

RN-BF 4000. 2. 2020

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RPA/18256/2023  
RADY DYSCIPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE

Podpis .....  
Foralewski

13.10.2023



Prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz

Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

al. gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

tel. (+58) 349 15 63

mlucz@gumed.edu.pl

Gdańsk, dn. 05.10.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anety Starzec**

**pt.: „Badania związków wielofenolowych w gatunku *Cistus x incanus* L.”, wykonanej pod kierunkiem Promotor – Pani prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej oraz Promotora pomocniczego – Pana dr n. farm. Macieja Włodarczyka**

Obiektem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest czystek szary (*Cistus x incanus* L.) z rodziny *Cistaceae* Juss, będący mieszańcem *C. albidus* L. i *C. crispus* L., rosnący naturalnie w krajach położonych w basenie Morza Śródziemnego oraz w północno-zachodniej Afryce. Ten wiecznie zielony krzew nie dostarcza wprawdzie substancji ani przetworów farmakopealnych ale jak wskazują dane etnofarmakologiczne jest rośliną stosowaną w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu w: przeziębieniach, zaburzeniach przewodu pokarmowego, stanach zapalnych skóry, układu oddechowego i nerek, a także jako środek przeciwcukrzycowy. Współczesne badania biologiczne potwierdziły wiele ze wspomnianych powyżej zastosowań czystka, podkreślając, że zarówno bogata frakcja polifenolowa jak i

terpenowa zawarta w omawianym gatunku wykazują m.in. aktywność: antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwdrobnoustrojową, immunostymulującą itd. Stąd też w ostatnich dziesięciu latach wzrosło zainteresowanie powyższą rośliną w grupie naukowców zajmujących się lekiem naturalnym oraz fitoterapeutów polecających przetwory z czystka szarego w zapobieganiu oraz leczeniu szeregu jednostek chorobowych.

W związku z powyższym oraz biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonej szczegółowo kwerendy literaturowej, a także wstępne badania fitochemiczne, Pani mgr Aneta Starzec sformułowała podstawowy cel projektu doktoranckiego, którym było scharakteryzowanie jakościowego oraz ilościowego składu chemicznego liści *Cistus x incanus* L. w zakresie połączeń polifenolowych, ze szczególnym uwzględnieniem garbników hydrolizujących, tzw. elagotanin. Ponadto, Doktorantka zaplanowała określenie, dla wyciągów wodno-metanolowych z liści czystka szarego, pochodzących z różnych krajów (52 próbki), wybranych kierunków aktywności biologicznej (inhibicja  $\alpha$ -glukozydazy oraz działanie antyoksydacyjne), istotnych dla potencjalnego efektu przeciwcukrzycowego przetworów z niniejszego surowca.

Cel badań został określony w sposób jasny, a przedstawiony dodatkowo szczegółowy plan dotyczący poszczególnych zadań eksperymentalnych, realizowanych w obrębie szeroko rozumianego profilowania metabolicznego *C. incanus* pozwala zorientować się w zakresie podjętych wyzwań naukowych.

Ogólnie ujmując rozprawa doktorska mgr Anety Starzec stanowi, spójny tematycznie, zbiór trzech, wieloautorskich artykułów, dwóch eksperymentalnych, opublikowanych w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach naukowych (*Industrial Crops and Products* – IF: 5,64 / MNiSW: 200,0; *Antioxidants* – IF: 7,67 / MNiSW: 100,0 ), o łącznym współczynniku oddziaływania IF=13,32 i punktacji MNiSW=300 oraz jednej pracy przeglądowej, która ukazała się w czasopiśmie krajowym *Farmacja Polska* (MNiSW: 70,0). Powyższe publikacje zostały opatrzone streszczeniem, przedstawionym w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem, celem pracy, rozdziałami poświęconymi materiałom i metodom badawczym, wynikami przeprowadzonych eksperymentów, a także dyskusji nad nimi, podsumowaniem, wnioskami i bibliografią. Praca zawiera również oświadczenia Współautorów publikacji odnośnie ich udziału w poszczególnych manuskryptach. Ogółem rozprawa doktorska Pani mgr Anety Starzec liczy 96 stron, a tekst mieszczący się na 37 stronach, poprzedzający załączone publikacje wsparto 33 pozycjami literaturowymi, 2 tabelami oraz trzema rycinami.

