



dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa  
UNIwersytet Medyczny w Lublinie  
KATEDRA CHEMII, ZAKŁAD CHEMII ANALITYCZNEJ  
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin, tel./fax (081) 535-73

---

**Recenzja dysertacji doktorskiej mgr Wiolety Jesionek**

*Badanie aktywności biologicznej wybranych ekstraktów roślinnych  
i otrzymanych na ich bazie preparatów farmaceutycznych*

wykonanej w Zakładzie Metod Chromatograficznych

Wydziału Chemii

Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Promotor: dr hab. Irena Choma**

Pomimo intensywnego rozwoju antybiotykoterapii drobnoustroje są ciągle zagrożeniem dla zdrowia i życia. Jest to związane między innymi z pojawianiem się drobnoustrojów posiadających wyspecjalizowane mechanizmy lekooporności np. wśród drobnoustrojów szpitalnych znajdują się gronkowce, odporne nawet na metycylinę oraz zarazki z opornością wielokrotną, posiadające nawet do 10 genów oporności. Grupa tzw. *alert patogenów*, będących nośnikami szczególnie niebezpiecznych mechanizmów oporności, stale się powiększa i oprócz szczepów gronkowca złocistego opornego na metycylinę (MRSA) i wankomycynę (VRSA) obejmuje między innymi, enterokoki odporne na wankomycynę (VRE), pałeczki *Enterobacteriaceae* wytwarzające beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) i karbapenemazy (MBL) oraz pałeczki niefermentujące *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter spp.*

Według szacunków Europejskiej Agencji Leków (EMA), odporne na antybiotyki bakterie powodują na obszarze Europy nawet 25 tysięcy zgonów rocznie. Alarmujące tempo nabywania oporności przez kolejne szczepy drobnoustrojów spowodowało, że problem ten został uznany za jeden z priorytetów zdrowia publicznego w Polsce i na świecie. Szereg organizacji takich jak Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), Parlament Europejski, Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), amerykańskie Centrum Prewencji i Kontroli Zakażeń

(CDC), czy amerykańska Agencję Żywności i Leków (FDA) , uznały lekooporność za „jedno z globalnych zagrożeń dla zdrowia publicznego”. Również w Polsce został powołany Narodowy Program Ochrony Antybiotyków (NPOA), który nadzoruje działania dotyczące stosowania antybiotyków między innymi w medycynie, medycynie weterynaryjnej czy w rolnictwie.

W odpowiedzi na zagrożenia spowodowane narastającą odpornością bakterii na stosowane leki, poszukiwanie nowych preparatów, również pochodzenia naturalnego mogących wspomagać lub częściowo zastąpić antybiotykoterapię jest kluczowym wyzwaniem współczesnej nauki.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie właściwości przeciwbakteryjnych i dodatkowo przeciwutleniających ekstraktów roślinnych z: dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.), rumianku pospolitego (*Matricaria recutita* L.), krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium* L.), macierzanki tymianku (*Thymus vulgaris* L.), szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.) oraz preparatu farmaceutycznego pochodzenia naturalnego Ukrain™ (Nowicky Pharma, Austria).

Przedłożona do recenzji dysertacja została napisana i wykonana w Zakładzie Metod Chromatograficznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Ireny Chomy. Część badań Autorka wykonała we współpracy z: Zakładem Mikrobiologii Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Pracownią Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii Interdyscyplinarnego Centrum Badań Naukowych Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II (ICBN KUL), Zakładem Chromatografii Planarnej Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Zakładem Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Pécs, Instytutem Ochrony Roślin Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie oraz firmą „Herbapol-Lublin” S.A.

Recenzowana praca liczy 186 stron, jest napisana w układzie typowym dla dysertacji doktorskich i zawiera: wstęp, część teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna, omówienie wyników badań, wnioski i wykaz piśmiennictwa. Na końcu pracy zamieszczono również streszczenie w wersji angielskiej.

Część teoretyczna rozpoczyna się od omówienia wybranych zagrożeń cywilizacyjnych oraz naturalnych metod ich zwalczania. Następnie systematycznie Autorka zestawia i opisuje wybrane bakterie będące ludzkimi i roślinnymi patogenami oraz bakterie nie patogenne. Kolejny rozdział dysertacji poświęcony jest wolnym rodnikom - ich charakterystyce, wpływowi na organizmy żywe jak również sposobami ich „zwalczania” przez przeciwutleniacze. W części teoretycznej Autorka zwięźle lecz wyczerpująco charakteryzuje testy aktywności biologicznej szczególną uwagę poświęcając bioautografii. Fragment ten jest dobrym kompendium wiedzy

w omawianej dziedzinie. Widać, że Autorka wyjątkowo dobrze opanowała wiedzę z bioautografii o czym świadczy jej współautorstwo rozdziału „Effects-Directed Biological Detection: Bioautography” w monografii Handbook of Separation Science. Część teoretyczna kończy się zwięzłym omówieniem analizowanych surowców i preparatów roślinnych.

