biologicznej ekstraktów wodno-etanolowych z kwiatostanów lawendy, a także aktywności przeciwzapalnej i antyoksydacyjnej m.in. *Hypericum prolificum*.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawiona jest w postaci manuskryptu obejmującego łącznie 229 stron. Manuskrypt zawiera typowe rozdziały prac tego typu: spis treści, wstęp i cele pracy, przegląd piśmiennictwa obejmujący charakterystykę rodzajów: *Lavandula* i *Hypericum* i zagadnienia dotyczące stosowanej metodyki badań, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski, wykaz stosowanych skrótów, spis rysunków i tabel, piśmiennictwo. W ostatnim punkcie Doktorantka przedstawiła swoją aktywność naukową. Bogata lista obejmuje związane z tematyką doktoratu: pięć artykułów naukowych, osiem komunikatów wystąpień ustnych i siedem prezentacji posterowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorantka jest również współautorką dziewięciu artykułów naukowych, sześciu komunikatów i dwunastu posterów niezwiązanych z tematyką doktoratu. Brała udział w realizacji projektów naukowych NCN i NCBiR. Powyższe informacje wskazują na dobre przygotowanie Autorki do prowadzenia badań naukowych.

W przedstawionej do oceny dysertacji, mgr Natalia Dobros w bardzo dobrze napisanym wprowadzeniu, przedstawiła charakterystykę rodzaju *Lavandula*, koncentrując się na dwóch gatunkach: *Lavandula angustifolia* Mill. (Lawenda wąskolistna) i *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel. (Lawenda pośrednia). Szczegółowo zostały również opisane trzy gatunki *Hypericum*: *H. perforatum*, (dziurawiec zwyczajny), *H. prolificum* (dziurawiec łuskowaty) i *H. androsaemum* (dziurawiec barwierski), W opisach uwzględniono właściwości lecznicze badanych gatunków. W obszernej części teoretycznej Autorka przedstawiła informacje na temat metod analiz fitochemicznych, które stosowała jak również badań aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej oraz badań toksyczności na modelu zwierzęcym *Danio rerio*. Wszystkie wiadomości w tej części rozprawy ujęte zostały przez Autorkę w sposób zwięzły, co niewątpliwie świadczy o umiejętności korzystania z literatury

fachowej jak i o umiejętności jasnego i ścisłego przekazywania swej wiedzy innym. Należy podkreślić niezwykle solidną podstawę źródłową recenzowanej rozprawy.

Autorka postawiła sobie bardzo wymagający i ambitny cel nie tylko określenia profilu związków polifenolowych i flawonoidowych oraz aktywności przeciw zapalnej i antyoksydacyjnej badanych surowców, ale również ocenę wpływu tradycyjnych i nowoczesnych metod ekstrakcji na skład i właściwości ekstraktów. Założyła również badania toksyczności badanych ekstraktów roślinnych.

Tak duży zakres badań i dokonań naukowych wymagał dobrego przygotowania Doktorantki. Na uznanie zasługuje umiejętność współpracy naukowej Doktorantki, którą nawiązała z Instytutem Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie i Pracownią Hodowli Danio Pręgowanego, z Międzynarodowym Instytutem Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, z zespołem Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie, z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi oraz z Laboratorium NMR Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Przystępując do analizy przedstawionych rezultatów, trzeba stwierdzić, że mgr Natalia Dobros dążyła do realizacji wszystkich celów pracy, a przede wszystkim do uzyskania takich ekstraktów, które odznaczałyby się dużą zawartością związków polifenolowych i tym samym oczekiwaną aktywnością biologiczną. W badaniach surowców roślinnych istotne jest prawidłowe oznaczenie botaniczne badanych gatunków. Doktorantka do badań wybrała odmiany *Lavandula angustifolia* Mill. (Lawenda wąskolistna) i odmiany *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel. (Lawenda pośrednia), które pozyskała z plantacji mającej status Kolekcji Narodowej rodzaju *Lavandula*. Należy założyć, że gwarantuje to prawidłowość oznaczenia taksonów. Mam pytanie do Doktorantki, czym kierowała się w wyborze odmian dwóch badanych gatunków lawendy. Czy oprócz różnic morfologicznych, charakteru i intensywności zapachu, producent roślin posiadał dodatkowe informacje na temat poszczególnych odmian?

W tym miejscu mam również pytanie o identyfikację botaniczną trzech gatunków *Hypericum*, zebranych w Podlaskim Ogrodzie Ziołowym w Korycinach.

Podkreślenia wymaga fakt, że okazy badanych roślin z obu rodzajów zostały prawidłowo zdeponowane w Herbarium Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, z nadaniem numerów identyfikacyjnych (ang. voucher specimen).