We wprowadzeniu, opartym o bardzo starannie dobrane dane literaturowe, Autorka omówiła kluczowe zagadnienia, konieczne do uzasadnienia celu pracy, a także poszczególnych założeń badawczych, które, jak już wspomniałam zostały precyzyjnie określone wraz ze

sposobami ich osiągnięcia. Szczególną uwagę zwraca bardzo dokładny opis części doświadczalnej projektu, nietypowy w przypadku rozpraw doktorskich przygotowanych na bazie cyklu publikacji. Opis ten pozwala na prześledzenie sposobu prowadzenia eksperymentów, doboru materiału roślinnego, metod fitochemicznych oraz biologicznych, analizy statystycznej, a także weryfikacji uzyskanych danych oraz wyjaśnienia ewentualnych nieścisłości. Następnie Doktorantka omówiła wyniki, odwołując się do publikacji stanowiących integralną część prezentowanej rozprawy. Należy tu podkreślić, że mgr A. Starzec przedstawiła tę część rozprawy doktorskiej w sposób spójny, przejrzysty, stanowiący samodzielną całość, w większości prawie nie wymagającą równoczesnego śledzenia, przez czytelnika, tekstów załączonych manuskryptów, celem określenia zakresu wykonanych badań, uzyskanych wyników, a przede wszystkim zgodności przeprowadzonych eksperymentów i analiz z założonym planem projektu. Co najważniejsze układ rozprawy pozwolił na dokonanie oceny umiejętności i kompetencji Doktorantki, co w przypadku publikacji wieloautorskich jest kluczowe.

W tym miejscu chciałabym również podkreślić, że przeprowadzone przez Panią mgr Anetę Starzec poszczególne prace eksperymentalne, w tym ich poziom, aktualność, trafność podjętej tematyki badawczej, sposób wykonania doświadczeń oraz poprawność i znaczenie uzyskanych wyników z uwagi na ich walory poznawcze, a także aplikacyjne zostały już pozytywnie zweryfikowane w toku procedur związanych z publikacją kolejnych manuskryptów. Z tego względu moja recenzja ma charakter bardziej ogólny i poza potwierdzeniem wymienionych powyżej aspektów dotyczących wysokiej jakości prowadzonych badań ma na celu również ocenę poziomu naukowego samej Doktorantki.

Przechodząc do recenzji szczegółowej doktoratu należy zaznaczyć, że cykl prac eksperymentalnych, w których opisano realizację poszczególnych zadań projektowych został uzupełniony o publikację przeglądową w języku polskim pt.: „Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus x incanus* L.”, opublikowaną w 2020 roku na łamach *Farmacji Polskiej*, która stanowi bogate kompendium wiedzy dotyczące taksonomii, botaniki, ekologii, składu chemicznego, aktywności biologicznej oraz tradycyjnego i współczesnego zastosowania czystka szarego. Udział Doktorantki w omawianej pracy, której jest pierwszą autorką polegał na zebraniu oraz analizie piśmiennictwa naukowego, przygotowaniu manuskryptu wraz ze stroną graficzną, a także korespondencji z redakcją i tym samym był znaczący. W tym miejscu trzeba podkreślić, że w krajowym piśmiennictwie naukowym dysponujemy pracą poglądową dotyczącą rodzaju *Cistus*, opublikowaną w 2016 r. w *Postęпах fitoterapii* przez P. Kubicę i wsp. zawierającą również podsumowanie szeregu danych związanych z czystkiem szarym,

którą Doktorantka cytuje w swoim artykule przeglądowym (pozycja [2]). Z tego względu mgr A. Starzec miała utrudnione zadanie w zakresie oryginalności przygotowanego manuskryptu, z którego wywiązała się znakomicie. Praca oparta na 78 pozycjach literaturowych została napisana poprawną polszczyzną zarówno z uwagi na prawidłowe słownictwo fachowe, wolne od niepotrzebnych zapożyczeń z języka angielskiego, styl wypowiedzi, składnię zdań oraz interpunkcję. Ten godny podkreślenia fakt jest coraz rzadszy w przypadku rozpraw i publikacji przygotowanych w języku ojczystym i niejednokrotnie utrudnia, a nawet uniemożliwia prawidłowe zrozumienie tekstu. Omawiana publikacja stanowi doskonałe źródło w zakresie szczegółowej charakterystyki *C. incanus*, niezbędne dla naukowców zajmujących się przedstawionym gatunkiem, wykładowców uniwersyteckich oraz fitoterapeutów. Na uwagę zasługują przygotowane, niezwykle szczegółowo, rozdziały dotyczące właściwości leczniczych i prozdrowotnych czystka szarego, w tym: działania przeciwutleniającego, przeciwdrobnoustrojowego, przeciwzapalnego, antyproliferacyjnego, cytotoksycznego oraz wielu innych. Autorka omówiła w nich, bardzo dokładnie, stosowane modele badawcze, uzyskane wyniki, a także ich znaczenie dla ewentualnego zastosowania wyciągów z czystka szarego lub wyizolowanych z tego gatunku połączeń naturalnych w nowoczesnym leczeniu alopaticznym. Pani mgr Aneta Starzec poświęciła dużą uwagę aktualnemu stanowi wiedzy, dotyczącej składu chemicznego rośliny, a także zjawisku hybrydyzacji *C. incanus* z pokrewnymi gatunkami, wiążącemu się z powstawaniem szeregu podgatunków, różniących się profilem metabolicznym, przekładającym się na ich działanie farmakologiczne. W efekcie Doktorantka przygotowała się z dużą starannością do realizacji kolejnych zadań doświadczalnych, a sformułowane przez Nią cele oraz tezy były ze wszech miar uzasadnione.

W warstwie empirycznej projektu doktoranckiego można wyróżnić dwa główne kierunki doświadczalne. Pierwszy z nich dotyczył analizy fitochemicznej liści czystka szarego w zakresie połączeń polifenolowych, takich jak: garbniki hydrolizujące (elagotanoidy), flawonoidy oraz kwasy fenolowe. Drugi obszar eksperymentalny związany był z testowaniem określonych kierunków aktywności biologicznej (działanie antyoksydacyjne oraz hamujące  $\alpha$ -glukozydazę) ekstraktów wodno-metanolowych otrzymanych z badanych surowców, a także indywidualnych polifenoli zawartych w liściach *C. incanus*, w tym połączeń wyizolowanych z matryc roślinnych w toku realizacji poszczególnych zadań projektowych.

Pierwszemu z wymienionych kierunków doświadczalnych poświęcona jest w całości publikacja P2 pt.: „Isolation and structure elucidation of cistusins: a new ellagitannin from *Cistus x incanus* L. leaves”, opublikowanej w *Industrial Crops and Products*. Problemy związane z zawartością wtórnych metabolitów z grupy polifenoli w czystku szarym zostały

również zawarte w pracy P3 pt: „Polyphenol profile of *Cistus x incanus* L. and its relevance to antioxidant effect and glucosidase inhibition”, która ukazała się w 2023 r. w czasopiśmie *Antioxidants*.

Pierwsza z wymienionych publikacji dotyczy izolacji oraz identyfikacji elagotanoidów w badanym gatunku. W tym względzie Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitne zadanie, gdyż, jak opisała w publikacji przeglądowej P1, do tej pory, z liści czystka szarego wyizolowano i określono struktury ponad 30 związków polifenolowych, w tym szeregu garbników.