Cel pracy doktorskiej został sformułowany w 5 zwięzłych punktach, a założone etapy badań powiązane są przyczynowo skutkowo. Zaplanowano wstępną ocenę aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów roślinnych przy pomocy testów TLC-DB, a następnie izolację związków przeciwbakteryjnych metodą TLC i ich identyfikację metodami HPLC-DAD i LC-MS. Kolejnym wyznaczonym przez Autorkę celem była optymalizacja rozdzielania olejków eterycznych metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz identyfikacja przy użyciu metod TLC-DPPH i LC-MS związków wykazujących właściwości przeciwutleniające w ekstraktach roślinnych, jak również analiza porównawcza składu preparatu farmaceutycznego Ukrain™ i ekstraktu z glistnika jaskółcze ziele z wykorzystaniem TLC-UV/VIS i TLC-DB oraz LC-MS.

Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele pracy. Wykazała, że technika TLC-DB może być stosowana nie tylko jako szybka metoda skringowa oceny aktywności biologicznej ale również jako metoda półilościowa. Autorka przebadła pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej ekstrakty z sześciu wcześniej wymienionych surowców a następnie zidentyfikowała związki odpowiedzialne za tego typu aktywność stosując HPLC-DAD i LC-MS. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu z dziurawca zwyczajnego, rumianku pospolitego, krwawnika pospolitego, macierzanki tymianku oraz szalwii lekarskiej została przebadana po raz pierwszy wobec bakterii: *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* oraz *Allivibrio fischeri*. Ponadto po raz pierwszy dokonano oceny właściwości przeciwbakteryjnych 4,4'-dihydroksy-5,5'-diizopropyl-2,2'-dimetylo-3,6-bifenylo-dionu - związku wyizolowanego z tymianku. Autorka opracowała nową fazę ruchomą, dzięki której po raz pierwszy udało się rozdzielić dwa izomery tymol i karwakrol z zastosowaniem jednowymiarowej TLC. Dodatkowo analizując skład preparatu Ukrain metodą LC-MS po raz pierwszy zidentyfikowała stylopinę, norchelidoninę,  $\alpha$ -homochelidoninę, dihydrochelidoninę, hydroberberynę jak również berberynę i koptyzynę oraz wykazała aktywność przeciwbakteryjną tego preparatu wobec szczepu *B. subtilis*.

Wyniki badań zostały wyczerpująco przedyskutowane, a istotne dla pracy wnioski poprawnie sformułowane. Na wyróżnienie zasługuje bogata dokumentacja prowadzonych badań w postaci zdjęć płytek chromatograficznych, bioautogramów TLC, chromatogramów oraz widm LC-MS/MS. Chciałbym również podkreślić, że Autorka większość swoich badań już

opublikowała w renomowanych czasopismach z listy Filadelfijskiej oraz przedstawiała w formie wystąpień ustnych i doniesień plakatowych na wielu konferencjach naukowych międzynarodowych oraz polskich.

Niezależnie od mojej wysokiej oceny jakości badań opisywanych w przedłożonej dysertacji, pragnę z obowiązku recenzenta przedstawić kilka drobnych uwag i pytań, jakie nasunęły mi się podczas jej lektury:

- 1) W pracy występują nieliczne błędy merytoryczne, m.in:
  - a) współczynnik korelacji to  $R$  a nie  $R^2$  jak podano na stronie 112,
  - b) krzywe kalibracyjne dla TLC powinny być konstruowane jako zależności ilości (a nie stężenia) od pola powierzchni pików,
  - c) w rozdziale 3.1. wartości  $R_s$  są błędnie policzone. Podane wartości (znacznie poniżej 1) wskazują, że badane substancje nie są podzielone czemu przeczą załączone zdjęcia płytek chromatograficznych,
  - d) na stronie 112 Autorka pisze „Sporządzono liniowe krzywe kalibracyjne przedstawiające powierzchnię plamek substancji wzorcowych od ich stężenia”. Do badań ilościowych powinno być wykorzystane pole powierzchni pików uzyskanego dla danej substancji a nie pole powierzchni plamki.
- 2) Ponadto nie wszystkie skróty zostały wyjaśnione np. TLC-DB, DB (spis treści), c.f.u. (strona 83), brak jest również długości fali, przy której wykonano chromatogramy HPLC (Rys. 26-29).
- 3) Autorka stosuje także skróty myślowe i nieprawidłowe sformowania, m.in.:
  - a) „do opanowania wielu nieuleczalnych dotychczas chorób”,
  - b) „Doprowadziło to do wyhodowania opornych szczepów bakteryjnych wyposażonych w liczne mechanizmy obronne” (str.14),
  - c) „do identyfikacji tych związków w .... stosuję się praktycznie jeden układ chromatograficzny”- układ chromatograficzny stosuje się do rozdzielania substancji (str.144 ),
  - d) „opierającej się ona na założeniu” (str. 23),
  - e) „z wielotysięcznym okresem leczenia” (str. 23),
  - f) „a także w umiarkowanej części Ameryki” (str. 27),
  - g) „po umieszczeniu szklanej komory w ciemnej schłodzonej kamerze” (str. 85),
  - h) „kwasu siarkowego (AS)” strona 106.
- 4) Zwracają również uwagę drobne błędy, m.in.:
  - a) „Podczas diagnozowanie przyczyn infekcji skórnych..”(str. 20),

- b) „nieepodważalny” (str. 22),
- c) „okresłają” (str. 38),
- d) „podsawie” (str. 41),
- e) „ursonowy” (str. 60),
- f) „różne rodzaje fazy ruchomych” (str. 77),
- g) „elektrorozpylanie” (str. 82),
- h) na stronie 21  $^1\text{O}_2$  brak odniesienia do indeksu (str. 21),
- i) brak kursywy „*fischeri*” (strona 38), „*Candida* i *Cryptococcus*” (str. 60),
- j) wyraz „mikrostudzienkowej”, „studzienkowej ” pochodzi od bezpośredniego angielskiego tłumaczenia, lepiej stosować mikrodołkowej, dołkowej,
- k) powtórzone wyrazy „należącym do rodziny rodziny jasnotowanych” (str. 61),
- l) niewłaściwa afiliacja firmy Merck (odczynniki chemiczne, str. 69),
- m) dodawanie oznaczenia (v/v) w przypadku mieszanin trój i więcej składnikowych; powinno być (v/v/./v),
- n) błędne oznaczenie płytek :  $\text{SiO}_260$  (Tab.5) zamiast  $\text{Si}60$ ,
- o) użycie sformułowania: „flawonoidów aglikonowych” zamiast: aglikonów flawonoidów (str. 91),
- p) w rycinie 8 (str. 44) pojawia się dodatkowa linia,
- q) brak kropki symbolizującej niesparowany elektron przy (DPPH) (str. 49),
- r) błędy w cytowaniach np. 12, 14,..
- s) brak konsekwencji w pogrubieniach nazw drobnoustrojów „pałeczkę zapalenia płuc..... pałeczka ropy błękitnej”(str.17).

Mam również parę pytań do Autorki:

- 1) Strona 47 Autorka podaje że ograniczeniem metody TLC-DB jest występowanie w próbkach pochodzenia roślinnego związków z grupy kumaryn. Dlaczego akurat ta grupa związków przeszkadza w tego typu badaniach?
- 2) Jakie pochodne kwasu ursolowego Autorka miała na myśli (strona 62)?
- 3) Autorka opisuje test TLC-DPPH oraz TLC-ABTS czy stosuje się również test TLC-FRAP? (czy ewentualnie Autorka myślała o przeprowadzeniu tego typu testu?).
- 4) Na jakiej podstawie (danych literaturowych czy badań własnych,) Autorka opracowała sposób przygotowania nalewek i ekstraktów do badań (str. 72)?
- 5) Czy analiza MS w rozdziale 5.2.1. była wykonana po zebraniu odpowiednich frakcji czy też MS był bezpośrednio sprzężony z LC?

6) Czy rozdzielanie tymolu od karwakrolu w układzie S9 było wystarczające do ilościowej analizy densytometrycznej na podstawie pól powierzchni pików?

Jednak pragnę podkreślić, że powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przedłożonej do recenzji dysertacji. W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Wiolety Jesionek spełnia wymagania Art. 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym, ponieważ stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autorkę, wykazuje jej dużą wiedzę teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie naukowej i zawiera elementy nowości naukowej. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualność podjętej przez Autorkę tematyki badawczej, ogrom uzyskanych wyników i jakość ich opracowania oraz dogłębną znajomość i umiejętność wykorzystania metod chromatograficznych, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Jesionek.

Dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa

  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa