



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Orłowskiej

„Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych”

ANALIZA fitochemiczna oraz badanie aktywności ciał czynnych jest jednym z najważniejszych trendów współczesnej farmakognozji. Ogromny postęp tworzy złudne wrażenie, że wszystkie gatunki są kompleksowo fitochemicznie przebadane. Jednak nadal skład wielu z nich stanowi całkowitą tajemnicę. Dodatkowo zawartość ciał czynnych w roślinach zależy od wielu czynników i w pełni uzasadnione są badania porównawcze tych samych taksonów zebranych z różnych regionów geograficznych. Do takiego trendu badawczego zalicza się przedłożona do recenzji dysertacja doktorska, wykonana w Instytucie Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego pod kierunkiem dra hab. MIECZYŚLAWA SAJEWICZA. Badania były dofinansowane z dotacji podmiotowej zadań projakościowych, dotacji dla młodych naukowców Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz unijnego programu stypendialnego realizowanego w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego *DoktoRIS - Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska*. Praca liczy 222 strony, w tym 166 stron właściwej dysertacji oraz 56 stron suplementu, zawierającego odbliski 6 publikacji, zamieszczonych w 3 czasopismach ze współczynnikiem IF.

Na początku pracy zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów i akronimów. Zwięzły i dwustronicowy wstęp stanowi przejście do części teoretycznej, liczącej 32 strony. Doktorantka podaje na początku opis taksonu *Thymus vulgaris* L. i pozycję systematyczną tego gatunku. Po scharakteryzowaniu szerokiego zastosowania tej rośliny następują zwięzłe opisy pięciu innych gatunków: *T. serpyllum* L., *T. pulegioides* L., *T. mastichina* L., *T. capitatus* (L.) HOFFMANNS. & LINK oraz *T. × citriodorus* (PERS.) SCHREB. Dalej Autorka podaje opis najważniejszych ciał czynnych występujących w badanych roślinach. W części poświęconej olejkom eterycznym znajdujemy zestawienie najczęściej spotykanych składników, opis składu olejku tymiankowego wraz ze wzorami ciał czynnych oraz metodykę otrzymywania olejków z surowców roślinnych. Następnie Autorka przedstawia czytelnikowi najważniejsze dane na temat polifenoli z podziałem na kwasy fenolowe oraz flawonoidy.

Kolejna część pracy wprowadza w aktywność antyoksydacyjną, przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową. Doktorantka szczegółowo omawia wolne rodniki, ich występowanie w organizmach żywych oraz rys historyczny pojęcia przeciwutleniaczy wraz z opisem mechanizmów ich działania. Dalej następują opisy metodologii badawczych oznaczania aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwnowotworowej.

Doktorantka postanowiła w pierwszej kolejności wykorzystać chromatografię wysokosprawną oraz cienkowarstwową do porównania zawartości frakcji związków fenolowych w gatunkach z rodzajów

Thymus, *Salvia* oraz *Dracocephalum* oraz porównać skład olejków eterycznych w wybranych gatunkach rodzaju *Thymus* techniką GC-MS. Zaplanowano także porównanie efektywności dwóch technik wyodrębniania związków lotnych z materiału roślinnego oraz badanie właściwości antyoksydacyjnych technikami EPR, TLC i spektrofotometrii UV-Vis. Jako uzupełnienie projektu zaplanowano badania właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciwnowotworowych.

Wstępną, ale bardzo pracochłonną częścią badań, była optymalizacja przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej surowca *T. vulgaris* L. z zastosowaniem chemometrycznego projektowania eksperymentu (*Central Composite Design*). Otrzymano zależność efektywności ekstrakcji jako funkcji dwóch parametrów: stężenia metanolu oraz temperatury. Istotność efektów (współczynników regresji) zbadano analizą wariancji z dodatkową oceną reszt, błędu dopasowania i współczynnika determinacji. Za efektywność ekstrakcji Doktorantka przyjęła pole powierzchni pod densytogramem, przy czym końcowy densytogram stanowił wynik zaawansowanej obróbki chemometrycznej zestawu densytogramów dla wielu długości fali. Densytogramy uśredniono w optymalnym zakresie spektralnym, odjęto od nich sygnał czystej płytki, usunięto linię podstawową oraz nałożono sygnały na siebie celem niwelacji losowych przesunięć. W doborze odpowiednich warunków ekstrakcji, niezależnie od maksymalizacji otrzymanej funkcji odpowiedzi, uwzględniono zjawisko rozkładu ciał czynnych, zaobserwowane w wyższych temperaturach podczas dodatkowych badań analitycznych.