Do prac izolacyjnych mgr. Aneta Starzec przeznaczyła wysuszone liście *C. incanus*, pochodzące z firmy Herbapol Kraków S.A. (Poland), których próbkę zdeponowała w Herbarium Katedry i Zakładu Farmakognozji i Leku Roślinnego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Szkoda, że w toku prowadzonych prac doświadczalnych nie potwierdzono metodami genetycznymi tożsamości badanego materiału roślinnego co z uwagi na hybrydyzację czystka szarego z pokrewnymi gatunkami wydaje się bardzo ważne, a także istotne ze względu na charakter prowadzonych doświadczeń (izolacja oraz identyfikacja garbników wraz z przypisaniem ich obecności do konkretnego surowca). Niemniej chciałabym w tym miejscu zaznaczyć, że wybrana firma komercyjna, dostarczająca surowce roślinne szczyci się wieloletnią tradycją i gwarantuje tożsamość oferowanego materiału roślinnego, a sugerowane przeze mnie dodatkowe badania mogłyby dodatkowo uwiarygodnić prezentowane wyniki.

Prace eksperymentalne nad izolacją elagotanoidów dotyczyły otrzymania, z liści czystka, wyciągu wodno-acetonowego, zawierającego zespół badanych połączeń, zagęszczenia powyższego ekstraktu techniką SPE, a następnie izolacji poszczególnych metabolitów metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej, z wykorzystaniem złoża C18 oraz układu faz odwróconych. Otrzymane połączenia naturalne Doktorantka poddała procedurze oczyszczania na sitach molekularnych (Sephadex LH-20) oraz po etapie odparowania rozpuszczalników i krystalizacji przeznaczyła do szczegółowej analizy spektroskopowej i spektrofotometrycznej, celem ustalenia ich tożsamości. Strukturę wyizolowanych metabolitów określono na podstawie widm UV, MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC, HMBC, COSY, DOSY oraz NOESY. W warstwie eksperymentalnej projektu, dotyczącej: ekstrakcji, izolacji oraz oczyszczania elagotanoidów Doktorantka umiejętnie wykorzystwała techniki powszechnie stosowane w badaniach fitochemicznych, stąd też przedstawione z tego zakresu osiągnięcia nie mieszczą się w kategorii nowości metodycznych, posiadają natomiast istotne walory aplikacyjne. Pani mgr Aneta Starzec podczas realizacji kolejnych zadań badawczych osiągnęła dużą biegłość w zakresie

posługiwania się, przede wszystkim, zróżnicowanymi technikami chromatograficznymi (HPLC, TLC), zarówno w ujęciu preparatywnym jak i analitycznym. Szczególnie w drugim przypadku zoptymalizowała metodę rozdzielania zespołu polifenoli występujących w czystku, którą po walidacji (praca P2) oraz rewalidacji (publikacja P3) wykorzystywała do kontroli frakcji otrzymanych na etapie izolacji elagotanoidów, a także do analiz porównawczych składu chemicznego liści czystka o różnym pochodzeniu (publikacja P3). Jak wskazują oświadczenia odnośnie udziału poszczególnych Autorów w obydwu manuskryptach, rola Doktorantki w wyżej opisanych pracach laboratoryjnych była wiodąca. Oczywiście, podczas analiz spektroskopowych wyizolowanych związków naturalnych, w szczególności widm NMR, Pani mgr A. Starzec musiała korzystać z pomocy Promotor oraz Promotora pomocniczego, co zostało również podkreślone w dołączonych oświadczeniach. Umiejętność oceny widm NMR związków pochodzenia naturalnego stanowi największy stopień „wtajemniczenia” fitochemika, zajmującego się identyfikacją wtórnych metabolitów. W tym miejscu należy zaznaczyć, że Promotor, Pani prof. dr hab. n. farm. Izabela Fecka, w tym względzie, jest uznanym, wysokiej klasy ekspertem, a doświadczenie uzyskane przez Doktorantkę, pod jej opieką, będzie procentować być może w dalszej karierze naukowej Pani mgr A. Starzec.

