



Warszawa 15.04.2020

Ocena rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Marchelak

pt.: „Charakterystyka fitochemiczna i aktywności biologicznej ekstraktów z kwiatów *Prunus spinosa* L. w kontekście chorób układu krążenia”

Śliwa tarnina (*Prunus spinosa*) jest krzewem należącym do rodziny różowatych (Rosaceae) występującym powszechnie na terenie Europy oraz w niektórych rejonach Azji, Afryki i Ameryki Północnej. Roślina ta jest źródłem materiału, przede wszystkim kwiatów, stosowanych tradycyjnie w prewencji i leczeniu schorzeń układu krążenia, układu pokarmowego, oddechowego oraz moczowego. Dostępne piśmiennictwo wskazuje na silne właściwości przeciwutleniające ekstraktów przygotowanych z różnych części nadziemnych śliwy tarniny. Postuluje się, że za obserwowane aktywności odpowiedzialne są związki z grupy polifenoli, w tym flawonoidy i kwasy fenolowe, występujące w dużych ilościach w wyciągach z *Prunus spinosa*. Jednocześnie w doniesieniach literaturowych brakuje wystarczających danych dotyczących składu chemicznego oraz zmienności tego składu w zależności od typu ekstraktu czy miejsca pochodzenia materiału roślinnego.

Badanie składu chemicznego roślin leczniczych stanowi podstawę oceny możliwości ich zastosowania w terapii. Dotyczy to zarówno surowców farmakognostycznych o dobrze udokumentowanym tradycyjnym zastosowaniu, jak i innych roślin o nieustalonym jeszcze potencjale terapeutycznym. Obok mało dokładnych i nieprecyzyjnych metod chemicznych, metody chromatograficzne w tym HPLC są podstawowymi technikami pozwalającymi na szybkie ustalenie profilu fitochemicznego praktycznie każdego materiału pochodzenia roślinnego.

Biorąc pod uwagę powyższe z pełnym przekonaniem uważam, że podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy jest ciekawy i zasadny w świetle trendów obowiązujących w badaniach dotyczących leku pochodzenia roślinnego. Wybrana roślina jest stosowanym tradycyjnie surowcem leczniczym,



stąd też pogłębienie wiedzy dotyczącej składu chemicznego wyciągów z niej przygotowywanych jest kluczowe ze względu na dalsze wyjaśnienie zasadności jej stosowania. Dodatkowo bardzo ważnym aspektem pracy Doktoranki jest opracowanie kompleksowych metod standaryzacji badanego materiału roślinnego oraz ekstraktów z niego przygotowywanych. Dobra standaryzacja materiału pochodzenia roślinnego stosowanego w lecznictwie przekłada się w sposób bezpośredni na zapewnienie jakości i bezpieczeństwa jej stosowania przez pacjentów, stąd też konieczność opracowania zwalidowanych metod analitycznych służących oznaczaniu zawartości poszczególnych składników badanego surowca jest kluczowa w dobrej praktyce fitochemicznej.

Doktorantka przedstawiła do oceny rozprawę wykonaną pod opieką dr hab. n. farm. Moniki A. Olszewskiej prof. UML oraz dr n. farm. Aleksandry Owczarek z Zakładu Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na rozprawę składa się zbiór czterech artykułów naukowych dotyczących podjętego zagadnienia opublikowanych w latach 2017-2020 w liczących się czasopismach z dyscypliny. Sumaryczny współczynnik oddziaływania złożonych prac wynosi 9.727, a suma punktów MNiSW 270 pkt. Prace stanowią logiczny monotematyczny cykl poświęcony badaniom chemicznym oraz biologicznym ekstraktów z kwiatów śliwy tarniny. W trzech pracach Doktorantka jest wiodącym (pierwszym autorem). W jednej pracy mgr Marchelak występuje jako autor ostatni.

Uzyskane wyniki Doktorantka prezentowała również w ramach licznych zjazdów o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym, w siedmiu na osiem komunikatów Doktorantka pełniła rolę pierwszego autora.

Dodatkowo przedłożona praca zawiera, krótki merytoryczny komentarz autorki będący podsumowaniem artykułów składających się na rozprawę.

Doktorantka w ramach przeprowadzonych prac postawiła sobie szereg celów naukowych na które składały się m.in. izolacja i określenie struktury chemicznej wybranych składników wyciągów



ze śliwy tarniny, opracowanie metody chromatograficznej przeznaczonej do oceny składu jakościowego i ilościowego badanej rośliny, ocena potencjału przeciwutleniającego przygotowanych ekstraktów oraz sprawdzenie bezpieczeństwa komórkowego i właściwości przeciwzapalnych analizowanych wyciągów.