Chromatograficzne odciski palca TLC frakcji związków fenolowych porównano dla dwóch gatunków z rodzaju *Thymus*: *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* L., jak również dodatkowo *Salvia triloba* L.F., *Salvia staminea* MONTBRET & AUCHER ex BENTH. oraz dwóch form *Dracocephalum moldavica* L. Przeanalizowano sześć frakcji: octanowe glikozydy flawonoidowe, butanolowe glikozydy flawonoidowe, aglikony flawonoidowe, wolne kwasy fenolowe oraz kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy kwasowej i zasadowej. Densytogramy rejestrowano przy optymalnej długości fali 366 nm, a w dysertacji skupiono się na wynikach z trzech najważniejszych frakcji. Największą zdolność różnicowania badanych taksonów miała frakcja aglikonów flawonoidowych. Niezależnie od TLC, otrzymano również dane HPLC rejestrowane detektorem ELSD oraz DAD (przy długości fali 254 nm) z zastosowaniem elucji gradientowej.

Lotne frakcje gatunków *Thymus* Doktorantka przebadala chromatografią gazową z detekcją MS celem identyfikacji najważniejszych związków. Zidentyfikowano ich 29 i przedstawiono względną zawartość w formie dwóch obszernych tabel. Do porównania zarejestrowanych na tym etapie sygnałów zastosowano analizę czynników głównych po wstępnej obróbce polegającej na odsumieniu, usunięciu linii podstawowej oraz nałożeniu sygnałów. Analizowane gatunki podzielono na 3 wyraźne grupy i zidentyfikowano związki odpowiedzialne za różnice pomiędzy tymi grupami.

Dodatkowo wykonano porównanie sześciu gatunków przy pomocy średnich densytogramów metodą ANOVA-PCA oraz ANOVA-SCA. Wstępna obróbka polegała na eliminacji tła, korekcji linii podstawowej oraz nałożeniu. Istotność gatunku oraz istotność jego partii była badana względem 50 tysięcy permutacji danych i znajdowała się daleko poza krzywą gęstości rozkładu permutacji. Zaobserwowano, że gatunki *T. vulgaris* i *T. serpyllum* różnią się od pozostałych, a za tę różnicę odpowiadają związki położone w specyficznym miejscu densytogramu.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową określono względem bakterii *Bacillus subtilis* testem *dot blot*, mierząc powierzchnię strefy zahamowania wzrostu bakterii na płytce chromatograficznej. Największą uzyskano dla *T. × citriodorus* 'Golden Dwarf' oraz *T. marschallianus*. Analogiczny test zastosowano do oceny zdolności antyoksydacyjnej przy użyciu DPPH i ABTS, przy czym analizę TLC uzupełniono tutaj spektroskopią EPR i spektrofotometrią UV-Vis. W przypadku każdej z metod największą aktywność przeciwutleniającą zaobserwowano dla form *T. serpyllum*, a najniższą

T. praecox ‘Pygmaeus’ oraz korzenia *T. × citriodorus* ‘Golden Dwarf’.

Aktywność przeciwnowotworowa była badana z użyciem linii komórkowej ludzkiego raka okrężnicy HCT116. Wszystkie przebadane gatunki wykazały właściwości przeciwnowotworowe, największą w przypadku jednej z form *T. serpyllum* (która wykazuje również największą zdolność antyoksydacyjną), a najniższą dla *T. vulgaris*.

Otrzymane dane aktywności zostały całościowo porównane z wykorzystaniem hierarchicznej analizy skupień oraz analizy czynników głównych. Pozwoliło to na podział badanych gatunków na 3 grupy pod względem zdolności antyoksydacyjnej oraz 4 grupy pod względem aktywności biologicznej. Dodatkowo wykazano, że ekstrakty wykazujące silne właściwości przeciwutleniające posiadają niskie właściwości przeciwbakteryjne, a obydwie powyższe właściwości są całkowicie nieskorelowane z aktywnością przeciwnowotworową.

Pracę kończy zwięzłe, ale trafne podsumowanie. Przed suplementem zawierającym odbitki publikacji zamieszczono również listę doniesień zjazdowych (29 pozycji) oraz CV Doktorantki.

Praca zawiera pewne drobne nieścisłości, które z obowiązku recenzenta chciałbym wymienić.