Jak już wspomniałam wyizolowanie, z liści *C. incanus*, 3 połączeń z grupy elagotanoidów oraz określenie ich struktur, w wyniku pełnej analizy spektroskopowej, jako: punikalaginy, terflawiny A oraz cystuzyny należy uznać za największe osiągnięcie natury poznawczej w przedstawionej rozprawie doktorskiej. Jak podaje Doktorantka obecność pierwszego z wymienionych metabolitów była uprzednio odnotowana w badanym gatunku, drugi został stwierdzony w roślinie, po raz pierwszy, w ramach zaprezentowanych badań, trzeci natomiast stanowi połączenie zupełnie nowe, nie tylko nie zidentyfikowane dotychczas w czystku szarym ale również nie określone do tej pory w świecie roślin. Tym samym Doktorantka z udziałem Promotor i Promotora pomocniczego poszerzyła wiedzę odnośnie składu chemicznego *Cistus incanus* L. oraz szeroko rozumianej bioróżnorodności. Powyższe osiągnięcie uprawniło Autorów publikacji P2 do nadania wyizolowanej strukturze nazwy zwyczajowej, tj. **cystuzyny**.

Poza wymienionymi elagotanoidami, z matryc roślinnych czystka szarego Doktorantka wyizolowała również 7 połączeń flawonoidowych, których struktury określiła w oparciu o kochromatografię ze związkami wzorcowymi, analizę widm UV, HRMS, MS/MS oraz NMR (eksperymenty jedno- i dwuwymiarowe). Powyższe badania wraz z szeroko rozumianym profilowaniem metabolicznym liści *C. incanus* w zakresie polifenoli (elagotanoidy, flawonoidy – glikozydowe pochodne: mirycetyny, kwercetyny, kemferolu oraz estry tilirozydu z kwasem

kumarowym, kwasy fenolowe, a także flawan-3-ole) zawarto w publikacji P3 pt. „Polyphenol profile of *Cistus x incanus* L. and its relevance to antioxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibition (Antioxidants, 2023), w której mgr Aneta Starzec jest pierwszą autorką.

W grupie analizowanych związków naturalnych Doktorantka, wykorzystując 6 próbek czystka szarego o różnym pochodzeniu, zidentyfikowała 54 polifenole, z bardzo bogatą frakcją flawonoidową (26 związków). Tożsamość poszczególnych połączeń, z wyłączeniem metabolitów wtórnych wyizolowanych uprzednio z liści *C. incanus* metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej (publikacje P2 i P3), określiła w zespołach, w toku analiz UHPLC-ESI-qTOF-MS, poprzez porównanie ich czasów retencji ze wzorcami, ocenę widm UV/Vis oraz MS (obecność jonów pseudomolekularnych i fragmentacyjnych). Dotychczas w żadnej z opublikowanych prac eksperymentalnych nie opisano profilu metabolicznego czystka szarego tak szczegółowo, identyfikując jedynie kilkanaście związków polifenolowych (Viapiana i wsp., 2021). Z tego względu należy uznać osiągnięcie Pani mgr A. Starzec za znaczące z punktu widzenia poznawczego. W tym miejscu trzeba również zaznaczyć, że badania fitochemiczne umożliwiające przewidywanie, z większą precyzją, nowych kierunków aktywności biologicznej omawianego surowca, opisane w publikacji P3, miały również charakter ilościowy, realizowany na płaszczyźnie porównawczej, dla 52 próbek czystka szarego, pochodzących z: Turcji (23), Albanii (10), Grecji (3) oraz bliżej nieokreślonych krajów – prawdopodobnie Albanii. Metodą HPLC-DAD, na kolumnie C18, w układzie faz odwróconych, z wykorzystaniem elucji gradientowej, mgr A. Starzec określiła, w testowanych surowcach, sumaryczną zawartość polifenoli, flawonoidów, elagotanin oraz kwasów fenolowych, a także stężenie indywidualnych połączeń ze wspomnianych grup metabolitów wtórnych, wskazując związki dominujące. Opublikowane badania ilościowe zostały również uzupełnione o analizy spektrofotometryczne poszczególnych matryc roślinnych, w wyniku których oznaczono w czystkach zawartość polifenoli i flawonoidów ogółem, stosując dla wymienionych grup połączeń naturalnych, odpowiednio metodę: Folina-Ciocalteu oraz opisaną w Farmacji Polskiej/Europejskiej dla *Betulae folium*. W wyniku przeprowadzonych prac eksperymentalnych Doktorantka wykazała istotne statystycznie różnice między ocenianymi surowcami, pochodzącymi z poszczególnych krajów, w zakresie: elagotanoidów, w które obfitowały przede wszystkim próbki pochodzące z Turcji. Różnic takich nie stwierdziła natomiast w grupie flawonoidów i kwasów fenolowych. Przedstawiona, fitochemiczna analiza porównawcza, ma istotne znaczenie aplikacyjne, wskazuje bowiem na wartość terapeutyczną surowców importowanych z określonych krajów, będącą pochodną ich składu chemicznego. W

