UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
tel. 12 620-54-30

RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej
„Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych"
wykonanej przez mgr Martę Orłowską
w Instytucie Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Marty Orłowskiej, to bardzo interesujące i wartościowe opracowanie obejmujące nowoczesne badania fitochemiczne, promujące możliwość wykorzystania różnych metod ekstrakcji i różnych technik chromatograficznych w określaniu składu chemicznego materiału roślinnego, wzbogacone o badania biologicznej aktywności roślinnych ekstraktów (ukierunkowane na udowodnienie ich właściwości antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych) oraz o badania chemometryczne.

Zmienność składu chemicznego w świecie roślin, przejawiająca się istnieniem różnych gatunków w obrębie jednego rodzaju oraz istnieniem podgatunków, odmian, form i odmian hodowlanych w obrębie jednego gatunku oraz istnieniem mieszańców międzygatunkowych jest niezwykle interesująca w sensie poznawczym oraz bardzo istotna z praktycznego punktu widzenia. Różnicom morfologicznym i anatomicznym towarzyszą bowiem różnice w zdolnościach biosyntetycznych.

Oceniana praca dotyczy właśnie tej problematyki naukowej – zmienności chemicznej i prób oceny wartości materiału roślinnego jako potencjalnego surowca leczniczego, kosmetycznego i spożywczego.

Dobór materiału badawczego, parunastu gatunków z rodzaju *Thymus sp.* (tymianek), oraz podjednostek taksonomicznych - podgatunków i odmian, jest bardzo trafny. Wybór takiego materiału badawczego podyktowany był z pewnością przede wszystkim potencjalnymi właściwościami leczniczymi gatunków z tego rodzaju, wynikającymi ze wskazań chemotaksonomicznych. Głównymi składnikami gatunków z rodzaju *Thymus sp.* są olejki eteryczne, kwasy fenolowe, flawonoidy, garbniki – metabolity wtórne decydujące m. in. o właściwościach wykrztuśnych, spazmolitycznych, antybiotycznych i antyoksydacyjnych tych roślin. O wyborze materiału badawczego zdecydowała z pewnością jego dostępność, możliwa w ramach współpracy z Ogrodem Botanicznym Uniwersytetu Marii Curie -Skłodowskiej w Lublinie i częściowo z Ogrodem Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Wybrane gatunki z rodzaju *Thymus sp.* posiadają utrwaloną światową pozycję zarówno w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, jak i spożywczym. Liście i szczytowe partie kwitnących pędów *Thymus vulgaris* L. – Tymianku pospolitego posiadają swoją monografię w International Pharmacopoeia wydawanej przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Za równocenny surowiec uważany jest, zgodnie z tym dokumentem, *Thymus zygis* L. – Tymianek iberyjski. Ziele *Thymus vulgaris* posiada utrwaloną pozycję w przemyśle spożywczym. EFSA (European Food Safety Authority) rekomenduje go jako bezpieczny surowiec kulinarny o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. W wykazie substancji czynnych i pomocniczych dopuszczonych do wykorzystania w kosmetyce figuruje pod nazwą *Thymus vulgaris* (nazewnictwo wg INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) olejek tymiankowy – „substancja czynna" o właściwościach bakteriostatycznych

stosowana w preparatach do higieny jamy ustnej, w dezodorantach i w produktach przeciwłupieżowych.

Tradycyjnie wykorzystywanym gatunkiem w lecznictwie polskim i europejskim jest *Thymus vulgaris* L. – jest to gatunek pochodzenia śródziemnomorskiego, nieposiadający naturalnych stanowisk w Polsce, ale uprawiany na szeroką skalę w celach komercyjnych. Gatunek ten jest bardzo zmienny. Obejmuje liczne podgatunki, odmiany i formy oraz tworzy liczne mieszańce. Drugim popularnym gatunkiem, posiadającym z kolei liczne stanowiska naturalne w Europie, w tym Polsce, uważanym jednak za mniej wartościowy, jest *Thymus serpyllum* L. – Macierzanka piaskowa. Wymienione gatunki charakteryzują się niezwykłą zmiennością składu głównie olejku eterycznego. Dotyczy to przede wszystkim proporcji między tymolem i jego izomerem, karwakrolem oraz zawartości linalolu.

