



UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Wydział Farmaceutyczny z Oddz. Analityki Medycznej
Zakład Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin

Recenzja dysertacji doktorskiej mgr Dariusza Szeremety
pt. Skład chemiczny rośliny leczniczej *Cistus incanus* L. (czystek szary)
a jej wybrane właściwości biologiczne
wykonanej w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pod kierunkiem dr hab. Mieczysława Sajewicza
Promotor pomocniczy: dr Magdalena Knaś

Praca doktorska p. mgr Dariusza Szeremety dotyczy ziela z gatunku *Cistus incanus* L. Jest to gatunek śródziemnomorski z rodziny czystkowatych (osłonkowatych), wytwarzający żywicę tzw. labdanum (lub ladanum) znaną od starożytności i wymienianą także w Biblii: *...ujrzeli z dala idących z Gileadu kupców izmaelskich, których wielbłądy niosły wonne korzenie, żywicę i olejki pachnące, szli oni do Egiptu*” (Rdz 37,25). Labdanum początkowo otrzymywano przez wyczesywanie z sierści i bród kóz oraz wełny owiec wypasanych w zaroślach czystka, potem wyczesywano zarośla czystka specjalnymi narzędziami (drewniany grzebień) zbierającymi żywicę, Obecnie labdanum otrzymuje się drogą ekstrakcji z gałązek i liści roślin. Labdanum było stosowane do leczenia zakażeń i stanów zapalnych układu moczowego, przewodu pokarmowego, wątroby, skóry, układu oddechowego i stawów od starożytności.

Chromatografia stanowi perfekcyjne narzędzie analityczne umożliwiające identyfikację rozdzielonych składników. Chromatografia cienkowarstwowa także należy do tych narzędzi analitycznych. Ostatnio coraz częściej jest stosowana także do innych celów, a mianowicie do wstępnego rozpoznania aktywności farmakologicznej ekstraktów roślinnych. Można określić drogą odpowiedniego traktowania chromatogramów na cienkiej warstwie właściwości antyoksydacyjne, bakteriobójcze, grzybobójcze a nawet zdolność do hamowania określonych enzymów przez częściowo czy też całkowicie rozdzielone składniki mieszanin naturalnych. Procedury te, mniej lub bardziej skomplikowane umożliwiają badania skринingowe na szeroką skalę. Tego typu procedury zastosował mgr Szeremeta do badania ekstraktów z ziela czystka szarego.

Część teoretyczna pracy obejmuje charakterystykę gatunku *Cistus*. Następnie autor omawia takie klasy związków występujących w czystku jak: terpeny i terpenoidy (monoterpeny, diterpeny, seskwiterpeny i ich pochodne) oraz polifenole (kwasy fenolowe i flawonoidy). Dziesięciostronicowy, obszerny rozdział dotyczy właściwości biologicznych gatunku *Cistus incanus* L. i obejmuje właściwości antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne.

Badania autora dotyczą ziela czystka szarego pochodzącego z Turcji, Albanii i Grecji, jak zostało zadeklarowane przez producentów. Doktorant pozyskiwał bowiem komercyjnie dostępny na polskim rynku materiał roślinny. W sumie było to 12 próbek. Poddane one zostały badaniom składu zarówno frakcji lotnej jak i nielotnej, zatem narzędziem badawczym była chromatografia gazowa i chromatografia cieczowa.

Aby przeprowadzić eksperyment doktorant przygotowywał próbki do analiz. Aby analizować frakcję lotną zastosował destylację z parą wodną z dodatkiem ksylenu w aparacie Derynga a także dokonywał desorpcji do fazy nadpowierzchniowej wygrzewając próbkę materiału roślinnego w fiolce autosamplera GC i pobierając odpowiednią ilość fazy nadpowierzchniowej do bezpośredniego wstrzyknięcia do systemu.

W celu analizy frakcji nielotnej mgr Szeremeta zastosował przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem ASE w aparacie Dionex ASE 200, stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę metanolu i wody (27:73) w temperaturze 130°C pod ciśnieniem 100 atm. uzyskując z 2,5g każdego surowca ekstrakt, przechowywany następnie w -10°C.

Analizę frakcji lotnej przeprowadzano metodą GC-MS stosując chromatograf gazowy Trace 2000 sprzężony z spektrometrem mas, wyposażony w automatyczny podajnik próbek. Zastosowano kolumnę kapilarną Thermo Scientific i hel jako gaz nośny oraz gradient temperaturowy w zakresie 50 – 220 °C. Składniki frakcji lotnej zidentyfikowano na podstawie czasów retencji i widm wzorców oraz na podstawie biblioteki widm NIST a także posiłkując się danymi literaturowymi. Frakcje z różnych próbek miały odmienny skład chemiczny. W sumie w olejku wyodrębnionym metodą destylacji z parą wodną autor zidentyfikował w badanym materiale roślinnym następujące grupy związków: monoterpeny (2), pochodne tlenowe monoterpenów (7), związki fenolowe (4), pochodne tlenowe seskwiterpenów (4), seskwiterpeny (8), kwasy tłuszczowe i pochodne (5), diterpeny i pochodne (6), związki karbonylowe (5) i inne. Natomiast poprzez analizę fazy nadpowierzchniowej zidentyfikowano znacznie mniej związków: pochodne tlenowe monoterpenów (4), związki karbonylowe (3), związki fenolowe (3), seskwiterpeny (4), kwasy tłuszczowe i pochodne (2), pochodne diterpenów (3) i 3 inne związki. Dwa związki dominują w frakcji lotnej z wszystkich

badanych próbek czystka i stanowią ponad 30% - są to tlenek manoilu oraz tlenek 13-epi-manoilu., główne składniki żywicy labdanum. Natomiast trudno z otrzymanych wyników dopatrzeć się markerów związanych z miejscem pozyskania próbek. Jakkolwiek w destylacie zidentyfikowano znacznie więcej związków niż metodą HS GC-MS, to było wśród nich 8 związków nieobecnych w destylacie. Można zatem uznać metody za komplementarne. Różnice w składzie frakcji lotnej badanych próbek wynikają prawdopodobnie z różnic w przygotowaniu surowca do sprzedaży.

Frakcję nielotną, otrzymaną metodą ASE w aparacie Dionex analizowano metodą chromatografii cieczowej stosując zarówno technikę TLC jak i HPLC. Można powiedzieć, że centralna część pracy dotyczy analizy metodą chromatografii cienkowarstwowej. Układ chromatograficzny wybrany do rozdzielania ekstraktów jest typowy: warstwa żelu krzemionkowego jako faza stacjonarna była przemywana i aktywowana a następnie kondycjonowana w komorze pionowej w parach fazy ruchomej będącej mieszaniną (octan etylu - dichlorometan – kwas mrówkowy - kwas octowy – woda) i rozwijana. Wyniki rozdzieleń były rejestrowane densytometrycznie oraz za pomocą fotografii cyfrowych w świetle UV. Aby zbadać aktywność biologiczną ekstraktów i ich składników p. Szeremeta zastosował biodetekcję. Było to badanie zdolności do zmiatania wolnych rodników przez nielotne frakcje czystka. W tym celu autor zastosował wywoływanie rozwiniętych i dokładnie wysuszonych płytek roztworem DPPH, będącym stabilnym wolnym rodnikiem w kolorze fioletowym. Jego zredukowana forma jest żółta a zatem antyoksydanty pokazały się na cienkowarstwowym chromatogramach jako żółte plamy na fioletowo-purpurowym tle. Z obrazów po tym wywoływaniu można było wnioskować, czy ekstrakty czystka mają zdolność do zmiatania wolnych rodników i które składniki są za to odpowiedzialne. Na jedenaście częściowo rozdzielonych pasm siedem wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Aby porównać właściwości antyoksydacyjne ekstraktów doktorant liczy sumę wysokości pików poszczególnych ekstraktów po wywołaniu płytek DPPH, z których wynika najwyższa aktywność czystka pochodzącego z Albanii.

Następne badania mgr Szeremety związane są z badaniem aktywności antybakteryjnej ekstraktów z czystka metodą TLC z bioautografią. W tym celu przygotowane zostały ekstrakty metodą wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxletha. Ekstrakcję prowadzono dwuetapowo – n-heksanem w celu usunięcia balastów - chlorofili i wosków a następnie metanolem, do zaniku barwy świeżej porcji ekstraktu. Otrzymywano surowy ekstrakt roślinny. Poddawano go testom na właściwości antybakteryjne i przeciwnowotworowe. Surowy ekstrakt został także rozfrakcjonowany metodą hydrolizy i ekstrakcji ciec-ciecz

według znanych metod. Otrzymano sześć frakcji: aglikonów flawonoidowych (I), wolnych kwasów fenolowych (II), niepolarnych glikozydów flawonoidowych (III), polarnych glikozydów flawonoidowych (IV), fenolokwasów po hydrolizie kwaśnej (V), oraz fenolokwasów po hydrolizie zasadowej (VI). Tak przygotowane ekstrakty i frakcje rozdzielano na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego przy użyciu wieloskładnikowego eluentu: chloroform - metanol - octan etylu w odpowiednich proporcjach. Płytki suszono i wywoływano odczynnikami zazwyczaj stosowanymi do detekcji związków fenolowych, obserwowano w świetle UV-VIS i rejestrowano. Oprócz odczynników derywatyzujących stosowano bioautografię bezpośrednią. Zastosowano dwa szczepy bakterii *Bacillus subtilis* i *Aliivibrio fischeri*. Badania te dały bardzo interesujące wyniki. Surowy ekstrakt nie wykazał bowiem właściwości antybakteryjnych, natomiast ekstrakt zatężony oraz frakcje związków fenolowych wykazały wyraźne strefy zahamowania wzrostu bakterii dowodzące obecności w nich związków o charakterze antybiotyków. Najwyższą aktywność wykazały ekstrakty z próbek ziela A1, A3, A4, T1 i T3 i im doktorant poświęcił najwięcej uwagi. Ostatecznie do szczegółowych badań wybrał te surowce i frakcje związków fenolowych (I-VI) z nich izolowane. Ponieważ frakcje III i IV miały składniki w zbyt niskim zakresie wartości Rf dodatkowo poddał je analizie i bioautografii w innym układzie faz. Nie okazały się one jednak bardzo aktywne antybakteryjnie. Ostatecznie uwagę p. Szeremety skupiła frakcja I zawierająca aglikony flawonoidowe. Wszystkie frakcje nr I wyodrębnione z badanych próbek czystka poddał analizie TLC i bioautografii. Do dalszych badań dotyczących identyfikacji aktywnych biologicznie związków wybrane zostały próbki A4 i T3. Wyizolował z tych frakcji sześć pasm eluując je z plamek na chromatogramie cienkowsarstwowym – wydrapując adsorbent i stosując wymywanie etanolem. Dla tych frakcji c1 – c6 przeprowadził analizę HPLC z detektorem DAD i MS z jonizacją ESI + i ESI -. Doprowadziło to do wstępnej identyfikacji występujących w tej frakcji związków fenolowych. Aby potwierdzić, które ze związków flawonoidowych występują w formie glikozydowej doktorant zastosował dwukierunkową chromatografię cienkowsarstwową, co pozwoliło na wykrywanie glukozy uwolnionej metodą hydrolizy *in situ* z wyodrębnionych frakcji c1-c4. Podobną procedurę zastosował w celu potwierdzenia obecności w izolatach kemferolu. Badania identyfikacyjne dodatkowo potwierdzone zostały techniką LC-MS. Całość części dotyczącej chromatografii cienkowsarstwowej została świetnie zilustrowana pięknymi videoskanami – fotografiami chromatogramów, tak wyskalowanymi, że widać od razu na nich, które pasma odpowiadają najbardziej aktywnym związkom. Nie trzeba nikogo przekonywać o celowości użytej techniki rozdzielczej połączonej z różnymi metodami detekcji fizycznej, chemicznej i biologicznej.

Uważam, że ta część pracy zasługuje na szczególne wyróżnienie. Część tych wyników została zresztą opublikowana ze współautorstwem doktoranta w prestiżowym czasopiśmie chromatograficznym – Journal of Chromatography A.

Odrębną część pracy stanowią badania aktywności przeciwnowotworowej ekstraktów z czystka. Zostały one przeprowadzone na dwu różnych genetycznie liniach raka jelita grubego. Określono wartości IC_{50} dla surowych metanolowych ekstraktów. Wszystkie testowane ekstrakty wykazały porównywalną aktywność antynowotworową. Badania te potwierdzają doniesienia literaturowe na temat tego typu aktywności frakcji fenolowej z ziela czystka.

Dysertację wieńczą wnioski, będące podsumowaniem osiągnięć zawartych w dysertacji.

W pracy cytowane są 153 pozycje literaturowe głównie pochodzące z ostatniego dziesięciolecia z czasopism o zasięgu światowym.

Praca ma typowy podział na Wstęp, Część teoretyczną, Cel pracy i Część doświadczalną. Godne podkreślenia jest zamieszczenie listy skrótów i symboli stosowanych w pracy a także streszczenia. W pracy prezentowanych jest 45 rysunków i 11 tabel w jasny sposób uwidoczniających wyniki badań. Zwracają uwagę świetne podpisy pod rysunkami z podaniem szczegółów dotyczących procedur analitycznych, których w takim razie nie trzeba za każdym razem szukać w tekście pracy. Dobrą praktyką jest także zamieszczenie listy własnych prac i ich odbitek a także komunikatów na końcu dysertacji. Z całości tego opracowania widać wyraźnie, że autor wywodzi się ze znakomitej śląskiej szkoły chromatograficznej.

Mam kilka pytań do doktoranta, a mianowicie:

1. Dlaczego doktorant nie zastosował metody spektrofotometrycznej określania właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z badanych surowców roślinnych. Wyniki tak uzyskane, również przy użyciu DPPH byłyby z pewnością bardziej precyzyjne niż liczenie sumy wysokości pików po derywatywacji DPPH, które przecież były częściowo rozdzielone i wyniki tak uzyskane należy uważać za mało precyzyjne.
2. Z czego wynikała różna procedura zastosowana do otrzymania ekstraktów do badań na aktywność antyoksydacyjną i antybakteryjną. W pierwszym przypadku zastosowano bowiem technikę ASE i ekstrahent wodno-metanolowy, w drugim przypadku wyczerpującą ekstrakcję metanolem w aparacie Soxhleta. Czy nie

warto byłoby się pokusić o zbadanie właściwości antyoksydacyjnych surowych ekstraktów metanolowych otrzymanych metodą klasyczną?

3. Aż się prosiło, żeby zbadać pod względem aktywności antyoksydacyjnej i antybakteryjnej także frakcję lotną. Wszak to z pracowni p. profesor Kowalskiej i p. prof. Sajewicza pochodzi metoda niskotemperaturowej TLC. Wyniki z pewnością byłyby bardzo interesujące. Myślę, że będą te badania kontynuowane.

Z obowiązku recenzenta przytaczam też kilka zauważonych niedokładności i usterek. Na stronie 63 autor formułuje określenie o związkach „o względnie bardzo wysokiej polarności”. Jest to określenie wysoce nieprecyzyjne.

Na rysunku 34 a prezentowany jest antybiogram z użyciem bakterii *Bacillus subtilis*. Skąd wzięły się ciemne plamy dla niektórych frakcji?

Str 85 raczej w celu doboru niż w celu dobrania.

Błędy literowe:

Str 27	jest	potencjał przeciwutleniających	powinno być	potencjał przeciwutleniający
Str 28	jest	badanie mającą...	powinno być	badanie mające ...
Str 28	jest	niewielki różnice	powinno być	niewielkie różnice
Str 29	jest	Uniwersytety Narodowego	powinno być	Uniwersytetu Narodowego
Str 30	jest	przeciwnowotworowych	powinno być	przeciwnowotworowym
Str 32	jest	linii komórkowy	powinno być	linii komórkowych
Str 36	jest	związki wykazał	powinno być	związki wykazały
Str 41	jest	ekstraktów roślinny	powinno być	ekstraktów roślinnych
Str 67	jest	podać analizie	powinno być	poddać analizie
Str 76	jest	chromatograficzny rozdziału	powinno być	chromatograficzny rozdział
Str 82	1 linijka od dołu	jest	pasem chromatograficzny	powinno być jest pasm chromatograficznych
Str 103	jest	które byłyby	powinno być	które byłyby

Oczywiście usterki te i pewne otwarte kwestie, do których mam nadzieję p. mgr Dariusz Szeremeta ustosunkuje się na obronie doktorskiej, nie umniejszają wartości pracy, która całkowicie odpowiada wymogom stawianym dysertacjom doktorskim. Wnioskuje zatem do wysokiej Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie p. mgr Dariusza Szeremety do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zważywszy na to, że część wyników doktoranta jest opublikowana w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym

jedna publikacja jest w wiodącym chromatograficznym czasopiśmie Journal of Chromatography A, wnoszę o wyróżnienie pracy.


KIEROWNIK
Zakładu Chemii Nieorganicznej
Prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos

prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos

Lublin, 2019-08-27