tym miejscu chciałabym również podkreślić dużą czasochłonność prowadzonych badań oraz konieczność precyzji podczas ich wykonywania, która cechowała Doktorantkę.

Przechodząc do osiągnięć natury metodologicznej, w omawianej części projektu doktoranckiego, za najważniejsze należy uznać opracowanie metody ekstrakcji polifenoli z liści czystka szarego, warunkującej poprawną ocenę profili metabolicznych poszczególnych surowców tak w ujęciu jakościowym jak i ilościowym. Wymienione procedury badawcze będą mogły być wykorzystane w przyszłości do rutynowych analiz roślin, importowanych w celach leczniczych. W opisywanym projekcie Doktorantka porównała również, w testowanych próbkach czystków, sumaryczną bądź ogólną zawartość polifenoli, w tym flawonoidów, obliczoną na podstawie odpowiednich analiz chromatograficznych lub spektrofotometrycznych, wskazując, że drugą ze wspomnianych metod można uzyskać jedynie wyniki o wartości szacunkowej (zawyżone poziomy ocenianych grup metabolicznych), zaś analizę chromatograficzną charakteryzuje wyższa precyzja, a tym samym ma ona większe znaczenie poznawcze.

Jak już wspomniałam na początku recenzji, obok badań typowo fitochemicznych mgr A. Starzec, w projekcie doktoranckim, realizowała również prace eksperymentalne mające na celu określenie wybranych kierunków aktywności biologicznej wyciągów z czystka szarego, zawierających polifenole oraz indywidualnych połączeń występujących jako dominujące składniki liści *C. incanus* L. różnego pochodzenia. Bazując na kwerendzie literaturowej Doktorantka skoncentrowała się na działaniu przeciwcukrzycowym rośliny, opisanym zarówno w doniesieniach o charakterze etnofarmakologicznym jak i we współczesnych publikacjach eksperymentalnych. Jako, że stres oksydacyjny jest również pośrednio skorelowany z nadmierną, po posiłkową hiperglikemią, zaliczaną do najważniejszych czynników rozwoju cukrzycy typu-2, mgr A. Starzec we wstępnych badaniach z powyższego zakresu skoncentrowała się na aktywności przeciwutleniającej wodno-metanolowych ekstraktów pochodzących z 52 próbek testowanego gatunku, wykorzystując w tym celu trzy testy: ABTS, DPPH i FRAP, stosowane rutynowo w tego typu analizach. W toku badań porównawczych Doktorantka wykazała, że największy potencjał antyoksydacyjny (testy ABTS i FRAP) wykazywały surowce pochodzenia tureckiego i był on dodatnio skorelowany zarówno z poziomem elagotanoidów jak i flawonoidów w poszczególnych matrycach roślinnych. Wniosek ten ma więc istotne znaczenie aplikacyjne.

Badania dotyczące aktywności antyoksydacyjnej czystka szarego były prowadzone przez kilka ośrodków naukowych, w tym grupę badaczy z GUMed (Viapiana i wsp., 2022).



Doktorantka, w swoich badaniach, potwierdziła ich spostrzeżenia, jednak znacznie większa ilość analizowanych, w projekcie doktoranckim, matryc roślinnych upoważniła Panią mgr A. Starzec do wysuwania wniosków o bardziej ogólnym charakterze. Również skorelowanie aktywności przeciwutleniającej testowanych wyciągów, w szczególności z zawartymi w nich flawonoidami i elagotaninami, a nie tylko polifenolami ogółem, ma pewne cechy nowości naukowej.

W badaniach biologicznych o bardziej zaawansowanym charakterze Pani mgr A. Starzec określiła aktywność hamującą wodno-metanolowych wyciągów z czystka szarego oraz wybranych połączeń naturalnych z zespołu występujących w nich polifenoli (12 metabolitów – 3 elagotanoidy, 3 aglikony i 4 glikozydy flawonoidowe, a także 2 kwasy fenolowe), wobec  $\alpha$ -glukozydazy, jednego z kluczowych enzymów, biorących udział w metabolizmie polisacharydów oraz transporcie cukrów prostych. W eksperymencie wykorzystano rutynową metodę spektrofotometryczną z użyciem p-NPG (4-nitrofenylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd), stosowaną w tego typu analizach. W przebiegu badań oceniono również wpływ stężenia testowanych wyciągów na spodziewaną aktywność biologiczną oraz charakter obserwowanych interakcji związek-enzym (kinetyka inhibicji), z uwzględnieniem budowy poszczególnych połączeń naturalnych.

W wyniku przeprowadzonej serii eksperymentów mgr A. Starzec wykazała istotną, pod względem statystycznym, aktywność wyciągów z czystka szarego w zakresie hamowania  $\alpha$ -glukozydazy, zależną od ich stężenia. Doktorantka stwierdziła, że wszystkie analizowane połączenia naturalne, w stosowanym stężeniu, charakteryzują się silniejszym działaniem hamującym wobec  $\alpha$ -glukozydazy niż askarboza (wzorzec dodatni), zależnym od typu połączenia oraz określonych elementów jego struktury. Zgodnie z powyższym najsilniej zaznaczoną inhibicję wobec  $\alpha$ -glukozydazy zaobserwowano w klasie elagotanoidów, a w szczególności dla cystuzyny, a najslabszą w przypadku flawonoidów. Liczna grupa testowanych flawonoidów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów (7 związków) pozwoliła również na stwierdzenie pozytywnego wpływu wzrastającej ilości grup -OH w cząsteczce na jej aktywność biologiczną oraz brak znaczenia w tym względzie rodzaju cukru w połączeniu glikozydowym.

Na uwagę zasługuje również seria eksperymentów, dotycząca typu obserwowanej inhibicji wobec  $\alpha$ -glukozydazy, która miała charakter kompetycyjny (terflawina A) lub mieszany (pozostałe związki naturalne).

Przedstawione wyniki badań, uzyskane, w opisanym zakresie, po raz pierwszy dla liści czystka szarego, mają istotne znaczenie z uwagi na potwierdzenie właściwości anty-

hiperglikemicznych przetworów z niniejszego gatunku. Skłaniają one również do kontynuacji projektu, w oparciu o kolejne modele eksperymentalne *in vitro* oraz *in vivo*.