W pierwszej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Phytochemistry Letters* mgr Marchelak przedstawiła sposób opracowania metody do preparatywnego rozdzielania czterech związków flawonoidowych zawartych w wybranych frakcjach pochodzących z wyciągu z liści śliwy tarniny. Doktorantka stosując modele statystyczne uzyskała rozdzielanie chromatograficzne pozwalające na szybką i efektywną izolację rzadko występujących diglikozydów kemferolu. Uzyskała w ilościach miligramowych czyste związki i poddała je gruntownym badaniom spektralnym, na podstawie których określiła ich strukturę chemiczną w sposób jednoznaczny. Praca ta dowodzi opanowania przez Doktorantkę w stopniu bardzo dobrym podstawowych metod z zakresu preparatyki fitochemicznej oraz sposobu identyfikacji związków pochodzenia naturalnego z grupy flawonoidów.

W drugiej pracy opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Frontiers in Pharmacology* mgr Marchelak skupiła się na badaniu składu wyciągów z kwiatów śliwy tarniny oraz na ocenie ich potencjału przeciwutleniającego, przeciwzapalnego i wpływu na żywotność prawidłowych leukocytów ludzkich. Doktorantka, stosując modele komórkowe oraz enzymatyczne, wykazała że wyciągi z kwiatów śliwy tarniny charakteryzują się wysokim potencjałem przeciwutleniającym oraz przeciwzapalnym poprzez zdolność do hamowania wybranych enzymów prozapalnych. Dodatkowo bezpieczeństwo badanych wyciągów zostało potwierdzone poprzez wykazanie braku negatywnego wpływu na żywotność leukocytów w całym zakresie badanych stężeń. Mgr Marchelak swoimi badaniami udowodniła, że ekstrakty z kwiatów *Prunus spinosa* są obiecującym materiałem mogącym posłużyć w przyszłości do produkcji farma- i nutriceutyków o potencjalnym zastosowaniu w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego. Należy podkreślić, że w ramach przeprowadzonych



prac Doktorantka wykazała się znajomością metod używanych do oceny potencjału przeciwutleniającego wyciągów roślinnych oraz z podstawowymi metodami z użyciem komórek zwierzęcych.

Praca trzecia została opublikowana w czasopiśmie *Phytochemistry Letters* i dotyczy kompleksowej oceny aktywności przeciwutleniającej wyciągu i frakcji różniących się składem chemicznym przygotowanych z kwiatów śliwy tarniny. Dodatkowo mgr Marchelak dokonała porównania aktywności ekstraktów/frakcji i związków w nich występujących. Bardzo ciekawym aspektem pracy jest włączenie do badań również metabolitów polifenoli w postaci kwasu dihydrokawowego oraz pochodnej kwasu fenylooctowego. Rozszerzenie badań o te dwa związki pozwoliło na przedyskutowanie ewentualnej aktywności *in vivo* po metabolizmie jelitowym polifenoli zawartych w analizowanym materiale.

Ostatnia, czwarta praca włączona przez Autorkę do jej rozprawy doktorskiej przedstawia opracowanie zwalidowanej metody opartej na technice HPLC przeznaczonej do standaryzacji kwiatów śliwy w postaci preparatów ziołowych dostępnych na rynku. W pracy Doktorantka zoptymalizowała rozdział związków występujących w badanym materiale, a następnie oznaczyła główne składniki należące do grupy flawonoidów oraz pochodnych kwasów fenolowych. Mgr Marchelak w trakcie procedury walidacyjnej wykazała, że metoda jest selektywna, precyzyjna, dokładna oraz czuła i może posłużyć do rutynowej standaryzacji materiału roślinnego jakim są kwiaty *Prunus spinosa*.

Po zapoznaniu się z pracami włączonymi do rozprawy, uważam że wszystkie założone przez Autorkę cele zostały zrealizowane w stopniu bardzo dobrym. Podczas czytania przedłożonej rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi oraz pytania, które chciałbym zaadresować do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:



1. Biorąc pod uwagę możliwość wchłaniania się metabolitów polifenoli użytych w badaniach w pracy II chciałbym zapytać, czy związki te wedle obecnej wiedzy mają szanse występowania w krwioobiegu w postaci niezmienionej i jakim ewentualnym procesom mogą podlegać po wchłonięciu z układu pokarmowego człowieka?
2. W pracy IV mgr Marchelak wyznaczyła najważniejsze parametry walidacyjne zalecane przez wytyczne ICH. Jakie inne parametry możnaby wyznaczyć (jakie inne badania przeprowadzić) w celu rozszerzenia przedstawionej procedury walidacyjnej?
3. W pracy IV Doktorantka zdecydowała się na przedstawienie krzywych kalibracyjnych w postaci równań liniowych $y=ax$. W większości prac z zakresu analizy fitochemicznej krzywe (o ile są liniowe) są przedstawiane w postaci równania $y= ax + b$. Chciałbym aby Doktorantka uzasadniła wybór sposobu wyznaczania krzywych kalibracyjnych w przeprowadzonych badaniach i skomentowała dlaczego Jej zdaniem większość autorów używa drugiej wspomnianej formy?

Przechodząc do podsumowania niniejszej recenzji stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska pt.: „**Charakterystyka fitochemiczna i aktywności biologicznej ekstraktów z kwiatów *Prunus spinosa* L. w kontekście chorób układu krążenia**” spełnia formalne i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Anny Marchelak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie ze względu na wysokie walory naukowe rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.

dr hab. n farm. Sebastian Granica