1. Mimo, że dysertacja zawiera aż 345 pozycji literaturowych, umiejscowienie przeprowadzonych badań w kontekście dotychczasowych wyników innych badaczy praktycznie nie ma miejsca. W literaturze można odnaleźć prace opisujące pewien podzbiór badanych gatunków zebrany z innych regionów geobotanicznych i badany w zbliżony sposób. Ze względu na specyfikę tematyki badawczej nie obniża to wartości naukowej pracy, jednakże krytyczne porównanie znacznie powiększyłoby wartość naukową. Istnieją także wcześniejsze publikacje (wbrew deklaracji na str. 114), przedstawiające wyniki bioautografii, jednak dla innych gatunków bakterii¹.
2. Nazywanie wszystkich gatunków z rodzaju *Thymus* słowem „tymianek” jest niepoprawne — polska nazwa tego rodzaju to „macierzanka”. Tylko *T. vulgaris* ma nazwę „macierzanka tymianek”. Nie można mówić o „różnych gatunkach tymianku”, lecz o różnych gatunkach z rodzaju *Thymus*.
3. W pracach doświadczalnych operujących na roślinach konieczne jest bardzo szczegółowe i jednoznaczne określenie badanych gatunków na podstawie najbardziej aktualnych baz taksonomicznych. Dotyczy to w szczególności stopni rodzajów o licznych gatunkach i wielu synonimach, a właśnie przykładem tego jest rodzaj *Thymus*:
 - zarówno *T. pannonicus* ALL., jak i *T. marschallianus* WILLD. są obecnie uznane za synonimy tego samego gatunku z obowiązującą nazwą *T. pulegioides* subsp. *pannonicus* (ALL.) KERGUÉLEN
 - *T. pseudolanuginosus* RONNIGER jest synonimem *T. praecox* subsp. *britannicus* (RONNIGER) HOLUB i ta ostatnia nazwa jest obecnie obowiązująca²
 - *T. austriacus* BERNH. ex RCHB. jest synonimem obowiązującej obecnie nazwy *T. odoratissimus* MILL.
 - opisany w części teoretycznej, a nie badany *T. capitatus* (L.) HOFFMANNS. & LINK jest obecnie klasyfikowany poza rodzajem *Thymus* jako *Thymbra capitata* (L.) CAV.

¹np. Horváth et al. (2004) J. Planar Chromatogr. 17 (4), 300-304.

²Według niepewnych literaturowo sugestii *T. praecox* var. *arcticus* (w pracy wymieniony jako subsp. *arcticus*) jest także synonimem subsp. *britannicus*.

- dla *Salvia triloba* L.F. obowiązuje obecnie nazwa *Salvia fruticosa* MILL.
4. Użyte nazewnictwo pozostawia w niektórych przypadkach wątpliwości, czy mamy do czynienia z kultywarami, czy też podgatunkami lub odmianami botanicznymi. Dotyczy to głównie *T. serpyllum* ‘Albus’, gdzie oprócz takiego kultywaru istnieje również odmiana botaniczna *T. serpyllum* var. *albus* B. GHOSH & U. C. BHATTACH.. Mieszkańce powinny być oznakowane znakiem ×, dotyczy to *T. × citriodorus*. Sformułowanie „gatunek z białym/niebieskim kwiatostanem” jest niebotaniczne.
 5. Fakt pozyskania materiału roślinnego z ogrodu botanicznego nie zwalnia badacza z podania nazwiska osoby, która dokonała identyfikacji taksonomicznej badanego materiału oraz zachowania egzemplarzy zielnikowych. Obecnie, ze względu na rozpowszechnienie fotografii cyfrowej i dobrych skanerów, skany egzemplarzy zielnikowych są standardowym suplementem do dokumentacji badań.

Drobniejsze szczegóły: nie ma „Polskiej Farmakopei VI” (str. 52), lecz jest Farmakopea Polska VI (skrót FP VI). Czynniki główne (PCs) nie są „prostopadłymi wektorami” (str. 94), lecz indeksami projekcji na prostopadłe wektory (tzw. wektory obciążeń). Nibyokólek (*verticillastrum*) nie jest kwiatostanem groniastym, lecz wierzchotkowym (str. 14). Kwas benzoesowy nie jest kwasem fenolowym (str. 25).

Niezależnie od powyższych słabszych stron pracy, należy wyraźnie podkreślić jej dobre strony: całościowe ujęcie kompleksowego zadania badawczego na obfitym materiale roślinnym, zastosowanie licznych metod badawczych oraz skuteczne i poprawne stosowanie metod chemometrycznych (w tym rzadko używanych, jak ANOVA-PCA i ANOVA-SCA), zarówno na etapie projektowania eksperymentu, jak i na etapie analizy licznych danych doświadczalnych. Uzyskane wyniki stanowią bardzo ważny wkład w badania roślin z rodziny *Lamiaceae* i są ważne w skali światowej.

Podsumowując, praca doktorska mgr Marty Orłowskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 17 marca 2016.