Według aktualnie obowiązującego w krajach Unii Europejskiej VIII wydania European Pharmacopoeia i w tłumaczeniach tego dokumentu na języki narodowe państw członkowskich, w tym w X wydaniu Farmakopei Polskiej, gatunkami dopuszczonymi do wykorzystania w oficjalnej terapii są: *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L. i *Thymus serpyllum* L.. W celu potwierdzenia tożsamości surowców (*herba*), a także ich standaryzacji oraz w celu uniknięcia zafałszowań, rekomendowane są przez Eur. Pharm. i farmakopee narodowe różne techniki chromatograficzne, w tym TLC, GC, HPLC. Standaryzacja *Thymi herba* pozyskiwanego z *Thymus vulgaris* i *Thymus zygis* lub ich mieszaniny obejmuje określenie zawartości olejku (12 ml/kg) oraz minimalnej zawartości tymolu i karwakrolu (40%). Standaryzacja *Serpylli herba* dotyczy jedynie określenia zawartości olejku (min. 3 ml/kg). Kolejnym farmakopealnym surowcem jest olejek tymiankowy, posiadający od roku 2012 (Suplement 2012 do IX wyd. Farmakopei Polskiej, tłumaczenie 7th Ed. Eur. Pharm.), w miejsce tradycyjnej nazwy *Thymi aetheroleum,* nową nazwę – *Thymi typo thymolo aetheroleum*, zwracającą uwagę na wymaganą wysoką zawartość tymolu. Tożsamość tego surowca potwierdza przede wszystkim określona zawartość tymolu oraz karwakrolu. Wśród farmakopealnych monografii preparatów galenowych figuruje wyciąg tymiankowy płynny – *Thymi extractum fluidum* (standaryzowany na zawartość tymolu – min. 0.03%) oraz syrop tymiankowy złożony – *Thymi sirupus compositus* (zawierający wyciąg płynny i tymol w ilości min. 0.012 – 0.016%). Wśród farmakopealnych monografii narodowych (w polskim wydaniu farmakopei) figuruje mieszanka ziołowa *Species expectorantes* – zioła wykrztuśne. W pięcioskładnikowej mieszance głównym składnikiem jest *Thymi herba* – surowiec standaryzowany na zawartość tymolu.

Powyższy przegląd, udowadniający przede wszystkim ważną pozycję wybranych gatunków z rodzaju *Thymus* sp. w lecznictwie europejskim i polskim, potwierdza trafność wyboru materiału badawczego w ocenianej rozprawie.

Przepisy farmakopealne, w celu potwierdzenia tożsamości zarówno *Thymi herba*, jak i *Serpylli herba* nakazują wykonanie rozdziałów chromatograficznych metodą TLC i potwierdzenie obecności w ekstraktach innych charakterystycznych związków, depsydu - kwasu rozmarynowego oraz glikozydu flawonoidowego - rutozydu.

Przepisy farmakopealne zwracają uwagę na występujące często niebezpieczeństwo zafałszowań surowców, stąd konieczność potwierdzania ich tożsamości. Zafałszowania surowców wynikają przede wszystkim z trudności w pozyskiwaniu wartościowego surowca (m. in. kłopoty z uprawami, choroby roślin, zmienność chemiczna), różnic w cenie surowców, etc.....

W identyfikacji materiału roślinnego pozyskiwanego zarówno dla celów leczniczych, jak i kosmetycznych oraz spożywczych, powszechnie wykorzystuje się różne techniki chromatograficzne.

Zasadnicza część ocenianej pracy udowadnia możliwość zastosowania różnych technik chromatograficznych w badaniach składu chemicznego poszczególnych gatunków, podgatunków i odmian w obrębie rodzaju *Thymus sp.*

W badaniach własnych Autorki można wyróżnić trzy główne części – fitochemiczną, badania biologicznej aktywności ekstraktów oraz część chemometryczną. Część fitochemiczna obejmuje analizę olejku eterycznego oraz wybranych związków fenolowych – kwasów fenolowych i flawonoidów, analizę frakcji lotnej i nielotnej, jak określa to Autorka pracy. Badania biologicznej aktywności ekstraktów obejmują udowodnienie właściwości antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych ekstraktów z badanego materiału roślinnego. Badania chemometryczne dotyczą analiz wyników uzyskanych zarówno w części fitochemicznej pracy, jak i w ramach badań biologicznych.

Ten plan i całościowy zakres badań wpisuje się w ogólnoświatowe trendy badawcze i skierowany jest wyraźnie nie tylko na uzyskanie wyników o charakterze poznawczym, ale wyraźnie na ich potencjalną aplikacyjność.

Zakres zaplanowanych i zrealizowanych badań jest szeroki. Oceniana praca mogłaby z powodzeniem, po pewnych uzupełnieniach, stanowić rozprawę habilitacyjną (aktualnie tzw. osiągnięcie naukowe). Wyniki badań zostały bowiem opublikowane w formie sześciu prac oryginalnych w czasopismach z listy filadelfijskiej, o profilu chemiczno-analitycznym i chromatograficznym, o łącznym współczynniku oddziaływania IF ≈ 5.7 (Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, IF ≈ 0.64; Journal of the Association of Analytical Chemists International, IF ≈ 1.12; Acta Chromatographica, IF ≈ 0.6). Fragmenty pracy były prezentowane na bardzo licznych konferencjach krajowych, międzynarodowych w kraju i zagranicznych (Belgrad, Siófok). Poziom pracy doktorskiej i powodzenie w jej opublikowaniu Doktorantka zawdzięcza w dużym stopniu wysokiej pozycji naukowej Pana Dr hab. Mieczysława Sajewicza oraz możliwości korzystania z ogromnego doświadczenia i wiedzy naukowego Autorytetu, w Osobie Pani Prof. dr hab. Teresy Kowalskiej.

Sądzę, że Autorka pracy powinna czuć się dumna i czerpać ogromną satysfakcję z faktu możliwości pracy naukowej pod tak znakomitym przewodnictwem. Rangę prowadzonych badań podnosi także fakt współpracy z Panią Prof. Moniką Waksmundzką-Hajnos i Zespołem, reprezentującą znaną jednostkę naukową z Lublina wyspecjalizowaną w badaniach chromatograficznych – Zakład Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Przeprowadzona analiza fitochemiczna objęła optymalizację warunków ekstrakcji frakcji lotnej i nielotnej z materiału roślinnego. Związki lotne ekstrahowano i analizowano z wykorzystaniem klasycznej aparatury - aparatów Derynga oraz z fazy nadpowierzchniowej, w połączeniu odpowiednio z analizą GC-MS oraz HS-GC-MS (headspace gas chromatography-mass spectrometry). Uzyskane dane Autorka opracowywała przy pomocy programu X-Calibur, korzystając jednocześnie z biblioteki widm MS (NIST – National Institute of Standards and Technology). Zastosowana metodyka ma pewne ograniczenia, gdyż nie pozwala na identyfikację dwóch par izomerów strukturalnych obecnych w olejkach gatunków z rodzaju *Thymus* sp. (o-cymen i m-cymen, tymol i karwakrol). W pierwszym etapie analiz skupionym na badaniach frakcji lotnej dwóch gatunków i jednego podgatunku, porównano efektywność GC-MS i HS-GC-MS. technika HS okazała się bardziej wydajna i szybsza, ale nie do końca doskonała. Obecność niektórych związków frakcji lotnej stwierdzano bowiem po zastosowaniu techniki GC-MS. Autorka zaleca zatem wykonywanie analiz równocześnie dwoma technikami, w celu uzyskania kompletnych, wiarygodnych wyników. Badania te Autorka wykonała na przykładzie dwóch gatunków tymianku – *Thymus*

vulgaris, *Thymus kosteleckyanus* oraz podgatunku - *Thymus pulegioides ssp. pulegioides*. Autorka nie podaje jednak informacji, czym podyktowany był wybór właśnie tych dwóch gatunków i podgatunku?

W drugim etapie, analizie poddano frakcję lotną z parunastu gatunków rodzaju *Thymus* sp. i podjednostek taksonomicznych, wykorzystując technikę HS-GC-MS. Materiał poddano analizie jakościowej i półilościowej (przedstawiając procentowy udział poszczególnych związków w sumie pików). W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano tylko jeden wspólny związek dla wszystkich badanych frakcji lotnych – β-linalol. Obecność tymolu i/lub karwakrolu potwierdzono tylko w przypadku dziesięciu badanych ekstraktów.

W wyniku przeprowadzonej analizy chemometrycznej wyników analiz frakcji lotnych z zastosowaniem analizy czynników głównych, badane frakcje lotne zostały sklasyfikowane na trzy grupy, w których dominują ilościowo różne związki: grupa I – z dominującym ilościowo β-linalolem, grupa II – z dominującą ilościowo mieszaniną m-cymenu i/lub o-cymenu, t-terpinenu i mieszaniną tymolu i/lub karwakrolu oraz gupa III - z dominującymi ilościowo β-pinenem i eukaliptolem.

W tej części pracy można dopatrzyć się pewnych niedoskonałości. Materiał do badań pochodził z wiarygodnych źródeł (Ogród Botaniczny Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie). Autorka pracy nie podaje jednak informacji, czy materiał był zbierany w tym samym okresie wegetacji roślin, czy w jednym określonym punkcie czasowym (bez uwzględnienia osobniczych cech badanych gatunków, podgatunków i odmian). Zmienność składu chemicznego w obrębie różnych jednostek i podjednostek taksonomicznych zależy od licznych czynników zewnętrznych, takich jak m. in. warunki klimatyczne (wilgoć, nasłonecznienie), czy czynniki edaficzne. Brakuje w pracy też krótkich informacji o rozmieszczeniu naturalnych stanowisk badanych gatunków i podjednostek na świecie, w Europie, w Polsce. Klasyczne profesjonalne opracowanie autorstwa Prof. Władysława Szafera i wsp. „Rośliny polskie" obejmuje opis 12 gatunków z rodzaju *Thymus sp.* występujących w Polsce na stanowiskach naturalnych. Tylko 3 gatunki badane w ramach ocenianej pracy występują w Polsce. Nie znamy zatem wymagań pozostałych badanych gatunków i podjednostek taksonomicznych.

Chemometryczna optymalizacja ekstrakcji nielotnych związków fenolowych (kwasów fenolowych i flawonoidów) objęła klasyczną ekstrakcję w aparatach Soxhleta oraz przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem (ASE). Autorka wykazała, że całkowita zawartość związków fenolowych w ekstraktach uzyskanych z wykorzystaniem przyspieszonej ekstrakcji jest ok. 3-krotnie wyższa niż zawartość uzyskana tradycyjną metodą z wykorzystaniem aparatów Soxhleta. W badaniach tych Autorka wykorzystała ziele tymianku dostępne komercyjnie. Autorka nie podaje jednak producenta tego surowca. Czy była to jedna ze znanych firm zielarskich w Polsce? Zakładam, że identyfikacja materiału roślinnego nie budziła żadnych zastrzeżeń. Autorka nie wspomina o potrzebie potwierdzenia tożsamości tego materiału np. metodą PCR.

W prowadzonej, z wykorzystaniem rozpuszczalników o różnym stopniu polarności, wieloetapowej ekstrakcji frakcji nielotnej Autorka uzyskała łącznie sześć frakcji – trzy frakcje flawonoidowe oraz trzy frakcje kwasów fenolowych. Były to frakcje: aglikonów flawonoidowych, polarnych glikozydów flawonoidowych, niepolarnych glikozydów flawonoidowych, frakcja wolnych kwasów fenolowych oraz frakcje związanych kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej i zasadowej.

Kolejna niedoskonałość pracy dotyczy analizy kwasów fenolowych. Jak wynika z licznych badań dotyczących analiz tych związków prowadzonych w krakowskim Zakładzie

Botaniki Farmaceutycznej UJ CM, macierzystej Jednostce niżej podpisanej, warunki hydrolizy są niezwykle istotne w otrzymywaniu wiarygodnych wyników prowadzonych analiz. W ocenianej pracy nie znalazłam informacji dotyczących prób optymalizacji warunków hydrolizy frakcji związanych kwasów fenolowych. Czy zastosowana metodyka w tej części analiz była wcześniej z powodzeniem wykorzystywana w innych pracach eksperymentalnych, dając wiarygodne wyniki i nie wymagała optymalizacji?

Kolejnym etapem prowadzonych analiz dotyczących związków fenolowych było opracowanie wzorcowych chromatografów – chromatograficznych „fingerprintów" (odcisków palca) dla sześciu gatunków z rodziny *Lamiaceae* (dwa gatunki *Thymus sp.*, dwa gatunki *Salvia sp.* oraz dwie odmiany o różnej barwie kwiatów *Dracocephalum moldavica)*. Identyfikacja wyjściowego materiału do badań opierała się z pewnością na profesjonalnej wiedzy kompetentnych Pracowników jednego z wymienionych ogrodów doświadczalnych na terenie Lublina – Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego. Niepokoi jednak fakt, że zbioru materiału dokonano w różnych latach (2009 r. – *Salvia* sp., 2011r. – pozostały materiał). Wyjaśnieniem zasygnalizowanej sytuacji są z pewnością trudności w uzyskaniu materiału roślinnego w tym samym roku wegetacji.

Zarówno „fingerprinty" uzyskane z wykorzystaniem TLC, jak i HPLC wskazywały, że spośród sześciu badanych frakcji związków fenolowych największą przydatność w identyfikacji materiału roślinnego mają frakcje aglikonów flawonoidowych. Można traktować je jako chromatograficzne markery różnicujące gatunki rodziny *Lamiaceae*. Ponadto stosując TLC, Autorka wykazała, że frakcja polarnych glikozydów flawonoidowych oraz frakcja związanych kwasów fenolowych uwalnianych w wyniku zasadowej hydrolizy, mogą też być wykorzystane pomocniczo jako chromatograficzne markery. Stosując różne detektory w technice HPLC Autorka udowodniła, że większą liczbę rozdzielonych związków można potwierdzić w przypadku detektora DAD, natomiast w przypadku detektora ELSD (fotodyspersyjny detektor laserowy) intensywność poszczególnych pików jest większa.

Udowodniona przez Autorkę rozprawy przydatność stosunkowo prostych i szybkich w zastosowaniu oraz stosunkowo tanich metod chromatograficznych w identyfikacji materiału roślinnego i zaproponowanie chromatograficznych markerów na podstawie „fingerprintów" mieści się doskonale w nowoczesnych trendach preferowanych przez takie ciała opiniotwórcze w zakresie roślinnych surowców leczniczych, jak m. in. ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotheraphy), niemiecka Komisja E (Experten Kommision), czy EMEA/HMPC (European Medicines Agency/Committe on Herbal Medicinal Products). Zalecają one jako wstępne badania potwierdzające tożsamość surowców, chromatograficzne obrazy przygotowanych z nich ekstraktów.