Z uwagi na powyższe oceniam je wysoko. W zakresie badań biologicznych Pani mgr A. Starzec współpracowała ściśle z Zakładem Biomedycznych Analiz Środowiskowych, przy Katedrze Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Opisane udziały w publikacji P3, w której zawarto wspomniane eksperymenty, wskazują na wiodącą rolę, w określaniu inhibicji  $\alpha$ -glukozydazy przez testowane wyciągi i związki polifenolowe, Pani mgr Dominiki Kunachowicz. W związku z tym, chciałabym spytać Doktorantkę czy miała możliwość osobistego uczestniczenia w tych badaniach, co znakomicie podniosłoby Jej kompetencje naukowe, czy jedynie analizowała otrzymane rezultaty? Pragnę jednak podkreślić, że odpowiedź na moje pytanie nie ma wpływu na pozytywną ocenę dokonań pani mgr. Anety Starzec, przedstawionych w przywołanej publikacji P3. Ogólnie, zaprezentowane w manuskrypcie P3 badania są przykładem nowoczesnego podejścia farmakognostycznego, łączącego klasyczne eksperymenty fitochemiczne oraz testy biologiczne w obrębie matryc roślinnych. Uzyskane w nich rezultaty są wyjątkowo cenne zarówno pod względem aplikacyjnym jak i poznawczym, co jest szczególnie ważne w naukach farmaceutycznych.

Oceniając stronę edytorską pracy należy zauważyć dużą staranność przygotowanego opracowania, brak błędów stylistycznych oraz obecność tabel i rycin ułatwiających lekturę tekstu. Wobec różnorodności izolowanych i identyfikowanych połączeń polifenolowych, uważam, że korzystne byłoby dodatkowe, tabelaryczne przedstawienie listy zidentyfikowanych związków, z uwzględnieniem ich nazewnictwa chemicznego i zwyczajowego, umieszczenia informacji na jakiej podstawie określono ich tożsamość oraz czy zostały stwierdzone w czystku szarym po raz pierwszy czy też potwierdzono obecność poszczególnych połączeń w roślinie. Zdaję sobie sprawę, że zestawienie takie byłoby rozległe, zważywszy jednak fakt, że obecnie Autorka odsyła czytelnika do materiałów dodatkowych, które nie znajdują się w dołączonych publikacjach, a zapoznanie z nimi wymaga sięgnięcia do źródeł elektronicznych, sądzę, że przedstawienie wspomnianego zestawienia w pracy wpłynęłoby korzystnie na spójność opracowania, w także ułatwiłoby ocenę osiągnięć.

Nie mam do Doktorantki pytań dotyczących tematyki badawczej rozprawy, ponieważ jest ona tak dobrze przygotowana pod względem merytorycznym, że w trakcie jej czytania mogłam znaleźć odpowiedzi na wszystkie nurtujące mnie pytania.

Podczas obrony chciałabym poprosić Panią mgr Anetę Starzec o przedyskutowanie zagadnienia związanego z zastosowaniem czystka szarego i jego przetworów leczniczych.

Będąc ekspertem w zakresie chemizmu oraz aktywności biologicznej *Cistus incanus* prosiłabym Panią o ustosunkowanie się co do zasadności wykorzystywania wspomnianego gatunku w zapobieganiu oraz leczeniu określonych jednostek chorobowych, biorąc pod uwagę skuteczność surowca, bezpieczeństwo, ewentualną toksyczność, modele podawania (dawki, długość terapii) oraz spodziewane efekty.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Anety Starzec zawiera elementy nowości naukowej o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym. Tematyka pracy jest aktualna i istotna w obszarze badań farmakognostycznych. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, a także umiejętnością prowadzenia doświadczeń oraz ich interpretacji.

Tym samym niniejsza rozprawa, zatytułowana: „Badania związków wielofenolowych w gatunku *Cistus x incanus* L.”, w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574).

Przedstawiam zatem Radzie Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anety Starzec do dalszych etapów przewodu doktorskiego i składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Katedra i Zakład Farmakognozji  
z Ogirodem Roślin Lecznich  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
*Maria Luczkiewicz*  
prof.dr hab.n.jarm. Maria Luczkiewicz  
tel +58 349 15 63