

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej  
„Skład chemiczny rośliny leczniczej *Cistus incanus* L. (czystek szary),  
a jej wybrane właściwości biologiczne”  
wykonanej przez mgr Dariusza Szeremetę  
w Instytucie Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii  
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

### Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Dariusza Szeremety, to bardzo ważne, interesujące opracowanie, które obejmuje nowoczesne badania fitochemiczne promujące możliwość wykorzystania różnych metod ekstrakcji i różnych technik chromatograficznych w badaniach składu chemicznego materiału roślinnego. Opracowanie to wzbogacone jest o badania biologicznej aktywności roślinnych ekstraktów, obejmujące aktywność antyoksydacyjną, przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową.

Powszechnie znanym w przyrodzie zjawiskiem jest zmienność chemiczna roślin należących do określonego gatunku, rosnących na stanowiskach naturalnych. Wynika ona m.in. z różnych warunków klimatycznych i edaficznych, w których rozwijają się rośliny. Oceniana praca dotyczy właśnie takiej problematyki naukowej – zmienności chemicznej i prób szybkiej oceny wartości materiału roślinnego jako potencjalnego surowca leczniczego, kosmetycznego i/lub spożywczego (promowanego jako health food).

Analizowanym w pracy materiałem roślinnym, były części nadziemne *Cistus incanus* L. – czystka szarego, o różnym pochodzeniu (Turcja, Grecja, Albania oraz 1 próbka o nieznanym pochodzeniu), dostępne w formie preparatów handlowych (jako herbaty ziołowe) w sklepach stacjonarnych i internetowych w Polsce. W preparatach tych rozpoznawalne były części nadziemne rośliny w rozdrobnionej formie – liście, łodygi i kwiaty. Analizą objęto łącznie 12 preparatów: 5 bazujących na roślinach z Turcji, 2 na roślinach z Grecji oraz 4 na roślinach rosnących w Albanii.

Od kilku lat *Cistus incanus* L. – skalna róża (pink rock-rose) reprezentant rodziny Cistaceae – Czyszkowate, gatunek pochodzący z obszaru Morza Śródziemnego robi ogromną karierę w Europie Środkowej, w tym w Polsce, jako roślina lecznicza o wysokim potencjale antyoksydacyjnym ze względu na dużą zawartość związków polifenolowych. Polecany jest w prewencji różnych chorób cywilizacyjnych, posiada wyraźne walory pro-zdrowotne. W gatunku tym, w jego częściach nadziemnych, podobnie jak w innych gatunkach całego rodzaju *Cistus*, występuje także olejek eteryczny i żywica, o charakterystycznej nazwie „labdanum”.

Wybór tego właśnie gatunku jako obiektu badań uważam za bardzo ważny i bardzo trafny.

O wyborze tego materiału badawczego zdecydowała z pewnością jego ogromna popularność i dostępność w Polsce i równocześnie też potrzeba oceny jego wartości leczniczej i/lub pro-zdrowotnej.

Gatunek ten stwarza pewne problemy taksonomiczne, m.in. występuje pod synonimową nazwą, jako *Cistus creticus*. Producent jednego z analizowanych przez Autora pracy produktów bazującego na materiale roślinnym pochodzącym z Grecji, podaje tę synonimową łacińską nazwę. Część taksonomów uważa, że jest to mieszaniec dwóch gatunków: *C. albidus* L. oraz *C. crispus* L.



Do tej pory *Cistus incanus* L. nie posiada statusu rośliny farmakopealnej w państwach członkowskich Unii Europejskiej mimo, że skład chemiczny tego gatunku jest bogaty w cenne terapeutycznie związki. Wynikać to może z niewystarczającego stanu wiedzy nad jego składem chemicznym i zmiennością tego składu. Dotychczas z szerokiej gamy związków polifenolowych udowodniono w tym gatunku obecność licznych flawonoidów (w tym aglikonów i glikozydów), katechin, procyanidyn B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> oraz wybranych kwasów fenolowych (głównie kwasu galusowego i jego pochodnych). Odrębną grupę metabolitów wtórnych obecnych w *C. incanus* stanowią terpeny, w tym monoterpeny, seskwiterpeny oraz bardzo charakterystyczne dla tego gatunku diterpeny typu labdanu. Dotychczasowe badania składu chemicznego olejku eterycznego udowodniły różny procentowy udział podgrup związków terpenowych w jego składzie związany z różnym pochodzeniem geograficznym badanego surowca.

Za surowce farmaceutyczne uważa się *Cisti herba* (ziele czystka) i *Cisti folium* (liść czystka). Surowce te od dawna były wykorzystywane w tradycyjnej medycynie bliskowschodniej, szczególnie w medycynie tureckiej. Oba surowce zalecano w leczeniu stanów zapalnych skóry, reumatyzmu i stanów zapalnych nerek. Wykorzystywano także ich działanie przeciwwrzodowe, przeciwbiegunkowe i przyspieszające gojenie ran.

Współcześnie w lecznictwie europejskim rekomenduje się oba surowce jako działające przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, przeciwgrzybiczo i immunomodulująco, a przede wszystkim antyoksydacyjnie. Udowodniono także ich działanie spazmolityczne, hipotensyjne, gastroprotektoryjne, neuroprotektoryjne i cytotoksyczne. Zwraca uwagę także ich skuteczność w leczeniu boreliozy, grypy ludzkiej i ptasiej oraz leishmaniozy.

Większość wymienionych możliwych aplikacji udowodniono w badaniach *in vitro* i/lub na zwierzętach.

Europejskie ciała opiniotwórcze – EFSA (European Food Safety Authority) i Komisja Europejska, która opracowała bazę CosIng (Cosmetic Ingredients), rekomendują odpowiednio oba surowce jako bogate, naturalne źródło substancji przeciwutleniających oraz ekstrakty z całej rośliny (*Cistus incanus* extract), jako chroniące skórę. Baza CosIng dopuszcza też do wykorzystania trzy inne surowce – jako kondycjonujące skórę – ekstrakty z kwiatów, liści i łodyg (*Cistus incanus* flower, leaf and stem extract).

Celem ocenianej rozprawy była analiza składu chemicznego handlowych próbek nadziemnych części *C. incanus* różnego pochodzenia i ocena właściwości biologicznych frakcji polifenolowej (aktywności antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej).

Dalekosiężnym celem było opracowanie metod analitycznych, głównie chromatograficznych, które pozwalałyby na szybką i łatwą ocenę zarówno, składu chemicznego, jak i aktywności biologicznej handlowych próbek *C. incanus*. Badania z tego zakresu skoncentrowane były na wykorzystaniu chromatografii cienkowarstwowej (TLC), zarówno w szybkiej ocenie składu chemicznego, jak i bioprofilowaniu, jak określa to Autor pracy. Bioprofilowanie objęło wykorzystanie TLC w badaniach aktywności antyoksydacyjnej i bioautografię w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej.

W badaniach własnych Autora można wyróżnić dwie główne części – część fitochemiczną i badania biologicznej aktywności nielotnych frakcji ekstraktów. Część fitochemiczna obejmuje analizę frakcji lotnej i nielotnej.

Związki lotne uzyskano prowadząc klasyczną destylację z parą wodną w aparacie Derynga (metoda polecana przez Farmakopeę Polską, wyd. XI) oraz wykorzystując zjawisko desorpcji termicznej związków lotnych bezpośrednio z materiału roślinnego. Związki lotne analizowano odpowiednio metodą GC-MS oraz HS-GC-MS (HS – headspace – analiza fazy nadpowierzchniowej) korzystając z biblioteki widm MS (NIST – National Institute



of Standards and Technology) oraz wybranych standardów. Porównawczą analizę ilościową związków oparto na procentowej zawartości związków w próbce, nie na rzeczywistych stężeniach poszczególnych związków.

Uzyskane przez Autora wyniki w tej części pracy są bardzo interesujące.

Wykazały one znacznie bogatszy skład frakcji lotnej uzyskanej metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga w porównaniu z techniką analizy fazy nadpowierzchniowej. Łącznie z wykorzystaniem obu metod zidentyfikowano aż 51 związków, spośród których 29 uzyskano wyłącznie z zastosowaniem metody destylacji, a 8 wyłącznie techniką „headspace”.

Mimo udowodnionej mniejszej wydajności HS-GC-MS, całościowa ocena wyników wskazuje na potrzebę prowadzenia analiz frakcji lotnych badanego materiału obiema metodami, które wzajemnie się uzupełniają. Dopiero zastosowanie obu metod może być gwarancją otrzymania pełnej informacji o składzie frakcji lotnej.

W badanych 12 handlowych próbkach materiału roślinnego stwierdzono bardzo duże różnice składu jakościowego, jak i ilościowej zawartości poszczególnych związków, które nie były związane z krajem pochodzenia. Co interesujące, w każdej z analizowanych próbek, niezależnie od zastosowanej metody potwierdzono obecność 2 związków diterpenowych: tlenku manoilu i tlenku 13-epi-manoilu. Innymi związkami obecnymi w większości analizowanych próbek były: eukaliptol,  $\alpha$ -linalol, kamfora, tymol, karwakrol, viridiflorol,  $\delta$ -kadinen, sklareol, tlenek sklareolu i fiton. W składzie olejków dominowały ilościowo diterpeny.

Badania frakcji nielotnej dotyczyły analizy składu metanolowych i wodno-metanolowych ekstraktów z próbek handlowych oraz badań ich aktywności biologicznej – aktywności antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej. W badaniach właściwości antyoksydacyjnych składników ekstraktów, z sukcesem wykorzystano metodę łączącą chromatografię cienkowsarstwową z testem aktywności antyoksydacyjnej (TLC-DPPH). Wykorzystano zdolność poszczególnych, rozdzielonych frakcji do wychwytywania rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Wodno-metanolowe ekstrakty otrzymane metodą ASE (Accelerated Solvent Extraction – przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikami), różniły się ilością i intensywnością sygnałów chromatograficznych i aktywnością antyoksydacyjną. Udowodniono, że największą liczbą sygnałów chromatograficznych oraz największą ich intensywnością, a także najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzują się ekstrakty z próbek handlowych bazujących na roślinach pochodzących z Albanii. W ramach tej części badań wykazano ponadto w teście DPPH, że aż siedem spośród jedenastu składników (pasm) ekstraktów, wykazuje właściwości antyoksydacyjne.

W tej części badań wykazano także powtarzalność uzyskiwanych obrazów chromatograficznych (fingerprintów), dobrej jakości – z dobrze rozdzielonymi pikami, ze stosunkowo niską linią bazową. Ekstrakcję próbek metodą ASE, po wstępnym oczyszczeniu w aparacie Soxhleta oraz kolejno rozdziały metodą TLC-DPPH zaproponowano jako modelowe podejście do screeningowego badania i kontroli jakości handlowych próbek bazujących na *C. incanus*.

Uzyskane wyniki w tej części badań mają potencjalnie aplikacyjny charakter.

W badaniach aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystano surowe, metanolowe ekstrakty uzyskane metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Modelowymi bakteriami były: G(+) bakteria glebowa – *Bacillus subtilis* i G(-) naturalnie świecąca bakteria – *Aliivibrio fischeri*. Aktywność przeciwbakteryjną oceniano stosując metodę chromatografii cienkowsarstwowej z bioautografią bezpośrednią (TLC-DB (TLC- direct bioautography)). Uzyskane wyniki badań udowodniły działanie przeciwbakteryjne ekstraktów z wszystkich



badanych próbek handlowych *C. incanus*. Działanie to było silniejsze w stosunku do G(+) bakterii – *B. subtilis*.

W wyniku wielostopniowej ekstrakcji surowego, metanolowego wyciągu z aktywnej próbki handlowej bazującej na *C. incanus* pochodzenia albańskiego (jeden z najbardziej aktywnych wyciągów w teście antyoksydacyjnym) uzyskano 6 frakcji. Analiza TLC-DB przeprowadzona dla tych frakcji wykazała największą aktywność przeciwbakteryjną frakcji I. Zastosowanie różnych technik chromatograficznych (TLC/HPTLC i HPLC) pozwoliło na identyfikację aż 6 związków obecnych we frakcji I. Związkami tymi były: apigenina, 3-O-metylokemferol, *cis*-tylirozyd, *trans*-tylirozyd oraz izomery tylirozydu sprzężonego z kwasem p-kumarowym (dikumaroilo-glukozydy kemferolu).

Wyniki badań uzyskane w tej części pracy mają też potencjalnie aplikacyjny charakter.

Udowadniają przydatność różnych technik chromatograficznych w połączeniu z testami aktywności biologicznej w screeningowym badaniu aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych składników ekstraktów oraz w identyfikacji związków.

Badania aktywności przeciwnowotworowej wykonano *in vitro* przeprowadzając test cytotoksyczności metanolowych ekstraktów z wszystkich badanych próbek *C. incanus* wobec komórek raka jelita grubego linii HCT116p53 <sup>+/+</sup> z dziką formą genu TP53 oraz linii HCT116p53 <sup>-/-</sup> pozbawionej obu alleli tego genu. Stwierdzono umiarkowany efekt przeciwnowotworowy wszystkich badanych ekstraktów wobec obu testowanych linii komórkowych. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że apoptoza komórek nowotworowych jest niezależna od białka p53. Były to pierwsze badania metanolowych ekstraktów z *C. incanus* wobec tego typu nowotworu.

Ważnymi wynikami ocenianej dysertacji jest także udowodnienie niedoskonałości metody wielostopniowej ekstrakcji związków polifenolowych, dotychczas szeroko stosowanej w badaniach fitochemicznych. Autor rozprawy udowodnił m.in. obecność licznych związków o charakterze glikozydów we frakcji aglikonów flawonoidowych oraz obecność tylirozydu (glikozydu flawonoidowego) we frakcji wolnych kwasów fenolowych.

Ponadto Autor opracował 3 różne metody HPTLC, umożliwiające identyfikację związków obecnych w fenolowej frakcji I połączone z hydrolizą kwaśną *in situ*, dokumentującą obecność związanych strukturalnie związków – kemferolu i glukozy. Opracowane metody HPTLC to: wielokrotne rozwijanie na żelu krzemionkowym modyfikowanym aminą oraz dwukierunkowe rozwijanie na żelu krzemionkowym – dwie metody.

Metodyka zastosowana przez Autora rozprawy, zarówno w fitochemicznej części pracy, jak i w badaniach aktywności biologicznej ekstraktów nie budzi żadnych zastrzeżeń. Opracowania Autora są nowatorskie i posiadają potencjalnie aplikacyjny charakter. Opracowane procedury analityczne opierające się na technikach chromatograficznych pozwoliły nie tylko na ocenę składu chemicznego badanych ekstraktów, ale również na ocenę ich potencjału antyoksydacyjnego, przeciwbakteryjnego i przeciwnowotworowego.

Uzyskane wyniki badań udowodniły wysoką potencjalną wartość terapeutyczną badanych ekstraktów *C. incanus*.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska przypomina „małą”, klasyczną rozprawę habilitacyjną. Wyniki badań zostały opublikowane w formie czterech oryginalnych publikacji w specjalistycznych czasopismach o profilu chemiczno-analitycznym i chromatograficznym z listy filadelfijskiej: w *Acta Chromatographica* (IF=0,773), *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (2 prace, IF=0,827 i 0,987) oraz w *Journal of Chromatography A* (IF=3,858).



Zestaw tych czterech prac poprzedzony jest ok. 100 stronicowym tekstem, w którym Autor zapoznaje potencjalnego czytelnika (w tym Recenzenta) z problematyką badawczą, celami, metodyką, wynikami i bogatym piśmiennictwem.

Tekst rozprawy poprzedzony jest rzeczowym streszczeniem w języku polskim oraz wprowadzeniem. Część teoretyczna obejmująca ok. 25 stron tekstu przedstawia charakterystykę taksonomiczno-biologiczno-chemiczno-farmakologiczną badanego gatunku – *Cistus incanus*. Autor rzeczowo prezentuje grupy związków typowych dla badanego gatunku, które objęto analizą – różne grupy terpenów i ich pochodnych stanowiących składniki olejku eterycznego oraz wybrane grupy polifenoli - kwasy fenolowe i flawonoidy. Kolejno charakteryzuje właściwości biologiczne ekstraktów – ich aktywność antyoksydacyjną, przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą oraz cytotoksyczność.

Autor rzeczowo, w sposób umiejętny selekcjonuje istotne informacje nawiązujące do zakresu zaplanowanych badań. Świadczy to o Jego dojrzałości naukowej.

Kolejna (ok.65 stron) część rozprawy, część eksperymentalna, prezentuje stosowaną metodykę i omówienie wyników. Klarowny podział na badania frakcji lotnej i frakcji nielotnej w połączeniu z badaniami biologicznymi tej ostatniej ułatwia zapoznanie się z rozmachem prowadzonych badań i ich wynikami.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie bardzo licznych chromatogramów i denzytogramów, profesjonalnych tabel (m.in. z widmami MS i wzorami związków). Chromatogramy prezentujące rozdziały związków, ich obrazy w obecności promieniowania UV przy  $\lambda=254$  nm,  $\lambda=365$  nm oraz po derywatywacji są bardzo dobrej jakości i prezentują się bardzo atrakcyjnie.

Tekst dysertacji kończą rzeczowe (3,5 strony) wnioski oraz prezentacja dorobku naukowego: lista oryginalnych publikacji i doniesień konferencyjnych, zarówno związanych z realizacją pracy doktorskiej, jak i stanowiących pozostały dorobek publikacyjny. Bibliografia poprzedzona istotnymi spisami – spisem rysunków i spisem tabel, umieszczona na końcu dysertacji obejmuje 153 pozycje nawiązujące problematyką do różnych aspektów poruszanych w pracy. Tekst kończą dołączone odbitki czterech prac oryginalnych związanych z pracą dokorską.

Przy znacznych objętościach tekstu, zwykle niemożliwe jest uniknięcie błędów typu edytorskiego i błędów stylistycznych. Na ok. 126 stronach ocenianego tekstu (łącznie z bibliografią) jest ich stosunkowo dużo; zdecydowałam się jednak ich nie wymieniać. Zwrócę uwagę jedynie na wybrane błędy nomenklaturowe i o charakterze merytorycznym, które wkrały się w tekst:

- żywica „labdanum” mylnie nazywana jest parokrotnie „ladanum”
- izopren błędnie nazwano izoterpenem
- rutozyd błędnie nazwano rutyną
- analizowane części nadziemne roślin błędnie kilkakrotnie określono jako części naziemne
- 3-O-rutynozyd kwercetyny błędnie nazwano 3-O-rutozydem kwercetyny (rutynoz – dwucukier złożony z 1 cząsteczki ramnozy i 1 cząsteczki glukozy)
- tymol i karwakrol – proste fenole błędnie zaklasyfikowano do terpenów.

Inne uwagi dotyczące niedoskonałości ocenianej rozprawy ograniczają się tylko do:

- braku wizerunku *Cistus incanus* L., który pomógłby potencjalnym czytelnikom w świadomym odbiorze i ocenie prezentowanych wyników
- braku wyraźnego podkreślenia potencjalnej aplikacyjności uzyskanych wyników. Brak ten świadczy równocześnie o dojrzałości naukowej Autora pracy, naukowej ostrożności i skromności
- brak wartości współczynników oddziaływania IF w wykazie publikacji



- brak rozdzielenia doniesień konferencyjnych związanych z realizacją pracy doktorskiej od pozostałej aktywności naukowej.

Podsumowując, przedłożoną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona bogate kompendium wiedzy o możliwościach wykorzystania różnych technik chromatograficznych w badaniach składu chemicznego *Cistus incanus* L. oraz w ocenie jego właściwości antyoksydacyjnych, przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych, niezwykle istotnych w ocenie wartości pozyskiwanych z tego gatunku surowców dla celów farmaceutycznych, kosmetycznych i spożywczych.

Wyniki uzyskanych przez Autora badań, posiadają nie tylko istotne walory poznawcze, ale równocześnie posiadają potencjalnie aplikacyjny charakter.

#### Ocena dorobku naukowego

Mgr Dariusz Szeremeta jest Współautorem czterech oryginalnych publikacji naukowych, przedstawiających wyniki badań wykonanych w ramach ocenianej pracy doktorskiej. W trzech publikacjach Mgr Dariusz Szeremeta jest pierwszym, głównym Autorem, w jednej jest drugim z Autorów. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania IF tych prac wynosi 6,445. Publikacje te ukazały się na łamach renomowanych czasopism z listy filadelfijskiej związanych z problematyką naukową z zakresu chemii analitycznej, w tym szczególnie z technikami chromatograficznymi, które już wcześniej zostały wymienione (Acta Chromatographica, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (2 prace), Journal of Chromatography A).

Mgr Dariusz Szeremeta jest ponadto Współautorem dwóch innych publikacji oryginalnych opublikowanych w Acta Chromatographica oraz w Journal of Environmental Science & Health, Part B (sumaryczna wartość IF=1,948).

O dużej aktywności naukowej świadczą też bardzo liczne komunikaty konferencyjne (z lat 2013-2017) w liczbie 32 (w tym 3 prezentacje ustne i 29 prezentacji posterowych), prezentowane na zjazdach krajowych, międzynarodowych w kraju i zagranicznych (Bratysława, Banskó), a także na konferencjach studenckich.

Dotychczasowy znaczny dorobek naukowy i duża aktywność naukowa Pana Mgr Dariusza Szeremety wskazują, że jest On dobrym kandydatem do uzyskania stopnia naukowego doktora.

#### Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej oraz wysoką ocenę dorobku naukowego zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z wnioskiem o dopuszczenie Pana Mgr Dariusza Szeremety do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie pracy !

Kraków, dn. 24.09.2019 r.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM

*H Ekiert*

prof. dr hab. Halina Ekiert