Badania biologicznej aktywności ekstraktów (frakcji nielotnej otrzymanej metodą ASE, w zoptymalizowanych warunkach (130°C, $CH_3OH:H_2O$ = 27:73 v/v) z różnych gatunków tymianku i podjednostek taksonomicznych były skupione na badaniach aktywności przeciwbakteryjnej, antyoksydacyjnej i przeciwnowotworowej.

W badaniach dotyczących właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów zastosowano test „dot blot" w połączeniu z bioautografią bezpośrednią. Autorka wykazała, że wszystkie badane ekstrakty wykazują aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Bacillus subtilis*. Największą aktywność (wyrażoną wielkością stref zahamowania kolonii bakteryjnej) Autorka udowodniła dla *Th. citriodorus* „golden dwarf" oraz dla *Th. marschaliana*, natomiast najmniejszą dla *Th. vulgaris* i *Th. degenii*.

Badania właściwości antyoksydacyjnych przeprowadzono z wykorzystaniem trzech różnych metod – testu „dot blot", spektroskopii elektronowego rezonansu (EPR) oraz

spektrometrii UV-VIS, wykorzystując dwa różne źródła wolnych rodników, DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) i ABTS (2,2'-azo-bis(3-etylo-benzotiazolino)-6-sulfonian).

W teście „dot blot" (z DPPH) skanowano zmiany obrazów chromatograficznych z użyciem densytometru skaningowego; jako standard wykorzystywano kwas galusowy. Analiza z wykorzystaniem tej metody wykazała właściwości antyoksydacyjne wszystkich badanych ekstraktów. Największą aktywność wykazano dla *Th. serpyllum „albus"* i *„aureus"*.

Wykorzystując metodę EPR (spektroskopię elektronowego rezonansu) z DPPH udowodniono również aktywność antyoksydacyjną wszystkich badanych ekstraktów. Największą aktywność udowodniono także dla *Th. serpyllum „albus"* i *„aureus"*. W tej metodzie standardem była witamina E (w formie Troloksu).

Z wykorzystaniem kolejnej metody – spektrofotometrii UV-VIS z DPPH, stosując kwas askorbinowy lub kwas galusowy jako standardy, stwierdzono, że wszystkie badane ekstrakty wykazują właściwości antyoksydacyjne. Największe zdolności udowodniono dla *Th. serpyllum „albus"* i *„aureus"* oraz dla *Th. pulegioides ssp. pulegioides*.

Oznaczenia spektrofotometryczne UV-VIS wykonano też z odczynnikiem ABTS, stosując kwas askorbinowy i kwas galusowy jako odnośniki. Wszystkie badane ekstrakty wykazały aktywność antyoksydacyjną. Największą aktywność stwierdzono, podobnie jak w trzech innych testach, dla *Th. serpyllum „albus"* i *„aureus"*.

Właściwości przeciwnowotworowe testowano na komórkach ludzkiego raka okrężnicy HCT-116. Wykorzystano też prawidłowe komórki NHDF typu fibroblastów wyizolowane ze skóry. Obie linie pozyskano z banku ATCC (American Type Culture Collection). Wykorzystując test MTS (kolorymetryczna metoda pozwalająca określić liczbę komórek zdolnych do życia) Autorka udowodniła, że wszystkie badane ekstrakty wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Największą aktywnością charakteryzowały się ekstrakty z *Th. serpyllum „albus"* (wartość MIC = 300 µg/ml), najmniejszą z *Th. vulgaris* (5-krotnie mniejszą).

Wyniki badań biologicznych poddano analizie chemometrycznej. W I etapie poszukiwano zależności pomiędzy trzema stosowanymi metodami badań właściwości antyoksydacyjnych. W II etapie podjęto próby analizy chemometrycznej obejmującej trzy kierunki badań aktywności biologicznej dla poszczególnych gatunków i podjednostek taksonomicznych. Analizę przeprowadzono metodą grupowania hierarchicznego z wykorzystaniem analizy czynników głównych uwzględniając porównanie wszystkich badanych gatunków i podjednostek i wyników z sześciu rodzajów badań.

Przeprowadzona analiza chemometryczna wyników dotyczących właściwości antyoksydacyjnych pozwoliła na podział badanych gatunków i podjednostek na trzy grupy – o największych, średnich i najmniejszych właściwościach przeciwutleniających.

Analiza chemometryczna wszystkich wyników (II etap) wykazała, że właściwości biologiczne badanych gatunków i podjednostek są różne.

Wszystkie lub niemal wszystkie wyniki badań Autorki w fitochemicznej części pracy są nowatorskie.

Wyniki kolejnej części pracy, poświęconej badaniom aktywności biologicznej są również w znacznym stopniu nowatorskie i posiadają potencjalnie aplikacyjny charakter.

Wyniki analiz chemometrycznych, dotyczących zarówno badań fitochemicznych, jak i badań aktywności biologicznej w całości są nowatorskie.

Metodyka zastosowana, zarówno w fitochemicznej części pracy, jak i w badaniach aktywności biologicznej nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Metodyka badań chemometrycznych wykorzystana w ocenie wyników części fitochemicznych analiz oraz badań aktywności biologicznej intryguje i zaciekawia. Można pogratulować oryginalności badań z tego zakresu.

Autorka ocenianej pracy swobodnie porusza się w różnej metodyce badawczej i realizuje różne cele. Jest to logicznie zaplanowany i zrealizowany cykl badań prowadzący od analiz fitochemicznych do badań biologicznych, z finałowymi analizami chemometrycznymi. Jakkolwiek znaczna część przeprowadzonych badań ma charakter screeningowy, to posiadają one dużą wartość praktyczną.

Podsumowując, Autorka pracy wykazała się doskonałą znajomością i umiejętnością wykorzystania zarówno klasycznej, jak i nowoczesnej metodyki badawczej z różnych dyscyplin naukowych, zarówno z chemii analitycznej, fitochemii, farmakologii, mikrobiologii i chemometrii.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska (w nowej formule) przypomina klasyczną rozprawę habilitacyjną. Zestaw sześciu oryginalnych publikacji prezentujących wyniki pracy doktorskiej poprzedzony jest szerokim, ok. 140 stronicowym tekstem, w którym Autorka przybliża czytelnikowi rozwiązywaną problematykę naukowo-badawczą, prezentując cele, metodykę, wyniki i ich podsumowanie oraz liczne pozycje piśmiennictwa.

Część teoretyczna pracy, określona jako „część literaturowa", poprzedzona jest rzeczowymi streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wstępem. W części teoretycznej na ok. 30 stronach tekstu Autorka przedstawia krótką charakterystykę biologiczno-chemiczno-farmakologiczną gatunków roślin z rodzaju *Thymus sp.* – tymianek. Kolejno rzeczowo prezentuje grupy związków typowych dla przedstawicieli tego taksonu, które objęto analizą – składniki olejków eterycznych, kwasy fenolowe i flawonoidy. Rzeczowo opisuje właściwości biologiczne ekstraktów roślinnych objęte badaniami – właściwości antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe, prezentując różne znane metody stosowane w celu ich udowodnienia.

Za wartościowe i świadczące o dojrzałości naukowej w tej części pracy należy uznać umiejętne wyselekcjonowanie istotnych informacji nawiązujących do zakresu zaplanowanych badań.

Mimo (albo z powodu) różnowątkowej części teoretycznej pracy pominięto jednak istotne informacje, m. in.:

- nie do końca jest zrozumiały wybór 6 reprezentatywnych gatunków z rodzaju *Thymus* sp. opisanych w części teoretycznej, tym bardziej, że dwóch spośród nich nie objęto badaniami. Zabrakło z kolei charakterystyki *Thymus zygis* – Tymianku iberyjskiego, wyróżnianego zarówno przez Int. Pharm. i Eur. Pharm. jako gatunek równocenny z *Thymus vulgaris*. Szkoda też, że gatunek ten nie był objęty ani badaniami fitochemicznymi, ani biologicznymi,
- w opisie analizowanych grup związków zabrakło miedzy innymi promocji kwasów fenolowych jako związków o właściwościach antyagregacyjnych i immuno-stymulujących, flawonoidów jako znanych związków o właściwościach uszczelniających naczynia kapilarne; z kolei w informacjach o olejkach eterycznych zabrakło informacji o ich istotnych właściwościach uspokajających, drażniących skórę i żółciopędnych,
- brak informacji o ważnej pozycji w lecznictwie onkologicznym takich związków pochodzenia roślinnego, jak paklitaksel (dawniej: taksol, pozyskiwany z cisów), winkrystyna i winblastyna (pozyskiwane z barwinka różowego), czy pochodne podofilotoksyny (pozyskiwane ze stopkowca),

- w grupie związków pochodzenia roślinnego zalecanych w prewencji chorób nowotworowych powinny być wymienione glukozynolaty (S-glikozydy) występujące w rodzinie *Brassicaceae* (Kapustowate) i lotne związki zawierające siarkę charakterystyczne dla rodzaju *Allium* sp..

Kolejna obszerna (ok. 100 str.) część tekstu, część eksperymentalna, określona w pracy jako „część doświadczalna" obejmuje metodykę i omówienie wyników z podziałem na badania fitochemiczne i badania biologicznej aktywności ekstraktów, przeplatane nowoczesnymi, oryginalnymi badaniami chemometrycznymi.

Omówienie wyników zostało wzbogacone w atrakcyjne elementy graficzne – m. in. w profesjonalne tabele, schematy, krzywe wzorcowe, chromatogramy, densytogramy i szczególnie atrakcyjne dendrogramy.

Część eksperymentalną kończą: rzeczowe (1.5 str.) „podsumowanie wyników" oraz prezentacja dorobku naukowego – wykaz sześciu oryginalnych publikacji i bardzo licznych – 31 komunikatów zjazdowych, związanych z realizacją pracy doktorskiej.

Piśmiennictwo, poprzedzone CV Autorki pracy, określone jako „literatura", umieszczone na końcu tekstu obejmuje aż 345 pozycji nawiązujących tematycznie do różnych aspektów poruszanych w pracy.

Proponuję uzupełnienie tej bogatej listy o pracę przeglądową dotyczącą zastosowań metod chromatograficznych w analizie substancji i preparatów farmaceutycznych, w tym surowców pochodzenia roślinnego oraz o wybrane pozycje książkowe dotyczące występowania gatunków z rodzaju *Thymus sp.* w Europie i w Polsce oraz o klasyczną pozycję dotyczącą chemotaksonomii roślin i monografię *Thymus vulgaris* w Int. Pharm..

- Ekiert R., Krzek J. i in. – „Wykorzystanie technik chromatograficznych i elektroforetycznych w analizie substancji i preparatów farmakopealnych", Farmacja Polska, 2012, 68, 63-68,
- Tutin T., Heywood V. H., *et al.* – "Flora Europaea" Cambridge University Press, Cambridge, 1968,
- Szafer Wł., Kulczyński St. i in. – „Rośliny polskie" PWN, Warszawa, 1986,
- Hegnauer R. – „Chemotaxonomie der Pflanzen", Bd. 4, Bd. 8, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, 1966 i 1989,
- WHO Monographs on selected medicinal plants, vol. 1, Thymi herba ,WHO, Geneva, 1999.

Prace te, a szczególnie odpowiednie fragmenty wymienionych pozycji książkowych, ze względu na ich ograniczoną dostępność, z przyjemnością prześlę Autorce pracy.

Pod względem edytorskim praca przygotowana jest bez zarzutu.

Przy znacznej objętości tekstu (łącznie z piśmiennictwem ok. 160 stron) prawie niemożliwe było uniknięcie błędów stylistycznych i typu edytorskiego, których zdecydowałam się nie wymieniać (ich przykłady zostaną ewentualnie wymienione w bezpośredniej rozmowie z Autorką). Zwrócę uwagę jedynie na wybrane błędy nomenklaturowe i drobne błędy merytoryczne, które wkradły się tekst:

- kwas protokatechowy sporadycznie nazywany jest błędnie kwasem protokatechinowym,
- amoniakoliaza fenyloalaninowa błędnie nazwana jest amoniakolizą fenyloalaninową,
- kwas cynamonowy i kwas benzoesowy błędnie zaklasyfikowane zostały do kwasów fenolowych,
- garbniki określono jako związki garbnikowe,

- rodzina *Lamiaceae*, to rodzina Jasnotowatych (dawna nazwa rodziny – *Labiatae*, to Wargowe); w tekście parokrotnie zestawienia nazwy w j. łacińskim i w j. polskim występują w innych kombinacjach),
- określenie „jagoda" w nomenklaturze botanicznej oznacza określony typ budowy owocu (np. owoc pomidora jest jagodą); w tekście pracy chodziło chyba o borówkę czarną (??!).

Inne uwagi dotyczące niedoskonałości pracy ograniczają się w zasadzie tylko do:

- nieprecyzyjnego do końca tytułu pracy, w którym brak informacji o podjednostkach taksonomicznych gatunków z rodzajy *Thymus sp.*, które objęto badaniami oraz brak informacji o nowatorskich, oryginalnych badaniach chemometrycznych,
- braku wizerunku (-ów) przynajmniej jednego (lub dwóch) przedstawiciela (-i) rodzaju *Thymus sp.* rosnącego (-ych) *in vivo* – np. *Thymus vulgaris* lub/i *Thymus serpyllum*; ich obecność pozwoliłaby potencjalnym czytelnikom, w tym szczególnie specjalistom z zakresu nauk chemicznych na świadomy odbiór i ocenę prezentowanych wyników,
- paru (w zasadzie dyskusyjnych) uwag dotyczących części teoretycznej pracy, które przedstawiono powyżej w krótkiej ocenie tej części pracy,
- niezbyt szczęśliwej decyzji dotyczącej miejsca umieszczenia w pracy C. V. i informacji o dorobku naukowym Autorki przed wykazem piśmiennictwa. Uważam, że dane te powinny być umieszczone albo na początku, albo na końcu rozprawy,
- braku spisu tabel i rycin, które co prawda zwiększyłyby nieco objętość dysertacji, ale równocześnie byłyby bardzo pomocne dla potencjalnego czytelnika,
- merytoryczną niedoskonałością pracy jest porównywanie zdolności biosyntetycznych różnych gatunków z rodziny *Lamiaceae* (z rodzaju *Salvia sp.*, *Thymus sp.* i dwóch odmian *Dracocephalum moldavica*), materiału roślinnego pochodzącego co prawda z tego samego stanowiska (Ogród Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie), ale zebranego w różnych latach wegetacji (2009 r. – *Salvia* sp. i 2011 r. – pozostały materiał roślinny),
- merytoryczną niedoskonałością pracy, o innym charakterze, jest brak wyraźnego podkreślenia potencjalnej aplikacyjności uzyskanych wyników, związany ze screeningowym charakterem większości badań. Brak ten równocześnie świadczy o naukowej ostrożności i „skromności" Autorki pracy.

Jestem pewna, że do każdej z wymienionych niedoskonałości bardzo rozsądnie ustosunkuje się Autorka pracy.

Podsumowując, przedłożoną do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona bogate kompendium wiedzy o możliwościach wykorzystania różnych technik chromatograficznych w badaniach składu chemicznego różnych gatunków i podjednostek taksonomicznych z rodzaju *Thymus sp.*, w ocenie wartości pozyskiwanych z tego materiału roślinnego surowców dla celów farmaceutycznych, kosmetycznych i spożywczych.

Wyniki pracy dokumentują też bardzo cenne właściwości biologiczne wybranych ekstraktów z badanego materiału roślinnego – zarówno właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, jak i przeciwbakteryjne.

Niezwykle atrakcyjną, nowatorską i wartościową częścią pracy są badania chemometryczne dotyczące zarówno uzyskanych wyników w części analitycznej, jak i w badaniach właściwości biologicznych.

Niewielu specjalistów w Polsce i Europie zajmuje się profesjonalnie badaniami chemometrycznymi. Autorka rozprawy dołącza do tej elitarnej grupy.

Chociaż znaczna część przeprowadzonych w ramach ocenianej pracy badań ma charakter screeningowy, to wyniki tych badań posiadają zarówno istotne walory poznawcze, jak i praktyczne.

Przedłożona do oceny praca zasługuje na wyróżnienie nie tylko ze względu na zakres przeprowadzonych badań, ale przede wszystkim nowatorstwo uzyskanych wyników i ich potencjalną aplikacyjność.

Sama Autorka pracy podkreśla poznawczy charakter uzyskanych wyników badań; z dużą ostrożnością i skromnością zwraca uwagę na ich potencjalnie aplikacyjne znaczenie, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Ocena dorobku naukowego

Mgr Marta Orłowska jest współautorką sześciu oryginalnych publikacji naukowych. Wszystkie publikacje przedstawiają wyniki badań wykonanych w ramach ocenianej pracy doktorskiej. Wszystkie publikacje związane są z problematyką naukową z zakresu chemii analitycznej, w tym szczególnie z różną metodologią chromatograficzną, oraz z chemometrią.

Wyniki badań Autorka opublikowała w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, co świadczy o wysokim poziomie merytorycznym, oryginalności i atrakcyjności uzyskanych wyników (Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Journal of the Association of Analytical Chemists International, Acta Chromatographica). W czterech publikacjach Mgr M. Orłowska jest pierwszym, głównym Autorem, w kolejnych dwóch drugim. Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF publikacji wynosi około 5.7.

Publikacje te, to dorobek zaledwie z okresu trzech lat (2012 – 2015), co świadczy o dużej aktywności naukowej Doktorantki. Potwierdzeniem niezwykle dużej aktywności są ponadto bardzo liczne komunikaty zjazdowe (z lat 2012 – 2015) w liczbie 31 (w tym dwa komunikaty ustne i 29 prezentacji posterowych), prezentowane na zjazdach krajowych, międzynarodowych w kraju i zagranicznych (Belgrad, Siófok), związane zarówno z problematyką ogólnochemiczną, fitochemiczną, z zakresu chemii analitycznej i chromatografii oraz na konferencjach studenckich i doktoranckich. Komunikaty te w większości związane są z problematyką naukową pracy doktorskiej.

Dotychczasowy bogaty dorobek naukowy i duża aktywność naukowa Pani Mgr Marty Orłowskiej wskazują, że jest Ona dobrym kandydatem do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej wysoką ocenę merytoryczną i metodologiczną 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 Pani Mgr Marty Orłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z pełnym przekonaniem wnioskuję również o wyróżnienie pracy.

Kraków, 2016.04.04

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM

H Ekiert

prof. dr hab. Halina Ekiert