Nie mam uwag krytycznych dotyczących sposobu opracowania części dotyczącej zastosowanych analitycznych metod w badaniach fitochemicznych. Należy stwierdzić, że ta część pracy wymagała opanowania przez Doktorantkę szeregu metod. W analizach fitochemicznych Doktorantka stosowała metody spektroskopowe: spektroskopię absorpcyjną UV-VIS, spektroskopię NMR (magnetycznego rezonansu jądrowego), metody chromatograficzne HPLC, UHPLC (ultrasprawa chromatografia cieczowa), LC-MS (chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas). Z zestawienia przeprowadzonych badań wynika, że mgr Natalia Dobros wykonała dużą liczbę analiz, co nie tylko świadczy o jej zaangażowaniu w prowadzeniu badań, lecz również wskazuje na nabycie przez Autorkę wielkiej wprawy w poczynaniach fitochemicznych. Szczegółowy opis wszystkich stosowanych metod stanowi bardzo dobry przewodnik analiz fitochemicznych..

Dużą wartość mają wyniki oceny stosowanych metod ekstrakcji badanych surowców. Jest to bardzo ważny etap badań surowców roślinnych. Doktorantka założyła porównanie efektywności klasycznych, tradycyjnych metod takich jak maceracja i przygotowanie odwarów z metodami nowoczesnymi: ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami przy użyciu 50% metanolu i 70% etanolu oraz ekstrakcją nadkrytycznym CO₂. Wyniki badań spektrofotometrycznych wykazały, że niezależnie od badanych gatunków i odmian, najwyższa zawartość polifenoli wyrażona jako równoważniki kwasu galusowego (GAE) oraz całkowita zawartość flawonoidów wyrażona jako równoważniki katechiny (CAE) uzyskana była dla 70% ekstraktów metanolowych otrzymanych ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami. Istotne są wyniki wyższych zawartości polifenoli i flawonoidów w ekstraktach *H. prolificum* i *H. androsaemum* w porównaniu do ekstraktów farmakopealnego surowca *H. perforatum*,

Omawiając efekty pracy i sukcesy Doktorantki należy wymienić wskazanie potencjalnych markerów odróżniających poszczególne odmiany zarówno gatunku lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia Mill.* jak i lawendy pośredniej (*Lavandula × intermedia Emeric ex Loisel.*). Doktorantka wskazała również potencjalne markery fitochemiczne dla trzech badanych gatunków *Hypericum*.

Celem badań aktywności biologicznej było określenie aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej ekstraktów badanych gatunków. Doktorantka omawiając rezultaty badań wskazała zależność i wpływ na wyniki metod otrzymania ekstraktów jak również skład związków polifenolowych. Dużym ułatwieniem w ocenie wyników i określeniu wszystkich zależności jest przeprowadzona przez Doktorantkę analiza chemometryczna z zastosowaniem analizy głównych składowych (Principal Component Analysis –PCA).

Istotne są wyniki wskazujące, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z dziurawca związana jest z zawartością kwasu chlorogenowego i kwercytryny, a aktywność przeciwzapalna z zawartością kwasu chlorogenowego, hiperozydu i kwercetyny. Autorka **po raz pierwszy** opisała aktywność antyoksydacyjną i przeciwzapalną *Hypericum prolificum*.

Omawiając efekty pracy w odniesieniu do badań ekstraktów odmian *Lavandula angustifolia Mill.* i *Lavandula × intermedia Emeric ex Loisel.*, za wartościowe należy uznać wyniki Autorki wskazujące, że za aktywność antyoksydacyjną większości badanych ekstraktów z lawendy odpowiedzialny jest kwas rozmarynowy i kwas kawowy, a za aktywność przeciwzapalną moryna i kwas rozmarynowy.

Cel badań aktywności biologicznej zakładał również oznaczenie toksyczności otrzymanych ekstraktów. Doktorantka zastosowała w badaniu model zwierzęcy zarodków kręgowców wodnych, danio pręgowane - *Danio rerio* i ustaliła, że ekstrakty badanych gatunków są nietoksyczne w zakresie stężeń 0,01 i 0,02 mg/ml.

Wszystkie uzyskane wyniki w ocenianej pracy znacząco poszerzają stan wiedzy na temat potencjalnego zastosowania badanych gatunków roślin.

Oceniając stronę edytorską pracy chciałabym podkreślić dużą staranność z jaką została przygotowana.. Wyniki są dobrze udokumentowane. W pracy zawarte są 33 tabele i aż 105 rysunków.

Rolą recenzenta jest obiektywna ocena i uzasadnienie, że praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i że doktorant zasługuje na miano pracownika nauki. W przypadku ocenianej pracy stwierdzam, że rozprawa mgr Natalii Dobros dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy, umożliwiając prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań obejmujących, analizę fitochemiczną i badania aktywności biologicznej.

Wnioski końcowe

Recenzowana pracę oceniam wysoko z uwagi na duże walory naukowe. Uzyskane wyniki mogą być pomocne w badaniach nad roślinami leczniczymi. Będą stanowiły również podstawę do dalszych wielokierunkowych badań.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023.742).

Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Natalii Dobros, ubiegającej się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Renata Ochocka

